

원 지

疏風活血湯 煎湯液이 XO/HX에 의해 損傷된 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響

楊慶錫, 申善濂

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실

Effects of *Sopunghwalhyul-tang* Water Extract against Xanthine Oxidase / Hypoxanthine(XO/HX)-Induced Neurotoxicity in the Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

Kyung-Suk Yang, Sun-Ho Shin

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

In order to elucidate the toxic mechanism of oxygen radicals in cultured mouse spinal sensory neurons, cytotoxic effect of oxygen radicals was evaluated by MTT assay and NR assay. In addition, protective effect of *Sopunghwalhyultang*(SPHHT) water extract on oxidant-induced neurotoxicity was investigated on these cultures.

Spinal sensory neurons derived from mice were cultured in mediums containing various concentrations of Xanthine Oxidase / Hypoxanthine(XO/HX). Cell viability was measured by MTT assay and NR assay.

XO/HX-mediated oxygen radicals remarkably decreased cell viability of cultured spinal sensory neurons in a dose- and time-dependent manner. And also, SPHHT blocked XO/HX-induced neurotoxicity in these cultures.

These results suggest that oxygen radicals are toxic and SPHHT are effective in blocking against the oxidant-induced neurotoxicity in cultures of spinal sensory neurons of mice. (J Korean Oriental Med 2000;21(1):29-39)

Key Words: *Sopunghwalhyul-tang*, Neurotoxicity, Xanthine Oxidase, Hypoxanthine, Spinal Sensory Neurons

緒 論

痺證은 邪氣에 의하여 氣血이 閉塞되어 발생하는 질환으로 風寒濕熱의 邪氣에 感觸됨으로써 筋骨, 肌肉, 關節 등에 疼痛, 麻木, 重着, 關節腫大灼熱, 屈伸不利 등의 증상을 일으키게 되는 질환이다¹⁾.

現代醫學의 痺證은 저리다, 저리면서 아프다, 무겁다 등 여러 가지로 표현되는 근육과 관절의 순환장애로 영양을 받지 못하여 통증과 감각이상, 운동장애를 나타내는 특징적인 질환을 말하는데, 일반적으로 류마티스관절염, 골관절염, 좌골신경통, 통풍, 혈전폐색성 맥관염, 신경염, 유주성관절염, 만성류마티스, 다발성류마티스, Paralysis, 중

풍후유증 등이 이 범주에 속한다고 할 수 있다^{2,5)}.

神經組織에 손상이 발생되면 운동마비, 지각이상, 의주감, 저린감 등을 포함한 신경학적 증상이 나타나는데^{6,9)}, 韓醫學의 辨證하면 痺證의 범주에 속할 것으로 사료된다. 神經損傷은 外傷에 의한 손상도 있지만 그 외에도 많은 원인이 있다. 이의 病態生理를 살펴보면 神經組織 損傷에 따른 국소 뇌혈류의 減少로 인한 일련의 대사물질에 의해 酸素自由基, 글루탐산 등의 毒性物質이 生成되거나 沈着되는데 이들의 상호작용에 의해 神經細胞는 사망하게 되어 운동마비, 감각이상을 포함한 신경학적 증후를 나타내게 된다^{6,7,9)}.

中樞나 末梢神經系를 구성하고 있는 神經細胞에 酸化的 損傷을 유발하는 화학물질로 酸素自由基가 있는데¹⁰⁾, 酸素自由基는 最외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로서 이러한 특수구조때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생

· 접수 : 2000년 3월 27일 · 수정 : 5월 6일 · 채택 : 5월 16일
· 교신저자 : 신선호, 전주 덕진구 덕진동 2가 142-1 원광대 전주한방병원 (Tel. 0652-270-1013)

* 본 논문은 원광대학교 교비 연구비지원에 의해 이루어짐

체내의 여러 가지 病態生理인 반응에 관여하고 있어, 생체막의 불포화지방산을 過酸化시키거나 단백질, DNA를 변화시킨다¹¹⁻¹²⁾. 특히, 酸素自由基는 흥분성아미노산(excitatory amino acid, EAA)의 분비를 促進시키고¹¹⁻¹²⁾, 세포내 Ca²⁺의 농도를 增加시켜 결국 細胞의 死滅을 초래한다¹³⁻¹⁴⁾.

본 실험에 사용한 疎風活血湯은 清代 沈金鰲의 《沈氏尊生書》¹⁵⁾에 처음 수록된 이래, 주로 痺證을 다스리는데 있어서 祛風, 活血시킬 목적으로 활용되어 왔다¹⁶⁻²⁴⁾. 當歸, 川芎, 威靈仙, 白芷, 防己, 黃柏, 南星, 蒼朮, 羌活, 桂枝, 紅花, 生薑으로 構成된 處方으로 風·濕·痰·瘀血에 의하여 隨伴되는 一連의 症候를 疏散과 流通으로 改善시키는 處方이다²⁵⁾.

지금까지 疎風活血湯에 관한 실험적 연구로는 南²⁶⁾이 消炎, 鎮痛, 解熱作用에 관한 연구를 보고하였고, 尹²⁷⁾이 家兔의 腎臟機能에 미치는 영향에 관한 연구를 보고하였으나, 酸素自由基에 의해 손상된 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 著者は 疎風活血湯이 酸素自由基에 의해 손상된 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 효과를 究明하기 위하여 생쥐에서 순수 분리 배양한 脊髓의 感覺神經細胞에 여러 농도의 Xanthine Oxidase / Hypoxanthine(XO/HX)을 처리하여 細胞生存率을 분석하고, XO/HX에 의한 神經細胞의 酸化的 損傷에 대하여 疎風活血湯의 防禦效果를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

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

2) 藥材

本 實驗에 使用한 疎風活血湯의 處方內容은 《東醫寶鑑》²⁴⁾에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 韓方病院에서 購入한 후 嚴選하여 使用하였고, 疎風活血湯의 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of Sopunghwalhyul-tang(SPHHT)

韓藥名	生藥名	重量(g) (한침량×4침)
當歸	Radix Angelicae Gigantis	4×4=16
川芎	Rhizoma Chuanxiong	4×4=16
靈仙	Radix Clematidis	4×4=16
白芷	Radix Angelicae	

	Dahuricae	4×4=16
防己	Radix Cocculi Seu Stephaniae Tetrandrae	4×4=16
黃柏	Cortex Phellodendri	4×4=16
南星	Rhizoma Arisaematis	4×4=16
蒼朮	Rhizoma Atractylodis Japonicae	4×4=16
羌活	Rhizoma Seu Radix Notopterygii	4×4=16
桂枝	Ramulus Cinnamomi	4×4=16
紅花	Flos Carthami	1.2×4=4.8
生薑	Rhizoma Zingiberis Recens	5편(10g)×4=40
總計		204.8g

2. 實驗方法

1) 檢液의 調劑

疎風活血湯 204.8g을 증류수와 함께 환적플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간동안 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서 24시간 凍結乾燥하여 각각 33.27g의 분말 시료를 얻었다.

