

歸脾湯이 Glutamate에 의한 C6 glial Cell의 Apoptosis에 미치는 영향

강익현, 이 인, 한상혁¹⁾, 문병순¹⁾

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 원광대학교 한의학전문대학원¹⁾

Effects of *Gwibitang* on Glutamate-induced Apoptosis in C6 Glial Cells

Ik-Hyun Kang, In Lee, Sang-hyok Han¹⁾, Byung-Soon Moon¹⁾

Department of Circulatory internal medicine and Professional Graduate School¹⁾
of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives : The water extract of *Gwibitang* (GBT) has been traditionally used for treatment of psychologic disease and brain damage in Oriental Medicine. This study was designed to investigate the effect of GBT on the glutamate-induced toxicity of rat C6 glial cells.

Methods : The cultured cells were pretreated with GBT and exposed to glutamate. The cell damage was assessed by using MTT assay and Hoechst, JC-1 staining.

Results : GBT had protective effects in glutamate-induced cytotoxicity, which was revealed as apoptosis characterized by chromatic condensation and the loss of mitochondrial membrane potential in C6 glial cells. However, GBT and glutamate had no effect in the activation of caspase family cysteine proteases including caspase-3, -8 and -9 proteases in C6 glial cells. GBT significantly recovered the depletion of GSH and inhibited the generation of H₂O₂ by glutamate in C6 glial cells. In addition, both GBT and antioxidants such as GSH and NAC protected the glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells, indicating that GBT possibly has antioxidative effect. Moreover, GBT also inhibited the glutamate-induced degradation of IκBα in C6 glial cells. This result suggest that GBT has some inhibitory effects on the transcriptional activation of NF-κB.

Conclusions : GBT has protective effects in glutamate-induced cytotoxicity via an antioxidative mechanism. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(4):45-57)

Key Words: *Gwibitang*(GBT), C6 glial cells, glutamate, antioxidant

서론

歸脾湯은宋代嚴¹⁾의《濟生方》에 “治思慮過度 勞傷

心脾 健忘 怔忡”이라고 기록된 이래 주로 心脾兩虛로 인한 失眠, 心悸, 怔忡, 健忘 등을 치료하는데 사용되어 왔으며^{2,9)}, 최근에는 뇌신경계질환, 혈액질환, 부인과 질환 및 심인성 질환 등에 광범위하게 활용되고 있다^{7,9)}.

중추신경세포 손상은 세포막의 파괴, 세포의 팽창, 용해를 동반하는 괴사와 glutamate에 의한 흥분독성, 이온통로를 통한 칼슘의 세포내 유입, 산소자유기에

· 접수 : 2001년 8월 17일 · 채택 : 9월 27일
· 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신룡동 344-2 원광대 익산한방병원 2내과
(Tel. 063-850-2102, Fax: 063-841-0033, E-mail: moonbs58@hanmail.net)

의한 산화성 손상, acidosis 등의 다양한 생체내의 생화학적 기전이 단독 또는 복합적으로 작용하는 apoptosis에 의하는 것으로 보고되고 있다^{10,11)}. 특히, glutamate는 중추신경계의 흥분성 신경전달물질로서 신경세포 사이에서 정보를 전달하는 역할을 담당하지만 신경독소로서도 작용한다. 즉 신경세포가 허혈성 손상을 입게 되면 신경말단에서 glutamate를 포함한 신경전달물질이 과다하게 유리되고 신경교세포에 의한 재흡수가 감소하여 glutamate가 신경연접부위에 축적되어 신경세포의 손상을 초래하게 된다^{11,13)}.

따라서 뇌신경계질환, 혈액질환 등에 광범위하게 활용되고 있는 歸脾湯이 glutamate에 의한 중추신경세포의 산화적 손상에 일정한 효과가 있을 것으로 사료되어 본 연구를 시행하였다.

최근 歸脾湯에 대한 실험적 연구로는 항스트레스 효과¹⁴⁾, 지혈작용과 자궁수축작용¹⁵⁾, 수면시간연장과 진정진통작용¹⁶⁾, 肝의 TPA치 감소와 혈압강하작용¹⁷⁾, 면역증강작용¹⁸⁾ 등이 보고되고 있다.

이에 저자는 歸脾湯이 중추신경세포에서 glutamate에 의한 세포손상에 미치는 방어효과를 실험적으로 구명하고자 과량의 glutamate에 의해 유도된 생쥐의 배양 신경교세포인 C6 glial 세포의 손상에서 MTT assay, 형광현미경적 조사, Hoechst staining, Western blotting 등의 방법으로 歸脾湯이 세포생존율, 염색사의 응축과 핵 분절, 미토콘드리아, caspase 활성화도, GSH contents, H₂O₂의 생성, 전사활성인자의 활성화에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

C6 glial 세포는 흰쥐 신경교세포로서 한국 세포주은행(KNCC, 서울대학교)에서 분양 받아 계대 배양하면서 실험을 실시하였다.

2) 약재

실험에 사용한 歸脾湯의 처방내용은 《東醫寶

鑑》⁹⁾에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 익산 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 1貼의 내용과 분량은 다음과 같다.

3) 시약 및 기기

Prescription of Gwibitang

韓藥名	生藥名(學名)	重量(g)
當歸	Radix Angelicae gigantis(Angelica gigas Nakai)	3.750
龍眼肉	Arillus Longanae(Euphoria longan Steud)	3.750
酸棗仁	Semen Zizyphi spinosae(Zizyphus spinosa Hu)	3.750
遠志	Radix Polygalae(Polygala tatarinowi Regel)	3.750
人蔘	Radix Ginseng(Panax schinseng Ness)	3.750
黃芪	Radix Astragalii(Astragalus Membranaceus Bunge)	3.750
白朮	Rhizoma Atractylodis macrocephala(Atractylodis macrocephala Koidz)	3.750
白茯苓	Poria(Poria cocos Wolf)	3.750
木香	Radix Saussurea(Saussurea lappa Clarke)	1.875
甘草	Radix Glycyrrhizae(Glycyrrhizae uralensis Fisch)	1.125
生薑	Rhizoma Zingiberis(Zingiber officinale Rosc)	6.500
大棗	Fructus Zizyphi jujubae(Zizyphus jujubae Mill)	3.000
Total amount		42.500

