18 β -Glycyrrhetic acid가 lipopolysaccharide에 의한 생쥐 뇌조직의 염증성 사이토카인과 해마신경세포 자연사에 미치는 영향

이지승^{1#}, 권만재¹, 권수현¹, 김지호¹, 문지영¹, 조윤정¹, 신정원¹, 이종수², 손낙원^{1*}

1 : 경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공, 2 : 경희대학교 한의과대학 한방재활의학과

Effects of 18 β -glycyrrhetic acid on pro-inflammatory cytokines and neuronal apoptosis in the hippocampus of lipopolysaccharide-treated mice

Ji-Seung Lee^{1#}, Man-Jae Kwon¹, Su-Hyeon Kweon¹, Jeeho Kim¹, Ji-Young Moon¹,
Yoon-Cheong Cho¹, Jung-Won Shin¹, Jong-Soo Lee², Nak-Won Sohn^{1*}

1 : Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University,

2 : Department of Rehabilitation Medicine, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : 18 β -Glycyrrhetic acid (18betaGA) is an metabolite of glycyrrhizin in *Glycyrrhiza* (licorice). The present study investigated anti-inflammatory and anti-apoptosis effect of 18betaGA on the brain tissue of lipopolysaccharide (LPS)-treated C57BL/6 mice.

Methods : 18betaGA was administered orally with low (30 mg/kg) and high (100 mg/kg) doses for 3 days prior to LPS (3 mg/kg) injection. Pro-inflammatory cytokines mRNA including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, and inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA were measured in the cerebral cortex, hippocampus, and hypothalamus tissue using real-time polymerase chain reaction at 24 h after the LPS injection. Histological changes of Cornu ammonis area 1 (CA1) neurons, Bax, Bcl-2, and caspase-3 expression in the hippocampus was also evaluated by immunohistochemistry and Western blotting method.

Results : 18betaGA significantly attenuated the up-regulation of TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA, and COX-2 mRNA expression in the brain tissues induced by the LPS injection. 18betaGA also significantly attenuated the reductions of the thickness of CA1 and the number of CA1 neurons. The up-regulation of Bax protein expression in the hippocampal tissue by the LPS injection was significantly attenuated, while the ratio of Bcl-2/Bax expression was increased by 18betaGA treatment. 18betaGA also significantly attenuated the up-regulation of Bax and caspase-3 expression in the CA1 of the hippocampus.

Conclusion : This results indicate that 18betaGA has anti-inflammatory and anti-apoptosis effect under neuroinflammation induced by the LPS injection and suggest that 18betaGA may be a beneficial drug for various brain diseases accompanied with the brain tissue inflammation.

Key words : 8 β -Glycyrrhetic acid, Pro-inflammatory cytokines, lipopolysaccharide, Hippocampus, Neuronal apoptosis

*Corresponding author : Nak-Won Sohn, Dept. of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University.

· Tel : +82-31-202-2747 · E-mail : sohnw@khu.ac.kr

#First author : Ji-Seung Lee, Dept. of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, acup99@hanmail.net

· Tel : +82-31-202-2747 · E-mail : stardom0419@naver.com

· Received : 10 October 2016 · Revised : 28 October 2016 · Accepted : 16 November 2016

I. 서 론

甘草(*Glycyrrhiza*, licorice)는 콩과에 속한 다년생 초본인 감초(*Glycyrrhiza glabra* L.과 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 또는 동속식물의 뿌리를 건조한 약재로 다양한 염증성 질환에 응용되어 왔으며¹⁾, 신경세포 손상 보호효능에 대해서도 많은 연구들이 이루어졌다^{2,3)}. 또한甘草의 신경세포손상 보호효능은 사포닌 성분 중 하나인 glycyrrhizin (GRZ)이 소화기계통 내에서 가수분해된 대사체인 18 β -glycyrrhetic acid (18betaGA)에 의한다는 보고가 있다^{3,4)}. 18betaGA는 지질과산화를 억제하는 항산화 작용⁵⁾, 사이토카인 분비를 억제하는 항염증 작용⁶⁾과 미세아교세포 활성화를 억제하는 중추신경염증 억제작용⁷⁾ 등을 통해 신경세포 손상을 보호하는 것으로 보고되고 있다. Mizoguchi 등⁸⁾의 연구에 의하면, 18betaGA는 혈액뇌관문(blood-brain barrier)을 통과하여 뇌조직에 들어가며, 해마에서 가장 높은 비율로 작용한다고 하였다. 한편으로 해마조직 신경세포 손상에 대해 GRZ의 작용은 많이 연구 보고되어 있으나⁹⁻¹²⁾, 18betaGA의 작용과 기전에 대한 *in vivo* 연구는 최근 Oztanir 등⁵⁾의 뇌허혈에 대한 연구보고와 Zhou 등⁷⁾의 자가면역성 뇌척수염에 대한 연구보고 이외에는 찾아보기 어렵다.

뇌조직에서 염증성 사이토카인의 과도한 증가와 미세아교세포의 활성화는 만성적인 뇌조직 염증의 가장 큰 특징 중 하나로서¹³⁾, 수면과 식이 등 중추신경계 작용에 따른 생리적 행동의 변화는 물론 질병행동(sickness behavior)을 유발하고 각종 뇌질환을 악화시키는 이차적인 요인이 된다^{14,15)}. 그러므로 뇌조직 염증에 대한 한약성분의 효능과 작용기전 연구는 다양한 급만성 뇌질환은 물론 퇴행성뇌질환의 예방과 치료에 활용될 수 있는 한약물에 대한 유용한 기초적인 자료를 제공한다.