2) 藥劑 製造

本 實驗에 使用한 藥劑로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine(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 使用하였다.

3) 細胞培養

脊髓感覺神經細胞의 분리는 Michikawa 등²⁸⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 1-3일된 생쥐에서 적출한 뇌조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한후 36℃, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 培養하였다. 培養완료후 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3회 세척후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 Poly-L-lysine (Sigma)으로 전처리된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 培養液으로 교환하여 주었으며 7일 동안 培養後 本 實驗에 使用하였다.

4) 酸素自由基 처리

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 농

도의 xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)이 포함된 培養液에서 1-12시간 동안 처리후 分析하였다.

5) 細胞毒性 및 防禦效果 檢定

(1) 細胞生存率 分析

① MTT 定量

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma) 定量은 Mosmann²⁹⁾의 方法에 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 最終濃度로 희석하여 넣어 37℃, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 처리한 다음 Microelisa Reader로 570nm에서 흡광도를 측정후 대조군과 比較 調査하였다.

② NR 定量

Neutral red(NR, Sinma)의 定量은 Borenfreud와 Puerner³⁰⁾의 方法에 따랐다. 즉 여러 濃度の xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)을 처리한 培養 神經細胞를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 최종濃度로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37℃, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 培養하였다. 培養 완료후 PBS로 3회 세척후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 Microelisa Reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 比較 調査하였다.

③ SRB 定量

酸素自由基나 疏風活血湯으로 일정시간 동안 처리한 脊髓感覺神經細胞에 0.4% sulforhodamine B를 200μl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음 1.0% acetic acid로 3회 세척하였다. 세척 완료 후 10mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 比較 調査하였다.

④ LDH 定量

LDH활성의 측정은 변형된 Takahashi 등³¹⁾의 方法에 의하여 行하였다. 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.

6) 統計 處理

實驗 結果에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p 값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

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 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 xanthine oxidase(XO)가 1mU/ml에서 50mU/ml까지의 각각의 濃度로 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 후 xanthine oxidase(XO)의 毒性效果를 MTT assay법에 의하여 調査한 結果 1mU/ml XO 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 80.3%로 나타났다. 그러나 10mU/ml의 처리에서는 69.7%로 이보다 다소 낮게 나타났다. 또한 30mU/ml와 50mU/ml xanthine oxidase(XO)를 처리한 경우 이의 생존율은 각각 53.0%(p<0.05)와 42.4%(p<0.01)로 대조군에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Absorbance (% of control) at 570nm Wavelength for the MTT Assay on Xanthine Oxidase(XO) in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO(mU/ml)	MTT absorbance(570nm)	Decrease of cell viability(%)
control	0.66±0.08	-
1	0.53±0.05	19.7
10	0.46±0.03	30.3
30	0.35±0.04*	47.0
50	0.28±0.02**	57.6

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with various concentrations of xanthine oxidase(XO) for 6 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

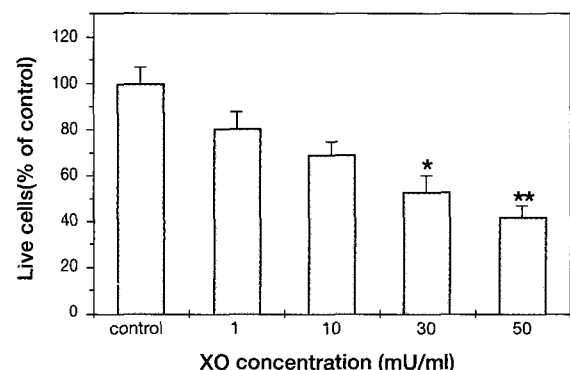


Fig. 1. Dose-dependency of xanthine oxidase(XO). XO-induced neutotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 1, 10, 30 and 50 mU/ml XO for 6 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). **p<0.05; **p<0.01.

Xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)가 시간에 따라 培養 脊髄感覺神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 30mU/ml xanthine oxidase(XO)와 0.2mM hypoxanthine(HX)가 포함된 培養液에서 脊髄感覺神經細胞를 각각 1~12시간 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 66.0%의 細胞生存率을 보였다. 또한 3시간 培養에 있어서는 57.4%로 대조군에 비하여 다소 낮은 생존율을 나타냈으며 6시간 培養에서는 대조군에 비하여 53.8%($p<0.05$)의 생존율을, 12시간 培養에 있어서는 41.1%($p<0.01$)의 생존율을 각각 나타냈다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Time-response Relationship of Xanthine Oxidase(XO) and Hypoxanthine (HX) by MTT Assay in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO/ HX	MTT absorbance(570nm)				
	0hr	1hr	3hr	6hr	12hr
0	0.58±0.06	0.53±0.05	0.52±0.04	0.52±0.07	0.56±0.03
30	0.41±0.05	0.35±0.03	0.31±0.06	0.28±0.04*	0.23±0.01**

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with 30mU/ml XO and 0.2mM HX for various time intervals. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between XO/HX untreated group and XO/HX treated group are marked with asterisks. ** $p<0.01$

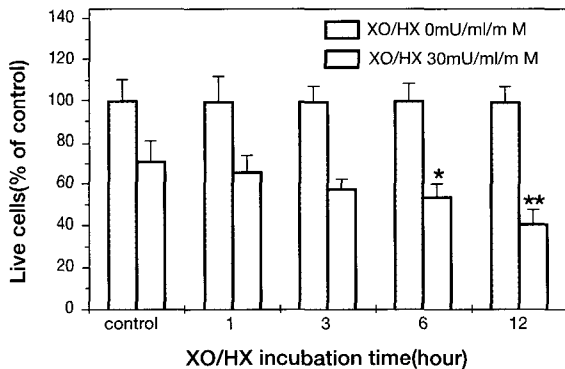


Fig. 2. Time-dependency of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 30mU/ml XO and 0.2mM HX for 1, 3, 6 and 12 hours, respectively. Cell viability was measured by MTT assay. The results represent the mean±SE(n=6). ** $p<0.01$.