DMEM(dulbecco's modified eagle's medium), glucose-free DMEM, FBS(fetal bovine serum), 항생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL Co.(Grand Island, NY, U.S.A.)로 부터 구입하였으며, 배양용기(24 well plate와 10cm dish)는 Falcon Co.(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 세포 및 핵 염색과 관찰에 이용한 slide chamber는 Nunc Co.(Germany)로 부터 구입하여 사용하였다. MTT (methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide), Hoechst 33258, BCA(bicinchoninic acid), glutamate, GSH(reduced glutathione), NAC(N- acetyl-L-cysteine), SDS(sodium dodesyl sulfate), DMSO(Dimethyl sulfoxide), scopoletin(7-hydroxy-6-methoxy-2-H-1- benzopyran-2-one), HRP(horse radish peroxide)는 Sigma(St. Louis, Missouri, U.S.A.)로 부터 구입하였고, JC-1은 Molecular probes(U.S.A.)로 부터 구입하였다. AMC(7-amino-4- coumarin)-DEVD(asparatic acid-glutamic acid-valine- asparatic acid), caspase 8의 기질인 Z-IETD-AFC, caspase 9의 기질인 Ac-LEHD-AFC 등은 Calbiochem Co.(San Diego, CA, U.S.A.)로 부터 구입하였으며, IkB α 에 대한 항체는 Santa Cruz(Santa

Cruz, CA, U.S.A.)로 부터 구입하였다.

2. 방법

1) 검액조제

검액은 歸脾湯 4貼 분량인 170g을 3,000ml 환저 플라스크에 증류수 1,500ml와 함께 넣은 다음, 120분간 가열하여 얻은 전탕액을 여과지로 여과한 후 5,000rpm으로 30분간 원심분리하고 rotary vacuum evaporator에 넣어 감압농축한 다음 동결건조기로 완전히 건조하여 25g을 얻었다. 시료는 eppendorf tube에 100mg/ml를 DMSO로 녹여서 냉장 보관하면서 사용시에는 DMEM에 희석하여 사용하였다.

2) C6 glial 세포의 배양

원취 신경교세포인 C6 glial 세포는 한국 세포주은행(KNCC, 서울대학교)에서 분양 받아 10% FBS가 포함된 DMEM 세포배양액으로 5% CO₂, 95% 대기 공기 및 37℃ 세포배양기에서 10cm 세포배양판에 배양하였다. 24시간 간격으로 trypsin/EDTA를 사용하여 계대배양 하였으며, 배양액을 교체한 후 log phase에 있는 세포를 사용하였다.

3) 세포생존율 측정

세포생존율은 MTT assay¹⁹⁾를 이용하였다. C6 glial 세포를 24wells 세포배양판에 1×10⁶cells/ml씩 분주하여 24시간 배양판에 부착시키고, glutamate와 검액 및 항산화제 등을 전처리한 후 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 살아있는 세포에 의해 MTT로부터 생성된 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 540nm 파장에서 분광광도계(THERMO max, U.S.A.)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) 핵 염색

세포핵의 형태를 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다. 먼저 4% formaldehyde 용액으로 세포를 고정시킨 다음, PBS로 2번 세척하고 Hoechst 33258을 10μM로 희석하여 10분 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 관찰하였으며, 역상 광학 현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용하여 10×10의 배율로 사진을 촬

영하였다.

5) 미토콘드리아 염색

미토콘드리아의 핵으로의 이동과 형태를 관찰하고자 JC-1(1μM)을 사용하여 세포를 염색하였다. 검액과 glutamate를 처리한 세포의 배양액을 버린 후 차가운 PBS로 세척하였으며, C6 glial 세포에 JC-1(1μM)을 처리하고 세포배양기에서 10분간 반응시킨 다음, PBS로 3번 세척한 후 역상 형광 현미경으로 10×40의 배율로 사진을 촬영하였다.

6) GSH contents 측정

C6 glial 세포를 6cm 세포배양판에 2×10⁶cells/ml씩 분주하여 세포배양기에서 24시간 배양하여 안정화시킨 후 검액과 glutamate를 처리하였다. 세포 배양액을 제거한 후 차가운 10% trichloroacetic acid(TCA)를 400μl씩 분주하여 10분 반응시켰다. TCA에 의해 용출된 분획을 모아 원심 분리한 후 상청액은 3M NaOH를 사용하여 중성 pH로 조정하였다. 상청액 50μl에 250μl의 5,5'-dithionitrobenzoic acid(0.1M phosphate buffer, pH7.4 및 5mM EDTA 0.96mg/ml)와 250μl의 NAPDH(0.59mg/ml)와 450μl의 glutathione reductase(5U/ml)를 첨가하고 실온에서 10~15분 반응시킨 다음, 분광광도계를 이용하여 412nm에서 GSH contents를 측정하였다.

7) H₂O₂ 생성 측정

C6 glial 세포를 6cm 세포배양판에 2×10⁶cells/ml씩 분주한 다음 24시간 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. 시약 처리된 세포의 상청액을 모아 96 wells 세포배양판에 각각 100μl씩 분주하고 0.2~0.4μM HRP와 1~2μM scopoletin을 실온에서 10분 반응시켰다. 생성된 H₂O₂에 의해 감소된 scopoletin의 형광을 대조군과 비교하여 fluorometer(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA)로 405/510nm의 파장에서 측정하여 대조군에 의한 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

8) Caspase family cysteine protease 활성도 측정

C6 glial 세포를 4℃에서 30분 파쇄용액(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 1mM phenylmethylsulfonyl

fluoride(PMSF), 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH8.0)으로 파쇄하여 14,000rpm으로 15분 원심분리를 하고 이때 얻어진 상청액은 bicinchronic acid(BCA) 용액에 30분 반응시켜 분광광도계를 이용하여 540nm에서 정량하였다. 정량하여 얻어진 100 μ g의 세포파쇄액은 caspase assay buffer (100 mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM DTT, pH7.5)에 희석되어 형광표지된 기질과 37 $^{\circ}$ C에서 30분 반응시킨 후 fluorometer로 각각의 caspase 활성도를 측정하였다. Caspase 3-like protease에 의한 AMC-DEVD의 절단 능력은 excitation wavelength (380nm)/emission wavelength (460nm)에서 caspase-8의 기질인 Z-IETD-AFC와 caspase-9에 의한 Ac-LEHD-AFC의 절단 능력은 405/510nm에서 측정하였다.

9) Western blotting analysis

배양된 C6 glial 세포에 시료를 처리한 후 세포를 포함한 다음 파쇄용액(50mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 2mM Na₃VO₄, 100 μ M phenylarsine oxide)으로 4 $^{\circ}$ C에서 파쇄하여 마찬가지로 BCA 용액에 의하여 동량으로 정량하여 2배의 sample buffer (5mM EDTA, 4% SDS(sodium dodesyl sulfate), 20% glycerol, 200mM Tris, pH6.8, 0.06% bromophenol blue)를 섞어 100 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 끓여 단백질을 변성을 유도하고 10% SDS-PAGE(sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 0.8mA/cm²의 전기를 걸어주면서 이동시킨 후 blocking buffer(5% skim milk)로 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. 1kBa에 대한 항체를 TBS에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated HRP(TBS로 1:3,000으로 희석, Amersham, England)와 상온에서 1시간 반응시켜 ECL kit(Amersham, England)를 사용하여 ECL film에 감광시켜 현상하였다.