본 연구에서는 18betaGA가 중추신경염증 상태에서 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향을 관찰해보고자 하였다. 생쥐에 lipopolysaccharide (LPS)를 복강주사하는 방법으로 중추신경염증을 유발하고, 대뇌피질과 해마 및 시상하부 뇌조직에서 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6의 mRNA, 염증매개 효소인 cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA 발현과 해마조직에서 Bax와 Bcl-2 발현의 변화를 통해 신경세포 자연사에 대한 영향을 관찰한바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 나라바이오테크(Nara Biotechnology, Korea)에서 구입한 25-28 g의 수컷 C57BL/6 생쥐를 사용하였다. 실험동물의 사육과 처치는 00대학교 실험동물윤리위원회의 방침과 동물실험관련 규정을 따랐으며, 실험에 사용한 생쥐는 온도(21-23°C), 습도(40-60%)와 조명(12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료를 자유롭게 공급하며 사육되었고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물 및 투여

본 실험에 사용한 18 β -glycyrrhetic acid (18betaGA, Fig. 1)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 1일 1회 3일간 각각 30 mg/kg 또는 100 mg/kg을 생리식염수에 녹여 경구투여 하였다.

Fig. 1. Chemical structure of 18 β -glycyrrhetic acid.

3. 실험군의 구분

생쥐를 무작위로 4개 군으로 구분하였다. 정상군(Normal)은 약물처리 없이 통상적으로 사육하였으며, 대조군(LPS)은 LPS 3 mg/kg을 복강주사 하였다. 18betaGA를 투여한 군은 이전의 *in vivo* 연구들^{5,7)}에서 사용한 용량을 참고하여 저농도군(18betaGA-L)과 고농도군(18betaGA-H)으로 구분하였으며, 18betaGA-L군은 30 mg/kg, 18betaGA-H군은 100 mg/kg의 18betaGA를 LPS의 복강주사 3일전부터 1일 1회 경구투여 하고, 3일째 경구투여 1시간 후에 LPS 3 mg/kg을 복강주사 하였다. 실험동물은 각 군 당 12마리씩 총 48마리의 실험동물이 사용되었으며, 무작위로 6마리는 면역조직화학염색으로, 6마리는 real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) 실험용 및 Western blotting 실험용으로 사용하였다.

4. 뇌조직의 처리

실험동물을 tiletamine과 zolazepam으로 마취한 상태에서 RT-PCR 실험용 생쥐는 단두로 희생시키고 뇌를 적출한 다음, 대뇌피질과 해마 및 시상하부의 뇌조직으로 분리하였다. 조직 염색용 생쥐는 개흉하고, 심장을 통하여 0.05 M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출하여 24시간 정도 post-fixation 하고, sucrose 용액에 담귀 침전시킨 다음 뇌조직을 -40°C의 dry ice-isopentane 용액으로 동결시켰다. 동결조직은 cryocut (Leica, 2800N, Germany)으로 30 μ m 두께의 횡단절편으로 제작하여 조직염색에 사용하였다.

5. 염증성 사이토카인 mRNA의 RT-PCR 측정

대뇌피질과 해마 및 시상하부로 분리한 각각의 뇌조직으로

부터 Trizol (Qiagen, Germany)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 이후 1 μ g의 total RNA와 Script cDNA synthesis Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 DNA로 역전사하였으며, 정량적 real-time PCR은 CFX 96 REAL-TIME PCR Detection System (Bio-Rad, USA)에서 iQ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad, USA)와 preoptimized primer/probe mixture를 사용하여 측정하였다. Housekeeping gene으로는 β -actin을 사용하였으며, 측정에 사용된 gene의 primer sequence는 아래 Table 1과 같다. 이외 측정방법은 제조사의 사용설명서에 따랐으며, 각 시료로부터 측정된 mRNA 발현량은 Normal군의 측정치를 1로 하여 그 배수 (fold change)를 자료로 사용하였다.

Table 1. Primer sequences

TNF- α	forward	5'-TGA GAA GTT CCC AAA TGG C-3'
	reverse	5'-GCT ACA GGC TTG TCA CTC-3'
IL-1 β	forward	5'-TGA GCA CCT TCT TTT CCT TCA-3'
	reverse	5'-TTG TCT AAT GGG AAC GTC ACA C-3'
IL-6	forward	5'-AGA CTT CAC AGA GGA TAC CA-3'
	reverse	5'-GCA TCA TCG TTG TTC ATA CA-3'
COX-2	forward	5'-GCT GGC CTG GTA CTC AGT AGG TT-3'
	reverse	5'-CGA GGC CAC TGA TAC CTA TTG C-3'
β -actin	forward	5'-TTT CCA GCC TTC CTT GGG TAT G-3'
	reverse	5'-CAC TGT GTT GGC ATA GAG GTC TTT AC-3'

6. Western blotting

분리된 뇌조직을 각각 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail; Sigma, USA)에 넣어 균질화하고 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 단백질 총량은 Bradford 방법을 사용하여 정량하였으며, 50 μ g의 단백질을 포함한 표본을 SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 세분하고, Western blotting을 시행하였다. 1차항체는 anti-Bax (AB7977, Abcam, USA)와 anti-Bcl-2 (SC7382, Santa Cruz Biotechnology, USA)와 anti- β -actin antibody (MAB1501, Millipore, USA)를 사용하였다.

7. 뇌조직의 염색

해마 신경세포들의 조직학적 소견을 관찰하기 위해 0.5% cresyl violet 용액으로 염색하고 흐르는 물에서 수세하였으며, 이후 탈수하고 봉입하여 조직표본을 제작하였다. Bax와 caspase-3의 면역조직화학염색은 뇌조직 절편을 0.05 M PBS로 10분간 2회 씻어내고, 3% H₂O₂에서 30분간 반응시킨 다음 다시 2회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain, USA)과 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)을 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다.

