

허혈·재관류 유도성 신경세포사멸에 대하여 신정보호효과를 가지는 약용식물 추출물의 검색

오태우^{1#}, 이미영², 이혜원², 박용기^{1*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 한국한의학연구원

Neuroprotective effects of some herbal medicine plant extract against ischemia·reperfusion-induced cell death in SK-N-SH neuronal cells

Tae-Woo Oh^{1#}, Mi Young Lee², Hye Won Lee², Yong-Ki Park^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

2 : AAing Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseongdae-ro, Yuseong-gu, 305-811, Daejeon, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of the study is to determine the neuroprotective effects of the water and 80% EtOH extract of some herbal medicine plant on ischemia·reperfusion-induced cell death in SK-N-SH human brain neuronal cells.

Methods : SK-N-SH cells were treated with 3mM sodium azide and 10 mM 2-deoxy-D-glucose for 45 min, prior to the addition of different concentrations of herbal medicine plant extract (0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml) for 2 hr and then reperfused with growth medium, incubated for 24 h. Cell viability was determined by WST-1 assay, and ATP/ADP levels were measured by ADP/ATP ratio assay kit.

Results : Herbal medicine plant extract significantly inhibited decreasing the cell viability in ischemia-induced SK-N-SH cells. Also increased the ratio of ADP/ATP in ischemia-induced neuronal cells.

Conclusions : Our results suggest that herbal medicine plant extract has a neuroprotective property via increasing the energy levels in neuronal cells, suggesting that extract may has a therapeutic potential in the treatment of ischemic brain injury. The exact component and mechanism remains for the future study.

Key words : Herbal medicin plant, SK-N-SH neuroblastoma cell, Chemical ischemic injury, neuroprotective effect

서 론

퇴행성 뇌질환인 치매는 대표적으로 뇌혈관 질환으로 발생하는 혈관성 치매(vascular dementia, VaD)와 A β 의 침착에 의하여 생기는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)로 나눌 수 있으며, 마약이나 음주와 같은 화학물질에 대한 중독, 두부 외상, 전해질 장애, 갑상선 질환 등 60여 가지의 원인과 경로를 거쳐 발생한다^{1,2)}. 이외에도 퇴행성 신경질환인 뇌졸중을 포함하여 파킨슨병 등은 특정 뇌 세포사멸로 인한 치명적

인 에너지 대사의 소실이 신경계의 기능장애로 나타나고 있다. 뇌는 대사를 위한 산소이용률이 높고 과산화지질의 함량도 높은 반면에 활성산소에 대한 산화방지 효소계나 저분자의 산화방지제가 타 조직에 비해 상대적으로 적은 관계로 유해 활성산소나 라디칼에 의한 산화적 손상에 대하여 매우 약하기 때문에 신경세포의 사멸 유도로 인한 퇴행성 신경질환과 관련이 큰 것으로 최근 여러 연구를 통해 보고되어지고 있다³⁻⁵⁾. 또한 뇌조직의 경우 일단 손상이 되면 기능회복이 어렵기 때문에 퇴행성 신경질환에 있어서 신경세포를 보호 할 수 있는

* 교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr
제1저자 : 오태우, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 054-770-2647 · E-mail : taewoo2080@gmail.com
· 접수 : 2013년 2월 20일 · 채택 : 2013년 3월 21일

치료제의 개발이 요구된다.

본 연구에 사용된 소재들(건울, 목과, 석창포, 지황, 석곡) 중 밤(건울, *Castanea crenata Siebold et Zuccarini*)의 tannin 조성은 주로 gallic acid이고⁶⁾ 그 외 3,6-digalloyl glucose, pyrogallol, resorcinol, chebulinic acid, chebulagic acid, sugar 등으로 구성되어 있는 것으로 알려져 있다. 지금까지 밤의 생리활성에 관한 연구는 밤나무 잎차의 항알레르기 효과⁷⁾, 밤 귀피의 용매분획별 항산화 활성과 항산화 물질의 분리⁸⁾ 등이 있으며, 저장⁹⁾, 가공식품 제조¹⁰⁾, 밤 전분의 제조, 변색¹¹⁾ 등에 대한 연구들이 이루어져 왔다. 모과(*Chaenomeles sinensis* Koehne)는 장미과(Rosaceae)에 속한 모과나무 및 동속식물의 성숙과실을 건조한 것으로 중국 의학서인 《명의별록(名醫別錄)》에 처음 기재된 이래 서근활락(舒筋活絡), 화위화습(和胃化濕), 강근골(強筋骨)하는 효능 및 치습비구련(治濕痺拘攣), 요슬관절산동통(腰膝關節酸痛), 토사전근(吐瀉轉筋), 각기수종(脚氣水腫)의 효과로 임상에서 널리 쓰이고 있다¹²⁾. 그 효능으로는 감기나 기관지염의 가래 완화제, 특히 류마티즘, 폐렴 등에 좋다고 알려져 있다¹³⁾. 또한 Chung등¹⁴⁾의 모과의 휘발성과 비휘발성 flavonon 성분 분석, 모과와 사과 혼합 음료의 제조¹⁵⁾, 항산화성, 항균성 등의 모과 주류의 생리기능성¹⁶⁾, 모과의 분석 및 가공에 관한 연구¹⁷⁾가 이루어지고 있다.

석창포(*Acorus gramineus* Solander)는 腦神經 및 心血管系 疾患의 治療에 이미 널리 사용되어 온 藥物로서, 天南星科(Araceae)에 屬한 多年生草本인 뿌리줄기를 건조한 것이며, 性味는 시고 따뜻하며, 心胃經에 歸經하며, 開竅寧神, 化濕和胃하는 效能을 갖고 있다^{12,18)}. 理研究로는 中樞神經系統에 대한 影響으로 진정작용, 수면촉진 및 진통작용 그리고 心血管系統에 대한 영향으로 항부정맥작용, 혈압강하작용, 혈액순환 촉진작용 등이 연구되어 있으며, 이외에도 호흡기계에 대한 진해작용 등 연구가 보고되어 있다²⁰⁾.

