

# 산소자유기에 의한 척수운동세포 독성에 대한 羚羊角 추출물의 방어효과

강길성 · 권강범 · 류도곤\*

원광대학교 한의과대학 생리학교실

## Protective Effects of *Cornu Saigae Tataricae* Extracts on Cultured Spinal Motor Neurons Damaged by Oxygen Free Radical

Gil Seong Kang, Kang Beom Kwon, Do Gon Ryu\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

In order to clarify the neuroprotective effect of *Cornu Saigae Tataricae*(CST) water extract on cultured mouse spinal motor neuron damaged by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay, LDH (Lactate Dehydrogenase) activity assay and SRB (Sulforhodamine B) assay were carried out after the cultured mouse spinal motor neuron were preincubated with various concentrations of CST water extract for 3 hours prior to exposure of hydrogen peroxide. Cell viability of cultured mouse spinal motor neurons exposed to various concentrations of hydrogen peroxide for 6 hours was decreased in a dose-dependent manner. MTT50 values were 40 uM hydrogen peroxide. Cultured mouse spinal motor neurons in the medium containing various concentration of hydrogen peroxide for 6 hours showed increasing of LDH activity and decreasing of total protein synthesis. We know that hydrogen peroxide was toxic on cultured spinal motor neurons. Pretreatment of CST water extract for 3 hours following hydrogen peroxide prevented the hydrogen peroxide-induced neurotoxicity such as increasing of LDH activity and decreasing of total protein synthesis. These results suggest that hydrogen peroxide shows toxic effect on cultured spinal motor neurons and CST water extract is highly effective in protecting the neurotoxicity induced by hydrogen peroxide.

Key words : Cornu Saigae Tataricae, Hydrogen Peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), MTT, NR, LDH, SRB

### 서 론

羚羊角은 牛科(소과 ; Bovidae)에 속한 脊椎動物인 영양의 뿔로서 성미가 鹹, 寒 無毒하고 肝·心 二經에 작용하며 熄風止 癎·平肝潛陽·清熱解毒 등의 효능이 있어 中風, 驚癇抽搐, 子 癇, 頭痛, 頭暈, 目眩, 高熱神昏, 溫毒發斑, 癰腫瘡毒의 병증을 치 료한다. 실험적 보고에 의하면 解毒作用 및 鎮靜, 抗痙攣作用 등 이 있다고 보고되고 있다<sup>1,4)</sup>.

운동신경세포의 손상은 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)과 같은 운동신경원질환(motoneuron

disease, MND)의 병변을 초래하게 된다<sup>5)</sup> 따라서 이러한 운동신 경을 저해하는 병인은 많이 있겠지만 지금까지 알려진 바에 의 하면 산소자유기<sup>6)</sup>와 excitotoxic amino acids(EAAs)<sup>6)</sup> 및 신경성 장인자 (neurotrophoc factor, NTF)의 결핍<sup>7)</sup> 등이다, 특히 NTF는 MND를 비롯한 각종 신경세포의 분화를 촉진시킬 뿐만 아니라 세포의 손상으로부터 방어해 준다고 보고된 바 있으며, 이에 관 한 연구의 하나로 산소 자유기에 의하여 손상된 해마신경원의 퇴화가 NTF에 의하여 방어되었다는 보고가 이를 뒷받침해주고 있다<sup>7)</sup>. 최근 산소자유기의 신경세포손상에 대한 한약재 추출물 의 방어효과가 많이 보고되고 있으며<sup>8-19)</sup> 특히 손 등<sup>16)</sup>은 天麻 추 출물의 척수운동신경세포 손상에 대한 방어효과를 보고하였다. 그러나 鎮靜, 抗痙攣作用에 쓰이는 羚羊角<sup>2,4)</sup>의 척수운동신경세 포에 대한 보고는 접할 수 없었다.

\* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-6846

· 접수 : 2003/06/27 · 수정 : 2003/07/30 · 채택 : 2003/09/25

본 논문은 산소자유기 중의 하나인 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 배양한 척수운동신경세포에 처리한 후 세포독성을 MTT 정량을 이용하여 조사하였으며 羚羊角의 방어효과를 관찰하기 위하여 羚羊角 추출물을 배양 척수운동신경세포에 전처리한 후 hydrogen peroxide를 처리하여 hydrogen peroxide의 신경세포 독성에 대한 방어효과를 총 단백질양 (total protein)과 세포막에서 세포외로 누출되는 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성도를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태가 양호한 백서를 사용하였다.