이후 PBS로 2회 씻어 낸 후, rabbit anti-Bax antibody (1:200, ab7977, Abcam, UK)와 rabbit anti-caspase-3 antibody (1:300, BS1518, BioWorld, USA)를 1차항체로 사용하여 각각 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 반응시켰다. 이후 2차항체에 반응시키고, avidin-biotin complex (Vector Laboratories, USA) 방법에 따라 0.05% DAB (Sigma-Aldrich, USA)로 발색한 다음 통상적인 면역조직화학염색법에 따라 조직표본을 제작하였다.

8. 해마 신경세포의 관찰

각각 염색된 뇌조직을 CCD카메라(DP70, Olympus, Japan)가 장착된 광학현미경(BX51, Olympus, Japan)을 사용하여 영상을 저장하고, ImageJ software (Ver. 1.44p, NIH, USA)를 사용하여 해마의 CA1 구역에서 신경세포의 수, 면역염색 발현의 강도 등을 측정하였다. 각 실험동물 당 4장의 조직표본, 각 조직표본 당 4개의 시야에서 측정하여 그 평균값을 각 실험동물의 측정치로 사용하였다.

9. 통계처리

본 논문에 제시된 자료들은 mean $\pm$ standard error로 표시되었다. 각 자료의 통계적 유의성 검증은 Student's t-test를 사용하여 p<0.05 이상의 유의수준으로 검정하였다.

III. 결 과

1. 뇌조직 TNF- α mRNA 발현의 변화

대뇌피질, 해마 및 시상하부 조직에서 TNF- α mRNA 발현을 RT-PCR 방법으로 측정한 결과는 Table 2와 같다. LPS군은 Normal군에 비해 모든 조직에서 매우 높은 유의성(p<0.001)으로 TNF- α mRNA 발현이 증가하였으며, 18betaGA-L군은 LPS군에 비해 대뇌피질과 해마 조직에서는 유의한 변화가 없었고, 시상하부 조직에서만 TNF- α mRNA 발현 증가가 유의하게(p<0.05) 억제되었다. 18betaGA-H군은 LPS군에 비해 대뇌피질과 해마 조직에서는 p<0.05의 유의성, 시상하부 조직에서는 p<0.01의 유의성 있게 TNF- α mRNA 발현 증가를 억제하였다(Table 2).

2. 뇌조직 IL-1 β mRNA 발현의 변화

대뇌피질, 해마 및 시상하부 조직에서 IL-1 β mRNA 발현을 RT-PCR 방법으로 측정한 결과는 Table 3과 같다. LPS군은 Normal군에 비해 모든 조직에서 매우 높은 유의성(p<0.001)으로 IL-1 β mRNA 발현이 증가하였다. 18betaGA-L군은 LPS군에 비해 대뇌피질과 해마, 시상하부 조직 모두에서 유의한 변화가 없었고, 18betaGA-H군은 대뇌피질과 해마, 시상하부 조직 모두에서 LPS군에 비해 IL-1 β mRNA 발현 증가가 유의하게(p<0.05) 억제되었다(Table 3).

Table 2. Changes of TNF- α mRNA Expression in the Brain Tissue of Mice Treated with Lipopolysaccharide

Group	TNF- α mRNA (fold change)		
	Cerebral cortex	Hippocampus	Hypothalamus
Normal	1.1 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1
LPS	112.7 $\pm$ 12.8*	103.2 $\pm$ 13.7*	133.7 $\pm$ 16.7*
18betaGA-L	97.8 $\pm$ 13.3	89.2 $\pm$ 9.2	87.4 $\pm$ 9.1†
18betaGA-H	76.7 $\pm$ 9.2†	59.9 $\pm$ 7.4†	64.7 $\pm$ 7.6‡

Normal : group without the LPS injection and 18 β -glycyrrhetinic acid treatment.

LPS : group of LPS injection without 18betaGA treatment.

18betaGA-L : group treated with 30 mg/kg of 18betaGA prior to the LPS injection.

18betaGA-H : group treated with 100 mg/kg of 18betaGA prior to the LPS injection.

Data are presented as mean $\pm$ standard error (n = 6 in each group; student t-test between the Normal and LPS groups (*, p<0.001) and between the LPS and 18betaGA groups (†, p<0.05; ‡, p<0.01; §, p<0.001).

Table 3. Changes of IL-1 β mRNA Expression in the Brain Tissue of Mice Treated with Lipopolysaccharide

Group	IL-1 β mRNA (fold change)		
	Cerebral cortex	Hippocampus	Hypothalamus
Normal	1.2 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2
LPS	114.3 $\pm$ 12.7*	98.9 $\pm$ 10.7*	141.3 $\pm$ 20.7*
18betaGA-L	104.1 $\pm$ 13.2	90.3 $\pm$ 10.8	105.1 $\pm$ 12.7
18betaGA-H	80.5 $\pm$ 8.1†	67.2 $\pm$ 7.2†	86.3 $\pm$ 12.4†

Normal : group without the LPS injection and 18 β -glycyrrhetinic acid treatment.

LPS : group of LPS injection without 18betaGA treatment.

18betaGA-L : group treated with 30 mg/kg of 18betaGA prior to the LPS injection.

18betaGA-H : group treated with 100 mg/kg of 18betaGA prior to the LPS injection.

Data are presented as mean $\pm$ standard error (n = 6 in each group; student t-test between the Normal and LPS groups (*, p<0.001) and between the LPS and 18betaGA groups (†, p<0.05; ‡, p<0.01; §, p<0.001).