10) 전사인자의 활성 측정

C6 glial 세포에 시료를 처리한 다음 세포를 포함하여 10mM HEPES, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 20 μ M pepstatin A, 0.1 mM antipain이 들어있는 저삼투압 용해용액과 얼음에서 10분 팽창시킨 후 1% Nonidet P-40에 반응시키고 상청액에 모아진 세포질액만을 버리고 pellet에 1:1 완충용액 A와 B를 넣어 핵에서 단백질을 모았다. NF- κ B(5'-CCG GTT AAC AGA GGG GGC TTT CCG AG-3)는 Rediprime kit (Amersham, England)을 사용하여 동위원소를 표지하였다. 5 μ g의 핵단백질과 동위원소에 표지된 NF- κ B probe는 실온에서 30분간 반응시킨 후 0.5 \times TBE 완충용액 안에서 4% polyacrylamide gel로 전기영동시켰다. 이 gel을 말린 후 X-ray 필름에 노출된 정도에 의해 NF- κ B의 활성도를 판정하였다.

11) 통계처리

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과로서 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며, p-value가 최대치 0.005이하의 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험성적

1. Glutamate에 의한 C6 glial 세포생존율의 변화

C6 glial 세포에 glutamate 15mM을 처리한 12시간 이후부터 세포생존율은 약 90%로 감소하여 유의성 있는 변화를 나타내기 시작하였고 시간이 경과함에 따라 생존율이 급격히 감소하는 것으로 나타났다 (Table 1).

또한 Glutamate를 5mM 농도로 처리한 경우에 세포생존율은 약 82%로 유의성 있는 변화를 나타내기 시작하였고 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 감소되었다(Table 2).

2. 歸脾湯이 세포생존율에 미치는 영향

Glutamate에 의해 약 50%로 감소되었던 세포생존율이 歸脾湯으로 전처리한 경우에는 유의성 있게 농

Table 1. Glutamate Induced the Death of C6 Glial Cells in a Time-dependent Manner

Time (hr)	Viability (%)
0	100±1.3
6	100±3.1
12	91±2.1*
18	75±2.1*
24	50±3.0*
30	28±1.5*

* p<0.005 by student's t-test, compared to control group

Table 2. Glutamate Induced the Death of C6 Glial Cells in a Dose-dependent Manner

Glutamate (mM)	Viability (%)
0	100±1.0
5	82±2.5 *
10	69 ±2.5 *
15	50 ±1.3 *
20	25 ±1.5 *

Cells were treated with various concentrations of glutamate for 24 hr. * p<0.005 by student's t-test, compared to control group

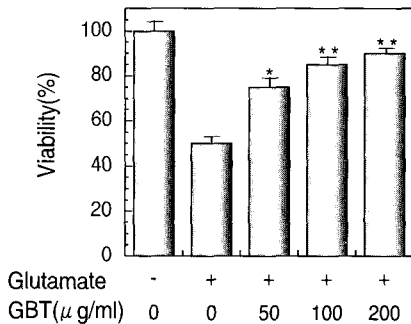


Fig. 1. *Gwibitang*(GBT) protected C6 glial cells from glutamate toxicity in a dose-dependent manner.

Cells were treated with various concentration of *Gwibitang* for 1hr and followed by the addition of 15mM glutamate for 24hr. * p<0.005, ** p<0.001 vs. only glutamate-treated group

도의존적으로 증가되었다(Fig. 1).

3. 歸脾湯이 형태학적 변화에 미치는 영향

Glutamate에 의해 유도된 C6 glial 세포고사에서 정상 대조군에서는 세포가 길게 뻗은 모양을 나타내지만(Fig. 2a) glutamate로 처리한 경우에는 세포가 수축된 모습을 나타내었으며(Fig. 2c), 歸脾湯으로 전처리한 경우에는 이러한 세포의 수축이 억제되어 정상대

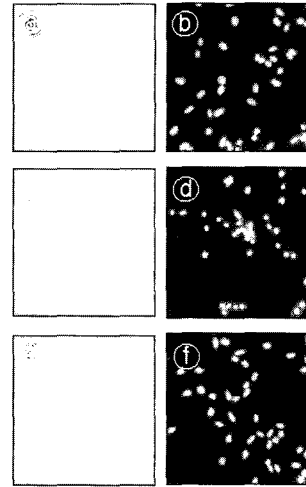


Fig. 2. *Gwibitang*(GBT) inhibited the glutamate-induced nuclear condensation of C6 glial cellsa, b: control cells, c, d: glutamate-treated cells, e, f: *Gwibitang*-pretreated cells with glutamate.

조군 세포의 모양과 유사하게 길게 뻗은 모양을 나타내었다(Fig. 2e).

또한 Hoechst 33258로 핵 염색을 이용한 관찰에서는 정상 대조군에서는 타원형이고 둥근 형태의 핵이 관찰되었으며(Fig. 2b), glutamate로 처리한 경우에는 세포고사의 형태학적 특징의 하나인 염색사의 응축 현상이 관찰되었으나 핵분절은 관찰되지 않았으며(Fig. 2d), 歸脾湯으로 전처리한 경우에는 이러한 염색사의 응축현상이 억제되었다(Fig. 2f).

4. 歸脾湯이 미토콘드리아의 변화에 미치는 영향

Glutamate에 의해 유도된 C6 glial 세포고사에서 정상 세포의 경우 미토콘드리아가 핵 주위로 분포되어 있으며 JC-1의 정상적인 색깔인 적색을 띄고 있지만(Fig. 3a), glutamate를 처리한 세포에서는 미토콘드리아가 핵 방향으로 많이 이동하였으며 색깔이 녹색으로 전환되었다(Fig. 3b). 그러나 歸脾湯을 전처리하고 glutamate를 처리한 세포군에서는 미토콘드리아의 위치가 정상세포와 유사하게 나타나면서 색깔도 적색에 가깝게 관찰되었다(Fig. 3c).

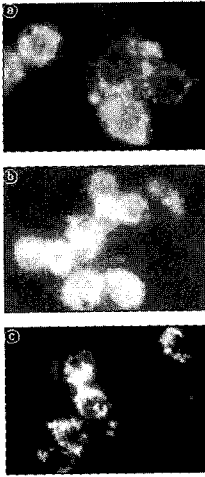


Fig. 3. *Gwibitang*(GBT) inhibited the glutamate induced mitochondrial membrane potential of C6 glial cells: control cells, b: glutamate-treated cells, c: *Gwibitang*-pretreated cells with glutamate.