지황(*Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel)은 현삼과에 속하는 다년초로서 중국이 원산지이고 약용식물로 재배되고 있으며, 한의학에서는 뿌리의 생것을 생지황, 건조시킨 것을 건지황, 썬 말린 것을 숙지황이라고 한다^{21,22)}. 지황의 주요 효능은 보혈, 강장 해열제로서 특히 빈혈, 하혈, 또는 허약병 결핵 등으로 신농본초경 수록되어 있고 그 주성분은 phytosterol류, 당류, iridoid glycosides, inorganic elements, chryseoriod, luteolin 및 아미노산 11종 등으로 구성되어 있다²³⁾. 생지황 및 건지황은 β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, rehmanin, fatty acids, catalpol, glucose, γ -butyl amino acid, carbohydrate, norcarotenoid, stachyose, arginine 등의 성분을 함유하며, 숙지황은 stachyose, verbascose, mannotriose, raffinose, sucrose, glucose, fructose, galactose 등의 당류와 catalpol, vitamin A, arginine, mannitol, β -sitosterol 등이 소량으로 함유되어 있다고 보고되어 있다²⁴⁻²⁶⁾.

석곡 (*Dendrobium nobile* Lindley)은 난초과(蘭科; Orchidaceae)에 속한 多年生 附生 本草로 功效主治는 益胃生津, 滋陰清熱이고 熱病傷津, 口乾煩渴, 傷陰目暗 등을 치료한다²⁷⁾. 石斛에 관한 실험적 연구로는 면역조절 효과²⁸⁾, 항염증 효과²⁹⁾, 신경세포 보호효과³⁰⁾ 등이 보고되었다. 석곡은 治風劑로서 風痺를 치료하며 半身不隨, 중풍 등에 응용되는 약재로서 신경세포 보호에 효과가 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 한의학적 기초 이론과 기초연구를 바탕으로 뇌혈관성 질환의 예방을 위한 약용식물에 관한 연구의 일환으로 계획되었고, 여러 약용식물 추출물이 화학적 허혈·재관류 손상을 유도한 신경세포주에서 세포증식 유도, 에너지 대사 변화에 중점을 두고 그 기능을 과학적으로 확인하여 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용된 약용식물은 건울(남원, 한국), 목과(영천, 한국), 석창포(제주, 한국), 지황(의성, 한국), 석곡(인도네시아)으로서 규격품으로 품질검사필한 절단생약을 광명당 제약회사로부터 구입하여 관능검사 후 제조한 추출물을 한국한약연구원(KIOM)으로부터 제공받아 사용하였다. 약재 표본은 한국한약연구원에 보관하였다(표본번호 KIOM 012901, 012904, 012907, 012908, 012915).

2) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 cell culture에 관련된 세포 배양용 시약으로는 Dulbecco's modified EAGle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(P/S)들은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, 허혈·재관류 손상을 유도하기 위한 시약으로는 Sodium azide, 2-deoxy-D-glucose, Sodium dodesyl sulfate(SDS)는 SIGMA(St. Louis, SA)사에서 구입하였다. Cell proliferation reagent 인 WST-1은 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서, ADP/ATP ration assay kit는 Abcam (Cambridge, MA, USA)사에서 구입하여 본 실험에 사용하였으며, 기타 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상을 사용하였다.

2. 방법

1) 추출물 제조

각각의 원료 한약재 추말 200 g에 10배량의 3차 증류수를 가하여 2시간 동안 환류추출(100℃)하고 전액을 여과지(Whatman No.2)로 여과한 후 잔류물에 동량의 물을 첨가하여 동일방법으로 2차 추출하였다. 1, 2차 추출액을 합하여 감압농축(Buchi Rotavapor R-114 system) 후 동결건조(일신랩 Freeze Dryer FD5508A, Korea)하여 물추출물 건조분말을 제조하였다. 또한, 원료 한약재 추말 200 g에 10배량의 80% 에탄올을 가하여 24시간 실온에서 냉침하고 천액을 여과한 후 잔류물에 동량의 80% 에탄올을 첨가하여 동일방법으로 2차 추출하였다. 1, 2차 추출액을 합하여 감압농축하여 80% 에탄올 건조분말을 제조하였다. 각각의 추출물 건조분말의 균일한 품질을 위하여 균질화 작업 시행 후 바코드를 부여한 후 냉장보관(2.5℃)하며 시험에 사용하였다.

2) 세포 배양

SK-N-SH(KCLB 30011, human brain neuroblastoma cell line) 세포는 ATCC(CRK2271, VA, USA)로부터 구입하

였으며, 10% FBS과 penicillin·streptomycin(10,000 U/ml, 10,000 µg/ml)을 넣은 Dulbecco's modified EAGLe's medium(DMEM) 세포 배양액으로 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 37°C 조건으로 배양하였다.

3) 허혈성 손상 세포배양모델 제작

본 연구팀이 허혈·재관류 손상을 유도하기 위하여 화학적으로 허혈성 손상 세포모델을 제작하였을때와 동일한 방법으로 본 실험에서 연구하였다. 즉, 산화적 인산화를 억제하는 sodium azide와 해당과정을 차단하는 2-deoxy-D-glucose를 사용하여 에너지대사를 인위적으로 억제하여 허혈성 손상을 유도하였다³¹⁾.

4) 세포 생존율 측정

약물에 의한 세포독성과 허혈·재관류 손상에 따른 세포생존도를 측정하기 위해서 WST-1 assay를 수행하였다⁴¹⁾. 먼저 96-well plate에 세포(1.5 × 10⁴ cell/well) 분주하여 24 시간 배양한 후 serum free media(SFM)에 여러 농도(0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml)로 희석한 약용식물 추출물을 처리하였다. 2시간 배양 후 CI-DPBS를 처리하여 45 분간 배양 한 후 배지를 제거하고 1 × PBS로 3회 세척한 후 growth medium로 배지를 교체하고 24 시간 배양을 하였다. 배양 종료 후 WST-1 시약을 200 µl/well씩 넣은 후 37°C CO₂ incubator에서 암실상태를 유지하면서 반응시키고 반응액을 96-well plate에 100 µl/well씩 옮겨서 Microplate Reader에서 420 nm의 흡광도를 측정하였다.

5) 에너지 변화량 측정

SK-N-SH 세포(1.5 × 10⁴ cell/well)를 luminometer plate에 분주하여 하룻밤 배양하고 이전 WST-1 assay에서 독성이 나타나지 않은 농도 범위의 약용식물 추출물을 2시간 동안 전처리한 다음, CI-DPBS 45분간 처리하여 허혈을 유도하였다. 이를 다시 growth medium로 교체한 후 24시간 동안 배양하고, 다시 배지를 제거한 다음 1 × PBS로 3회 세척하였다. 여기에 nuclear releasing reagent를 100 µl씩 넣고 5분 동안 실온에서 반응시킨 후 ATP monitoring enzyme을 1 µl씩 넣고 1분 동안 luminometer를 이용하여 측정을 하였다. ADP levels을 측정하기 위해서 다시 10분간 luminometer로 측정하여 값을 기록한 후 ADP converting enzyme을 1 µl를 넣고 1분 이내에 luminometer로 측정하여 ATP와 ADP의 비율(ADP/ATP ration)을 구하였다.

