

원 저

PC12 손상 세포 및 전뇌허혈 유발
Gerbil에 대한 枳實의 細胞保護效果 研究

김완식, 정승현, 신길조, 문일수¹⁾, 이원철

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 의과대학 해부학교실²⁾

Protective Effect of *Aurantii Immaturus Fructus* on Hypoxia Reperfusion Induced by PC12 Cell Damage and Global Ischemia in Gerbil

Wan-Sik Kim, Sung-Hyun Jeong, Gil-Cho Shin, Il-Soo Moon¹⁾ Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University,
Department of Anatomy, College of Medicine, Dongguk University²⁾

Object : This research was performed to investigate the protective effect of *Aurantii Immaturus Fructus* against ischemic damage using PC12 cells and global ischemia in gerbils.

Methods : To observe the protective effect of *Aurantii Immaturus Fructus* on ischemia damage, viability and changes in activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase and production of malondialdehyde (MDA) were observed after treating PC12 cells with *Aurantii Immaturus Fructus* during ischemic insult. Gerbils were divided into three groups: a normal group, a 5-min two-vessel occlusion (2VO) group, and an *Aurantii Immaturus Fructus* administered after 2VO group. The CCAs were occluded by microclip for 5 minutes. *Aurantii Immaturus Fructus* was administered orally for 7 days after 2VO. The histological analysis was performed at 7 days after the surgery. For histological analysis, the brain tissue was stained with 1% cresyl violet solution.

Results : The results showed that

1. *Aurantii Immaturus Fructus* had a protective effect against ischemia in the CA1 area of the gerbil hippocampus 7 days after 5-minute occlusion,
2. In the hypoxia/reperfusion model using PC12 cells, the *Aurantii Immaturus Fructus* had a protective effect against ischemia in the dose of 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ and 20 $\mu\text{g/ml}$
3. *Aurantii Immaturus Fructus* increased the activities of glutathione peroxidase and catalase,
4. The activity of superoxide dismutase (SOD) was increased by ischemic damage, which might represent self protection.

This study suggests that *Aurantii Immaturus Fructus* has some neuroprotective effect against neuronal damage following cerebral ischemia in vivo with a widely used experimental model of cerebral ischemia in Mongolian gerbils, and it also has protective effects on a hypoxia/reperfusion cell culture model using PC12 cells.

Conclusions : *Aurantii Immaturus Fructus* has protective effects against ischemic brain damage at the early stage of ischemia. (J Korean Oriental Med 2003;24(1):29-40)

Key Words: *Aurantii Immaturus Fructus*, ischemia, PC12 cell, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase, malondialdehyde (MDA)

· 접수 : 2002년 10월 4일 · 채택 : 2003년 1월 11일

· 교신저자 : 정승현, 경상북도 경주시 용강동 동국대학교 경주 한방병원

(Tel. 054-770-1341-2, Fax. 054-770-1500, E-mail: wideduck@hanmail.net)

서 론

뇌허혈이 발생하는 부위의 신경세포는 뇌혈류의 감소에 따라 전기적 대뇌피질 장애, 전기적 부전, 이온펌프 부전 등의 장애가 오고, 수분이 경과한 후에는 비가역성 손상을 입게 된다. 그러나 뇌허혈 주변부(penumbra region)의 대부분 신경세포들은 사고 발생 후 3일에서 1주일 후에 사망하게 되는데, 이를 지연성세포사(DND, delayed neuronal death)라고 하며 apoptosis에 의한 것으로 알려져 있다¹⁾.

최근 이러한 신경세포의 죽음을 초래하는 기전이 치료될 수 없는 것이 아니고 혈류를 회복시키거나 세포내로 칼슘유입을 막는 등 초기 중재를 통해 신경세포를 죽음으로부터 피하게 할 수 있는 가능성이 제시되었다. 그리고 신경조직을 손상시키는 신경전달물질의 역할과 허혈에 의해 신경 조직내에 일어나는 일련의 상호 연쇄 대사과정이 밝혀짐에 따라서, 뇌허혈의 급성기에 뇌손상을 경감시키기 위해 재관류를 위한 혈전용해제와 신경세포 손상을 최소화시킬 수 있는 적절한 신경보호제 등 여러 방어적 약물 제재에 대한 연구가 진행되고 있다^{2,3)}.

본 연구에 사용된 枳實은 중풍 급성기 中臟腑證에 邪氣作實하여 二便不通의 證候를 보이는 경우 사용하는 承氣湯類 處方의 주된 藥物 중의 하나로, 性味는 苦寒하며 破氣散積, 行痰消痞, 下氣通便 등의 效能이 있다. 이에 저자는 허혈성 뇌혈관 질환에서 지실의 신경세포 보호효과와 작용기전을 연구하기 위하여, 신경세포의 특징을 나타내는 PC12 세포에 허혈 상태와 유사한 조건인 serum 공급 중단에 따른 지실추출물 투여 후의 생존율과 Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase(GPx), Catalase(CAT), Malondialdehyde(MDA)의 효소활성을 측정하고, Mongolian Gerbil의 전뇌허혈 모델에서 지연성 신경세포 손상방지에 미치는 영향을 광학현미경(BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. PC12 세포의 세포사 및 항산화억제에 미치는 영향
1) 약물의 조제 및 투여

실험에 사용된 지실은 대한약전 및 대한약전의 한약 규격주해⁴⁾에 근거하여 동국대학교 강남 한방병원에서 구입하였으며, 지실 200g을 3,000ml round flask에 넣고 2,000ml의 정제수를 가하여 냉각기가 부착된 전탕기에서 1시간 30분을 가열한 후 여과지로 여과한 여액을 동결 건조하여 24.6g의 추출물을 얻었다.

지실의 PC12 세포에 대한 농도는 0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml 및 20 μ g/ml의 세가지로 나누어 실험하였다. 시약인 Bradford Reagent, assay buffer, NADPH, Bu-OOH, potassium phosphate buffer, TCA 등은 모두 SIGMA에서 구입하였다.

pharmaceutical name	<i>Aurantii immaturus fructus</i> (枳實)
scientific name	<i>Aurantii immaturus fructus</i> (枳實)

2) PC12 세포의 hypoxia/reperfusion model 에 대한 MTT assay

지실의 신경보호효과에 대한 in vitro model로서 PC12 세포를 이용한 hypoxia/reperfusion model을 사용하였다. 배양액으로는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, U.S.A), 5% Fetal Bovine Serum(Gibco BRL, U.S.A), 10% horse serum(Gibco BRL, U.S.A), 1% penicillin-streptomycin(Gibco BRL, U.S.A)으로 구성된 것을 사용하였다.