5. 歸脾湯이 caspase-3, 8, 9 활성화에 미치는 영향
glutamate를 처리하고 시간이 경과하여도 caspase 3-like protease 활성에 변화가 없었으며, 歸脾湯을 전처리한 경우에도 마찬가지로 caspase 3-like protease 활성에 유의한 변화가 나타나지 않았다. 또한, caspase-3의 상위분자로서 caspase-3의 활성을 유도할 수 있는 개시 protease인 caspase-8과 caspase-9의 활성의 경우에도 유의한 변화가 나타나지 않았다 (Fig. 4).

6. 歸脾湯이 GSH contents의 변화에 미치는 영향
Glutamate를 처리한 후 시간이 경과함에 따라 GSH contents가 감소하기 시작하여 12시간이 경과하자 GSH의 level이 정상세포에 비해 약 40%로 감소되었으며, 그 이후로 거의 비슷한 수준을 유지하였다 (Table 3). 그러나 歸脾湯을 전처리한 경우에는 GSH level이 농도에 따라 유의성 있게 증가되었다 (Table 4). 또한, 대표적인 항산화제인 GSH와 NAC를 전처리한 후 glutamate를 처리한 경우 24시간 이후 세포 생존율이 유의성 있게 증가되었으며, 歸脾湯을 전처리한 경우에도 약 90%의 세포생존율을 나타내었다 (Table 5).

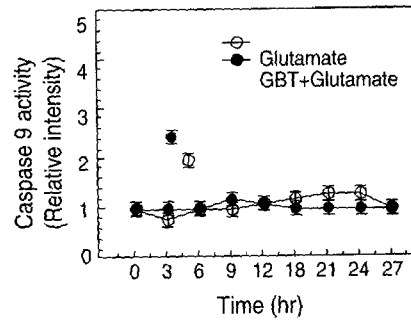
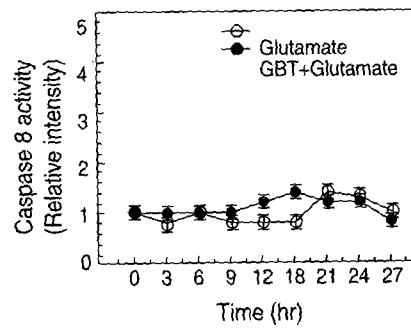
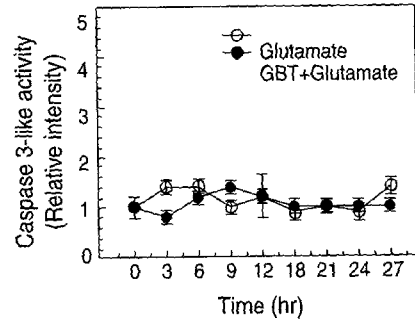


Fig. 4. *Gwibitang*(GBT) did not affect in the activation of caspase 3-like, 8, 9 protease in glutamate-treated C6 glial cells

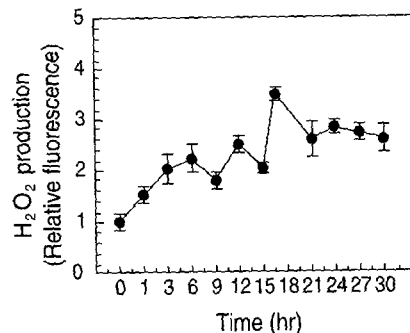


Fig. 5. Glutamate induced the generation of hydrogen peroxide(H₂O₂) in C6 glial cells

Table 3. Glutamate Decreased the Intracellular Contents of GSH of C6 Glial Cells in a Time-dependent Manner

Time (hr)	GSH contents(% of control)
0	100±2.5
3	86±3.0
6	88±3.4
9	70±3.6
12	40±2.9
15	35±5.0
18	34±4.3
21	32±2.8
24	33±5.3
27	34±4.3
30	33±5.0

Intracellular GSH levels were expressed as the percentage of control cells.

Table 4. *Gwibitang*(GBT) Recovered the Glutamate-induced Reduction of GSH Contents in a Dose-dependent Manner

GBT(μ g/ml)	Glutamate(15mM)	GSH contents(% of control)
0	-	100±2.0
0	+	33±3.4
50	+	36±2.6
100	+	50±4.0**
200	+	62±1.6**

Intracellular GSH levels were expressed as the percentage of control cells. ** p<0.001 by student's t-test, compared to only glutamate-treated group.

Table 5. Antioxidants, GSH and NAC protected C6 glial cells from glutamate-induced toxicity

Drugs	Glutamate(15 mM)	Viability (%)
-	-	100±3.0
-	+	50±2.9
GBT	+	90±3.5**
GSH	+	97±2.5**
NAC	+	95±4.1**

Cells were pretreated with antioxidants for 1hr and followed by the addition of 15mM glutamate for 24hr. Then, cells were washed with PBS and the viability was measured by MTT assay. Results represented as the mean(%) ±S.D. of three experiments. ** p<0.001 by student's t-test, compared to only glutamate-treated group.

7. 歸脾湯이 H₂O₂의 생성에 미치는 영향

C6 glial 세포에 glutamate를 처리하고 시간이 경과함에 따라 대조군에 비해 약 2-3배 정도의 H₂O₂가 생성되었으며, 24시간 이후에는 약간 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

그러나 歸脾湯을 1시간 전처리하고 glutamate를 처

리한 세포군에서 H₂O₂의 양이 대조군에 비해 감소하였으며 특히 歸脾湯 100 μ g/ml 농도부터 H₂O₂의 생성이 유의성 있게 감소되었다(Fig. 6).

8. 歸脾湯이 NF- κ B 전사활성인자의 활성화에 미치는 영향

Glutamate 15mM을 처리한 후 NF- κ B는 60분이 경과하자 활성을 나타내기 시작하였으며(Fig. 7), 또한 NF- κ B의 핵내 이동을 세포질에서 억제하는 단백질인 I κ B가 NF- κ B의 활성화 시간과 일치된 60분 이후부터 시간이 경과함에 따라 분해되었다(Fig. 8). 그러나 歸脾湯으로 전처리한 경우에는 농도의존적으로 glutamate에 의한 I κ B단백질의 분해가 억제되었다(Fig. 9).