6) 통계처리

결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean) ± 표준오차 (standard error SE)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 GraphPad Prism program의 anova test를 수행하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 약용식물 추출물의 수율

약용식물별로 용매별 수율을 분석한 결과, 물 추출물 경우

대부분의 추출물이 30%(w/w)의 수율을 나타내었다. 그 중에서도 특히, 지황의 경우 62.75%(w/w)로 가장 높은 수율을 나타내었으며 석곡의 경우 3.95%(w/w)로 가장 낮은 수율을 보였다. 에탄올 추출물은 대부분 20%(w/w)의 수율을 나타내었으며 건울의 경우 24.91%(w/w)로 가장 높은 수율을 보인 반면, 물 추출물과 마찬가지로 석곡의 에탄올 추출물은 2.65%(w/w)로 가장 낮은 수율을 나타내었다. (Table 1.)

Table 1. Neuroprotective effects of some herbal medicine plant extract information

Scientific name	Place of origin	Pharmaceuticals	Barcode No.			
			Water Extract	yield value (%)	80% EtOH Extract	yield value (%)
건울 <i>Castanea crenata Siebold et Zuccarini</i>	Korea	Namwon	Gwang Myoung Dang KIOM 112901	31,73	KIOM 212901	24,91
목과 <i>Chaenomeles sinensis Koehne</i>	Korea	Yeongcheon	Gwang Myoung Dang KIOM 112904	27,25	KIOM 212904	22,12
석창포 <i>Acorus gramineus Solander</i>	Korea	Jeju	Gwang Myoung Dang KIOM 112907	26,60	KIOM 212907	20,18
지황 <i>Rehmannia glutinosa Liboschitz ex Steudel</i>	Korea	Uiseong	Gwang Myoung Dang KIOM 112908	62,75	KIOM 212908	18,36
석곡 <i>Dendrobium nobile Lindley</i>	Indonesia		Gwang Myoung Dang KIOM 112915	3,95	KIOM 212915	2,65

2. 허혈·재관류에 의한 세포손상

본 연구팀이 SK-N-SH 세포에서 허혈·재관류에 따른 세포 손상 정도를 연구하였을 때³¹⁾와 유의한 결과를 얻었다. 즉, 3 mM sodium azide와 10 mM 2-deoxy-D-glucose을 처리하였을 때, 배양시간에 의존적으로 세포독성에 의한 세포생존도가 감소되었으며, 45분 배양시간 부터 DPBS만 넣은 정상 세포에 비해 유의적으로 감소하였으며, 생존율은 약 50%로 측정되었다. 또한 허혈 후 재관류 시간에 따른 세포생존도를 측정한 결과 24시간 재관류에서 세포생존도가 50%로 나타났으며, 재관류 시간에 의존적으로 감소하는 것을 관찰하였다. 이는 본 연구팀이 선행연구를 통하여 이미 보고하였던 결과와 유의한 결과를 나타내었으며³¹⁾ 본 연구에서도 동일한 조건으로 실험하였다.

2. 세포독성 평가

한편, SK-N-SH 세포에 약용 식물추출물을 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml 농도로 처리한 후 24시간 배양하여 WST-1 assay 방법으로 세포독성을 측정하였다. 그 결과, 물 추출물의 경우 건울(W-CSZ)의 경우에는 각각 94.13 ± 6.0%, 102.92 ± 6.0%, 97.32 ± 2.79%, 93.18 ± 5.76, 91.46 ± 6.06, 86.37 ± 3.66, 99.30 ± 4.43, 106.46 ± 3.43으로 1 mg/ml 농도까지 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1a). 건울과 마찬가지로 지황(W-RGLP)과 석곡(W-DNL)도 1 mg/ml 농도까지 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1d, 1e). 반면 목과(W-CSK)와 석창포(W-AGS)의 경우에는 500 µg/ml에서, 1 mg/ml에서 독성을 나타내었다(Fig. 1b, 1c). 또한 80% 에탄올 추출물의 경우도 건울(E-CSZ)과 지황(E-RGLP), 석곡(E-DNL)에서 1 mg/ml 농도까지 독성이

나타나지 않아 물 추출물과 같은 결과를 보였으나(Fig. 2a, 2d, 2e), 목과(E-CSK)와 석창포(E-AGS)의 경우에는 1 mg/ml에서 독성을 나타내었다(Fig. 2b, 2c). 따라서 이후의 실험은 독성이 없는 범위에서 실험을 진행하였다.

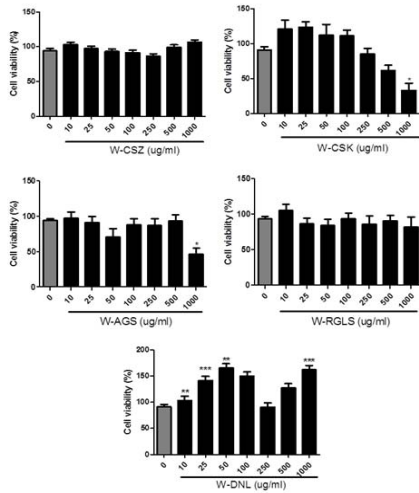


Fig. 1. Cytotoxicity of the water extract of Herbal medicine against SK-N-SH cells. The cells were treated with 0, 10, 25, 50, 250, 500, 1000 µg/ml of various extracts for 24 hr. Cell viability was determined WST-1 assay. The results are expressed as mean±SEM form three independent experiments. Significantly different from 0 µg/ml extracts; *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001. W-CSZ; *Castanea crenata Siebold et Zuccarini* water extract, W-CSK; *Chaenomeles sinensis* Koehne water extract, W-AGS; *Acorus gramineus* Solander water extract, W-RGLS; *Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel water extract, W-DNL; *Dendrobium nobile* Lindley water extract.