3. 뇌조직 IL-6 mRNA 발현의 변화

대뇌피질, 해마 및 시상하부 조직에서 IL-6 mRNA 발현을 RT-PCR 방법으로 측정된 결과는 Table 4와 같다. LPS군은 Normal군에 비해 모든 조직에서 매우 높은 유의성(p<0.001)으로 IL-6 mRNA 발현이 증가하였다. 18betaGA-L군은 LPS군에 비해 대뇌피질과 해마, 시상하부 조직 모두에서 유의한 변화가 없었고, 18betaGA-H군 역시 대뇌피질과 해마 조직에서는 유의한 변화가 없었으며 시상하부 조직에서만 LPS군에 비해 IL-6 mRNA 발현 증가가 유의하게(p<0.05) 억제되었다(Table 4).

4. 뇌조직 COX-2 mRNA 발현의 변화

대뇌피질, 해마 및 시상하부 조직에서 COX-2 mRNA 발현을 RT-PCR 방법으로 측정된 결과는 Table 5와 같다. LPS군은 Normal군에 비해 모든 조직에서 매우 높은 유의성

(p<0.001)으로 COX-2 mRNA 발현이 증가하였다. 18betaGA-L군은 LPS군에 비해 대뇌피질과 해마, 시상하부 조직 모두에서 유의한 변화가 없었고, 18betaGA-H군은 대뇌피질과 시상하부 조직에서는 LPS군에 비해 유의한(p<0.05) COX-2 mRNA 발현 증가가 억제되었으나 해마 조직에서는 변화가 없었다(Table 5).

Table 4. Changes of IL-6 mRNA Expression in the Brain Tissue of Mice Treated with Lipopolysaccharide

Group	IL-6 mRNA (fold change)		
	Cerebral cortex	Hippocampus	Hypothalamus
Normal	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1
LPS	11.5 $\pm$ 2.1*	12.7 $\pm$ 1.8*	13.6 $\pm$ 1.9*
18betaGA-L	9.8 $\pm$ 1.6	9.3 $\pm$ 1.4	11.1 $\pm$ 1.2
18betaGA-H	6.3 $\pm$ 1.4	7.8 $\pm$ 1.7	7.4 $\pm$ 1.8†

Normal : group without the LPS injection and 18 β -glycyrrhetinic acid treatment.

LPS : group of LPS injection without 18betaGA treatment.

18betaGA-L : group treated with 30 mg/kg of 18betaGA prior to the LPS injection.

18betaGA-H : group treated with 100 mg/kg of 18betaGA prior to the LPS injection.

Data are presented as mean $\pm$ standard error (n = 6 in each group; student t-test between the Normal and LPS groups (*, p<0.001) and between the LPS and 18betaGA groups (†, p<0.05; ‡, p<0.01; §, p<0.001).

Table 5. Changes of COX-2 mRNA Expression in the Brain Tissue of Mice Treated with Lipopolysaccharide

Group	COX-2 mRNA (fold change)		
	Cerebral cortex	Hippocampus	Hypothalamus
Normal	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1
LPS	7.8 $\pm$ 0.9*	4.3 $\pm$ 0.7*	8.2 $\pm$ 1.1*
18betaGA-L	6.3 $\pm$ 0.6	3.7 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 0.6
18betaGA-H	5.5 $\pm$ 0.4†	2.5 $\pm$ 0.4†	5.2 $\pm$ 0.4†

Normal : group without the LPS injection and 18 β -glycyrrhetinic acid treatment.

LPS : group of LPS injection without 18betaGA treatment.

18betaGA-L : group treated with 30 mg/kg of 18betaGA prior to the LPS injection.

18betaGA-H : group treated with 100 mg/kg of 18betaGA prior to the LPS injection.

Data are presented as mean $\pm$ standard error (n = 6 in each group; student t-test between the Normal and LPS groups (*, p<0.001) and between the LPS and 18betaGA groups (†, p<0.05; ‡, p<0.01; §, p<0.001).

5. 해마 조직에서 Bax와 Bcl-2 발현의 변화

해마 조직에서 Western blotting 방법으로 Bax 발현을 측정된 결과, Normal군의 100.0 $\pm$ 4.2%에 비해 LPS군은 279.7 $\pm$ 19.0%로 Normal군에 비해 유의성(p<0.001) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 18betaGA-L군은 230.6 $\pm$ 14.2%로 LPS군에 비해 Bax 발현이 억제되지 않았으며, 18betaGA-H군은 209.1 $\pm$ 12.5%로 LPS군에 비해 Bax 발현이 유의하게(p<0.05) 억제되었다(Fig. 2A, B). Bcl-2 발현은 Normal군의 100.0 $\pm$ 0.8%에 비해 LPS군은 120.3 $\pm$ 2.3%로 Normal

군에 비해 유의성($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 18 β GA-L군은 $123.2 \pm 2.9\%$ 로, 18 β GA-H군은 $125.5 \pm 2.5\%$ 로 LPS군에 비해 Bcl-2 발현은 모두 유의한 변화가 없었다(Fig. 2A, C). Bax 발현에 대한 Bcl-2 발현 비율을 계산한 결과는 LPS군은 $35.8 \pm 5.1\%$, 18 β GA-L군은 $52.2 \pm 6.2\%$ 로 LPS군에 비해 유의한 차이가 없었으며, 18 β GA-H군은 $58.9 \pm 4.8\%$ 로 LPS군에 비해 Bcl-2의 상대적 발현 비율이 유의성 있게($p < 0.01$) 높은 것으로 관찰되었다(Fig. 2D).