### 2. 약제 제조 및 처리

#### 1) 전탕액의 제조 및 처리

본 실험에서 사용된 羚羊角은 원광대학교 부속익산한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였고 추출물의 제조는 羚羊角 200g에 3차 증류수 1.8L를 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 0.97g의 분말 시료를 얻었다.

#### 2) Hydrogen peroxide의 제조 및 처리

본 실험에 사용한 약제로는 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma)로서 각각 100 mM, 10 mM, 1 mM의 저장액을 만들어 냉장암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 3. 세포배양

척수운동신경세포의 분리는 Zeman<sup>20)</sup>의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생후 1~3일된 백서에서 적출한 척수조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양완료 후 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3회 세척 후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 Poly-L-lysine(Sigma)으로 전처리된 96-multiwell에 3×10<sup>6</sup>cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양 후 본 실험에 사용하였다.

### 4. 세포독성 및 방어효과 검증

#### 1) MTT 정량

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma)> 정량은 Mosmann<sup>21)</sup>의 방법에 의하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 배양 신경세포를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후

dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 처리한 다음 ELISA Leader (Molecular Device, USA)로 570nm에서 흡광도를 측정후 대조군과 비교 조사하였다.

#### 2) Lactate Dehydrogenase(LDH) 활성도 조사

LDH 활성도의 측정은 최적화된 LDH/LD procedure(Sigma Diagnostics)를 이용하여 하였으며 배양액의 일부를 사용하였다. 즉 phosphate buffer (pH 7.5)에 등몰농도의 NADH를 pyruvate로 환원시키는 반응을 이용한 것이다. 340nm의 흡광도의 감소율은 배양액의 LDH 활성도에 비례하게 됨을 이용하여 LDH 활성도를 측정하는 방법이다.

#### 3) Sulforhodamine B 정량<sup>22)</sup>

과산화수소나 羚羊角 추출물을 일정시간 동안 처리한 배양 척수운동신경세포에 0.4% sulforhodamine B(SRB)를 200 μl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 반응시킨 후 1.0% acetic acid로 3회 세척하였다. 세척 후 10 mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인후 ELISA Reader(Molecular Device, USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

### 5. 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

## 실험성적

### 1. 산소자유기의 독성효과

#### 1) MTT 정량

배양중인 척수 운동신경세포를 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>이 없는 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)로 3회 세척한 후 hydrogen peroxide가 1 μM에서 70 μM까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 6시간 배양한 후 이의 영향을 조사한 결과 처리한 과산화수소의 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였다. 특히 40 μM, 70 μM hydrogen peroxide의 처리에서는 대조군에 비하여 각각 51.7%(p<0.05), 43.1%(p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 1).

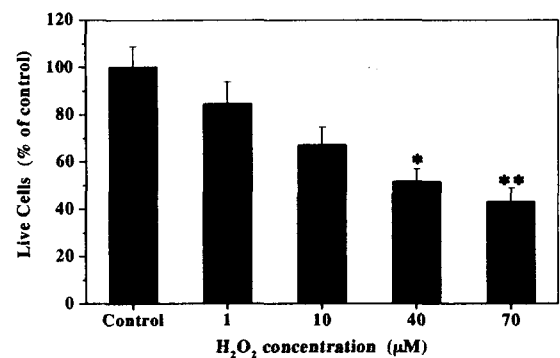


Fig. 1. Dose-dependency of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) by MTT assay. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in mouse spinal motor neurons. Cultured cells were treated with various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 hours. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

hydrogen peroxide의 배양시간에 따라 신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 40 uM hydrogen peroxide 농도에서 1-12시간 동안 배양한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포의 생존율이 감소하였으며 특히 6시간, 12시간에서는 대조군에 비하여 각각 52.6%(p<0.05), 21.2%(p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2).