PC12 cell을 96 well plate에 8×104개씩 접종하고 24시간 동안 37° C incubator (5% CO2, humid atmosphere, Forma, U.S.A)에서 배양하였다. 배양 후 실험군은 실험 약제를 PBS에 녹여서 최종 농도가 0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml 및 20 μ g/ml가 되도록 2시간 전에 전처리 하였다. 2시간 후 세포를 hypoxic chamber(CO2 5%, H2 10%, N2 85%, Forma, U.S.A)에 넣어 무산소 상태로 48시간 배양하여 저산소 상태를 유발한 후 정상적인 37° C incubator로 옮겨 6시간동안 배양하여 재관류를 유발하였다. 대조군은 지실 대신 PBS를 동량 넣어 주었고 같은 시간 동안 CO2 incubator에 넣

어 정상산소상태를 유지시켜 주었다. 세포 생존율은 conventional MTT dye reduction assay를 사용하여 측정하였다. 재관류가 유발된 후 각 well마다 MTT solution(final concentration, 1mg/ml)을 넣은 후 1시간 동안 37°C incubator에서 반응시켰다. 1시간 후 죽은 cell과 반응하여 생성된 formazan을 DMSO 150 μ l 넣은 후 60°C incubator에서 10분간 녹인 후 ELISA reader로 570, 650nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험군의 측정된 흡광도 값은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

3) 생화학적 측정

(1) 세포처리 및 단백질 정량

지실의 신경보호효과에 대한 PC12 세포를 이용한 생화학적측정에서 hypoxia/reperfusion model의 조건은 위의 MTT assay와 동일하게 적용하였고, 뇌허혈과 비슷한 상태인 e 배지에서 세포를 배양하였다. 지실의 배양액내 농도는 세가지(0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml 및 20 μ g/ml)로 하였으며, 단백질 정량은 Bradford 방법⁷⁾에 따라 측정하였다. Diluted dye 980 μ l에 sample 20 μ l를 반응시켜서 spectrophotometer로 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) SOD 활성도 측정

SOD 활성도 측정은 McCord와 Fridovich의 cytochrom c 방법⁸⁾을 이용하였다. SOD 측정을 위한 반응액에는 50mM의 potassium phosphate buffer(0.1 mM EDTA를 포함, pH 7.8)와 0.05mM의 xanthine, ferricytochrome c를 가하여 25°C에서 10분간 항온시킨 후, 조제된 효소액을 가하고 xanthine oxidase (XOD)의 첨가로 반응이 개시되었다. SOD 효소액을 넣기 전에 혼합액과의 반응에서 흡광도의 변화가 적어도 분당 0.025가 되도록 XOD의 양을 조절하는 과정을 먼저 수행하였다. 흡광도의 변화는 550nm에서 UV/Vis spectrophotometer로 측정하였다. SOD의 1unit은 550nm에서 흡광도를 측정하였을 때, cytochrom c의 환원속도를 50% 억제하는 양으로 정하였다.

(3) CAT 활성도 측정

CAT 활성도는 Hugo Abei의 방법⁹⁾에 따라 이 효소

에 의해 H₂O₂가 H₂O와 O₂로 분해되는 원리를 이용하여 측정하였다. 0.1M potassium phosphate buffer에 19mM H₂O₂인 반응액과 효소액을 가하여 20°C 240nm에서 흡광도의 변화를 3분간 10초 간격으로 측정하였다. CAT의 활성도는 1분 동안에 1mmol의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1unit으로 하였다.

(4) GPx 활성도 측정

GPx 활성도는 t-butyl hydroperoxide를 기질로 사용하여 NADPH의 산화정도를 측정한 Del Maestro와 McDonald의 방법¹⁰⁾을 이용하였다. 각각의 sample에는 Assay buffer(900 μ l + NADPH 50 μ l + sample 50 μ l + t-Bu-OOH 10 μ l)를, blank에는 assay buffer(950 μ l + NADPH 50 μ l + t-Bu-OOH 10 μ l)를 각각 넣고, 340nm에서 2분간 10초 간격으로 측정하였다. GPx 활성도는 1분간 NADPH 1 μ mol이 산화되는 양을 1unit으로 정하였다.

(5) MDA 활성도 측정

과산화지질함량은 Ohkawa 등의 방법¹¹⁾을 이용하여 thiobarbituric acid(TBA)와 과산화지질이 반응하여 생성되는 malondialdehyde를 흡광도로 측정하는 TBARS법으로 측정하였다. Sample 200 μ l에 차가운 10% TCA를 400 μ l 넣고 4°C에서 10분 동안 원심분리시킨 후, 상층액 500 μ l를 0.67% TCA 500 μ l와 섞어, 10분 동안 끓여 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. Gerbil의 전뇌허혈에 미치는 영향

1) 약물의 조제 및 투여

지실 200g을 3,000ml round flask에 넣고 2,000ml의 정제수를 가하여 냉각기가 부착된 전탕기에서 1시간 30분을 가열한 후 여과지로 여과한 여액을 동결 건조하여 24.6g의 추출물을 얻었다.

Gerbil에 지실 투여는 실험동물의 체중을 측정하여 3차 증류수에 82.9 mg/kg의 농도로 전뇌허혈 유발 후 2시간부터 7일까지 매일 같은 시간에 경구투여하였다.

Gerbil을 무작위로 두 군으로 나누어 각각 생리식염수를 투여하는 대조군(n=7)과 지실 추출물을 투여하는 실험군(n=3)으로 나누어 실험을 진행하였다.

2) 동물

동물은 Biogenomics에서 구입한 male Mongolian gerbils(Meriones unguiculatus)을 사용하였다. 물과 펠렛사료(Biogenomics)는 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실 내의 온도는 21-24℃, 습도는 40-60%로 유지하였고 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다. 실험실 환경에 2주간 적응시킨 후 사용하였으며 실험시 gerbil의 체중은 60-80g이었다.