Fig. 2. Effect of 18 β -glycyrrhetic acid (18 β GA) on Bax and Bcl-2 expression in the hippocampus. Representative western blots illustrating differences in the bands of Bax and Bcl-2 (A). High-dose of 18 β GA significantly attenuated the Bax expression in the hippocampus. Bcl-2 expression was not different, but ratio of Bcl-2/Bax expression was significantly attenuated in the 18 β GA-H group. Data are represented by mean $\pm$ SEM ($n=6$ in each group). Statistical significances were compared between the Normal and LPS groups (*, $p < 0.001$) and between the LPS and 18 β GA groups (†, $p < 0.05$; ‡, $p < 0.01$).

6. 해마 CA1 두께 및 신경세포 수의 변화

해마 CA1의 두께를 측정된 결과, Normal군은 $54.0 \pm 2.1 \mu\text{m}$, LPS군은 $40.3 \pm 1.8 \mu\text{m}$ 로 Normal군에 비해 유의성($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다. 이에 비해 18 β GA-L군은 $43.6 \pm 2.2 \mu\text{m}$ 로 LPS군에 비해 CA1 두께의 감소가 억제되지 못하였고, 18 β GA-H군은 $48.9 \pm 2.6 \mu\text{m}$ 로 LPS군에 비해 CA1 두께의 감소가 유의하게($p < 0.05$) 억제되었다(Fig. 3A, B). CA1의 500 μm 길이에서 측정된 신경세포 수는 Normal군에서 188.3 ± 2.3 개/500 μm , LPS군은 155.0 ± 4.2 개/500 μm 로 Normal군에 비해 유의성($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다. 18 β GA-L군은 160.7 ± 2.7 개/500 μm 로 LPS군에 비해 신경세포 수의 감소가 억제되지 못하였고, 18 β GA-H군은 173.3 ± 3.9 개/500 μm 로 LPS군에 비해 신경세포 수의 감소가 유의하게($p < 0.05$) 억제되었다(Fig. 3A, C).

Fig. 3. Effects of 18 β -glycyrrhetic acid (18 β GA) on the CA1 region in the hippocampus. Representative photographs of the cresyl violet-stained CA1 region (A). High-dose of 18 β GA significantly attenuated the reduction of the thickness of CA1 (B) and the number of CA1 neurons (C). Scale bar in the section A is 100 μm . Data are represented by mean $\pm$ SEM ($n=6$ in each group). Statistical significances were compared between the Normal and LPS groups (*, $p < 0.001$) and between the LPS and 18 β GA groups (†, $p < 0.05$).

7. 해마 CA1 구역에서 Bax 및 caspase-3 발현의 변화

해마 CA1 신경세포에서 면역조직화학 반응에 의한 Bax 발현 강도의 증가율을 Normal군의 발현을 기준으로 측정된 결과, Normal군의 $100.0 \pm 1.7\%$ 에 비해 LPS군은 $167.1 \pm 4.8\%$ 로 Normal군에 비해 유의성($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 18betaGA-L군은 $164.3 \pm 2.9\%$ 로 LPS군에 비해 Bax 발현이 억제되지 못하였고, 18betaGA-H군은 $143.2 \pm$

3.1%로 LPS군에 비해 Bax 발현이 유의하게($p < 0.01$) 억제되었다(Fig. 4A, B). Caspase-3 발현 강도는 Normal군의 $100.0 \pm 3.1\%$ 에 비해 LPS군은 $153.2 \pm 6.4\%$ 로 Normal군에 비해 유의성($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 18betaGA-L군은 $130.3 \pm 5.1\%$ 로 LPS군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 caspase-3 발현의 억제를 나타내었으며, 18betaGA-H군은 $107.9 \pm 4.8\%$ 로 역시 LPS군에 비해 caspase-3 발현이 유의하게($p < 0.001$) 억제되었다(Fig. 4C, D).

Fig. 4. Effects of 18 β -glycyrrhetic acid (18betaGA) on Bax and caspase-3 expressions in CA1 of the hippocampus. Representative photographs of the immuno-stained against Bax (A) and caspase-3 antibodies (C). High-dose of 18betaGA significantly attenuated the up-regulation of the Bax (B) and caspase-3 expression (D) in CA1 of the hippocampus. Scale bars in the section A and C are 100 μ m. Data are represented by mean $\pm$ SEM ($n=6$ in each group). Statistical significances were compared between the Normal and LPS groups (*, $p < 0.001$) and between the LPS and 18betaGA groups (†, $p < 0.05$; ‡, $p < 0.01$; §, $p < 0.001$).

IV. 고 찰

중추신경계에 대한 사이토카인의 작용은 전신적인 염증반응에 의해 중추신경계 외부에서 분비된 사이토카인이 혈액뇌관문을 통과하여 중추신경계 내로 들어와 작용하거나, 중추신경계 내에서 생산 분비되어 작용한다¹⁶⁾. 어떠한 사이토카인이든지 신경내분비계통에 영향을 미쳐 발열성(pyrogenic), 식욕감퇴성(anorectic) 및 기면성(lethargic) 행동 양상의 변화를 유발한다¹⁷⁾. 특히 TNF- α 와 IL-1 β 같은 염증성 사이토카인은 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 다발성경화증, 뇌허혈, 뇌경색, 다양한 뇌병증(encephalopathies) 등에서 분비가 증가한다^{14,18)}. 이러한 염증성 사이토카인의 과분비는 중추신경계에 신경독성으로 작용하고, 퇴행성 뇌질환을 악화시키는 요인이 된다¹⁹⁾.