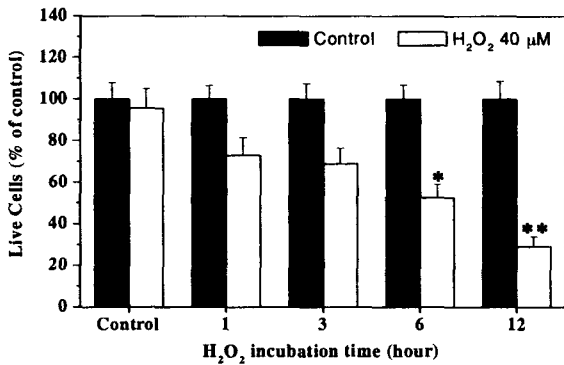


Fig. 2. Time-dependency of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) by MTT assay. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in mouse spinal motor neurons. Cultured cells were treated with 40 uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1, 3, 6 and 12 hours, respectively. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences between groups are marked with asterisks (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 독성에 대한 羚羊角의 효과

1) LDH 정량

(1) Hydrogen peroxide의 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 1~50 uM의 hydrogen peroxide가 각각 포함된 배양액에서 배양 척수 운동신경세포를 6시간 동안 처리한 후 세포배양액내로 유출된 LDH양을 대조군과 비교 조사하였다.

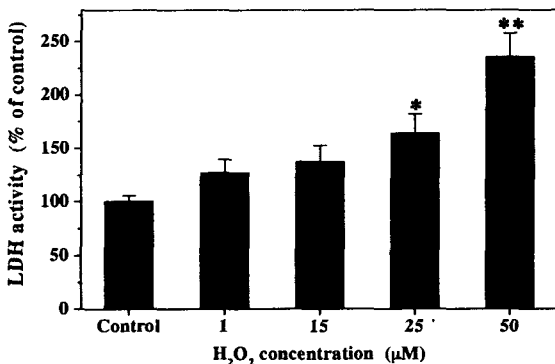


Fig. 3. Dose-dependency of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on LDH activity. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity was measured by LDH activity assay in cultured mouse spinal motor neurons. Cultured mouse spinal motor neurons were treated with various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 hours. LDH activity was measured as "material and method". The values are the mean±SE for 6 experiments. Control value of LDH activity is 15.8±1.3 mmol/mg protein. Significant differences from the control are marked with asterisks(\*p<0.05, \*\*p<0.01).

그 결과 1 uM hydrogen peroxide 처리에서는 대조군 100.0%(15.8±1.3 mmol/mg protein)에 비하여 126.6%로 나타났다. 또한 15 uM hydrogen peroxide 처리에서는 137.3%로 증가하는 경향을 나타냈으며 25 uM hydrogen peroxide, 50 uM hydrogen peroxide를 처리한 경우 각각 대조군에 비하여

163.9%(p<0.05), 235.4%(p<0.01)로 유의한 증가를 나타냈다. LDH 활성도의 MCV (midcytotoxicity value)값은 25 uM hydrogen peroxide의 처리에서 나타났다(Fig. 3).

(2) LDH 활성도에 대한 羚羊角 추출물의 영향

배양 척수운동신경세포에 대한 hydrogen peroxide의 산화적 손상에 있어서 羚羊角의 방어효과를 LDH 활성도측면에서 조사하기 위하여 hydrogen peroxide의 MCV값(midcytotoxicity value)인 25 uM hydrogen peroxide 농도에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15-120 ug/ml 羚羊角 추출물이 각각 포함된 배양액에서 처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 hydrogen peroxide를 처리하지 않고 羚羊角 추출물만을 농도별로 처리한 경우 대조군에 비하여 LDH활성이 약간 감소하였으며 세포독성은 나타내지 않았다. 25 uM hydrogen peroxide만을 처리한 경우 hydrogen peroxide를 처리하지 않은 대조군 100%(13.2±1.2 mmol/mg protein)에 비하여 216.7%로 LDH 활성도가 증가하여 세포독성을 나타냈다. 그러나 羚羊角 추출물을 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 방어효과를 나타냈다. 특히 120 ug/ml의 羚羊角 추출물의 전처리에서는 대조군에 비하여 126.1%(p<0.05)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 4).