3) 가역성 전뇌허혈 유발

체중 60-80g의 male Mogolian gerbil(Meriones unguiculatus)을 2-vessel occlusion 방법으로 시술하였다. 마취는 처음에 질소와 산소의 혼합가스(질소 70%, 산소 30%)에 포함된 5% isoflurane으로 유도하고 그 후에는 1.5% isoflurane으로 계속 유지시켰다. 마취 후 수술용 현미경(Zeiss, Germany)을 사용하여 목의 정중선을 2cm정도 절개한 후 총경동맥이 노출되던 미주신경을 분리해내고 5분간 microaneurysmal clip으로 폐색한 후 microaneurysmal clip을 제거하고 봉합하였다. Gerbil에 허혈을 유발, 재관류 및 회복기 동안 신경보호 효과를 유발하는 저체온증을 방지하기 위하여 직장온도를 이용한 자동 온도 조절 전열기로 37℃로 고정시켜서 실험하였다. 체온측정은 직장속으로 최소한 3cm 들어가게 probe를 삽입하므로써 뇌온도를 반영하는 직장체온을 측정하였다.

4) 전자현미경 관찰을 위한 표본제작

면역조직화학적 평가를 위해 허혈 유발 후 3일과 조직학적인 평가를 위해 허혈 유발 1주일 후 gerbil에 pentobarbital(중외제약)을 복강주사하여 희생시킨 후 단두하였다. 곧 뇌를 적출한 후 rat brain matrix(ASI, U.S.A)를 이용하여 rat brain atlas의 interaural distance에 따라 3mm 두께의 뇌절편을 만들었다. 뇌절편을 Carnoy's solution에 고정시켜서 paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 해마(hippocampus)를 포함하는 부분을 8μm로 section하였다. 표본제작을 위한 조직절편은 30μm마다 수집하였다.

5) 신경세포수 관찰

허혈유발 1주일 후에 gerbil을 희생시켜 8μm로 자

른 뇌조직 절편에서 dorsal hippocampus를 포함하는 조직을 cresyl violet에 10분간 염색하여 dorsal hippocampus CA1 중 가장 지연성 세포사에 손상받기 쉬운 부분인 middle zone의 500 μm길이에서 신경세포수를 관찰하였다. 세포수의 관찰은 광학현미경으로 고배율(×200)에서 동일시야(2.33 mm)내 CA1 영역의 정상 pyramidal cell의 수를 측정하였다.

3. 통계처리

실험결과 분석은 동물실험의 경우 약물투여군을 허혈유발 대조군과, PC12 세포실험의 경우 농도별 약물투여군을 허혈후 재관류 대조군과 각각 비교하는 Student's t-test를 사용하였다.

실험결과

1. PC12 세포를 이용한 세포사로부터의 세포보호효과 실험결과 0.2μg/ml의 농도에서 지실을 투여한 실험군이 대조군에 비해 134.51%의 효과율을 보였으며, 2μg/ml 농도에서는 119.77%, 20μg/ml의 농도에서는 85.07%로 효과율이 증가함을 보였다(Tabel 1). 지실의 농도가 증가함에 따라 지실의 PC12 세포 보호 효과가 감소하는 것을 알 수 있었으며, 20μg/ml 일 때에는 다시 세포사멸이 증가하여 PC12세포 보호효과가 일정 농도 이상에서는 효과가 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

2. 생화학적 측정결과

PC12세포에 지실 추출물을 투여한 경우, 세포배양액 50μl에 대해 지실 추출물 0.2μg/ml, 2μg/ml, 20μg/ml씩 가하여 활성도를 측정하였다.

1) SOD 활성도 측정

단백질 mg당 SOD 활성도는 지실 추출물을 투여하지 않은 대조군의 경우 142.5±3.2 nitrite unit (NU), 지실 추출물을 투여한 실험군 중 0.2μg/ml 농도에서 102.5±2.8 NU(P<0.01), 2μg/ml 농도에서 116.5±2.1 NU(P<0.01), 20μg/ml 농도에서 126.7±2.5 NU(P<0.05)로, 대조군이 가장 높았고 0.2μg/ml 농도

Table 1. The Protective Effect of *Aurantii Immaturus Fructus* on Hypoxia Reperfusion Induced PC12 Cell Damage.

	Effective Ratio (%)
H/R + AIF I	134.51
H/R + AIF II	119.77
H/R + AIF III	85.07

The number are shown as percentage for control
H/R(Hypoxia/Reperfusion) : Control. Incubated at hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h incubation at normoxic chamber

AIF I : *Aurantii Immaturus Fructus* 0.2 μ g/ μ l

AIF II : *Aurantii Immaturus Fructus* 2 μ g/ μ l

AIF III : *Aurantii Immaturus Fructus* 20 μ g/ μ l

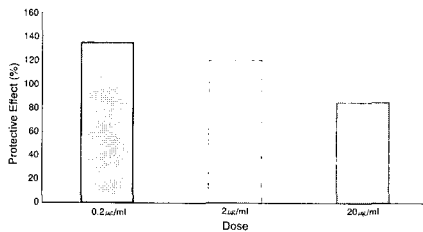


Fig. 1. Concentration dependent effect of *Aurantii Immaturus Fructus* extract on ischemia induced by hypoxia/reperfusion model with PC12 cell. PC12 cell were treated with 0.2 μ g/ μ l, 2 μ g/ μ l and 20 μ g/ μ l of *Aurantii Immaturus Fructus* extract and incubated at hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h incubation at normoxic chamber. Cell viability was measured by MTT assay as described previously.

의 실험군이 가장 낮았다(Table 2, Fig. 2). 따라서 지실의 투여농도에 따른 결과 0.2 μ g/ μ l 농도의 실험군이 2 μ g/ μ l 및 20 μ g/ μ l에 비해 SOD 활성도가 더 낮아 효과가 더 큰 것으로 나타났다.

2) CAT 활성도 측정

단백질 mg당 CAT 활성도는 대조군의 경우 68.4 \pm 1.1 nitrite unit (NU), 실험군 중 0.2 μ g/ μ l 농도에서 95.6 \pm 2.3 NU(P<0.01), 2 μ g/ μ l 농도에서 88.8 \pm 1.6 NU(P<0.01), 20 μ g/ μ l 농도에서 72.8 \pm 1.5 NU로, 대조군이 가장 낮고 0.2 μ g/ μ l 농도의 실험군이 가장 높았다(Table 2, Fig. 2). 특히 지실의 투여농도에 따른 결과 농도의 증가에 따라 CAT 활성도가 감소하는 경향을 보였으며, 0.2 μ g/ μ l 농도의 실험군이 2 μ g/ μ l 및

Table 2. Catalytic Activities of Superoxide Dismutase(SOD), Glutathione Peroxidase(GPx), and Catalase. Enzyme activities are measured after treated with *Aurantii Immaturus Fructus* at 0.2 μ g/ μ l, 2 μ g/ μ l, and 20 μ g/ μ l Concentrations.