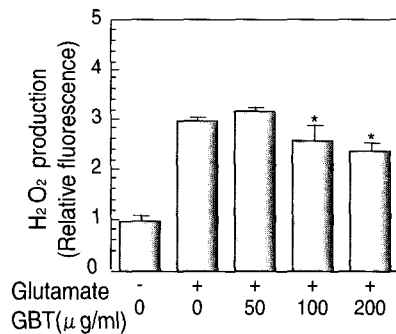


Fig. 6. *Gwibitang*(GBT) decreased the generation of hydrogen peroxide (H₂O₂) by glutamate in C6 glial cells * p<0.005 vs. only glutamate-treated group

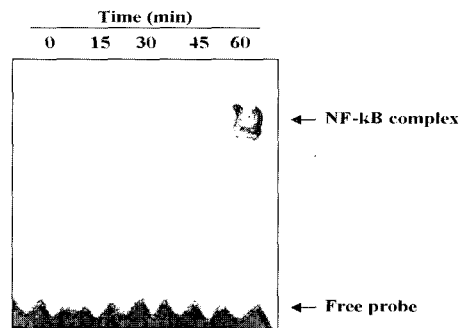


Fig. 7. Glutamate induced the transcriptional activation of NF- κ B in C6 glial cells



Fig. 8. Glutamate induced the degradation of Ikbα in C6 glial cells



Fig. 9. Gwibitang(GBT) recovered the degradation of Ikbα in glutamate-treated C6 glial cells

고 찰

歸脾湯은 宋代 嚴¹⁾의 《濟生方》에 처음 수록된 처방으로 思慮過度나 勞倦으로 心脾가 손상되어서 나타나는 健忘, 怔忡을 치료할 목적으로 입방되었으며, 元代의 危²⁾는 《世醫得效方》에서 《濟生方》의 주치증 외에도 脾가 손상되어 血을 통섭하지 못하여 발생하는 토혈, 하혈, 붕루, 대하 등에 활용하였고, 明代 薛³⁾은 《校註婦人良方》에서 當歸와 遠志를 가하여 경계, 정충, 심비작통, 기와, 소식, 대변부조, 지체중통과 사려로 脾가 손상되어 발생한 학질과 이질의 치료에도 사용한다고 하였다. 그 후 많은 의학자들⁴⁾은 주로 薛의 처방구성을 활용하여 心脾虛와 氣血虛弱으로 인한 실면, 심계, 정충, 건망 등을 치료하여 왔으며, 최근에는 뇌신경계질환, 혈액질환, 부인과 질환 및 심인성 질환 등에 응용되고 있다⁵⁾.

歸脾湯은 補氣劑인 四君子湯과 補血劑인 當歸補血湯에 養心安神하는 遠志, 酸棗仁, 龍眼肉과, 理氣醒脾하는 木香, 調和榮衛하는 生薑과 大棗로 구성되어 있으며 建脾益氣, 補血養心하는 효능이 있으므로 心脾虛證으로 인한 제질환에 활용되고 있다⁶⁾.

뇌에 대한 한의학적 인식은 《類經·失守失強者死篇》⁷⁾에서 “五臟六腑之精氣 皆上升于頭 以成七竅之用 故爲精明之府”라 하여 정신, 의식, 사유, 총명 등의 정신활동을 영위하는 오장육부의 정기를 간직하는 곳이며, 정신활동은 오장에서 주관하고 심이 총괄하는 것으로 인식되고 있다⁸⁾.

뇌의 병태생리에 대해서는 《靈樞·海論篇》⁹⁾에 “髓海有餘 則輕勁多力 自過其度髓海不足 則腦轉耳鳴 脛眩暈 目無所見 懈怠安臥…”라고 하여 뇌수의 충족여부가 정신 및 신체활동의 성쇠와 관련되어 있음을 기술하고 있으며, 뇌수의 기능이 실조되거나 감퇴되면 실면, 건망, 지능저하, 치매, 두통, 현훈, 이명 등의 임상증상이 나타난다고 하였고²³⁾, 그 원인은 心脾兩虛, 肝腎虛弱, 稟受不足, 痰瘀 등이 제시되고 있다²⁴⁾.

중추신경세포의 손상기전은 일반적으로 세포가 외부 자극에 의해 심각한 손상을 입었을 경우에는 세포막의 파괴, 세포의 팽창, 용해를 동반하는 괴사를 일으키지만 허혈성 뇌졸중, Alzheimer병, 파킨슨병 등과 같은 신경계질환에 있어서는 생체내의 다양한 생화학적 기전들이 작용하여 신경세포와 신경교세포의 고사를 초래하게 되는 것으로 알려져 있다^{11,25,26)}.

허혈성 뇌질환이나 대사성 뇌질환에서 중추신경세포 손상에 기여하는 물질은 여러 가지가 있으나 그 중 대표적인 것은 아미노산계의 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 가장 대표적인 물질이다²⁷⁾.

허혈성 손상 등의 병리적 외부 자극에 의해 신경조직에 산소 및 포도당의 공급이 줄어들면 ATP 관련 이온채널의 기능 손실에 의한 Ca²⁺과 같은 양이온의 세포내 유입으로 신경세포 탈분극이 발생하며, 신경말단에서 glutamate 등을 포함하는 신경전달물질의 유리가 증가하고 신경교세포에 의한 glutamate 재흡수가 감소하여 결과적으로 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 신경연접부위에 축적된다. Glutamate의 과도한 축적은 이온성 수용체인 AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-iso-xazolepropionic acid) 및 NMDA(N-methyl-D-aspartate) 수용체 등의 활성을 유도하며, 이로 인하여 신경세포의 고사가 초래된다^{11-13,28)}. 또한 활성산소종(reactive oxygen species)에 의한 산화적 손상이 신경독성 및 특정 유전자의 작용을 유도하여 세포고사를 일으키는 것으로 밝혀지고 있다²⁹⁾.

세포고사(apoptosis)는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리

현상의 하나인 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로, 괴사(necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적인 특징을 동반하는 유전자 활성화에 의하여 조절 받는 생리·병리과정이다³⁰⁾. 이러한 세포고사가 과소하게 발현되는 경우에는 암, 자가면역질환 등이 발생하고 과다하게 발현되는 경우에는 후천성 면역결핍증, 중추신경계의 퇴행성 질환이 발생하게 된다^(2,30,31) 최근 이러한 고사의 기전들이 점차 밝혀지고 있으며 중추신경계 세포고사에서 glutamate에 의한 흥분독성과 산화성 손상이 중요한 기전으로 연구되고 있다²⁹⁾.