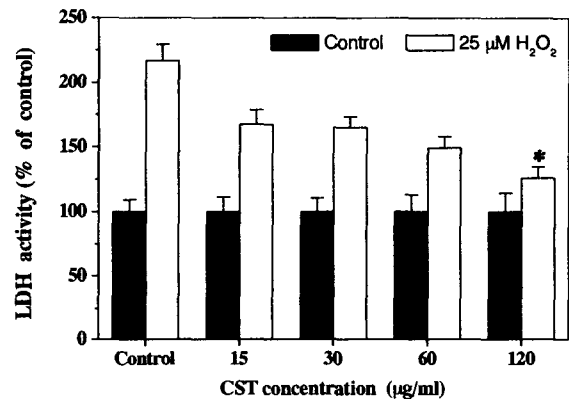


Fig 4. Effects of Cornu Saigae Tataricae (CST) for LDH activity increased by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Cultured mouse spinal motor neurons were pretreated with 15, 30, 60 and 120 ug/ml CST concentration for 3 hours, after then cultures were exposed to 25 uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 hours. LDH activity was measured as "material and method". The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated group are marked with asterisks(\*p<0.05).

2) SRB 정량

(1) Hydrogen peroxide의 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 배양 척수운동신경세포에 미치는 영향을 총단백질 함성량의 측면에서 조사하기 위하여 15 uM에서 120 uM까지의 hydrogen peroxide가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 후 hydrogen peroxide에 의한 총단백질 함성량의 변화에 대해 조사한 결과 처리한 hydrogen peroxide의 농도에 의존적으로 총단백질 함성량이 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 특히 60 uM와 120 uM hydrogen peroxide를 처리한 경우 총단백질 함성량은 대조군100%에 비하여 각각 50.6%(p<0.05)와 39.4%(p<0.01)로 나타나 유의하게 감소하였으며, MCV(midcytotoxicity value)값은 60 uM hydrogen peroxide처리에서 나타났다(Fig. 5).

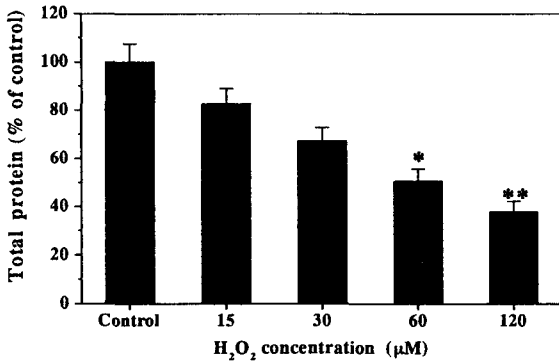


Fig. 5. Dose-dependency of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in total protein synthesis. Cultures mouse spinal motor neurons were exposed to 15, 30, 60 and 120 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 hours, respectively. Amount of total protein was measured by SRB assay (540nm), and shown as % 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)

(2) 총단백질 합성량에 대한 羚羊角 추출물의 영향

배양 척수운동신경세포에 대한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 총단백질 합성량의 감소에 대한 羚羊角의 방어효과를 조사하기 위하여 hydrogen peroxide의 MCV값(midcytotoxicity value)인 60 µM hydrogen peroxide 농도에서 6시간 동안 노출시키기 3시간 전에 30-90 µg/ml 羚羊角 추출물이 각각 포함된 배양액에서 처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 hydrogen peroxide만을 처리한 경우 총단백질 합성량의 변화는 hydrogen peroxide를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 38.6%로 감소하여 세포독성으로 인한 총단백질 합성량의 감소를 나타냈다. 그러나 hydrogen peroxide 처리에 앞서 羚羊角 추출물을 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 총단백질의 합성량이 증가하여 방어효과를 나타냈다. 특히 70 µg/ml, 90 µg/ml 羚羊角 추출물을 전처리한 경우 대조군에 비하여 82.6%(p<0.05), 88.4%(p<0.05)로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 6).