	GPx	Calase	SOD
Normal	100.4 \pm 3.9	100.2 \pm 3.0	100.6 \pm 1.8
H/R	32.6 \pm 2.4	68.4 \pm 1.1	142.5 \pm 3.2
H/R + AIF I	79.6 \pm 3.0**	95.6 \pm 2.3**	102.5 \pm 2.8**
H/R + AIF II	72.4 \pm 3.5**	88.8 \pm 1.6**	116.5 \pm 2.1**
H/R + AIF III	49.6 \pm 2.7**	72.8 \pm 1.5	126.7 \pm 2.5*

The number are shown as percentage for control

H/R(Hypoxia/Reperfusion) : Control. Incubated at hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h incubation at normoxic chamber

AIF I : *Aurantii Immaturus Fructus* 0.2 μ g/ μ l

AIF II : *Aurantii Immaturus Fructus* 2 μ g/ μ l

AIF III : *Aurantii Immaturus Fructus* 20 μ g/ μ l

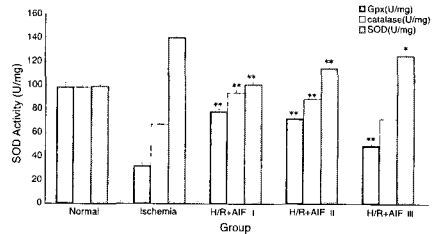


Fig. 2. Catalytic activities of Superoxide Dismutase(SOD), Glutathione Peroxidase(GPx), and Catalase. Enzyme activities are measured after treated with *Aurantii Immaturus Fructus* at 0.2 μ g/ μ l, 2 μ g/ μ l, and 20 μ g/ μ l concentrations.

20 μ g/ μ l에 비해 CAT 효소 활성을 더욱 억제하는 것으로 나타났다.

3) GPx 활성도 측정

단백질 mg당 GPx 활성도는 대조군의 경우 32.6 \pm 2.4 nitrite unit (NU), 실험군 중 0.2 μ g/ μ l 농도에서 79.6 \pm 3.0 NU(P<0.01), 2 μ g/ μ l 농도에서 72.4 \pm 3.5 NU(P<0.01), 20 μ g/ μ l 농도에서 49.6 \pm 2.7 NU(P<0.01)로, 대조군이 가장 낮고 0.2 μ g/ μ l 농도의 실험군이 가장 높았다(Table 2, Fig. 2). 특히 지실의 농도의 증가에 따라 GPx의 활성이 낮아져 CAT 활성변화와 비슷한 양상으로 나타났다.

4) MDA 활성도 측정

단백질 mg당 MDA 활성도는 대조군의 경우 125.4

± 1.1 nmol, 실험군 중 $0.2\mu\text{g/ml}$ 농도에서 103.2 ± 2.3 nmol($P<0.01$), $2\mu\text{g/ml}$ 농도에서 114.6 ± 2.5 nmol($P<0.05$), $20\mu\text{g/ml}$ 농도에서 124.5 ± 1.2 nmol로, 대조군이 가장 높고 $0.2\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군이 가장 낮았다(Table 3, Fig. 3). 특히 농도별 관찰에서 $0.2\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군이 $2\mu\text{g/ml}$ 및 $20\mu\text{g/ml}$ 에 비해 MDA 활성을 감소시킨 것으로 나타났다.

3. 뇌허혈 손상 후 신경세포 손상의 형태학적 관찰

해마 CA1 영역에서의 신경세포 손상이 완전히 일어난 시점인 재관류 후 1주일째 gerbil을 희생시켜 양쪽 해마의 조직 절편을 광학 현미경하에서 관찰하였다. 정상군 gerbil에서는 정상적인 형태의 해마 pyramidal neuron이 관찰되었다(Fig. 4. A, B). 5분간의 ischemia 유발 후 saline을 경구투여한 대조군의 경우

는 CA1 영역의 신경세포들이 주변 세포로부터 분리되어 유리되고 세포체 또한 정상적인 형태를 잃고 응축되어 단일 세포의 형태로 되어있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4: C, D).

반면에 지실을 1주일간 경구투여한 gerbil의 해마 CA1 영역에서는 정상 조직과 유사한 형태의 신경세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 4: E, F). 또한 이 세포들은 잘 뻗어나가는 perikaryon과 중앙에 위치하는 둥근 핵으로 인하여 쉽게 구분할 수 있었고, 비교적 온전한 상태로 관찰되었다.

4. CA1 영역의 pyramidal neuron의 개체수 측정
 허혈 시술 후 7일째에 희생시킨 gerbil의 뇌조직 절편을 cresyl violet으로 염색하여 해마 CA1영역 중앙부 $500\mu\text{m}$ 길이에서 정상적인 형태의 pyramidal

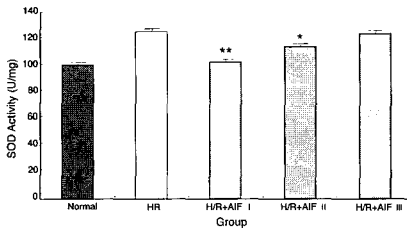


Fig. 3. The effect of *Aurantii Immaturus Fructus* on the production of MDA. The level of MDA was measured in PC12 cells after treated with various concentrations of *Aurantii Immaturus Fructus*.

Table 3. The Effect of *Aurantii Immaturus Fructus* on the Production of MDA. The Level of MDA was Measured in PC12 Cells after Treated with Various Concentrations of *Aurantii Immaturus Fructus*.