(2) NR 定量

培養中인 脊髄感覺神經細胞를 Ca^{2+} , Mg^{2+} free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 xanthine oxidase(XO)가 10mU/ml에서 80mU/ml까지의 濃度로 각각 포함된 培養液에서 6시간 培養한 다음 이

의 影響을 調査한 結果 10mU/ml의 처리에서 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 73.8%로 나타났으며 20mU/ml에서는 60.7%로 나타났다. 또한 40mU/ml, 80mU/ml xanthine oxidase(XO)에서는 각각 52.5% ($p<0.05$), 32.8%($p<0.01$)로 나타났다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Absorbance (% of control) at 540nm Wavelength for the NR Assay on Xanthine Oxidase(XO) in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO(mU/ml)	NR absorbance(540nm)	Decrease of cell viability(%)
0	0.61±0.05	-
10	0.45±0.06	26.2
20	0.37±0.04	39.3
40	0.32±0.03*	47.5
80	0.20±0.02**	67.2

Cultured mouse spinal sensory neurons were grown in media containing various concentrations of xanthine oxidase(XO) for 6 hours. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

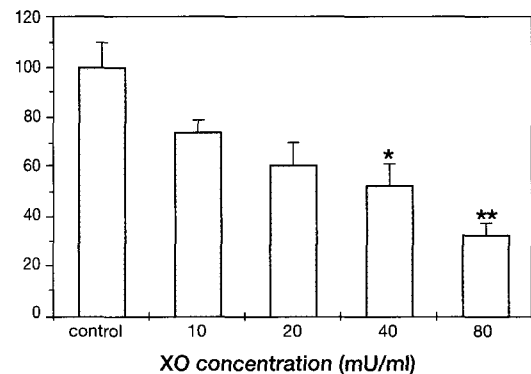


Fig. 3. Dose-response relationship of xanthine oxidase (XO) in cultured mouse spinal sensory neurons. Cytotoxicity was measured by NR assay. Cultures were exposed to 10, 20, 40 and 80 mU/ml XO for 6 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

Xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)가 培養時間에 따라 脊髄感覺神經細胞에 미치는 影響을 調査하기 위하여 MCV(midpoint cytotoxicity value) 값인 40mU/ml/ xanthine oxidase(XO)와 0.1mM hypoxanthine(HX) 濃度에서 1~12시간 동안 培養한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 調査한 結果 1시간 培養에서는 대조군(100%)에 비하여 65.2%로 나타났으며 3시간 배양에서는 60.5%로 나타났다. 또한 6시간 및 12시간 배양에서는 각각 47.7%($p<0.05$), 26.2%($p<0.01$)로 나타났다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Time-response Relationship of Xanthine Oxidase(XO) and Hypoxanthine(HX) by NR Assay in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO/ HX	MTT absorbance(570nm)				
	0hr	1hr	3hr	6hr	12hr
0	0.45±0.03	0.46±0.06	0.43±0.04	0.44±0.05	0.42±0.02
40	0.35±0.05	0.30±0.06	0.26±0.04	0.21±0.03*	0.11±0.01**

Cultured mouse spinal sensory neurons were incubated with 40mU/ml XO and 0.1mM HX for various time intervals. The values represent the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences between XO/HX untreated group and XO/HX treated group are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

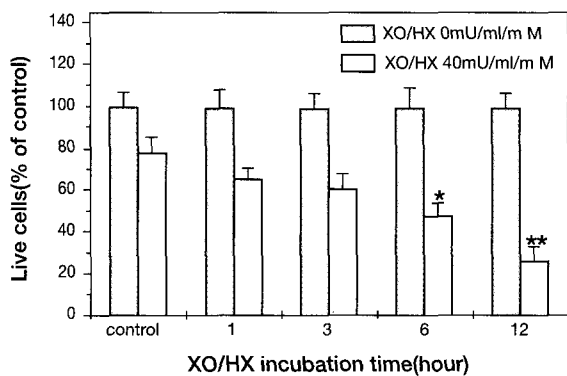


Fig. 4. Time-dependency of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) in cultured mouse spinal sensory neurons. Cultures were exposed to 40mU/ml XO and 0.1mM HX for 1, 3, 6 and 12 hours, respectively. Cell viability was measured by NR assay. The results represent the mean ± SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01.

Table 5. Dose-response Relationship of Xanthine Oxidase(XO) and Hypoxanthine(HX) on Total Protein Synthesis in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO/HX (mU/ml/mM)	Total Protein (% of control)
control	100 ± 10.4
5	75.6 ± 7.8
10	63.7 ± 8.5
20	51.4 ± 6.2*
40	32.5 ± 4.9**

Cultures mouse spinal sensory neurons were exposed to 5, 10, 20 and 40mU/ml/mM XO/HX for 6 hours, respectively. Amount of total protein was measured by SRB assay(540nm), and shown as % of control. The results indicate the mean ± SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

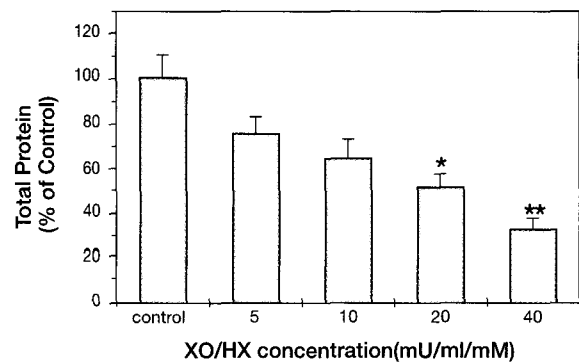


Fig. 5. Dose-dependency of oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) of total protein synthesis in cultured mouse spinal sensory neurons. Other legends are the same as the Table 5. *p<0.05; **p<0.01.

2. 韓藥抽出物の 效果

1) SRB 定量

(1) XO/HX의 影響

XO/HX가 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響을 총 단백질양의 측면에서 調査하기 위하여 XO/HX가 5-40mU/ml/mM까지 각각 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 후 XO/HX에 의한 단백질 합성의 변화에 대해 調査한 結果 5mU/ml/mM XO/HX 처리에서는 단백질의 합성이 대조군(100%)에 비하여 75.6%로 나타났고 10mU/ml/mM XO/HX의 처리에서는 대조군에 비하여 63.7%로 다소 낮게 나타났다. 또한 20mU/ml/mM XO/HX와 40mU/ml/mM XO/HX를 처리한 경우 단백질 합성은 각각 51.4%(p<0.05)와 32.5%(p<0.01)로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다.(Table 5, Fig. 5).

(2) 疏風活血湯(Sopunghwalhyultang, SPHH-T)의 效果 培養 脊髓感覺神經細胞에 대한 XO/HX의 산화적 손상에 있어서 SPHHT의 效果를 총 단백질의 양적 변화 측면에서 調査하기 위하여 XO/HX의 MCV값(midcytotoxicity value)인 40 mU/ml/mM XO/HX 濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에, 15~150µg/ml SPHHT이 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 SRB 정량분석을 하였다. 그 결과 총 단백질의 양적 변화는 XO/HX만을 처리한 경우 대조군(100%)에 비하여 51.3%로 나타났다. 40mU/ml/mM XO/HX를 처리하기 전에 15µg/ml SPHHT을 전처리한 경우는 대조군(100%)에 비하여 59.4%로 나타났고, 35µg/ml SPHHT, 75µg/ml SPHHT을 전처리한 경우는 대조군에 비하여 각각65.6%, 75.1%로 나타났다. 특히, 150µg/ml SPHHT을 전처리한 경우는 83.4%(p<0.05)로 XO/HX만의 처리에 비하여 높은 유의성을 나타냈다(Table 6, Fig. 6).