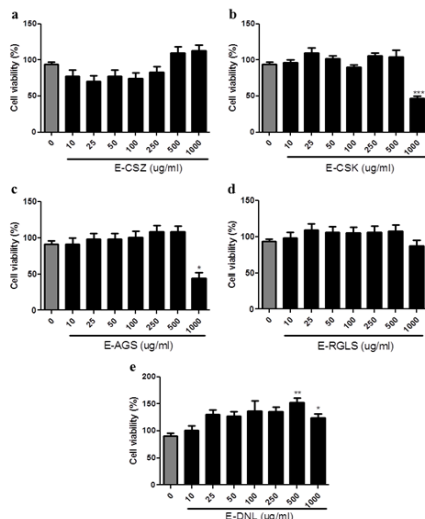


Fig. 2. Cytotoxicity of the 80% ethanol extract of Herbal medicine against SK-N-SH cells. The cells were treated with 0, 10, 25, 50, 250, 500, 1000 µg/ml of various extracts for 24 hr. Cell viability was determined WST-1 assay. The results are expressed as mean±SEM form three independent experiments. Significantly different from 0 µg/ml extracts; *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001. E-CSZ; *Castanea crenata Siebold et Zuccarini* 80% ethanol extract, E-CSK; *Chaenomeles sinensis* Koehne 80% ethanol extract, E-AGS; *Acorus gramineus* Solander 80% ethanol extract, E-RGLS; *Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel 80% ethanol extract, E-DNL; *Dendrobium nobile* Lindley 80% ethanol extract.

3. 허혈·재관류에 의한 세포손상에 대한 세포 증식도 효과

SK-N-SH 세포에 45분 동안 허혈 손상을 준 다음 24시간 재관류하여 세포사멸을 유도한 다음 독성이 없는 농도 범위의 약용식물 추출물을 처리하여 세포생존도를 측정된 결과, 세포 증식도를 유의하게 증가하는 약용식물을 확인 할 수 있었다. 즉, 약용식물의 물과 80% 에탄올 추출물을 처리한 세포에서 허혈·재관류에 의해 감소된 세포생존도가 대부분의 추출물에서 증가시키는 것으로 나타났지만, 특히 목과의 물추출물과 지황의 80% 에탄올 추출물에서 농도 의존적으로 증식을 나타냈다(Fig. 3b, 4d).

즉, 약용식물 물추출물에서는 대부분의 약용식물 추출물이 허혈을 유도한 그룹보다 세포의 증식을 증가시키는 것으로 나타났지만(Fig. 3), 80% 에탄올 추출물의 경우에는 목과(E-SCK)와 석창포(E-AGS)에서는 오히려 세포증식을 유도하지 못하고 세포사멸이 가해지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4b, 4c). 반면, 지황(E-RGLP)의 경우에는 각각 $94.33 \pm 6.0\%$, $52.16 \pm 7.71\%$, $74.40 \pm 8.42\%$, 82.84 ± 7.84 , 87.61 ± 10.57 , 83.62 ± 7.84 , 86.00 ± 11.53 , 100.5 ± 6.31 , 107.1 ± 10.57 으로 세포증식을 농도의존적으로 증가시키는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4d). 따라서 약용식물 추출물 중 80% 에탄올 추출물보다 물 추출물에서 허·재관류 손상에 따른 세포손상으로부터 신경세포를 보호하는 것으로 나타났다.

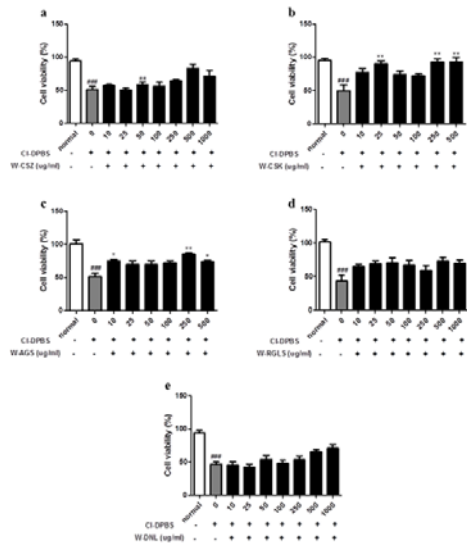


Fig. 3. Effects of Herbal medicine water extract on chemical ischemia-reperfusion injury in SK-N-SH cells. Cells were incubated with different concentrations of water extract after 45 min chemical ischemia and 24 h reperfusion with CI-DPBS. Cell toxicity was measured by WST-1 assay. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. #P<0.05, ##P<0.01 and ###P<0.001 vs. normal cells; and *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. chemical ischemia reperfusion group. W-CSZ; *Castanea crenata Siebold et Zuccarini* water extract, W-CSK; *Chaenomeles sinensis* Koehne water extract, W-AGS; *Acorus gramineus* Solander water extract, W-RGLS; *Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel water extract, W-DNL; *Dendrobium nobile* Lindley water extract.

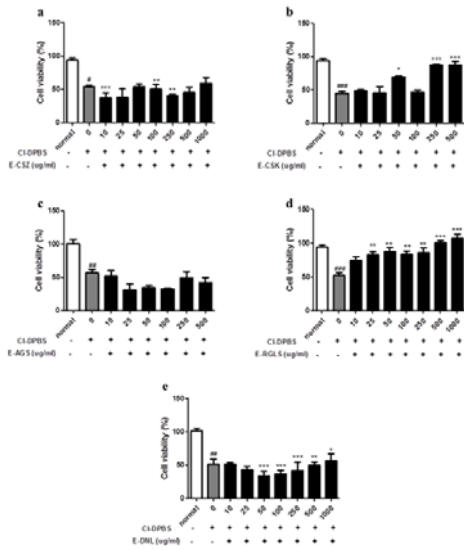


Fig. 4. Effects of Herbal medicine 80% Ethanol extract on chemical ischemia-reperfusion injury in SK-N-SH cells. Cells were incubated with different concentrations of water extract after 45 min chemical ischemia and 24 h reperfusion with CI-DPBS. Cell toxicity was measured by WST-1 assay. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. #P<0.05, ##P<0.01 and ###P<0.001 vs. normal cells; and *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. chemical ischemia reperfusion group. E-CSZ; *Castanea crenata Siebold et Zuccarini* 80% ethanol extract, E-CSK; *Chaenomeles sinensis* Koehne 80% ethanol extract, E-AGS; *Acorus gramineus* Solander 80% ethanol extract, E-RGLS; *Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel 80% ethanol extract, E-DNL; *Dendrobium nobile* Lindley 80% ethanol extract.

4. 에너지 생성에 대한 효과

생약 추출물의 신경세포에서의 허혈·재관류 손상에 의한 에너지 감소에 대한 조절 효과를 확인하기 위해 SK-N-SH 세포에 45분 허혈손상과 24시간 재관류 조건으로 세포사멸을 유도한 후 약용식물추출물을 처리하여 ATP/ADP ration을 측정하였다. 그 결과, 허혈성 손상이 유발된 세포(vehicle)에서는 ATP의 생성이 정상 세포에 비해 현저히 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5).