Group	MDA
Normal	100.0 ± 1.8
H/R	125.4 ± 1.1
H/R + AIF I	103.2 ± 2.3**
H/R + AIF II	114.6 ± 2.5*
H/R + AIF III	124.5 ± 1.2

The number are shown as percentage for control
 H/R(Hypoxia/Reperfusion) : Control. Incubated at hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h incubation at normoxic chamber

AIF I : *Aurantii Immaturus Fructus* $0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$
 AIF II : *Aurantii Immaturus Fructus* $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$
 AIF III : *Aurantii Immaturus Fructus* $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$

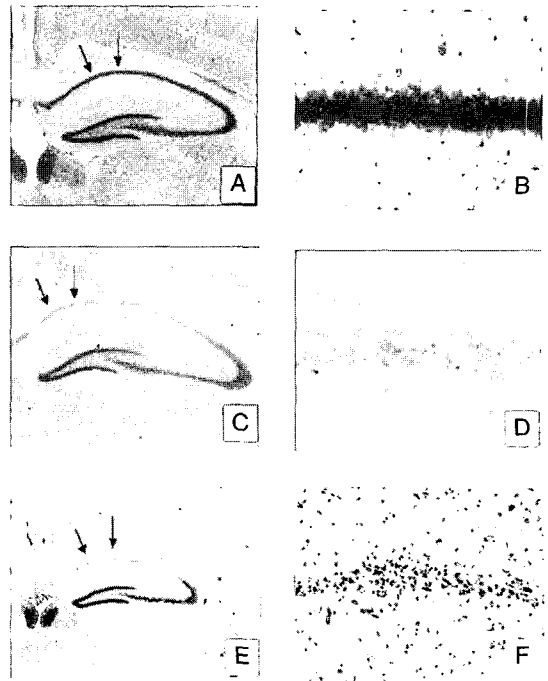


Fig. 4. Cresyl violet staining of the gerbil hippocampus CA1 area 7 days after 5-minute ischemia in the normal (A, B), vehicle-treated group (C, D), *Aurantii Immaturus Fructus* extract treated group (E, F). Arrows indicate pyramidal neurons in CA1 area.

Table 4. The Neuroprotective Effects of *Aurantii Immaturus Fructus* in the Neuronal Density of Gerbils in the CA1 Region of the Hippocampus 7 Days after 5-minute Occlusion

	Normal	Control	Sample
n	7	7	3
Cell counts ¹⁾	153.5 ± 4.9	51.0 ± 2.5	83.4** ± 2.2
Viability percent	100	33.2	54.3
Damaged percent	-	66.8	45.7

¹⁾ expressed as mean ± SEM

**; P<0.01

Normal; Intact group

Control; vehicle-treated group at 7days after ischemia

Sample; *Aurantii Immaturus Fructus* extract-treated group at 7days after ischemia

neuron 수를 측정하였다. 아무런 처치도 가하지 않은 정상군의 경우 정상 neuron의 수는 153.5±4.9개였다. 허혈 유발 후 saline을 투여한 대조군에서는 51.0 ± 2.5개였으며 ischemia 유발 후 지실 전탕액을 7일간 경구투여한 실험군의 경우 83.4±2.2개로 유의한 (p<0.01) 방어효과가 있음을 관찰할 수 있었다(Table 4, Fig. 5).

정상군의 CA1영역에서의 pyramidal neuron의 생존률을 100%로 계산한다면, 상대적으로 saline 투여한 대조군의 경우 생존률이 33.2%이며, 지실을 투여한 실험군의 경우 54.3%로 지실을 투여한 실험군이 saline을 투여한 대조군에 비하여 유의한 방어효과가 있음을 알 수 있었다.

고 찰

일과성 전뇌허혈에서 재관류 3~4일 이후 해마, 기저핵 등에서 관찰되는 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)¹²⁾의 발생기전은 현재까지 뚜렷하게 밝혀져 있지 않다. 칼슘을 매개로 하는 glutamate 흥분독성, 지속적인 단백질 합성의 장애, 열충격 단백질 발현 장애, 지질 대사 및 free radical에 의한 손상, 미토콘드리아 유전자 및 대사 이상 등이 작용할 것이라는 여러 실험결과들이 제시되어 왔다¹³⁻¹⁵⁾. 허혈에 의해 촉발되는 일련의 생화학적 연쇄반응(cascade)을 거치면서 신경세포는 허혈초기부터 세포의 팽화

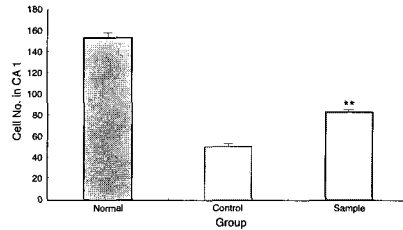


Fig. 5. The counts of intact pyramidal cell in the CA1 area of the gerbil hippocampus 7 days after 5-min occlusion induced ischemia. (*; P<0.01) Normal; Intact group, Control; Vehicle-treated group at 7 days after ischemia, Sample; *Aurantii Immaturus Fructus* extract-treated group at 7 days after ischemia

(swelling)와 세포막의 손상을 동반하는 necrosis의 과정을 밝게 될 것이라는 고전적 개념과는 달리 지연성 세포사에서는 허혈 초기에 뚜렷한 형태학적 변화를 보이지 않다가 일정 시간 경과 후 세포사의 과정을 겪게 되고 그 형태학적 변화 역시 국소허혈에서 보이는 necrosis와는 차이를 보이는 것으로 알려졌다. 지연성 세포사의 실체가 necrosis인지 또는 apoptosis인지에 대한 논란이 계속되고 있으며, 현재까지 이에 대한 결론이 나지는 않았으나 많은 연구결과들은 지연성 세포사에 이 두 가지 기전이 제각기 관여할 것이라는 형태학적, 분자생물학적 증거들을 제시하고 있다¹⁶⁾.

최근 뇌졸중과 퇴행성신경계 질환에 대한 국내외 연구에 따르면 신경세포의 사멸을 유도하는 경로로 excitotoxicity, oxidative stress 및 apoptosis가 알려져 있다.

Excitotoxicity는 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 N-methyl-D-aspartate(NMDA), kainate 수용체의 활성을 통하여 세포내에 Ca²⁺과 Na²⁺등 양이온들의 과도유입을 유도하여 신경세포의 사멸을 유도하는 것으로, glutamate neurotoxicity라고도 한다. 특히 세포내 Ca²⁺이 쌓이면 Calpain(a calcium-activated neutral protease family) 등의 고분자 분해를 촉진하는 효소가 활성화되거나, nitric oxide synthase(NOS)가 활성화되어 NO가 생성되고, NO는 superoxide(O₂⁻)와 반응하여 peroxinitrite(ONOO⁻)를 만들며 신경세포의

사멸을 유도한다.

신경세포에서 꼭 필요로 하는 산소는 생존에 가장 필수적인 물질로 전자전달계의 최종 전자수용체가 되며 여러 대사과정에 관여한다. 그러나 산소의 대사과정에서 생체에 독성을 나타낼 수 있는 중간대사 산물들이 나타날 수 있는데, 이러한 물질로는 superoxide radical(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical(OH^-), singlet oxygen(O_2) 등이 있다. 이 중 superoxide radical은 산소분자에 전자 하나가 더 부가된 음이온 형태로서 oxygen radical 독성작용의 중추적인 역할을 한다.