18betaGA의 항염증 및 사이토카인에 대한 연구들을 살펴보면, 18betaGA가 mouse macrophages RAW264.7과

peritoneal macrophages에서 LPS 자극에 의한 TNF- α 분비를 억제하고, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-(TPA-)에 의한 급성염증을 유의하게 억제하였으며²⁰⁾, macrophage에서 LPS에 의한 TNF- α , IL-6, IL-1 β 분비를 억제하고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 COX-2의 단백질과 mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였다²¹⁾. 또한 18betaGA가 혈관내피세포에서 NF- κ B 발현을 줄이고 이에 따라 IL-8 발현도 감소되어, LPS에 의한 혈관내피세포의 투과성 증가를 억제하는 항염증 작용을 발휘한다고 하였으며²²⁾, dendritic cells에서 LPS 자극에 의한 surface molecules cluster differentiation (CD)80, CD86 및 major histocompatibility complex (MHC) class I과 MHC class II 발현을 억제하는 항염증 작용을 나타내었다고 하였다²³⁾. 이와 같은 18betaGA의 항염증 및 사이토카인에 대한 연구들은 주로 그 작용기전을 관찰하기 위해 *in vitro* 세포실험을 통해 이루어졌으며, 18betaGA의 중추신경염증에 대한 *in vivo* 연

구는 C57BL/J6 mouse의 뇌허혈 손상에 대해 지질과산화 억제 등의 항산화 작용을 발휘한다는 보고⁵⁾와 C57BL/J6 mouse의 자가면역성 뇌척수염 모형에서 미세아교세포 활성화를 억제하여 염증을 줄인다는 보고가 있을 뿐이다⁷⁾. 그러므로 본 연구에서는 18 β GA가 *in vivo* 동물실험에서 LPS에 의한 중추신경염증에서 대뇌피질, 해마 및 시상하부의 뇌조직 별로 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 18 β GA는 30 mg/kg의 저농도에서는 시상하부 조직에서만 TNF- α mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였다. 100 mg/kg의 고농도에서는 대뇌피질과 해마 조직에서 TNF- α 와 IL-1 β mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였고, 시상하부 조직에서는 TNF- α , IL-1 β 와 IL-6 mRNA 발현 모두를 유의하게 억제하였다. 이러한 결과로 미루어보아 고농도의 18 β GA는 중추신경염증에서 전체적인 뇌조직의 염증성 사이토카인 발현 증가를 억제하는 작용이 있으며, 특히 시상하부의 염증에 대해 효과적인 작용을 하는 것으로 추측할 수 있다.

TNF- α 는 뇌조직에서 모세혈관의 투과성을 증가시키고, 중성백혈구의 침윤을 증가시켜 염증반응을 유발하며²⁴⁾, 신경세포의 TNF- α receptor에 작용하여 TNF receptor-associated death domain을 작동시키므로 신경세포를 사망에 이르게 한다²⁵⁾. 과도하게 발현된 IL-1 β 역시 신경세포를 손상시킨다²⁶⁾. IL-6는 염증유발 및 염증억제의 이중적 작용을 가지고 있는 사이토카인이지만 과도한 IL-6의 발현은 허혈성 및 출혈성 뇌경색의 악화에 관여하고²⁷⁾, 알츠하이머병에서 아밀로이드플라크 주변의 염증반응을 악화시키는데 관여하며²⁸⁾, 특히 시상하부에서 IL-6의 과발현은 체온조절 장애로 고열을 유발한다고 하였다²⁹⁾. 그러므로 이러한 염증성 사이토카인의 작용과 이전 *in vitro* 연구에서 보고된 18 β GA의 항염증 작용기전 및 본 연구의 *in vivo* 결과들을 종합해보면 18 β GA는 중추신경계에 대한 항염증 작용으로 신경세포손상에 대한 보호작용은 물론 대뇌피질과 해마 신경세포의 손상과 시상하부의 염증반응에 의한 질병행동의 개선 등에도 유의한 효능이 있을 것으로 추측된다.

나아가 18 β GA의 중추신경염증에 대한 항염증 작용을 확인하기 위해 뇌조직에서 COX-2 mRNA 발현을 관찰하였다. COX-2는 급성 및 만성 염증에서 염증반응을 확산시키는데 중심적인 역할을 하는 효소로 염증성 사이토카인과 염증유발 매개물질들의 자극에 의해 빠른 시간 내에 발현이 촉진되어 prostaglandin을 생성하게 된다³⁰⁾. 그러므로 COX-2 발현의 억제는 신경세포독성이나 퇴행성 뇌 병변에 대한 항염증 약물 개발의 유의한 목표가 된다³¹⁾. 본 실험의 결과, 저농도 18 β GA는 유의한 변화를 나타내지 못하였으나, 고농도 18 β GA는 대뇌피질과 시상하부 조직에서 COX-2 mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 18 β GA가 중추신경염증에 대한 항염증 작용이 있다는 것을 보완하는 것이다.

해마 신경세포 손상에 대한 18 β GA의 신경세포 보호효능을 관찰한 본 연구의 결과, 18 β GA는 고농도에서 LPS에 의한 해마 CA1 두께의 감소와 CA1 신경세포 수의 감소를 유의하게 억제하였다. 이는 18 β GA가 중추신경염증에 의한 해마 신경세포의 손상을 억제하는 작용이 있음을 추측하게 한다.