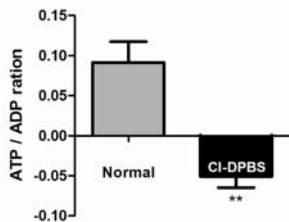


Fig. 5. Effects of chemical ischemia-reperfusion induced decreasing of ATP levels in SK-N-SH cells. Cells were incubated with CI-DPBS for 45 min and reperused for 24 h. The ration of ATP/ADP was measured ATP/ADP ration kit. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. **P<0.01 vs. normal group.

약용식물의 물추출물(건울(W-CSZ), 목과(W-CSK), 석창포(W-AGS), 지황(W-RGLP), 석곡(W-DNL))을 농도별로 처리하였을 때 건울(W-CSZ)의 경우가 가장 높게 ATP의 생성이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 6a). 특히 건울(W-CSZ) 추출물을 0.5 mg/ml 농도로 처리하였을 때 정상 세포보다

더 높은 수준으로 에너지 생성이 증가하였다. 또한 목과(W-CSK)의 경우에도 ATP의 생성을 증가시켰지만, 농도 의존적으로는 증가시키지는 않는 것으로 나타났으며(Fig. 6b), 석창포(W-AGS), 석곡(W-DNL)의 경우에는 오히려 ATP의 생성량이 더 줄어든 것으로 보아(Fig. 6c, e) 신경보호에는 그다지 효능이 없을 것으로 판단된다.

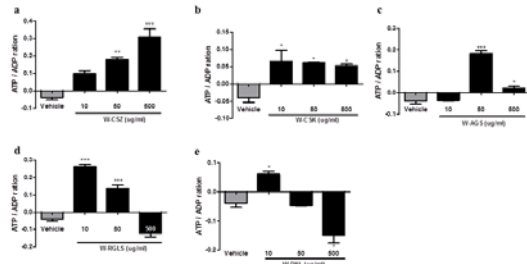


Fig. 6. Effects of Herbal medicine water extract on chemical ischemia-reperfusion induced decreasing of ATP levels in SK-N-SH cells. Cells were incubated with CI-DPBS for 45 min and reperused for 24 h. Cells were incubated with different concentrations of water extract for 2 h. The ration of ATP/ADP was measured ATP/ADP ration kit. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehicle group. W-CSZ; *Castanea crenata Siebold et Zuccarini* water extract, W-CSK; *Chaenomeles sinensis* Koehne water extract, W-AGS; *Acorus gramineus* Solander water extract, W-RGLS; *Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel water extract, W-DNL; *Dendrobium nobile* Lindley water extract.

반면 약용식물의 80% 에탄올 추출물(건울(E-CSZ), 목과(E-CSK), 석창포(E-AGS), 지황(E-RGLP), 석곡(E-DNL))의 경우에도 건울(E-CSZ)의 경우가 농도 의존적으로 ATP의 생성을 증가시키는 것으로 나타났으며(Fig. 7a), 목과(E-CSK)와 석창포(E-AGS)의 경우에는 10, 50 µg/ml의 농도에서 유의있게 ATP의 생성을 증가시킨 것으로 나타났다(Fig. 7b, c) 반면, 지황(E-RGLP)은 50 µg/ml에서만 에너지 생성을 증가시켰으며 (Fig7 d), 석곡(E-DNL)의 경우에는 오히려 ATP의 생성량이 더 줄어든 것으로 보아(Fig. 7e) 신경보호에는 그다지 효능이 없을 것으로 판단된다.

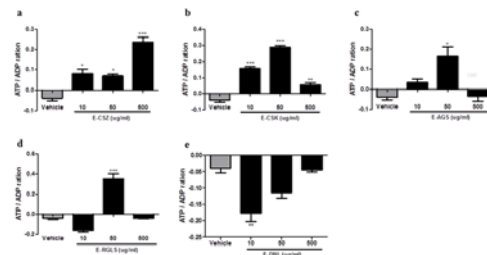


Fig. 7. Effects of Angelica acutiloba water (AA) extract on chemical ischemia-reperfusion induced decreasing of ATP levels in SK-N-SH cells. Cells were incubated with CI-DPBS for 45 min and reperused for 24 h. Cells were incubated with different concentrations of AA extract for 2 h (A). The ration of ATP/ADP was measured ATP/ADP ration kit. Values are means SEM of two different preparations with quadruplicate experiments. ***P<0.001 vs. control; #P<0.05, ###P<0.001 vs. vehicle group. E-CSZ; *Castanea crenata Siebold et Zuccarini* 80% ethanol extract, E-CSK; *Chaenomeles sinensis* Koehne 80% ethanol extract, E-AGS; *Acorus gramineus* Solander 80% ethanol extract, E-RGLS; *Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel 80% ethanol extract, E-DNL; *Dendrobium nobile* Lindley 80% ethanol extract.