이에 저자는 歸脾湯이 중추신경세포손상에 미치는 방어효과를 실험적으로 알아보기 위하여 생쥐의 배양 신경교세포인 C6 glial 세포에 과량의 glutamate에 의해 유도된 신경세포손상에서 MTT assay, 형광현미경적 조사, Hoechst staining, Western blotting 등의 방법을 이용하여 歸脾湯이 세포생존율, 염색사의 응축과 핵 분절, 미토콘드리아, caspase 활성화도, GSH contents, H₂O₂의 생성, 전사활성인자의 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

C6 glial 세포에서 glutamate에 의한 직접적인 세포독성을 알아보기 위하여 C6 glial 세포에 15mM의 glutamate를 처리하여 시간의 경과에 따른 세포생존율을 측정 한 결과 glutamate를 처리한 12시간 이후부터 세포의 독성이 관찰되었고, 24시간이 경과하자 세포생존율이 정상세포에 비해 50%가 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한 농도에 따라 glutamate를 24시간 처리하고 세포생존율을 측정 한 결과, 5mM glutamate 처리시 세포활성도가 대조군에 비하여 80%로 감소되기 시작하여 20 mM 처리시에는 30% 수준에 이르는 세포생존율을 나타내어 농도의존적으로 세포독성이 증가되었다.

이러한 C6 glial 세포에 미치는 glutamate의 세포생존율에 대한 歸脾湯의 효과를 알아보기 위하여 C6 glial 세포에 다양한 농도의 歸脾湯을 1시간 전처리하고 15mM의 glutamate를 24시간 처리하였다. 그 결과 glutamate에 의해 50% 이하로 감소되었던 세포생존율이 歸脾湯의 농도에 의존적으로 유의하게 증가되

어 200 μ g/ml농도의 歸脾湯을 전처리한 경우에는 90% 수준의 세포생존율을 유지하였다.

또한 glutamate 독성에 의한 C6 glial 세포의 형태학적인 변화와 이에 대한 歸脾湯의 효과를 알아보기 위하여 C6 glial 세포에 歸脾湯과 15mM의 glutamate를 처리하고 24시간이 경과한 후 광학현미경에 의한 관찰과 핵 염색을 시행하였다.

그 결과 광학현미경 관찰에서 정상적인 세포의 모양은 길게 뻗은 모양을 나타내지만 glutamate로 처리된 세포에서는 독성에 의하여 수축된 모습을 관찰할 수 있었으며, 歸脾湯 전처리시에는 이러한 세포의 수축이 억제되어 정상 대조군 세포와 유사하게 길게 뻗은 모양을 관찰할 수 있었다. 이러한 세포 모양의 변화와 함께 세포고사현상에 의한 핵 모양의 이상을 관찰하기 위하여 세포를 슬라이드에 4% formaldehyde로 고정하고 Hoechst 33258로 핵 염색을 시행하였다.

그 결과 정상 대조군에서는 타원형과 둥근 형태의 핵이 관찰되었으며, glutamate로 처리한 경우에는 세포고사의 형태학적 특징의 하나인 염색사의 응축현상이 관찰되었으나 핵 분절현상은 관찰되지 않았다. 그러나 200 μ g/ml의 歸脾湯을 1시간 전처리한 경우에는 이러한 염색사의 응축현상이 억제되었다.

Glutamate에 의해 유도된 세포고사에서 C6 glial 세포의 미토콘드리아 변화와 그에 대한 歸脾湯의 영향을 관찰하기 위하여 각각의 조건에 맞게 처리한 세포에 JC-1을 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다.

그 결과 정상 세포의 경우 미토콘드리아는 핵 주위로 분포되어 있으며, JC-1의 정상적인 색깔인 적색을 띄고 있었으나 glutamate를 단독 처리한 세포군에서는 미토콘드리아가 핵 방향으로 많이 이동하여 존재하며 녹색으로 색깔이 전환되었다. 그러나 200 μ g/ml의 歸脾湯을 1시간 전처리하고 15mM의 glutamate를 처리한 세포군에서는 정상세포와 근접하게 미토콘드리아의 위치가 선명하였으며 적색에 가깝게 관찰되었다. 이러한 결과는 glutamate의 세포독성은 미토콘드리아의 membrane potential의 손상을 유도하였으며 이러한 독성에 대하여 歸脾湯이 방어

효과를 나타내는 것을 의미한다.

Caspase family는 염증반응이나 포유동물의 세포 고사 기전에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로는 세포 내에 불활성 상태로 존재하다가 세포고사가 유도되면 활성화되어 세포고사의 집행자로서 역할을 수행한다.^{32,33)} 따라서 Hoechst 염색으로 glutamate의 세포독성 효과가 세포고사 기전에 의한 것임을 확인하였으므로 glutamate에 의한 세포고사도 caspase 활성화와 관계가 있는지 여부와 이에 대한 歸脾湯의 효과를 확인하기 위하여 C6 glial 세포에 glutamate를 처리하고 각각의 시간에 따른 caspase family cysteine protease-3, 8, 9의 효소적 활성을 조사하였다.

그 결과 caspase 3-like protease활성은 변화가 없었으며 歸脾湯을 처리한 경우에도 활성화에 아무런 영향을 주지 못하였다. 또한 caspase-3의 상위분자로서 caspase-3의 활성을 유도할 수 있는 개시 protease인 caspase-8과 caspase-9³³⁾의 활성을 측정하였으나 마찬가지로 caspase-8의 경우에도 歸脾湯과 glutamate에 의해 이들 각각의 정상대조군을 기준으로 caspase의 활성화에는 영향을 주지 못하였으며 caspase-9의 경우에도 정상 대조군에 비하여 큰 차이를 보이지 않았다.

Glutamate에 의해 유도된 C6 glial 세포고사에서 고사를 억제하는 歸脾湯의 작용기전을 연구하고자 glutamate에 의한 세포내 항산화제인 GSH level의 변화와 이에 대한 歸脾湯의 효과를 관찰하였다.

먼저 glutamate가 세포 내 GSH level에 직접적으로 어떤 영향을 주는지 관찰하기 위하여 C6 glial 세포에 15mM의 glutamate를 처리하고 세포 내 GSH level을 측정하였다.

Glutamate를 처리한 후, 서서히 GSH contents가 감소하기 시작하여 12시간이 경과하자 GSH의 level이 정상세포 수준에 비해 40% 이하로 떨어졌으며 이후 24시간부터 30시간까지 거의 비슷한 수준을 유지하였다. 이는 결국 glutamate로 인한 세포독성이 산화적 손상과 관련한 GSH의 contents 감소에 기인하고 있음을 의미한다. 그러나 歸脾湯으로 전처리한 경우에

는 감소된 GSH level이 정상대조군의 62% 수준까지 회복되었다. 이러한 결과는 glutamate에 의한 산화적 손상에 대하여 歸脾湯이 방어작용을 하고 있음을 나타낸다.