Bax와 Bcl-2는 세포자연사 기전을 조절하는 인자로서 Bax는 세포자연사를 촉진하는 유발인자, Bcl-2는 세포자연사를 억제하는 인자로 알려져 있다³²⁾. 그러므로 Bax 발현이 증가하고 Bcl-2 발현이 감소되는 상태에서는 세포자연사가 유발되고, Bax 발현이 억제되고 Bcl-2 발현이 증가하는 상태에서는 세포자연사가 억제된다고 하였다³³⁾. 18 β GA가 해마 조직에서 Bax와 Bcl-2 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 18 β GA는 면역조직화학염색에서 해마 CA1 신경세포의 Bax 발현 강도 증가를 유의하게 억제하였으며, Western blotting으로 측정한 Bax 단백질 발현의 증가 또한 유의하게 억제하였다. Bcl-2 발현에 대해서는 유의한 변화가 없었으나, Bax 발현에 대한 상대적 발현량을 관찰한 결과에서는 고농도의 18 β GA가 Bcl-2/Bax의 발현비율을 유의하게 증가시킨 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 Bcl-2/Bax의 비율이 세포자연사 기전에서 세포의 사망 또는 생존을 결정하는 지표가 된다는 보고³⁴⁾를 감안하면 18 β GA가 신경세포손상 보호효능이 있다는 것을 보완하는 결과이다. Caspase-3은 세포자연사를 실행하는 주요 인자이다³⁵⁾. 세포자연사 유발인자인 Bax가 세포내의 mitochondria에 작용하여 막투과성을 증가시키고, cytochrome C를 생성하게 되며, 생성된 cytochrome C는 caspase-9로부터 caspase-3을 생성한다³⁶⁾. Caspase-3은 caspase-activated DNase를 생성하여 세포핵의 DNA를 조각내고, 세포핵에 작용하여 염색질의 응축 (chromatin condensation)을 일으키며, 세포골격을 분해하여 세포가 사망하게 하는 자연사 기전을 유발한다³⁷⁾. Caspase-3 발현세포를 해마 조직에서 면역조직화학염색으로 관찰한 결과, 고농도의 18 β GA는 LPS에 의한 해마 CA1 신경세포의 caspase-3 발현 강도 증가를 유의하게 억제하였다. 이러한 결과 역시 18 β GA가 신경세포손상 보호효능이 있다는 것을 보완하는 결과이다.

본 연구의 결과들을 종합하면, 고농도(100 mg/kg)의 18 β GA는 대뇌피질과 시상하부 조직에서 LPS에 의한 TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하고, COX-2 mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였으며, 해마 조직에서 LPS에 의한 CA1 신경세포 사망을 억제하고, Bax 발현과 caspase-3 발현 증가를 유의하게 억제하였다. 그러므로 18 β GA는 중추신경염증에 대해 항염증작용과 신경세포손상에 대해 유의한 보호작용이 있는 것을 추측할 수 있으며, 중추신경염증을 수반하는 각종 뇌 병변을 예방 또는 치료하는데 유의한 약물이 될 수 있음을 추측하게 한다.

V. 결 론

甘草의 소화기관 내 대사체인 18 β GA가 뇌조직의 염증 상태에서 염증성 사이토카인 발현과 해마 신경세포 자연사에 대한 영향을 *in vivo* 동물실험에서 관찰하고자 하였다. 생쥐에 LPS를 복강주사하는 방법으로 염증을 유발하고 대뇌피질, 해마 및 시상하부 뇌조직에서 TNF- α 와 IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현을 관찰하였으며, 염증매개 효소인 COX-2 발현을 관찰하였다. 또한 해마 조직에서 신경세포 손상과 Bax, Bcl-2 및 caspase-3 발현을 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 18betaGA는 LPS에 의한 대뇌피질, 해마 및 시상하부 조직의 TNF- α mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였다.
2. 18betaGA는 LPS에 의한 대뇌피질, 해마 및 시상하부 조직의 IL-1 β mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였다.
3. 18betaGA는 LPS에 의한 시상하부 조직의 IL-6 mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였다.
4. 18betaGA는 LPS에 의한 대뇌피질, 해마 및 시상하부 조직의 COX-2 mRNA 발현 증가를 유의하게 억제하였다.
5. 18betaGA는 LPS에 의한 해마 조직의 Bax 발현 증가를 유의하게 억제하였으며, Bax에 대한 Bcl-2의 상대적인 발현 비율을 유의하게 증가시켰다.
6. 18betaGA는 LPS에 의한 해마 CA1 두께의 감소를 유의하게 억제하고, CA1 신경세포 수의 감소를 유의하게 억제하였다.
7. 18betaGA는 LPS에 의한 해마 CA1 신경세포의 Bax와 caspase-3 발현 강도 증가를 유의하게 억제하였다.