고찰

인간의 장기 중, 뇌는 혈액공급에만 전적으로 의존하여 에너지를 제공받는 기관으로 원활한 혈액 공급이 이루어지지 못했을 경우 즉각적인 손상을 받게 된다. 일반적으로 뇌 허혈의 70~80%는 혈전의 막힘으로 인한 혈액공급의 일시적 중단과 순간적인 혈전 제거에 따른 혈액의 재공급으로 인한 뇌 기능의 부분적, 전체적 손상을 일으킨다고 보고되어 있다³²⁾. 이러한 직접적인 뇌세포 손상으로 인하여 세포사멸이 유도되고 신경세포의 사멸에 따른 인지기능 장애, 행동장애, 운동장애가 수반되어 뇌기능 상실에 이르게 된다. 이처럼 대뇌의 혈액의 공급의 차단은 허혈성 뇌경색 뿐만 아니라 전반적인 뇌 조직 손상에 따른 각종 장애를 유발할 수 있다. 급격한 혈류감소에 의하여 뇌허혈이 발생되면 뇌 세포내 산소결핍으로 인하여 사립체내의 산화적 인산화 작용이 정지되고 ATP합성이 저하된다. ATP가 급격히 감소되면 Na^+ , K^+ -ATPase의 합성이 저하되어 이온펌프의 부전이 초래된다. 이로 인해 정상적인 이온운반이 불가능하게 되어 뇌 세포내 K^+ 은 즉시 세포 밖으로 유출되며 세포외강의 Na^+ 과 수분이 세포내로 유입되어 세포내 부종을 초래한다^{33,34)}. 뇌허혈로 인한 사립체내 ATP의 고갈을 대신하기 위하여 phosphocreatine 상태로 저장된 고에너지가 사용되며 phosphofructokinase의 활성이 증가되어 당분해작용이 촉진되고 뇌에 norepinephrine이 증가하므로서 adenylate cyclase가 활성화되어 ATP로부터 cyclic AMP를 생성하며 이것은 당원분해작용을 촉진한다. 이러한 보상적 뇌 대사작용으로 인하여 사립체내에 저장되었던 산소는 더욱 소모되어 혐기성 당분해 작용이 발생되고³⁵⁾ 이로 인하여 유산염이 축적되어 세포내 H^+ 농도가 증가되므로서 유산산증을 일으키게 된다. 조직 내 유산산증이 발생되면 점점 세포손상은 진행되어 비가역적 세포손상을 초래하게 된다. 이처럼 혈액의 감소에 따른 영양분과 산소 공급의 저해로 인한 뇌 에너지 대사 장애는 뇌손상의 일차적 기전이라고 사료된다³⁶⁾. 한편 에너지 생산을 위하여 필수적으로 산소가 이용되어지고, 이 과정에서 정상적으로 물과 이산화탄소를 배출하게 된다. 그러나 이 중 일부 2~3%의 산소가 불완전하게 전자를 흡수하려는 반응과정에서 세포의 파괴작용을 초래하는데, 이를 활성산소라고 한다³⁻⁵⁾. 이러한 활성산소는 항산화효소들의 작용에 의해 제거되며 생리적으로 정상적인 상태에서는 활성산소 생성과 항산화효소에 의한 제거 작용이 균형을 이루고 있다. 그러한 활성산소의 생성이 증가하거나 항산화효소의 작용이 감소하게 되면 불균형이 초래되고 이로 인하여 세포는 소위 산화적 스트레스에 빠지게 되어 다양한 기전을 통하여 세포의 노화와 변형을 유도함으로써 여러 가지 질병을 초래하게 된다^{32,33)}. 특히, 뇌는 대사를 위한 산소 이용률이 높고 과산화지질의 함량도 높은 반면에 활성산소에 대한 산화방지 효소계나 저분자의 산화방지제가 타 조직에 비해 상대적으로 적은 관계로 유해 활성산소나 라디칼에 의한 산화적 손상에 대해 매우 약하기 때문에 신경세포의 사멸 유도로 인한 퇴행성 신경질환이 나타나는 것으로 최근 여러 연구를 통해 보고되어지고 있다^{4,5)}. 즉 활성산소와 같은 산화적 스트레스에 의해 초래되는 미토콘드리아 손상과 기능부전이 노화 및 노화 관련 질환의 원인이 되며, 활성산소로 인한 DNA의 체세포 돌연변이, 미토콘드리아 DNA의 전사 장애로 인한 단백질 합성 저하, 이

에 따른 다량의 활성산소 발생의 악순환이 반복됨으로써 노화 관련 질환들이 나타나게 되며, 뇌졸중과 같은 뇌혈관 질환의 경우, 뇌의 혈액 순환 장애로 미토콘드리아 기능 손상과 세포 파괴가 유발되며, 세포사멸에 관여하는 여러 단백질들의 발현을 통해 뇌 신경세포가 죽게 되는 것으로 보고 있다. 즉, 산소와 포도당 고갈에 따른 미토콘드리아 내 에너지 대사이상, 그로인한 세포막 투과성변화에 따른 Ca^{2+} 등의 대량 유입, 세포사멸 관련 분자들의 발현 증가로 세포가 죽게 된다³⁵⁾. 따라서 건강증진과 질병예방을 위해 미토콘드리아의 기능 유지 및 회복이 매우 중요한 전략으로 인식되고 있다³¹⁾.

본 연구팀에서는 이미 뇌 신경세포에서의 허혈성 손상에 대해 sodium azide와 2-deoxy-D-glucose 처리에 의한 chemical ischemia 신경세포 배양모델을 제작하여 보고하였으며³¹⁾, 이 모델을 이용하여 국내·외에서 자생하고 있는 약용식물의 물과 에탄올 추출물에 대하여 SK-N-SH 신경 세포주를 이용하여 화학적 허혈·재관류 손상 모델에서 신경세포 보호효과를 갖는 천연 추출물의 탐색을 시도하였다.

건울(乾粟)은 밤나무의 종피를 벗긴 씨를 말린 것으로 특이한 냄새가 조금 있고 성질은 따뜻하고 맛은 달다²⁷⁾. 健胃作用이 있고 泄瀉를 멎게 하며 신장기능을 좋게 하여 耳鳴, 腰痛, 下肢無力등에 사용하며 지혈작용과 기관지염에도 효능이 있고 약리작용으로 항산화작용이 보고되고 있다³⁷⁾. 이에 대한 연구로는 t-BHP로 산화적 스트레스를 유발한 HepG2나 CCL₄로 간독성이 유발한 동물모델에서 항산화 효능에 대한 연구가 있으며³⁸⁾, palmitic acid가 투여된 HepG2 세포에서 TG level, ATP 그리고 glutathione을 측정하여 유의한 효능이 있다는 것이 알려져 있다³⁹⁾. 또한 모과는 《명의별록(名醫別錄)》에 처음 기재된 이래 서근활락(舒筋活絡), 화위화습(和胃化濕), 강근골(強筋骨)하는 효능 및 치습비구련(治濕痺拘攣), 요슬관절산통(腰膝關節酸痛), 토사전근(吐瀉轉筋), 각기수종(脚氣水腫)의 효과로서 임상에서 널리 쓰이고 있으며¹²⁾, 石菖蒲는 天南星科(Araceae)에 屬한 多年生草本인 Acorus gramineus SOLAND의 뿌리줄기를 건조한 것이며, 性味는 시고 따뜻하며, 心·胃經에 歸經하며, 開竅寧神, 化濕 和胃하는 效能을 갖고 있다^{12,18)}. 理研究로는 中樞神經系統에 대한 影響으로 진정작용, 수면촉진 및 진통작용 그리고 心血管系統에 대한 영향으로 항부정맥작용, 혈압강화작용, 혈액순환촉진 작용 등이 연구되어 있으며, 이외에도 호흡기계에 대한 진해작용 등 연구가 보고되어 있다²⁰⁾. 지황의 경우에는 한의학에서 생지황은 열을 식히고 혈열(血熱)을 삭히는 청열양혈(淸熱涼血) 작용과 진액을 생성하고 갈증을 없애는生津止渴(生津止渴) 작용이 있으며, 음기를 보하는 보음작용과 혈을 생성케 하는 양혈(養血)작용, 혈열을 식히는 양혈(涼血) 작용이 있다고 하였으며²¹⁾. 석곡(石斛)은 多年生 附生 本草로 동속근연식물의 지상부를 건조한 것으로 性은 甘하며 胃 肺 腎으로 歸經한다²⁷⁾. 석곡에 관한 연구로는 항산화, 면역조절효과²⁸⁾, 항염증²⁹⁾, 신경세포보호³⁰⁾, 뇌졸중으로 인한 염증반응과 뇌부종의 감소에 대한 효과 등이 보고되었다⁴⁰⁾.