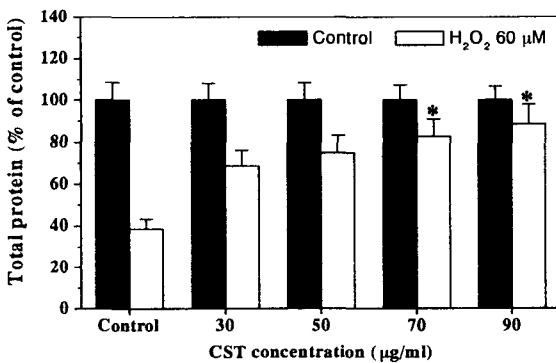


Fig 6. Effects of Cornu Saigae Tataricae (CST) for total protein synthesis decreased by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Cultured cells were preincubated with 30, 50, 70 and 90 µg/ml CST for 3 hours, respectively. After then, cultures were exposed to 60 µM for 6 hours. Amount of total protein was measured at wavelength of 540nm. The results indicate the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated group are marked with asterisks. (\*p<0.05)

고 찰

본 논문은 산소자유기중의 하나인 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의해 손상된 배양 척수운동신경세포가 羚羊角

추출물을 처리하여 방어효과를 나타내는지 조사한 논문이다. 산소자유기는 저산소증이나 허혈과 같은 병적인 상태에서 비정상적으로 생성된 산소자유기는 세포막의 지방을 과산화시킬 뿐만 아니라 각종 효소나 단백질을 불활성화시킴으로써 세포 및 조직의 손상을 초래하여 중추신경계를 비롯하여 말초신경계에 영향을 미쳐 근위축성측삭경화증이나 파킨슨씨병과 같은 신경질환을 유발하는 병인으로 밝혀지고 있다<sup>23-26</sup>. 그래서 이들 병변에 대한 치료적 측면에서 산소자유기에 의한 신경세포의 산화적손상에 대한 작용규명과 병리적 현상을 밝히기 위하여 많은 연구가 이루어져 왔다<sup>27</sup>. 또한 최근에 한약재가 산소자유기에 대하여 방어효과가 있다는 보고가 되고 있다<sup>8-19</sup>. 羚羊角은 牛科(소과; Bovidae)에 속한 脊椎動物인 영양의 뿔로서 성미가 鹹, 寒 無毒하고 肝·心 二經에 작용하며 熄風止癲·平肝潛陽·清熱解毒 등의 효능이 있어 中風, 驚癇抽搐, 子癇, 頭痛, 頭暈, 目眩, 高熱神昏, 溫毒發斑, 癰腫瘡毒의 병증을 치료한다고 알려져 있다<sup>1-4</sup>.

본 실험은 Mihalis 등의 보고<sup>28</sup>)에 근거하여 hydrogen peroxide를 처리하여 세포에 독성을 나타내는지 MTT assay를 이용하여 관찰하였으며 羚羊角의 방어효과를 관찰하기 위하여 羚羊角 추출물을 배양 척수운동신경세포에 3시간 동안 전처리한 다음 hydrogen peroxide에 시간 동안 노출시킨 후 LDH 활성도, 총단백질 합성량의 측면에서 관찰하였다. 또한, hydrogen peroxide의 세포독성의 유발여부를 관찰하기 위하여 여러농도의 hydrogen peroxide가 포함된 배양액에서 척수운동신경세포를 1-12시간 동안 배양한 후 MTT 분석법에 의하여 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 hydrogen peroxide의 처리농도와 시간에 비례하여 유의하게 세포의 생존율이 감소하였다(Fig. 1-4). 특히 MTT 분석법에서 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 6시간 동안 처리에서 MCV값(midcytotoxicity value)이 나왔다. 그리고 hydrogen peroxide의 산화적 손상에 대한 羚羊角 추출물의 방어효과를 조사하기 위하여 백서에서 순수 분리하여 배양한 척수운동신경세포에 hydrogen peroxide를 처리한 후 羚羊角 추출물의 효과를 LDH 활성도 측면에서 조사한 결과 hydrogen peroxide는 배양 척수운동신경세포에 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 증가하여 세포에 독성을 나타냈으며 25 µM MCV값을 나타냈다(Fig. 3). 그리고 25 µM hydrogen peroxide를 6시간 동안 운동신경세포에 처리하기 전 15-120 µg/ml의 羚羊角 추출물이 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 전처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 hydrogen peroxide에 의해 증가한 LDH 활성도가 감소하여 방어효과를 나타냈다. 특히 120 µg/ml 羚羊角 추출물의 처리에서는 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 4). 또한, 총단백질 합성량의 조사를 위한 SRB 분석에 있어서 여러농도의 hydrogen peroxide가 포함된 배양액에서 배양 척수운동신경세포를 6시간 동안 배양한 후 총단백질 합성량을 조사한 결과 hydrogen peroxide의 처리농도에 비례하여 감소하였으며 MCV는 60 µM hydrogen peroxide 처리에서 나타났다(Fig. 5). 한편 60 µM hydrogen peroxide를 6시간 동안 신경세포에 처리하기 전 30-90 µg/ml의 羚羊角 추출물이 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 처리 한 경우 처리한 농도에 비례하여 총 단백질양의