Table 6. Dose-response Relationship of Sopunghwalhyul-tang (SPHHT) for its Neuroprotective Effect on Xanthine Oxidase(XO) and Hypoxanthine(HX) in Total Protein Synthesis

XO/ HX	Total Protein (% of control)				
	Concentration of SPHHT				
	0 μ g/ml	15 μ g/ml	35 μ g/ml	75 μ g/ml	150 μ g/ml
0	100 \pm 7.3	100 \pm 6.7	100 \pm 5.4	100 \pm 8.1	100 \pm 5.6
340	51.3 \pm 6.2	59.4 \pm 6.4	65.6 \pm 4.4	75.1 \pm 7.7	83.4 \pm 9.6*

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with SPHHT. Cultures were preincubated with 15, 35, 75 and 150 μ g/ml SPHHT for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 40 mU/ml XO/ 0.2mM HX for 6 hours. Amount of total protein was measured at wavelength of 540nm. The results indicate the mean \pm SE for 6 experiments. Asterisks indicate the significant differences between groups. *p<0.05

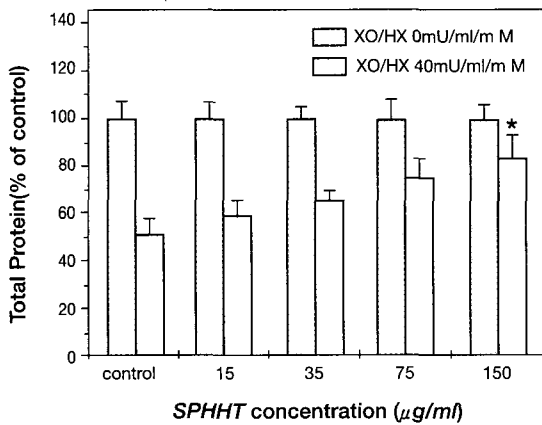


Fig. 6. Dose-dependency of Sopunghwalhyul-tang (SPHHT) for its neuroprotective effect on xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) in total protein synthesis. Other legends are the same as the Table 6. *p<0.05.

2) LDH 定量

(1) XO/HX의 影響

XO/HX가 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響을 LDH활성도의 측면에서 調査하기 위하여 XO/HX가 10-80mU/ml/mM까지 각각 포함된 培養液에서 6시간 동안 培養한 후 細胞培養液內로 유출된 LDH양을 대조군과 比較 調査하였다. 그 結果 10mU/ml/mM, 20mU/ml/mM XO/HX처리에서는 대조군 100%(14.8 \pm 1.7)에 비하여 각각 110.8%(16.4 \pm 1.8), 137.2%(20.3 \pm 1.7)로 나타났다. 또한 40mU/ml/mM, 80mU/ml/mM XO/HX 처리에서는 각각 대조군에 비하여 161.5%(23.9 \pm 3.6)(p<0.05), 206.1%(30.5 \pm 5.2)(p<0.01)로 나타났다. LDH활성도의 MCV값은 40mU/ml/mM XO/HX의 처리에서 나타났다 (Table 7, Fig. 7).

Table 7. Dose-dependency Of Oxidase(XO) and Hypoxanthine(HX) on LDH Activity in Cultured Mouse Spinal Sensory Neurons

XO/HX	control	10	20	40	80
Amount of LDH Release	14.8 \pm 1.7	16.4 \pm 1.8	20.3 \pm 1.7	23.9 \pm 3.6*	30.5 \pm 5.2**

Cultures were exposed to 10, 20, 40 and 80 mU/ml/mM XO/HX for 6 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). Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

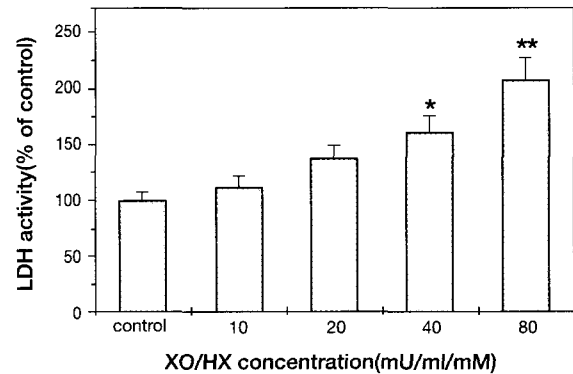


Fig. 7. Dose-dependency of oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) on LDH activity in cultured mouse spinal sensory neurons. Other legends are the same as the Table 7.

(2) 疏風活血湯(Sopunghwalhyul-tang, SPHHT)의 效果 培養 脊髓感覺神經細胞에 대한 XO/HX의 산화적 손상에 있어서 SPHHT의 效果를 LDH활성도측면에서 調査하기 위하여 XO/HX의 MCV값인 40mU/ml/mM XO/HX濃度에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15-150 μ g/ml SPHHT이 각각 포함된 培養液에서 전처리한 후 이의 防禦效果를 調査하였다. 그 結果 40mU/ml/mM XO/HX만을 처리한 경우 대조군 13.8 \pm 1.4에 비하여 32.6 \pm 2.9로 나타났다. 그러나 15 μ g/ml SPHHT 처리에서는 XO/HX만을 처리한 대조군(100%)에 비하여 68.4%로 나타났다. 또한 35 μ g/ml, 75 μ g/ml SPHHT 처리에 있어서는 XO/HX만을 처리한 대조군에 비하여 각각 63.5%, 59.2%로 나타났으나 유의성은 나타나지 않았다. 그러나 150 μ g/ml SPHHT의 처리에서는 41.7%로 나타나 XO/HX만을 처리한 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.(Table 8, Fig. 8).