따라서 歸脾湯의 항산화작용을 통한 세포고사 억제작용을 확인하기 위하여 세포내의 대표적인 항산화제로 알려져 있는 GSH와 NAC에 의한 세포생존율과 歸脾湯에 의한 세포생존율을 비교 관찰하였다.

GSH와 NAC로 1시간 전처리하고 15mM의 glutamate를 처리하여 24시간 동안 세포생존율을 관찰한 결과, glutamate로 단독처리한 세포군과 비교하면 정상세포 수준인 각각 97%, 95% 세포생존율을 나타내었으며, 歸脾湯으로 전처리하고 15mM의 glutamate로 처리한 세포군은 세포생존율이 정상대조군의 90% 수준에 이르는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 glutamate로 인한 세포고사가 산화적 손상과 관련한 GSH level의 감소와 관련하고 있고 이러한 산화적 손상과정에 歸脾湯이 glutamate의 세포독성으로 감소된 GSH level의 감소를 억제하여 항산화제(antioxidants)의 역할을 함으로써 산화적 손상을 방어하고 있음을 알 수 있다.

현재 많은 연구들이 glutamate에 의한 세포독성이 신경세포 고사의 주요 기전이라고 시사하고 있지만, 이외에 직접적인 산화적 손상(oxidative stress)도 중추신경세포 고사의 중요한 기전의 하나로 논의되고 있다³⁴⁾. 이러한 신경세포 고사에 있어서 산화적 손상이 세포 내에서 어떠한 대사적 경로를 통하여 신경세포 고사를 일으키는지는 아직 명확히 알려져 있지 않다. 그러나 아마도 hydrogen peroxide 같은 자유라디칼(free radical) 생성에 의한 GSH level의 감소에 기인하는 것으로 보여지며, 이러한 자유라디칼에 의한 산화적 손상은 일반적 세포노화에 관련되고 이러한 세포손상 기전들이 단독 또는 복합적인 기전으로 작용함으로써 세포고사를 초래하여 신경계 질환들이 유발된다고 보고되고 있으므로 glutamate로 유도된 활성산소종(reactive oxygen species)의 세포 내 직접적인 독성기전은 중요하다.

한편 glutamate에 의한 GSH level의 감소와 GSH,

NAC의 전처리에 의한 세포생존율의 회복은 활성산소종의 연관 가능성을 내포하며 또한 이때 歸脾湯의 작용도 활성산소종과 깊은 연관성이 있음을 알 수 있다. 따라서 glutamate로 인한 산화적 손상에 활성산소종이 관여하는지를 알아보기 위하여 glutamate를 처리하고 세포 내 H₂O₂의 생성을 직접 측정하였다.

C6 glial 세포에 15mM의 glutamate를 처리하고 3시간이 경과하자 정상세포군에 비해 2배 정도의 H₂O₂가 생성되었으며, 시간이 지남에 따라 서서히 증가하던 H₂O₂의 양이 12시간이 경과하면서 2.5배 정도로 증가하였고, 18시간이 경과하면서 3배 이상의 H₂O₂가 생성되었으며, 24시간이 지나면서 서서히 감소하였다. 이는 C6 glial 세포에 미치는 glutamate의 세포독성이 산화적 손상과 관련한 활성산소종의 생성에 의한 것임을 의미한다. 또한 이러한 활성산소종의 생성에 대한 歸脾湯의 효과를 확인하기 위하여 200µg/ml의 歸脾湯을 1시간 전처리하고 15mM의 glutamate를 처리한 세포군에서 H₂O₂의 양이 glutamate를 단독처리한 세포군에 비해 2.2배 수준으로 감소되었으며, GSH나 NAC를 1시간 전처리한 세포군에서도 마찬가지로 H₂O₂의 생성이 유의성 있게 감소되었다. 이 결과는 C6 glial 세포에 미치는 glutamate의 세포독성이 산화적 손상과 관련한 활성산소종의 생성으로 인하여 중추신경세포를 고사시키는 작용을 하고 여기에 歸脾湯이 항산화 역할을 함으로써 산화성 손상을 방어하고 glutamate의 세포독성을 억제하고 있음을 나타낸다.

최근 들어 transcription factor인 nuclear factor kappa B(NF-κB)의 활성이 흥분독성에 의한 신경세포의 고사과정에 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(34,35). NF-κB는 많은 단백질의 발현을 조절하는 프로모터(promotor)에 위치하는 전사인자 결합부위에 존재한다. NF-κB의 활성화는 각기 다른 자극에 의해 발생하는 세포고사에 저항성을 나타내는 것으로 보고되고 있으나, 신경세포나 glial 세포에서는 세포고사 유도에 직접적으로 관련이 있음이 보고되고 있다. NF-κB의 기본구조는 주 subunit인 RelA(p65)와 p50의 heterodimer로 이루어져 있는데, IκB의 ankyrin

domain은 NF-κB의 Rel homology domain과 결합하여 세포질에 존재한다. 산화적 손상과 관련한 free radical, 성장단백질 등을 처리하면 세포질에 있는 IκB의 인산화 및 분해가 일어나고 이어서 NF-κB는 자유로운 상태로 되어 p65-p50 heterodimer의 상태로 핵으로 전이된다^{34,35}.

따라서 본 연구에서도 glutamate의 세포독성으로 인한 C6 glial 세포고사과정이 전사활성인자 NF-κB와 어떤 관련이 있는지를 알아보기 위하여 Western blotting으로 NF-κB의 활성을 측정하였다.

C6 glial 세포에 15mM의 glutamate를 처리하고 시간의 경과에 따른 NF-κB의 활성을 측정하였다. Glutamate를 처리한 후 NF-κB는 60분이 경과하자 활성이 보이기 시작하였으며, 120분에 이르자 좀 더 많은 활성을 보였고 시간이 더 지나면서부터 감소하기 시작하였다. 이는 glutamate로 인한 C6 glial 세포의 고사가 전사활성인자 NF-κB의 활성화와 관련이 있음을 의미한다.

또한 NF-κB의 핵내 이동을 세포질에서 억제하는 단백질인 IκB의 분해정도를 확인하기 위하여 C6 glial 세포에 15mM의 glutamate를 처리하고 시간의 경과에 따른 IκB의 변화를 측정하였다. 그 결과 NF-κB가 핵에서 활성화를 보이는 시간과 일치하게 60분 이후부터 IκB의 분해가 시간의존적으로 증가하였으며 이는 glutamate가 IκB의 분해를 유발하여 NF-κB를 핵내로 이동시킴으로써 세포고사작용을 나타냄을 의미한다. 또한 이러한 IκB의 분해에 대한 歸脾湯의 효과를 확인하기 위하여 다양한 농도의 歸脾湯을 전처리하고 15mM의 glutamate를 처리한 결과 IκB의 분해가 농도의존적으로 억제되었다. 이러한 결과는 歸脾湯의 효과가 NF-κB의 활성을 억제하는데 있음을 시사하는데 직접적으로 NF-κB활성을 억제하거나 또는 IκB의 분해를 억제하거나 활성산소종 생성을 억제함으로써 간접적으로 억제할 가능성을 나타낸다.