증가를 보였다. 특히 70 ug/ml, 90 ug/ml 羚羊角 추출물의 처리에서는 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 6).

이상의 실험 결과를 종합해보면 羚羊角 추출물이 hydrogen peroxide와 같은 산소자유기의 산화적 손상에 의한 척수운동신경세포 독성에 대하여 효과적으로 방어하는데 LDH 활성도를 감소시키고 총단백질 합성량의 증가를 통하여 방어효과를 나타내는 것으로 사료된다. 앞으로 羚羊角 추출물의 항산화효과를 in vivo 실험방법을 통하여 검증하고 기전연구를 밝히는 것이 필요하리라 사료된다.

## 결론

羚羊角이 산소자유기에 의한 신경독성을 방어하는 효과를 구명하기 위하여 신생 흰쥐에서 분리 배양한 척수운동신경세포를 여러 농도의 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 포함된 배양액에 羚羊角 추출물을 3시간 동안 전처리한 다음 羚羊角이 배양 척수운동신경세포에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Hydrogen peroxide는 척수 운동신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포의 생존율을 현저히 감소시켰다. Hydrogen peroxide는 척수 운동신경세포에 LDH 활성도의 증가와 총단백질 합성량의 감소를 통하여 세포에 독성을 나타냈다. 羚羊角 추출물은 hydrogen peroxide에 의하여 유발된 LDH 활성도의 증가를 유의하게 방어하였다. 羚羊角 추출물은 hydrogen peroxide에 의하여 유발된 총단백질 합성량의 감소를 유의하게 방어하였다.

이상의 결과로서 hydrogen peroxide는 신생백서로부터 분리한 배양 척수운동신경세포에 신경독성을 보였으며 羚羊角은 이러한 신경독성에 대하여 방어효과를 나타냄으로서 항산화제로서 개발 가능성을 보여주었으며 이에 대한 다른 지표나 기전구명에 있어 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

## 감사의 글

본 논문은 2003년도 원광대학교 교비 지원에 의해 이루어진 것임.

## 참고문헌

1. 辛民教 : 臨床本草學. 서울. 영림출판사. pp.621-622, 1997.
2. 왕유생 : 中藥藥理應用, 北京, 人民衛生出版社, pp.207-211, 264-277,460-462,927-930,933-937,1110-1113,1213-1217, 1983.
3. 李尙仁 : 韓藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.42-44,65-66,92-93, 323-327, 417-418,430 -432, 481-482, 1990.
4. 金珍熙 : 羚羊角散이 鎮痙, 解熱, 鎮痛, 鎮靜 및 GABAergic system에 미치는 影響, 원광대학교 대학원, 1995.
5. Rosen D., Siddique T., Patterson D., Figlewix D., Sapp P., Hentati A., Deng H., Rahmani Z., Krizus A. : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature, 362:59-62. 1993.