이상의 결과로 보아 고농도 18betaGA는 뇌조직의 염증성 사이토카인 발현 증가를 억제하고, 해마 신경세포의 자연사를 억제하는 작용이 있으므로 중추신경염증을 수반하는 다양한 만성적인 뇌질환에 유의한 약물이 될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Wang L, Yang R, Yuan B, Liu Y, Liu C. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb. *Acta Pharm Sin B*. 2015 ; 5 : 310-15.
2. Hwang IK, Lim SS, Choi KH, Yoo KY, Shin HK, Kim EJ, Yoon-Park JH, Kang TC, Kim YS, Kwon DY, Kim DW, Moon WK, Won MH. Neuroprotective effects of roasted licorice, not raw form, on neuronal injury in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Acta Pharmacol Sin*. 2006 ; 27 : 959-65.
3. Hosseinzadeh H, Nassiri-Asl M. Pharmacological effects of glycyrrhiza spp. and its bioactive constituents: update and review. *Phytother Res*. 2015 ; doi:10.1002/ptr.5487.
4. Kawakami Z, Ikarashi Y, Kase Y. Isoliquiritigenin is a novel NMDA receptor antagonist in kampo medicine yokukansan. *Cell Mol Neurobiol*. 2011 ; 31 : 1203-12.
5. Oztanir MN, Ciftci O, Cetin A, Durak MA, Basak N, Akyuva Y. The beneficial effects of 18 β -glycyrrhetinic acid following oxidative and neuronal damage in brain tissue caused by global cerebral ischemia/reperfusion in a C57BL/J6 mouse model. *Neurol Sci*. 2014 ; 35 : 1221-8.
6. Kao TC, Shyu MH, Yen GC. Glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetinic acid inhibit inflammation via PI3K/Akt/GSK3beta signaling and glucocorticoid receptor activation. *J Agric Food Chem*. 2010 ; 58 : 8623-9.
7. Zhou J, Cai W, Jin M, Xu J, Wang Y, Xiao Y, Hao L, Wang B, Zhang Y, Han J, Huang R. 18 β -glycyrrhetinic acid suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis through inhibition of microglia activation and promotion of remyelination. *Sci Rep*. 2015 ; 5 : 13713.
8. Mizoguchi K, Kanno H, Ikarashi Y, Kase Y. Specific binding and characteristics of 18 β -glycyrrhetinic acid in rat brain. *PLoS One*. 2014 ; 9 : e95760.
9. Luo L, Jin Y, Kim ID, Lee JK. Glycyrrhizin suppresses HMGB1 inductions in the hippocampus and subsequent accumulation in serum of a kainic acid-induced seizure mouse model. *Cell Mol Neurobiol*. 2014 ; 34 : 987-97.
10. Luo L, Jin Y, Kim ID, Lee JK. Glycyrrhizin attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *Exp Neurobiol*. 2013 ; 22 : 107-15.
11. Akman T, Guven M, Aras AB, Ozkan A, Sen HM, Okuyucu A, Kalkan Y, Sehitoglu I, Silan C, Cosar M. The Neuroprotective effect of glycyrrhizic acid on an experimental model of focal cerebral ischemia in rats. *Inflammation*. 2015 ; 38 : 1581-8.
12. Zhang J, Wu Y, Weng Z, Zhou T, Feng T, Lin Y. Glycyrrhizin protects brain against ischemia-reperfusion injury in mice through HMGB1-TLR4-IL-17A signaling pathway. *Brain Res*. 2014 ; 1582 : 176-86.
13. Harry GJ, Kraft AD. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008 ; 4 : 1265-77.
14. Sternberg EM. Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest*. 1997 ; 100 : 2641-7.
15. Rosenberg PB. Clinical aspects of inflammation in Alzheimer's disease. *Int Rev Psychiatry*. 2005 ; 17 : 503-14.
16. Szelényi J. Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull*. 2001 ; 54 : 329-38.
17. Dunn AJ, Swiergiel AH. The role of cytokines in infection-related behavior. *Ann NY Acad Sci*. 1998 ; 840 : 577-85.
18. Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain:

- implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*. 2000 ; 157 : 683-94.
19. Campbell IL, Stalder AK, Akwa Y, Pagenstecher A, Asensio VC. Transgenic models to study the actions of cytokines in the central nervous system. *Neuroimmunomodulation*. 1998 ; 5 : 126-35.
 20. Ishida T, Mizushima Y, Yagi S, Irino Y, Nishiumi S, Miki I, Kondo Y, Mizuno S, Yoshida H, Azuma T, Yoshida M. Inhibitory effects of glycyrrhetic acid on DNA polymerase and inflammatory activities. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012 ; 2012 : 650514.
 21. Wang CY, Kao TC, Lo WH, Yen GC. Glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid modulate lipopolysaccharide-induced inflammatory response by suppression of NF- κ B through PI3K p110 δ and p110 γ inhibitions. *J Agric Food Chem*. 2011 ; 59 : 7726-33.
 22. Kim SR, Jeon HJ, Park HJ, Kim MK, Choi WS, Jang HO, Bae SK, Jeong CH, Bae MK. Glycyrrhetic acid inhibits *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced vascular permeability via the suppression of interleukin-8. *Inflamm Res*. 2013 ; 62 : 145-54.
 23. Kim ME, Kim HK, Kim DH, Yoon JH, Lee JS. 18 β -Glycyrrhetic acid from licorice root impairs dendritic cells maturation and Th1 immune responses. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2013 ; 35 : 329-35.
 24. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GF. Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke*. 1994 ; 25 : 1481-8.
 25. Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*. 1999 ; 283 : 543-6.
 26. Griffin WST, Sheng JG, Gentleman SM, Graham DI, Mark RE, Roberts GW. Microglial interleukin-1 β expression in human head injury: Correlation with neuronal and neuritic β -amyloid precursor protein expression. *Neurosci Lett*. 1994 ; 176 : 133-6.
 27. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, Sandercock P. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*. 2009 ; 40 : e380-9.
 28. Cacquevel M, Lebourrier N, Chenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets*. 2004 ; 5 : 529-34.
 29. Rivest S, Lacroix S, Vallieres L, Nadeau S, Zhang J, Laflamme N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000 ; 223 : 22-38.
 30. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 ; 63 : 901-10.
 31. Aid S, Bosetti F. Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie*. 2011 ; 93 : 46-51.
 32. Gibson ME, Han BH, Choi J, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Parsadanian M, Holtzman DM. BAX contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia: evidence for distinct apoptosis pathways. *Mol Med*. 2001 ; 7 : 644-55.
 33. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Develop*. 1999 ; 13 : 1899-911.
 34. Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 ; 959 : 93-107.
 35. Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*. 2003 ; 53 : S61-72.
 36. Jacotot E, Costantini P, Laboureaud E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann NY Acad Sci*. 1999 ; 887 : 18-30.
 37. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*. 2000 ; 256 : 12-8.