이상의 실험결과를 종합하면 glutamate는 시간, 농도의존적으로 C6 glial 세포에 독성을 나타냈으며, 歸脾湯은 glutamate에 의해 감소된 세포생존율을 농도의존적으로 증가시켰다. 이러한 歸脾湯의 신경세포

고사에 대한 방어효과는 염색사의 응축 현상, membrane potential의 손상, GSH contents의 감소, H₂O₂의 생성, IκB단백질의 분해 등을 억제하여 산화적 손상에 대한 방어작용을 나타내는 것으로 사료된다.

따라서 歸脾湯은 C6 glial 세포의 glutamate에 의한 세포고사에 보호효과가 있으므로 중추신경세포의 산화적 손상으로 인한 뇌졸중, Alzheimer병, 파킨슨병 등의 질환에 대하여 유용하게 활용될 수 있을 것으로 보이며, 작용기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

중추신경세포에서 glutamate에 의한 세포고사기전에 미치는 歸脾湯의 방어효과를 구명하고자 생쥐의 배양 신경교세포인 C6 glial세포에 과량의 glutamate에 의해 유도된 신경세포손상에서 MTT assay, 형광현미경적 조사, Hoechst staining, Western blotting 등의 방법으로 세포생존율, 염색사의 응축과 핵 분열, 미토콘드리아, caspase 활성도, GSH contents, H₂O₂의 생성, 전사활성인자의 활성에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 歸脾湯은 세포생존율을 농도의존적으로 증가시켰다.
2. 歸脾湯은 염색사의 응축현상을 억제시켰다.
3. 歸脾湯은 미토콘드리아의 핵 방향으로의 이동과 membrane potential의 손상을 억제시켰다.
4. 歸脾湯은 caspase 3-like, 8, 9 protease 활성에 유의한 변화를 주지 못하였다.
5. 歸脾湯은 GSH contents의 감소를 억제시켰다.
6. 歸脾湯은 H₂O₂의 생성을 억제시켰다.
7. 歸脾湯은 IκB 단백질의 분해를 농도의존적으로 억제시켰다.

이상의 결과로 보아 歸脾湯은 glutamate로 유발된 중추신경세포의 세포고사에 대하여 활성산소종의 발생을 억제하고 세포내 항산화제의 감소를 억제함으

로써 산화적 손상을 방어하는 효과를 나타내므로 뇌졸중, 치매 등의 뇌세포의 산화적 손상으로 인한 질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 嚴用和. 嚴氏濟生方. 北京:人民衛生出版社. 1980:117.
2. 薛 己. 薛氏醫案(文淵閣本)(卷1). 서울:驪江出版社. 1986:27.
3. 危亦林. 世醫得效方(文淵閣本)(卷7). 서울:驪江出版社. 1986:36-7.
4. 吳 謙. 醫宗金鑑. 北京:人民衛生出版社. 1980:117.
5. 朱震亨. 丹溪心法(卷10). 臺北:五洲出版社. 1981:6.
6. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1980:98.
7. 康舜洙. 巴耶方劑學. 서울:大成文化社. 1996:190-1.
8. 尹吉榮. 東醫臨床方劑學. 서울:名寶出版社. 1992:338-9.
9. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:醫聖堂. 1998:418-25.
10. 大韓神經外科學會. 神經外科學. 서울:中央文化社. 1997:15-7, 276-8.
11. Peter L. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol. Review.* 1999;70:1499.
12. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 1987;7:357-68.
13. Cho Y, Bannai S. Uptake of glutamate and cystein in C6 glioma cells and in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 1990;55:2091-7.
14. 柳敏烈. 歸脾湯 및 四物安神湯의 臨床效果에 關한 研究. 원광대학교 대학원. 1993.
15. 柳同烈. 歸脾湯 및 備金散 煎湯液이 실험동물의 止血作用과 摘出子宮筋에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 1987.
16. 李東鏡. 歸脾湯煎湯液이 睡眠時間 및 鎮痛作用에 미치는 影響에 關한 實驗的 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1970;2:163-70.
17. 鄭奉弼 外. 歸脾湯의 煎湯液이 家兔血壓 및 白鼠肝 TPA值에 미치는 影響에 關한 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1979;2:135-44.
18. 朴恩貞. 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 마우스의 過敏反應 및 免疫細胞의 機能에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 1990.

19. Kim YM, Talanian RV and Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increase in caspase-3 like activity via distinct mechanism. *J. Biol. Chem.*. 1997;272:311-38.
20. 張介賓. 類經(下). 서울:大成文化社. 1990:411.
21. 金完熙 · 崔達永 共編. 臟腑辨證論治. 서울:成輔社. 1985:286, 298-304.
22. 楊維傑. 內經靈樞譯解. 서울:大成文化社. 1990:104, 281-2.
23. 李京燮 外. 東醫心系內科學(上). 서울:書苑堂. 1995:36-7, 43-4.
24. 金利和. 癡瘓治療의 最近 研究動向에 關한 考察. 大韓鍼灸學會誌. 1997;14(2):115-26.
25. 지제근. 치매의 병리. *대한신경과학회지*. 1985;3(1):5-9.
26. 최진호. 노화의 메커니즘과 연구방향. *생화학뉴스*. 한국생화학회. 1985;5(3):39-53.
27. 서유현. 神經傳達物質. 서울:민음사. 1992:55-63.
28. Simon R, Swan J, Griffiths T, Meldrum B. Blockade of N-methyl-D- aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science*. 1984;226:850-2.
29. Coyle J and Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders, *Science*. 1993;262:689-95.
30. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol*. 1993;14:126-30.
31. Savitz S, Rosenbaum D. Apoptosis in neurological disease. *J. Neurosurgery*. 1998;42: 555-74.
32. Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur. J. Biochem*. 1998;254: 439-59.
33. Widmann C, Gibson S. Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J. Biol. Chem*. 1998;273(12):7141-7.
34. Baeuerle PA and Henkel T. Function and activation of NF- B in the immune system, *Ann. Rev. Immunol. Today*. 1994;12:141-79.
35. Siebenlist U, Franzo G and Brown K. Structure, regulation and function of NF- B. *Ann. Rev. Immunol*. 1994;12:405-55.