考 察

痺의 病名은 《素問·痺論》³²⁾에서 “風寒濕三氣雜至, 合

Table 8. Dose-response Relationship of Sopunghwalhyul-tang(SPHHH) for its Neuroprotective Effect on Oxidase(XO) and Hypoxanthine(HX) in LDH Release

XO/ HX	Amount of LDH Release				
	Concentration of SPHHT				
	0 μ g/ml	15 μ g/ml	35 μ g/ml	75 μ g/ml	150 μ g/ml
0	13.8 \pm 1.4	13.2 \pm 1.3	13.4 \pm 1.2	13.3 \pm 1.5	12.1 \pm 1.6
40	32.6 \pm 2.9	22.3 \pm 3.1	20.7 \pm 1.8	19.3 \pm 1.7*	13.6 \pm 1.2**

Cultured mouse spinal sensory neurons were treated with SPHHT. Cultures were preincubated with 15, 35, 75 and 150 μ g/ml SPHHT for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 40 mU/ml XO/ 0.2mM HX 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, **p<0.01

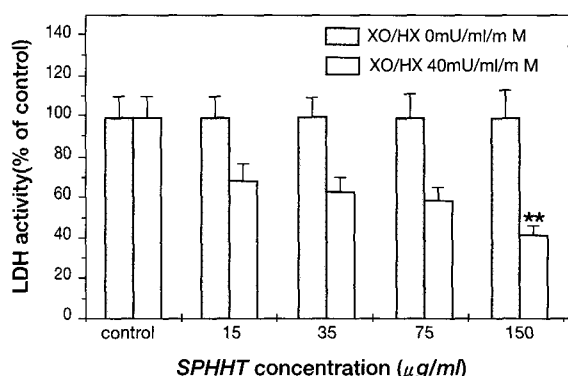


Fig. 8. Dose-dependency of Sopunghwalhyul-tang (SPHHH) for its neuroprotective effect on oxidase (XO) and hypoxanthine(HX) in LDH release. Other legends are the same as Table 8.

而爲痺也,其風氣勝者爲行痺,寒氣勝者爲痛痺,濕氣勝者爲着痺也.”,“其入臟者死,其留連節骨間者疼久,其留皮膚間者易也.”라하여 최초로 언급된 이래 많은 歷代醫書에서 論述하고 있으며, 그 분류도 다양하여 病因에 따라 風痺,寒痺,濕痺,熱痺,瘀血痺,痰痺,虛痺...등으로, 症候의 特徵에 따라 行痺,痛痺,着痺,白虎歷節風 등으로, 發病部位에 따라 筋痺,脈痺,肌痺,皮痺,骨痺의 五痺와 肝痺,心痺,脾痺,肺痺,腎痺의 五臟痺와 腸痺(胃痺,大腸痺,小腸痺),胞痺(三焦痺,膀胱痺)의 腑痺로 나누고 있다^{4,23,33-36}.

痺는 막혀서 통하지 않는다는 뜻이므로 人體가 虛弱한 틈을 타서 外邪(風,寒,濕,熱)가 侵入하여 氣血循環을 妨害하여 經絡을 막히게 하거나 혹은 體內的 老廢物이나 瘀血이 經絡을 따라 侵入하여 關節과 筋脈을 막히게 하는 것 모두가 痺證을 발생케 한다^{1,4,5,33-37}.

姜³⁶은 歷代文獻을 고찰한 결과, 風寒濕熱의 邪氣에 의한 각종 痺證에는 어느 한 藥物만 偏僻되어 사용된 것이

아니라 雜至하는 邪氣의 輕重에 따라 祛風,散寒,除濕,清熱하는 藥物들이 각각 主次로 組合되어 사용된다고 하였고, 이러한 痺證이 오래됨으로써 瘀血이나 痰濁으로 인한 痺證에는 補血活血之劑와 燥濕祛痰之劑 및 活血祛瘀之劑 등이 주로 사용되어진다고 하였다. 또한 平素에 體質이 虛弱하고 氣血津液이나 陽氣가 不足한 者와 久病으로 虛弱해진 患者에는 補血養血滋陰·補血益氣·補益副助之劑를 病症에 맞게 응용한다고 하고, 五痺는 發病時期와 發病部位에 따른 命名일뿐 風寒濕 三痺 외에 별도로 五痺가 있는 것이 아니라고 하였다. 즉, 筋痺는 곧 風痺요, 脈痺는 熱痺며, 肌痺는 濕痺, 皮痺와 骨痺는 寒痺라 하였듯이 五痺와 三痺의 用藥에 있어서는 각각 유사하였다고 하였다.

疎風活血湯은 沈의 《沈氏尊生書》¹⁵⁾에 “或由風濕與痰,與死血,致走注刺痛,其痛處或腫或紅,則必宜邪通氣,宜疎風活血湯.”이라 기재되어있고, 許의《東醫寶鑑》²⁴⁾에는 “治四肢百節流注刺痛,皆是風濕痰死血所致,其痛處或腫或紅”이라하여 오늘날까지 주로 痺證을 다스리는데 있어서 祛風,活血시킬 목적으로 활용되어 왔다.

本方을 구성하는 藥材 중 當歸는 性味가 甘·辛·溫하고 補血和血·調經止痛·潤腸通便의 效能이 있으며, 鎮靜·鎮痛하는 藥理作用이 있고, 川芎은 性味가 辛·溫하고 活血行氣·祛風止痛의 效能이 있으며, 中樞神經系에 作用하여 大腦活動을 抑制하고 血管擴張하여 血流量을 增加시키는 藥理作用이 있고, 威靈仙은 性味가 辛·鹹·溫 有毒하고 祛風除濕·通絡止痛의 效能이 있으며, 鎮痛의 藥理作用이 있고, 白芷는 性味가 辛·溫하고 祛風解表·消腫止痛·通鼻止帶의 效能이 있으며, 鎮痛作用과 血管收縮中樞를 興奮시키는 藥理作用이 있고, 防己는 性味가 苦·寒하고 利水消腫·祛風濕·止痛의 效能이 있으며, 解熱·鎮痛·消炎·筋弛緩의 藥理作用이 있고, 黃柏은 性味가 苦·寒하고 清熱燥濕·瀉火解毒의 效能이 있으며, 局所充血을 輕減시키는 등의 消炎의 藥理作用이 있고, 南星은 性味가 苦·辛·溫 有毒하고 燥濕化痰·祛風解癱의 效能이 있으며, 鎮靜·鎮痙·祛痰의 藥理作用이 있고, 蒼朮은 性味가 辛·苦·溫하고 燥濕健脾·祛風濕의 效能이 있으며, 鎮靜의 藥理作用이 있고, 羌活은 性味가 辛·苦·溫하고 發散風寒·祛風濕止痛의 效能이 있으며, 解熱·鎮痛의 藥理作用이 있고, 桂枝는 性味가 辛·甘·溫하고 發汗解氣·溫通經脈·通陽化氣의 效能이 있으며, 解熱·鎮痛의 藥理作用이 있고, 紅花는 性味가 辛·溫하고 活血通經·祛瘀止痛의 效能이 있으며, 冠狀動脈을 擴張하는 藥理作用이 있고, 生薑은 性味가 辛·溫하고 發汗解表·溫中止嘔·溫肺止咳의 效能이 있으며, 末梢血液循環을 促進하는 藥理作用이 있다³⁸⁻⁴⁹.