6. Rothstein J. D., Tsai G., Kunel R. W., Clawson S., Cornblath D. R., Drachman D. R., Pestronk A., Stauch B. L., Coyle J. T. : Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. 28: 18-25, 1990.
7. Jackson G. R., Apfell L., Werrbach-Perex K., Perex-Polo J. R. : Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balanced and neuronal injury. 1. Stimulation of hydrogen peroxide resistance. J. Neurosci. Res. 25:360-368, 1990.
8. 최환석, 권강범, 이호섭, 류도곤 : XO/HX에 의해 損傷된 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 加味十全大補湯의 效果, 대한동의생리병리학회지 15(1):67-72, 2001.
9. 권영달, 정상필, 송용선, 류도곤 : 附子半夏湯 煎湯液이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 損傷된 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 影響, 대한동의생리병리학회지 15(1):143-149, 2001.
10. 송왕기, 권강범, 이호섭, 김희찬, 김우경, 오광수, 안효창, 류도곤 : 活絡丹 전탕액이 Hydrogen Peroxide에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포의 LDH 활성도에 미치는 효과, 대한동의생리병리학회지 15(3):464-468, 2001.
11. 성은경, 권강범, 이호섭, 김희찬, 김우경, 오광수, 김영운, 금경수, 류도곤 : 解語丸 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포에 미치는 효과, 대한동의생리병리학회지 15(3):477-482, 2001.
12. 권영달, 산병철 : 獨活寄生湯 및 白屈菜가 손상된 배양척수감각신경세포에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지 15(6): 998-1005, 2001.
13. 이민주, 이영보, 최규선, 산병철, 권영달, 송용선:白僵蠶 전탕액이 Hydrogen Peroxide에 의해 손상된 배양 척수운동신경세포에 미치는 효과, 대한동의생리병리학회지 15(6):955-960,2001.
14. 이창호, 권강범, 장승호, 송용선, 류도곤 : 加味補中益氣湯이 GLUCOSE OXIDASE에 의해 損傷된 培養 脊髓感覺神經細胞의 총단백질 합성량에 미치는 影響, 대한동의생리병리학회지 16(1):141-145, 2002.
15. 김형수, 이용석, 이환봉, 손일홍, 이은미, 손영우, 최유선, 이정현, 이강창, 류명환, 송호준, 성강경, 박승택, 이갑상, 류도곤 : Hydrogen Peroxide에 의하여 손상된 배양 척수운동신경세포에 대한 천마의 영향에 관한 연구, 대한동의생리병리학회지 16(1):150-153, 2002.
16. 손일홍, 이정현, 김상수, 이강창, 이영미, 홍기연, 문형배, 박승택, 한두석, 신민교, 송호준, 류도곤 : 천마가 산소자유기로 손상된 생쥐의 배양 척수 운동신경세포에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지 16(2):262-266, 2002.
17. 이창호, 권강범, 박준수, 송용선, 류도곤 : 加味補中益氣湯이 培養 脊髓感覺神經細胞의 LDH 활성도에 미치는 影響, 대한동의생리병리학회지 16(2):343-347, 2002.
18. 양홍수, 권강범, 송용선, 류도곤 : 全蝎 煎湯液이 XO/HX에 의해 損傷된 培養 脊髓感覺神經細胞에 미치는 效果, 대한동의생리병리학회지 16(3):553-556, 2002.
19. 박광수, 권강범, 성은경, 송용선, 류도곤 : 鎮肝熄風湯 煎湯液

- 이 GO에 의해 損傷된 培養 脊髓感覺神經細胞의 LDH 活性도에 미치는 影響, 대한동의생리병리학회지 16(3):563-566, 2002.
20. Zeman S, Liyod C, Meldrum B, Leigh PN.: Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neurons disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20:219-231, 1994.
  21. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63, 1983.
  22. Zhi Xiu Lin, J. R. S. Hoult, Amala Raman : Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vililigo. *J. of Ethnopharmacology*, 66:141-150, 1999.
  23. Harber F., Weiss J. : The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by anion salts. *Proc. Roy. Soc. London A.* 147:333-351, 1934.
  24. Graf E., Mahoney J. R., Bryant R. G. and Eaton J. W. : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation: Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.* 259:3620-3624, 1984.
  25. 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)* p.362,59, 1993.
  26. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp.16-20,223-226,268, 270,283-285, 1980.
  27. Kikuchi S. and Kim S. U. : Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in cultures. *J. Neurosci. Res.* 36:558-569, 1993
  28. Mihalis P., Orestes T., Dimitrios G. : Glucose oxydase-produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces Ca<sup>2+</sup>-dependent DNA damage in human peropheral blood lymphocytes. *Free Radical Biology & Medicine* 26:548-556, 1999.