본 연구에서 여러 약용식물의 추출물에 대하여 한의학적 기초 이론과 기초연구를 바탕으로 뇌혈관성 질환의 예방을 위한 약용식물의 신경보호 효과에 대하여 화학적 허혈·재관류 손상을 유도한 신경세포주에서 그 기능을 과학적으로 확인하여 보고자 하였다. 이들 약용식물에 대하여 물추출물과 80%

에탄올추출물에 대하여 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml 농도로 세포 생존율을 test한 결과 5가지 약용식물 중 목과와 석창포에서 1 mg/ml의 농도에서 독성을 보였을 뿐 나머지 추출물 및 농도에서는 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1, 2). 또한 화학적 허혈·재관류 손상을 유도한 신경세포에서 세포의 증식도를 확인 해 본 결과 대부분의 추출물에서 농도구배에 맞게 효과를 보여 human SH-N-SK neuroblastoma cell에 화학적 허혈·재관류로 유도되는 세포 손상에 대한 보호 활성을 확인 할 수 있었다(Fig 3, 4).

뇌 신경세포에서 허혈·재관류 손상에 따른 현저한 ATP 합성의 감소를 약용식물의 추출물이 이를 개선시켜 에너지 대사를 증가시킴으로써 세포사멸을 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 특히, 건울의 추출물의 경우에는 세포의 증식율은 가장 우수하지는 않았지만, ATP의 합성은 다른 약용식물에 비하여 농도 의존적으로 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 석창포의 경우에도 10 µg/ml에서 에너지량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 반면, 물추출물에서 세포의 증식율이 가장 좋았던 목과의 경우에는 미토콘드리아에서의 에너지(ATP) 양을 유의하게 증가시키지는 못하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 그리고 약용식물의 80% 에탄올추출물의 경우에도 건울에서 에너지의 생성량이 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 나타났으며 목과의 경우에도 에너지의 생성량을 증가시키는 것으로 나타났다. 반면 지황과 석곡의 물과 에탄올 추출물 경우에는 모두 세포의 증식을 증가시키지는 하였으나, 에너지 생성에서는 유의한 결과를 얻지 못하였다. 뇌졸중에서 허혈성 자극에 따른 혈관 장벽 밀착결합 부위 손상을 통한 혈장의 유출은 조직부종을 발생시키고 결국 관류장애로 인해 신경세포에서 산소를 이용한 에너지 대사 장애를 초래하여 신경세포 손상 및 사멸을 유도하게 된다³²⁾. 따라서 약용식물 추출물의 허혈성 손상에 따른 에너지대사 장애의 극복은 신경세포 손상 및 사멸을 차단함으로써 뇌졸중과 같은 질환을 극복하는데 좋은 약물이 될 수 있음을 의미한다.

이상의 결과로부터 약용식물의 추출물은 허혈·재관류 손상으로부터 세포를 보호함으로써 세포증식을 유도하며, 미토콘드리아에서의 에너지(ATP) 양을 증가시키고, 세포사멸 유도분자의 발현을 억제함으로써 뇌 신경세포를 보호하는 것으로 나타났으며, 또한 이러한 약용식물에 대하여 향후 활성물질을 탐색하여 신경세포 사멸에 미치는 영향에 대하여 추가적으로 연구가 이루어진다면 뇌 허혈로 유발되는 뇌신경 관련 질환 및 퇴행성 뇌질환에 대하여 뇌 신경 보호약물로 활용할 수 있을 것이라 본다.

결론

본 연구에서는 뇌 신경세포인 SK-N-SH 세포에서 sodium azide와 2-deoxy-D-glucose 처리에 따른 허혈·재관류 손상에 따른 세포사멸에서 약용식물의 물추출물과 80% 에탄올 추출물의 세포증식 및 에너지 증가에 따른 신경보호효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다

1. 약용식물의 물추출물과 80% 에탄올추출물은 SK-N-SH 세포에서 대부분 독성을 나타내지 않았다.

2. 약용식물의 물추출물과 80% 에탄올추출물 중 건울과 목과, 지황에서 SK-N-SH 세포의 허혈·재관류로 인한 손상으로부터 세포 증식을 유도하였다.
3. 약용식물의 물추출물과 80% 에탄올추출물 중 건울과 목과에서 SK-N-SH 세포의 허혈·재관류로 인한 에너지(ATP) 감소를 유의성 있게 증가시켰다.

따라서 약용식물의 물추출물과 80% 에탄올추출물은 신경세포에서 세포증식과 에너지 생성 증가를 통해 세포사멸로부터 신경세포를 보호하였으며, 이는 허혈성 손상으로 부터 뇌신경을 보호함으로써 뇌졸중과 같은 각종 뇌 질환 치료제 개발 소재로 활용될 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 한국한의학연구원 위탁연구개발사업 연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kalaria RN, Ballard, Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia, *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 1999 ; 13(suppl3) : S115-23
2. Shah S, Tangalos EG, Petersen R, Mild cognitive impairment: When is it a precursor of Alzheimer's disease?, *Geriatrics*, 2000 ; 55 : 65-8
3. Omodeo-Sale F, Granigna D, Camoaniello R, Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: effect of chronic alcohol consumption, *Neurochem*, 1997 ; 22 : 557-82
4. Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP, Evidence for neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease, *Am J Pathol*, 1996 ; 149 : 21-8
5. Choi WH, Oh YS, Ahn JY, Kim SR, Ha TY, Antioxidative and protective effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* extracts on glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cells, *Korean J Food Sci Technol*, 2005 ; 37 : 479-83.
6. Kurogi M, Bessho Y, Shokuhin Sogo Kenkyujo, Kenkyu Hokoku (Report of National Food Research Institute), 1980 ; 36 : 33-7.
7. Choi OB, Kim KM, Yoo GS, Park KH, Anti-allergic effect of *Castanea crenata* leaf tea, *Korean J Food Sci Technol*, 1998 ; 30: 468-71.
8. Kwon EJ, Kim YC, Kwon MS, Kim CS, Kang WW, Lee JB, Chung SK, Antioxidative activity of solvent fraction and isolation of antioxidant compound from chestnut husk, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2001 ; 30 : 726-31.
9. Nha YA, Yang CB, Change of constituent components