脊髄感覺神經細胞의 손상으로 인한 질환의 증상은 손상받은 곳의 위치에 따라 다양하게 나타난다. 팔과 다리의 감각운동장애의 피질하에 병소가 있으면 대측의 사지 특히 원위부에 지각이상, 의주감과 저림감 등의 증상이 나타나고, 삼차신경염대와 외측척수시상로에 손상을 받으면 대측 안면과 신체의 통각, 온도각이 소실되고, 내측염대와 전척수시상로에 손상을 받으면 대측 신체에서 통각과 온도각을 제외한 모든 감각이 소실되고, 후색에 손상을 받으면 체위감각, 진동각 및 구별각이 소실되고, 후각에 손상을 받으면 동측의 통각, 온도각이 소실되나 다른 모든 감각은 정상이다. 인접한 몇 개의 후근이 손상을 받으면 신경근성지각이상과 신경근통이 나타나며 손상받은 분절이 분포하는 신체부위에 모든 감각이 저하된다. 만일 팔이나 다리에 분포하는 신경근이 손상을 받으면 저긴장증, 무긴장증, 무반사증과 실조 등의 증상이 나타난다⁵⁹.

酸素自由基는 中樞神經系를 비롯하여 末梢神經系에 영향을 미쳐 파킨슨씨병이나 근위축성측삭경화증과 같은 神經疾患을 유발하는 病因으로 밝혀지고 있다^{50,51}. 그러나 아직도 이의 정확한 病理的 機轉에 대해서는 정확하게 糾明되어 있지 않으나 최근에 운동신경원질환의 病因으로서 Superoxide Dismutase(SOD)-1 유전자의 돌연변이에 의한다는 것이 밝혀지면서 酸素自由基가 많은 神經病變에 관여하고 있음이 증명되어 酸素自由基의 毒性현상에 대한 기전규명과 酸素自由基에 의하여 유발되는 질환에 대한 치료적 접근을 위하여 국내외 많은 학자들이 동물을 대상으로 꾸준히 연구를 진행하여 오고 있다^{52,53}.

특히 酸素自由基는 세포막의 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 질소자유기의 하나인 Nitric Oxide(NO)와 상호작용함으로써 毒性이 강한 물질인 Peroxynitrite을 생성하여 병변을 더욱 가속화 시킨다고 한다. 또한 배양해마신경세포에서 흥분성아미노산(EAA)을 분비케 유도한다는 것이 밝혀졌으며, 분비된 EAA는 N-methyl-D aspartate(NMDA) 수용체를 과활성화시킴으로써 세포내 Ca²⁺의 恒常성을 깨뜨리며 그 결과 神經細胞를 손상시킬 뿐만 아니라 나아가서는 細胞의 死滅을 초래한다고 한다. 그 밖에도 酸素自由基는 protein kinase C(PKC)나 cyclic AMP와 같은 이차전달자에 영향을 미침으로써 細胞毒性을 초래한다고 한다^{54,56}.

酸素自由基는 치매나 중풍, 뇌허혈 뿐만 아니라 근위축성측삭경화증과 같은 神經病變의 병리학적 원인으로 밝혀지면서 이들 병변에 대한 치료적 측면에서 酸素自由基에 의한 神經세포의 산화적 손상에 대한 작용규명과 병리적 현상을 밝히기 위하여 연구가 이루어져왔다⁵⁷. 본 실험에서는 여러 농도의 Xanthine Oxidase(XO)와 Hypoxanthine(HX)을 생쥐에서 순수 분리 배양한 脊髄感覺神經

細胞에 노출시킨 후 XO와 HX가 神經세포에 미치는 영향을 MMT와 NR분석법으로 분석한 결과, XO/HX는 처리한 농도와 시간에 비례하여 脊髄感覺神經細胞의 生存率을 현저하게 감소시켰다. 이 같은 결과는 XO/HX가 생쥐의 배양 척수감각신경절세포에 독성을 나타냈다는 보고나,⁵⁸ 소의 뇌조직에서 순수 분리 배양한 희소돌기아교세포에 XO/HX가 농도에 비례하여 세포의 생존률을 현저하게 감소시켰다는 연구결과와 일치함을 알 수 있으며⁵⁹ 이는 酸素自由基가 중추나 말초신경계를 구성하고 있는 神經세포에 직접적으로 산화적 손상을 준다는 것을 제시한다고 하겠다⁶⁰. 본 실험에 있어서 XO/HX가 생쥐의 培養 脊髄感覺神經細胞에 독성을 나타낸 것은 XO가 단독으로 또는 HX와 상호작용함에 의한 결과일 것으로 생각된다. 특히 XO/HX는 神經세포내의 catalase나 glutathione peroxidase와 같은 항산화효소에 손상을 줌으로써 항산화효소에 의하여 제거되지 못한 酸素自由基들의 축적에 의한 가능성이 매우 높다⁵⁵.

본 실험에 있어서도 XO/HX는 脊髄感覺神經細胞에 처리한 농도에 비례하여 세포의 LDH활성증가와 총단백질량을 유의하게 감소시켰는데 이는 위의 현상을 증명한다고 하겠다¹². 그밖에도 본 실험의 MTT분석법이나 NR분석법을 비롯하여 단백질합성의 정량분석과 LDH활성도 분석의 결과를 볼 때 XO와 HX는 세포막의 손상 및 단백질합성계를 억제한 것으로 생각된다¹³.

XO나 XO/HX의 神經細胞에 대한 細胞毒性을 조사하기 위하여 1~50mU/ml의 XO가 각각 여러 농도로 포함된 배양액에서 脊髄感覺神經細胞를 6시간동안 배양한 후 MTT assay에 의한 細胞生存率을 측정하였다. 그 결과 XO의 처리농도에 비례하여 유의하게 細胞의 生存率이 減少하였다(Table 1, Fig. 1). 또한 XO/HX의 처리 시간에 의한 영향을 조사하기 위하여 30mU/ml XO와 0.2mM HX에서 1~12시간 동안 각각 培養 脊髄感覺神經細胞를 배양한 결과 XO/HX의 처리 시간에 비례하여 細胞의 生存率을 유의하게 減少시켰다(Table 2, Fig. 2). XO의 毒性에 대한 영향을 NR assay에 의하여 조사하기 위하여 10~80mU/ml의 XO가 각각 여러 농도로 포함된 배양액에서 脊髄感覺神經細胞를 6시간동안 배양한 후 NR assay에 의한 細胞生存率을 측정하였다. 그 결과 XO의 처리농도에 비례하여 유의하게 細胞의 生存率이 減少하였다(Table 3, Fig. 3). 또한 XO와 HX의 처리 시간에 의한 영향을 조사하기 위하여 MCV 값인 40mU/ml XO와 0.1mM HX에서 1~12시간 동안 각각 培養 脊髄感覺神經細胞를 배양한 후 조사한 결과 XO/HX의 처리 시간에 비례하여 細胞의 生存率을 유의하게 減少시켰다(Table 4, Fig. 4). 최근에는 한약추출물을 비롯한 천연추출물들이

항산화효과나 세포성장인자 등의 약리적 활성을 가지고 있어 뇌나 척수의 중추신경계나 또는 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포가 손상을 입었을 경우 이를 보호하는 효과가 있음이 규명되면서 이를 병변치료에 적용하려는 연구가 활발히 진행중이다⁶¹⁻⁷⁰. 본 실험에서는 酸素自由基의 酸化의 損傷에 의한 한약추출물의 효과를 조사하기 위하여 생쥐에서 순수 분리하여 배양한 脊髓感覺神經細胞에 酸素自由基의 하나인 XO/HX를 처리한 후 疎風活血湯의 효과를 총단백질양과 LDH활성의 측정을 통하여 조사하였다.