이러한 oxygen free radical에 관한 연구는 1969년 McCord와 Fridovich¹⁷⁾에 의해 superoxide dismutase (SOD)가 발견됨에 따라 활발하게 진행되었고, 이후 여러 질환과의 관련성에 대해 많은 연구가 진행되고 있는데, 최근에는 특히 뇌경색, 뇌외상 등과 같은 뇌손상후의 뇌기능 장애에 미치는 free radical의 역할이 주목을 받고 있다. Free radical은 허혈후 조직에 lipid peroxidation의 대사가 증가되면서 specific membrane associated protein에 손상을 주고, 이렇게 손상받은 세포막은 정상상태에서는 투과시키지 않던 물질들에 대한 투과성이 증가되어 궁극적으로 세포손상이 야기된다고 하며, 뇌손상 후 free radical이 내피세포와 혈관내피세포에 손상을 주고 직접 뇌세포에 작용하여 뇌부종 및 뉴런, 신경교세포의 구조적인 변화를 초래한다고 주장하였다. 특히 중추신경계는 세포막에 불포화지방산이 풍부하며 free radical을 제거하는 SOD, CAT, GPx 등의 효소가 적고, 또한 free radical을 형성하는 iron이 풍부하여 free radical에 의해 비교적 손상받기가 쉽다.

Oxidative stress는 최근 연구에 따르면 apoptosis를 통해 cell death를 유발하는 것으로 밝혀졌다¹⁸⁾.

Apoptosis는 최근 들어 신경계 질환의 주 사멸 기전으로 부각되고 있다. Apoptosis라고 명명되는 세포사멸 과정 중에는 세포막과 핵 내에 특이한 형태학적인 변화가 동반되는 특징을 가진다. 세포막 융기의 돌출(membrane blebbing) 및 여러 형태의 세포내용물이 세포막으로 쌓여져 세포로부터 떨어져 나온

apoptosis 소포체(apoptotic body)라는 특수한 구조를 형성하고, mitochondria 등과 같은 대개의 세포내 소기관들은 자신의 원형 구조를 유지하는데 비해 핵 내에서는 염색사 응축, 핵분절, DNA 분절 등과 같은 특이한 변화가 동반된다¹⁹⁾.

枳實은 芸香科에 속하는 常綠小喬木인 광굴나무, 당굴나무 혹은 탕자나무의 未成熟한 幼果로서, <神農本草經>²⁰⁾에 “治大風皮膚中如麻豆苦痒”이라고 최초로 언급되었다. 枳實은 破氣散積, 行痰消痞, 下氣通便 등의 效能이 있어 중풍 초기 中臟證에 邪氣作實하여 二便不通의 證候를 보이는 경우, 大小便不通을 解消하고 아울러 實熱을 清泄시킬 목적으로 사용하는 ‘通腑瀉下法’의 代表處方인 承氣湯類의 주된 藥物 중의 하나이다²¹⁾.

枳實의 약리작용으로는 동물실험에서 심혈관계의 작용으로 지실전탕액이 혈압을 높이고, 심장의 관상동맥이나 뇌에 혈류를 증가시키며, 위장평활근에 대한 연동작용을 높이고 수축 운동을 규칙적이고 강력하게 하며, 진경작용이 있고, 자궁에 있어서 자궁근의 흥분·수축력과 긴장도를 증가시키며, 최근에는 항알레르기 작용이 있다고 보고되었으나^{22,23)} 지실이 신경세포에 미치는 영향에 관해서는 보고된 바 없었다.

이에 본 연구에서는 枳實이 뇌허혈 초기의 신경세포손상에 미치는 방어효과를 살펴보기 위해 PC12 세포의 hypoxia/reperfusion model을 사용하여 신경세포의 생존율과 항산화제의 활성을 비교관찰하고, 인위적으로 허혈을 유발시킨 Mongolian Gerbil에 지실추출물을 투여한 후 광학현미경으로 조직학적 신경세포의 변화를 관찰하였다.

세포 생존력에 미치는 효과 실험에서 지실이 신경세포 손상에 미치는 영향을 실험적으로 연구하기 위하여 PC12 세포를 뇌허혈과 비슷한 상태인 저산소 상태로 배양하여 직후 정상적인 배양기로 옮겨 6시간 동안 배양하여 재관류를 유발한 상태와 정상상태에서 각각 세포생존효과를 측정 해보았고, 지실을 0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml, 20 μ g/ml의 세가지 농도로 처리한 후 세포생존효과를 측정해 보았다. 세포생존효과 측정은 MTT assay방법을 이용하였다. MTT assay의 원리

는 MTT 시약이 tetrazolium salt 로써 세포내의 미토콘드리아의 기능이 정상적일 때 대사적 환원이 일어나 푸른색의 formazan 침전물을 형성하며 이의 흡광도를 측정함으로써 세포 생존력을 간접적으로 알 수 있는 방법이다.

본 연구 결과 세포생존율은 농도에 따라 현저한 차이를 나타내었는데, 지실의 농도가 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 일 때는 134.51%, 2 $\mu\text{g/ml}$ 일 때는 119.77%, 20 $\mu\text{g/ml}$ 일 때는 85.07%로 나타나 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 가장 높은 생존율을 보이며, 농도가 20 $\mu\text{g/ml}$ 일 때는 오히려 세포생존에 미치는 효능이 떨어지는 것을 알 수 있었다.

생화학적 실험에서는 뇌세포를 손상시키는 free radical을 제거하는 SOD, CAT, GPx, MDA 등의 효소를 이용해 효소 활성도를 측정하였다.