- in chestnut during storage. *Korean J Food Sci Technol* 1996 ; 28 : 1164–70.
10. Kim SK, Jeon YJ, Kim YT, Lee BJ, Kang OJ. Sensory evaluation and retrogradation properties of chestnut mook. *J Korean Soc Food Nutr.* 1995 ; 24 : 601–5.
 11. Cho SH, Sung NK, Ki WK, Hur JH, Shim KH, Chung DH. Effect of blanching on the prevention of discoloration in the thermal-treated chestnut power. *J Korean Soc Food Nutr.* 1988 ; 17 : 211–4.
 12. Lee SI, Ahn DG, Shin MK, Lee YG. *Oriental medicine clinical applications.* Seoul : Seongbosa, 1986 : 182–3, 357–8.
 13. Lee CB. *Forest economics–mokchoganagmok.* Korean plant map. Seoul : Hyangminsa, 1982 : 29
 14. Chung TY, Cho DS, Song JC. Nonvolatile/volatile flavor components in chinese quince fruits, *Chaenomeles sinensis* Koehne. *Korea J Food Sci Technol.* 1988 ; 20 : 293–302
 15. Song JC, Cho EK, Park HJ. Studies of manufacture of mixed beverage drinks using chinese quince and apple. *Food Eng Prog.* 2002 ; 6 : 38–45
 16. Lee DH, Kim JH, Kim NM, Choi JS, Lee JS. Physiological functionality of chinese quince wine and liquors. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 2002 ; 17 : 266–70
 17. Kim YS, Lee SW, Lee KR, Kim SK, Cho SY, Lee JH. Studies on tasty constituents in various foodstuffs. Part 1. Tasty constituents of chinese quince. *Korea J Food Sci Technol.* 1971 ; 3 : 163–7
 18. An DG. *Korean herbal illustrated book.* Seoul : 2003 : 307–50
 20. National Chinese Medicine Bureau. *Chinese herbal.* Shanghai, Shanghai Science and Technology Publisher : 1999.
 21. Shih CK, Son YJ, Lee YJ. Changes in the carbohydrate contents of *Rehmanniae Radix* during processing. *Kor J Herbology.* 1999 ; 14 : 1–11.
 22. Hong SP, Kim YC, Kim KH, Park JH, Park MK. Characteristic component of *Rehmanniae radix* Preparata compared to *Rehmanniae radix* and *Rehmanniae radix Crudus*. *J Korean Soc Anal Sci.* 1993 ; 6 : 401–4.
 23. Park SJ, Park HS, Yoo SO. Effects of supplementation of *Rehmannia radix* on performance and physiological status in broiler chicks. *Korean J Poult Sci.* 1998 ; 25 : 195–202.
 24. Chen LZ, Feng XW, Zhou JH. Effects of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide b on T-lymphocytes in mice bearing sarcoma 180. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1995 ; 16 : 337–40.
 25. Tomoda M, Miyamoto H, Shimizu N, Gonoda R, Ohara N. Two acidic polysaccharides having reticuloendothelial system-potentiating activity from the raw root of *Rehmannia glutinosa*. *Biol Pharm Bull.* 1994 ; 17 : 1456–9.
 26. Tomoda M, Miyamoto H, Shimizu N. Structural features and anti-complementary activity of rehmanna SA, a polysaccharide from the root of *Rehmannia glutinosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1994 ; 42 : 1666–8.
 27. *Herbology department of all-korea oriental medicine collge.* *Herbology.* Seoul, Yongrimsa : 2004 : 647–9
 28. Park SD, Lee GH, Lee YS, Kwun YK, Park JH, Choi SM, Shin SW. Comparison of Immunomodulatory Effects of Water-extracted *Adenophorae Radix*, *Liriodopsis Tuber*, *Dendrobii Herba*, *Polygonati Odorati Rhizoma* and *Polygonati Rhizoma*. *Kor J Ori Med Physiol Pathol.* 2007 ; 21(2) : 414–24.
 29. Min HB, Roh SS, Seo HS. Effects of *Dendrobii herba* and *Punica granatum* Extract on the Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Anti-wrinkle and Whitening. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2010 ; 22(3) : 11–32
 30. Yoon MY, Kim JY, Hwang JH, Cha MR, Lee MR, Jo KJ, Park HR. Protective Effect of Methanolic Extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H₂O₂-induced Neurotoxicity in PC12 cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2007 ; 50(1) : 63–7.
 31. Oh TW, Park KH, Lee MY, Choi GY, Park YK. Effects of the water extract from *Achyranthis Radix* on serum-deprivation-induced apoptosis in PC12 cells and transient cerebral middle artery occlusion-induced ischemic brains of rats. *Kor J Herbology.* 2012 ; 27(2) : 77–83.
 32. Tabakman R, Jiang H, Shahar I, Arien-Zakay H, Levine RA, Lazarovici P. Neuroprotection by NGF in the PC12 in vitro OGD model: involvement of mitogen-activated protein kinases and gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 ; 1053 : 84–96
 33. Cohadon F, Rigoulet M, Averet N. Alterations of membrane-bound enzymes in vasogenic edema. In: Go KG, Baethmann A (eds) *Recent progress in the study and therapy of brain edema.* New York Plenum : 1983 : 223–32.
 34. Lee HG, Kim YS. Effects of *Salvia Miltiorrhiza Radix* on Neuronal Apoptosis following Intracerebral Hemorrhage of Rats. *Kor J Herbology.* 2012 ; 27(3) : 89–94.
 35. Kirno T, Tamura A, Aano K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol(Beri).* 1984 ; 64 : 139–47.

36. Torii K, Sugiyama S, Takagi K, Satake T and Ozawa T. Age-related decrease in respiratory muscle mitochondrial function in rats. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 1992 ; 6 : 88-92.
37. Heo J. Dongeubogam, Seoul. Bubin publishers : 2005 : 1886.
38. Noh JR. Antioxidant effects of the chestnut (*Castaneaescrata*) inner shell extract in t-BHP-treated HepG2 cells, and CCl4 and high-fatdiet-treated mice. *Fddf Chenm Toxicol*. 2010 ; 48 : 3177-83.
39. Lee SW. The effect of Extract from Taeumjowe-tang and Coicis Semen *Castaneae* Semen on Palmitic-acid induced lipotoxicity in HepG2 cell, Kyung Hee University, 2011.
40. Lee JD. The effects of dendrobii herba against intracerebral hemorrhage in rat. Kyung Won University, 2011.
41. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharmaceut Bull*. 1996 ; 19 : 1518-20.