총단백질 조사를 위한 SRB분석에 있어서 XO/HX가 5~40mU/ml/mM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 培養 脊髓感覺神經細胞를 6시간 동안 배양한 다음 총단백질양을 조사한 결과, XO/HX의 처리농도에 비례하여 총단백질의 量的 減少를 보였다(Table 5, Fig. 5). 그러나 XO/HX의 MCV 값인 40mU/ml/mM XO/HX를 6시간 동안 脊髓感覺神經細胞에 처리하기 전에 15~150µg/ml의 疎風活血湯이 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 전처리 한 경우, 처리한 농도에 비례하여 총단백질의 유의한 量的 增加를 보였다(Table 6, Fig. 6).

XO/HX가 脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향에 대한 LDH활성조사를 위하여 XO/HX가 10~80mU/ml/mM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 다음 LDH활성도를 조사한 결과, XO/HX의 처리농도에 비례하여 LDH활성의 增加를 보였다(Table 7, Fig. 7). 그러나 XO/HX의 MCV 값인 40mU/ml/mM XO/HX를 6시간 동안 神經細胞에 처리하기 전에 15~150µg/ml의 疎風活血湯이 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 전처리 한 경우, 처리한 농도에 비례하여 LDH활성의 減少를 보였다(Table 8, Fig. 8).

이같은 실험 결과를 종합해보면, XO/HX와 같은 酸素自由基는 酸化의 損傷에 의해 細胞 生存率을 減少시키고 神經細胞에 대하여 毒性을 나타내며 이에 대한 疎風活血湯 煎湯液의 투여가 총단백질양의 增加, LDH量的 減少를 보여 酸素自由基에 의하여 손상된 脊髓感覺神經細胞의 生存率을 增加시킨 것으로 생각된다. 또한 疎風活血湯이 韓醫學的으로 痺證과 관련된 感覺神經損傷으로 인한 感覺障礙에 일정한 藥理的 效果가 있음을 알 수 있었으며 이에 대한 精確한 機轉 究明을 위해서는 免疫學的, 生理學的 및 藥理學的인 측면에서 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

結 論

疎風活血湯 煎湯液이 酸素自由基에 의한 神經毒性을

防禦하는 효과를 究明하기 위하여 新生 생쥐에서 분리 배양한 脊髓感覺神經細胞를 여러 농도의 Xanthine oxidase(XO)와 Hypoxanthine(HX)이 포함된 배양액에 처리하기 전 疎風活血湯 煎湯液으로 3시간 동안 전처리 하는 실험을 통하여 疎風活血湯이 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. XO/HX는 MTT assay 및 NR assay에 의한 細胞生存率을 유의성있게 減少시켰다.
2. XO/HX의 酸化의 損傷에 의한 神經毒性에 대하여 疎風活血湯 煎湯液은 총단백질양을 유의성있게 增加시켰다.
3. XO/HX의 酸化의 損傷에 의한 神經毒性에 대하여 疎風活血湯 煎湯液은 LDH 활성을 유의성있게 減少시켰다.

이상의 실험결과에 따르면 疎風活血湯 煎湯液이 脊髓感覺神經細胞의 활성을 增加시키거나 酸素自由基에 의한 酸化의 損傷을 억제하여 生存率을 向上시키는 藥理的 效果가 있을 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 張伯興 [主編]. 中醫內科學. 北京:人民衛生出版社. 1988:627-638.
2. 金賢濟 外1人 [編譯]. 漢醫學辭典. 서울:成輔社. 1983:482.
3. 金동일 外 [編]. 동의학사전. 서울:圖書出版까지. 1990: 696.
4. 張斗浩. 素問 痺論에 對한 研究. 圓光大學碩士學位論文. 1995.
5. 蔡炳允. 疎風活血湯에 關한 臨床的 研究. 大韓韓醫學會誌. 1989;Vol.10,No.1:154-160.
6. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울:중앙문화사. 1997:276-279,284-285,299.
7. 이광우 外. 임상 신경학. 서울:고려의학. 1997:394-399, 900-906.
8. 李京燮 外. 東醫心系內科學(下). 서울:書苑堂. 1995:89,99.
9. 피터두스. 신경국소진단학. 서울:과학서적센타. 1992:29-30.
10. Mattson M.P., Cheng B., SmitSwintosky V.L. Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium and free radical mediated excitotoxic injury, Implications for treating neurodegenerative disorders. J. Exp. Neurol.. 1993;124:89-95.
11. Pellegrini-Giampietro D.E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Morroni F. Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. J. Neurochem.. 1988;51:1960-1963.