항산화 효소 중 SOD는 산소대사과정 중 생성되는 유리 superoxide radical(O_2^-)을 H^\cdot 와 반응시켜 O_2 와 H_2O_2 로 변화시키는($\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$) 효소이다. superoxide radical은 mitochondria에서 일어나는 산소대사과정 중 전자전달계로 전자가 이동되는 과정에서 산소분자가 효소를 통하지 않고 직접 전자 1개를 받음으로써 만들어지며 이차적으로 다른 oxygen radical도 생기게 된다²⁹. 이러한 superoxide radical이 증가하면 세포막에 손상을 입힐 수 있는데, mitochondria에서 생성된 superoxide radical의 대부분은 mitochondria 기질에 있는 SOD에 의해 제거되고 mitochondria에서 유리되어 나온 일부 superoxide radical은 cytosol에 있는 SOD에 의해 제거된다. 대사과정 중 생성된 반응성을 가진 free radical이 SOD에 의해 안정화되지 못하여 세포막 지질과산화물을 일으켜 세포가 손상되면 치매와 같은 퇴행성질환이 유발될 수 있다. 알츠하이머형 치매환자의 경우 과산화로 인해 반응성이 큰 O_2^- 와 H_2O_2 같은 물질들이 많이 생성되기 때문에 이를 안정화 시켜주기 위해 SOD의 활성도가 더욱 높게 나타난다. SOD의 활성도는 cytochrom c가 superoxide radical에 의해 환원되는 반응이 SOD 활성에 비례하여 억제되는 원리를 이용한 것으로 ferricytochrome c가 파장 550nm에서 최대의 흡광도를 나타내는 ferricytochrome c로의 전환이 억

제되어 생기는 흡광도의 차이를 이용한 방법이다.

CAT는 SOD로부터 생성된 H_2O_2 를 물과 산소로 전환($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)시키는 효소로서 주로 동물 의 간이나 적혈구, 신장세포의 cytosol에 존재한다³⁰.

GPx는 selenium(Se)을 함유하는 selenoenzyme으로서 cytosol에서 생체 이물질의 형성을 억제시키고, 활성을 띤 superoxide radical을 안정화시켜주는 역할을 하는 glutathione(GSH)을 oxidized glutathione(GSSG) 형태로 산화시키면서³¹ H_2O_2 와 같은 free radical은 환원시켜 안정화 시킴으로써 과산화물의 생성을 억제하는 역할을 한다. Glutathione reductase(GR)는 GPx와 함께 각종 산화환원반응에 관여하여 세포 내부에 GSH의 수준을 일정하게 유지시키는 역할을 하는 효소이다³².

이와같이 대사과정에서 생성된 superoxide radical이 SOD에 H_2O_2 의해, 등으로 전환되고 CAT와 GPx, GR 등의 작용에 의해 산소와 물로 전환되어 안정화되면 free radical의 공격으로 인한 세포 손상은 줄어든다. 그러나 이러한 효소의 작용이 원활하지 않아 free radical이 안정화되지 못해 세포가 손상되면 항산화 효소의 생성과 분비가 원활하게 이루어지지 않게 되고, 따라서 free radical의 생성은 더욱 증가되어 세포 손상이 가속화된다.

본 연구에서 SOD 활성도는 대조군이 높았으며 이는 허혈후 재관류에 의한 superoxide radical (O_2^-)의 생성이 증가하여 oxidative stress 상태가 되었음을 의미한다. 대사과정이 이루어지면서 superoxide radical은 계속적으로 생성되며 일부 제거되지 않은 superoxide radical이 지속적으로 세포에 손상을 가하게 되는데, 만약 허혈이 oxidative stress에 의해 발생하는 것이라면 허혈이 진행됨에 따라서 체내 free radical의 생성이 증가되고 이에 대한 방어작용으로 항산화효소인 SOD의 활성도는 증가한다.

본 연구에서 대조군이 보다 활성도가 높게 나타났는데, 이는 허혈에서 생성된 superoxide radical의 제거를 위한 방어기전이라 생각하며, superoxide radical의 제거가 지속됨으로써 높은 상태의 활성도를 유지하고 있는 것으로 추정된다. 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 경우가

SOD 활성을 가장 억제하였다.

CAT와 GPx의 활성도는 대조군에서 보다 유의하게 낮았는데, 이는 허혈시 생성된 superoxide radical에 의해 CAT와 GPx의 활성도가 억제된 것으로 생각된다. 또한 지실로 처리한 경우 CAT와 GPx의 활성도가 대조군보다 높았는데, 이는 지실 추출물이 hypoxia/reperfusion으로 인한 세포독성으로부터 세포를 보호하고, CAT와 GPx 효소의 활성 감소를 막는 것으로 밝혀졌다. CAT와 GPx 실험에서는 지실을 0.2 μ g/ml 처리한 경우가 효소의 활성도가 가장 높았으며, 20 μ g/ml 처리한 경우에는 오히려 효소 활성도가 현저하게 감소되어 SOD와 마찬가지로 0.2 μ g/ml에서 가장 큰 효과가 나타났다.

MDA 또한 대조군에서 활성도가 유의하게 높았고, 지실을 농도별로 처리한 경우 superoxide radical의 과잉생산을 막아 MDA 활성도를 감소시켰다. 지실을 0.2 μ g/ml 처리한 경우 효소 활성도가 가장 많이 감소되었고, 20 μ g/ml 처리한 경우에는 오히려 증가되어 대조군과 큰 차이없이 나타났다.

in vitro 실험에 사용한 Mongolian Gerbil은 후대뇌 교통동맥(posterior communicating artery)의 결손으로 인하여 뇌에 혈액을 공급하는 대뇌동맥륜(willis circle)이 불완전하게 형성되어 있기 때문에, 양쪽 총경동맥에 일시적인 폐색을 일으키기 쉽고 좋은 재현성을 보여 허혈성 뇌손상(ischemic brain damage)의 기전 연구 및 뇌허혈에 대한 약물의 신경세포보호작용(neuro protection)을 평가하는 동물모델로서 자주 사용되고 있다.

저자는 Mongolian Gerbil의 양쪽 총경동맥을 5분 동안 결찰한 후 재관류시켜 전뇌허혈을 유발한 후 7일째 hippocampus CA1지역의 pyramidal neuron의 상해 정도를 관찰하였다. 수분 이내의 일시적 허혈은 뇌세포 가운데 특정 취약 집단의 사망을 유도하게 된다³⁰⁾. 그러나 CA1지역의 pyramidal neuron들은 일시적 허혈 이후 바로 사망하지 않고, 며칠이 지난 후 지연성으로 사망하게 된다³¹⁾. 여러 동물실험에서 뇌의 기능 및 형태 관찰 결과, 짧은 전뇌허혈이 있는 후 24시간까지는 CA1지역 pyramidal neuron은 energy

crisis나 morphological change가 없이 정상인 것으로 알려져 있다. 2~4일에는 hippocampus형성체 CA1지역의 pyramidal neuron이 지연성 신경세포사를 시작하여³⁰⁾ 3주 뒤에는 약 5%의 신경세포만이 생존한다고 보고³²⁾되고 있다. 이러한 현상을 설명하기 위하여 많은 가설들이 제시되었으나, 그 기전은 아직 명확하지 않다.