12. Pellegrini-Giampietro D.E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Morroni F. Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurosci.* 1990;10:1035-1041.
13. 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.
14. Zeman S., Lloyd C., Meldrum B., Leigh P.N. Excitatory amino acid, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. *Neuropathol, Appl. Neurobiol.* 1994;20:219-231.
15. 沈金鰲. 沈氏尊生書. 臺北:自由出版社. 1980:309-317.
16. 黃度淵. 辨證論治方藥合編. 서울:南山堂. 1987:341-342.
17. 宋炳基. 方證新編. 서울:東園出版社. 1983:356.
18. 康命吉. 濟衆新編. 서울:杏林書院. 1982:10.
19. 謝觀 [編]. 中國醫學大辭典(二冊). 北京:商務印書館國際有限公司. 1981:2994.
20. 金定濟 [編著]. 診療要鑑(下). 서울:東洋醫學研究院. 1983:333.
21. 朴炳昆. 韓方臨床四十年. 서울:大光文化社. 1971:317,321.
22. 東醫科學院 [編]. 東醫處方大全(1). 서울:驪江出版社. 1993:322-323.
23. 林瓶琴. 類證治裁. 臺北:旋風出版社. 1970:332-330,336-339.
24. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1989:372.
25. 申載鏞 [編著]. 方藥合編解說. 서울:成輔社. 1989:99-100.
26. 南迎. 歷節風에 應用되는 疎風活血湯의 消炎, 鎮痛, 解熱에 關한 研究. 慶熙大學碩士學位論文. 1981.
27. 尹用甲. 疎風活血湯이 家兔의 腎臟機能에 미치는 影響. 圓光大學碩士學位論文. 1984.
28. Michikawa M., Lim K.T., McLarnon J.G., Kim S.U. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res.* 1994;37:62-70.
29. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
30. Borenfreund E., Puerner J.A. A Simple quantitative proced monolayer culture for cytotoxicity assay(HTD/NR-90). *J. Tiss. Cu.* 1984;9:7-9.
31. Takahashi K., Fujita T., Mayum T., Kish T. Effect of Adramycin on mouse embryo myocardial cells. *Chem Pharm.* 1987;35(1):326-334.
32. 楊維傑 [編]. 黃帝內經譯解(素問). 서울:成輔社. 1980:328-336.
33. 姜煥延. 痺證과 歷節. 醫林誌. 1984;164:158-166.
34. 李挺 [編著]. 編註醫學入門(雜病). 서울:大星文化社. 1986:58-61.
35. 宋峰根. 痺證의 形證과 病域에 關한 文獻의 考察. 圓光大學碩士學位論文. 1985.
36. 姜仁守. 痺證의 治法 및 治療에 對한 文獻의 考察. 圓光大學碩士學位論文. 1988.
37. 金明弼 [編著]. 痺痿專輯. 서울:醫聖堂. 1994:243-244,268.
38. 黃官綉 [纂]. 本草求真. 北京:人民書生出版社. 1987:5-6,75-76,78-83,91,143,185-187,214-215.
39. 汪昂. 本草備要. 서울:高文社. 1989:7,20,24,27-28,36-39,48-49,64,108,114-115,168-169.
40. 吳儀洛. 本草從新. 서울:杏林出版. 1989:9-10,13-14,29-31,41-42,57,75,96,99-100,110,118,170-171.
41. 李時珍. 本草綱目. 北京:人民衛生出版社. 1982:733-743,833-840,845-849,966-968,1307-1310,1620-1625,1977-1981.
42. 辛民教 [編著]. 原色臨床本草學. 서울:永林出版社. 1988:221-222,249-250,254-255,312-313,414-416,467-468,504-509,518-519,604-605,624-627.
43. 李尙仁. 本草學. 서울:學林社. 1986:101-103,191-192,203-204,222-224,226-227,229-231,244-246,319-321,346-347,407-409,459-460,507-509.
44. 李尙仁 [譯]. 漢藥臨床應用. 서울:成輔社. 1990:37-39,43-44,44-45,117-119,158-159,180-181,281-219,287-289,357-360,466-468.
45. 陸昌洙 外5人 [編著]. 漢藥의 藥理·成分·臨床應用. 서울:癸丑文化社. 1995:309-311,316-317,319-320,322-323,409-411,464-467,496-499,553-555,612-614,637-639,738-742,869-871.
46. 김창민 外3人. 中藥大辭典. 서울:圖書出版 正담. 1998:135-140,277-282,1159-1168, 1983-1992,2196-2205,2840-2848,4286-4294,5238-5246,5258-5265,5277-5285,6357-6362,6512-6525.
47. 高學敏 [編著]. 中藥學. 北京:中國醫藥科技出版社. 1990:40-41,45,46-47,50,76-77,125-127,141-142,226-228,231-232,253-254,351-352.
48. 雷載權 [主編]. 中藥學. 上海:上海科學技術出版社. 1995:29-30,31-32,34-35,62-63,110,118-119,127-128,198-199,206,224-225,300-301.
49. 上海中醫學院 [編著]. 中草藥學. 香港:商務印書館香港分館. 1983:27-29,34-36,38-40,42-44,200-202,218-220,240-241,279-280,378-379,381-382,463-464,564-566.
50. Conradi S., Ronnevi L., Norris F. Amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP(ed), Human Motor Neuron Diseases. New York Raven Press. 1982:35-56.
51. Rosen D., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J.O., Regan J., Deng H., Rahamni Z., Krizus A. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London).* 1993;362:59.
52. Floyd R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 1990;4:2587-2597.
53. Park S.T., Lim K.T., Chung Y.T., Kim S.U. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron

- culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol.* 1996;17:37-46.
54. Hall E., Braughler J.M. Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *CNS Trauma.* 1986;3:281-294.
 55. Yamamoto M., Shima T., Uozumi T., Sogabe 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.* 1983;14:977-982.
 56. Zhang Y., Tatsuno T., Carney J.M., Mattson M.P. Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 1993;13:378-388.
 57. Kikuchi S., Kim S.U. Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in cultures. *J. Neurosci. Res.* 1993;36:558-569.
 58. Park S.T., Mun Y.J., Kim B.H., Kim J.J., Choi M.K., Chung Y.T. Study on the effect of allopurinol against oxidant-induced neurotoxicity in cultured spinal sensory ganglion cells. *The Korean J. Anat.* 1996;29:65-71.
 59. Kim Y.S. and Kim S.U. Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci. Res.* 1991;29:100-106.
 60. Michikawa M., Lim K.T., McLarnon J.G., Kim S.U. Oxygen radical -induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res.* 1994;37:62-70.
 61. Park B.R., Kim M.S., Kim S.G., Kim H.K., Kim S.S. Effect of intermittent electrical stimulation on muscle atrophy in hindlimb suspended rats. *Proceeding of the 1st International FES Symposium, Japan.* 1992:223-229.
 62. 崔邦燮. 加味馬錢子湯이 Glucose Oxidase에 의해 損傷된 培養 脊髓運動神經細胞에 미치는 影響. 圓光大學碩士學位論文. 1998.
 63. 李英普. 加味十全大補湯 煎湯液이 培養 脊髓運動神經細胞에 미치는 影響. 圓光大學碩士學位論文. 1998.
 64. 李承勇. 附子半夏湯 煎湯液이 培養 脊髓運動神經細胞에 미치는 影響. 圓光大學碩士學位論文. 1998.
 65. 李星根. 四君子湯이 脊髓運動神經細胞에서 酸素自由基의 毒性에 미치는 影響. 圓光大學碩士學位論文, 1998.
 66. 李鎬承. 解語丸이 Methylmercuric chloride (MMC)에 의해 損傷된 培養 脊髓運動神經細胞에 미치는 影響. 圓光大學碩士學位論文. 1998.
 67. 徐永錫. 活絡丹 煎湯液이 脊髓運動神經細胞에 미치는 影響. 圓光大學碩士學位論文. 1998.
 68. 金永洙. 酸素自由基에 의해 損傷된 大腦皮質神經細胞에 미치는 壯元丸의 影響. 圓光大學碩士學位論文. 1999.
 69. 金成桓. 加味鎮肝熄風湯이 損傷된 培養脊髓運動神經細胞에 미치는 影響. 圓光大學博士學位論文. 1999.
 70. 柳道坤. 釣鉤藤 煎湯液이 척수운동신경세포의 산화적 손상에 미치는 영향. *東醫生理學會誌.* 1999;14(1):129-134.