이상의 결과로 볼 때 지실이 허혈성 뇌혈관 질환에 신경세포 보호작용이 있어 신경세포 손상을 감소시키는데 도움이 되며, 향후 구체적인 신경세포손상의 보호기전에 대한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

결론

枳實이 뇌허혈 초기의 신경세포손상에 미치는 방어효과를 알아보기 위하여 PC 12세포의 hypoxia/reperfusion model을 사용하여 신경세포의 생존율과 항산화제의 활성을 비교관찰하고, 인위적으로 허혈을 유발시킨 Mongolian Gerbil에게 지실추출물을 투여한 후 광학현미경으로 신경세포의 조직학적 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PC12 cell을 이용한 hypoxia/reperfusion model에서 지실이 허혈성 세포사에 방어효과가 있음을 관찰하였다.
2. 허혈성 세포사에 관여하는 SOD, CAT, GPx 및 MDA 활성도를 관찰한 결과 SOD와 MDA의 활성도는 억제하고 GPx와 CAT 활성도의 감소를 막아, hypoxia/reperfusion으로 인하여 증가하는 superoxide radical의 과잉생산을 억제하였다.
3. Gerbil에서 5분간의 전뇌허혈 유발 후 hippocampus CA1영역내 pyramidal cell의 수를 관찰한 결과, 지실 추출물을 투여한 실험군에서 대조군에 비해 높은 생존율을 보여 지실이 신경세포사 방어효과가 있음을 관찰하였다.

이상으로 본 연구 결과 지실이 전뇌허혈로 유발된 뇌허혈 손상을 억제하는 효과가 있으며 oxidative stress에 의한 세포독성을 억제하는 효과가 있는 것

으로 추정된다.

참고문헌

1. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Progress in Brain Res.* 1985;63:39-58
2. 이광우, 정희원. *임상신경학*. 서울:고려의학. 1997:393, 397, 399.
3. Iijma K, Kogure K. Prevention of delayed neural death in gerbil hippocampus by iron channel blockers. *Stroke.* 1998;19:1003-1007.
4. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia reversible and irreversible type of ischemic cell damage. *Prog Brain Res.* 1985;63:39-58.
5. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg.* 1992;77(3):337-54.
6. 지형준. *대한약전 및 대한약전의 한약규격주해*. 서울:한국메디칼인텍스사. 1998:577-8.
7. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
8. Mccord JM, Fridovich LJ. *Biol. Chem.* 1969;244:6049-55.
9. Hugo A. Catalase in vitro. *Methods in enzymatic analysis.* 1984:673-84.
10. Maestro RD, McDonald W. Oxidative enzymes in tissue homogenate. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* 1985:291-6.
11. Ohkawa H, Ohishi K, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.
12. Kirino T, Sano K. Fine structural nature of delayed neural death following ischemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol.* 1984;62:209-218.
13. Nowak TS. Localization of 70 kDa stress protein mRNA induction in gerbil brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1991;11:432-439.
14. Kawagoe J, Abe K, Sato S, Nagano I, Nakamura S, Kogure K. Distributions of heat shock protein-70 mRNA and heat shock cognate-70 mRNA after transient global ischemia in gerbil brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12:794-801.
15. Abe K, Aoki M, Kawagoe J, Yoshida T, Hattori A, Kogure K, Itoyama Y. Ischemic delayed neural death-A mitochondrial hypothesis. *Stroke.* 1995;26:1478-1489.
16. 이용석. Gerbil의 일과성 전뇌허혈모델에서 허혈 지속 시간과 체온이 해마의 Bax/Bcl-2 발현에 미치는 영향. 서울대학교 대학원. 2000.
17. 오영준, 최원석. Apoptosis의 조절인자:Bcl-2계열. 유전 제2권. 서울:윌드사이언스. 1998:92-105.
18. Islekel H, Islekel S, Guner G, Ozdamar N. Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia reperfusion. *Brain Res.* 1999;843:18-24.
19. Hussain S, W slikker, Ali SF. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Devl Neurosci.* 1995;13: 811-817.
20. 孫星衍輯. *神農本草經*. 臺北:文光圖書有限公司. 1979: 67.
21. 김동은, 정승현, 박인식, 신길조, 이원철. 三化湯이 중 간대뇌동맥 결찰로 유발된 뇌허혈에 미치는 영향. *한방내과학회지*. 2001;22(2):127-134.
22. 김순신. 蘇合香元이 白鼠의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1993.
23. 정승현, 신길조, 이원철. 六一順氣湯 抽出物이 생쥐의 全腦虛血에 미치는 영향. *동국한의학회연구논문집*. 1997;7(2):149-154.
24. 최은정, 신길조, 이원철. 蘇合香元이 실험적 뇌경색 흰 쥐의 국소뇌혈류량 및 경색 면적에 미치는 영향. *한의학회지*. 1997;18(1):462-465.
25. 조규선, 이원철, 윤상협. 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄 후 大造丸 투여가 대뇌반구 및 시상위축에 미치는 영향. *한방성인병학회지*. 1998;4(1):163-175.
26. 김선영, 윤상협, 이원철. 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄 후 黃連解毒湯 투여가 대뇌반구 및 시상위축에 미치는 영향. *동국노총*. 1998;37:229-246.
27. 유종삼. 星香正氣散이 흰쥐의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1992.
28. 전국한의과대학 본초학교실. *본초학*. 서울:영림사. 1994:350-351.
29. Ruis H. The biosynthesis of catalase, *Canadian Journal of Biochemistry.* 1979;57:1122-1130.

30. Zamocky M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1999;72:19-65.
31. Harding JJ, Blakytyn R, Ganea E. Glutathione in disease, *Biochemical Society Transactions*. 1996;24: 881-884.
32. Harding JJ, Blakytyn R, Ganea E. Glutathione in disease, *Biochemical Society Transactions*. 1996;24: 881-884.
33. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*. 1982;239: 57-69.
34. Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed hippocampal damage in human following cardiorespiratory arrest. *Neurology*. 1987;37:1281-6.
35. Bonnekoh P, Barbier A, Oschlies U, Hossmann KA. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus: morphological change after 5-min ischemia and long survival times. *Acta Neuropathol(Berl)*. 1990;80:18-25.