

대뇌피질 신경세포에 미치는 glutamate 독성에 대한 한약재 효능연구

이미영* · 강봉주* · 윤유식* · 홍성길* · 광병주** · 조동욱*

ABSTRACT

The effect of herbal medicine on cultured cerebral cortical neurons induced by glutamate neurotoxicity

Mi-Young Lee · Bong-Joo Kang* · Yoo-Sik Yoon* · Seong-Gil Hong* ·
Byoung-Joo Gwag** and Dong-Wuk Cho**

The effect of herbal medicine on glutamate mediated neurotoxicity was studied in mouse neurons in primary culture. Immature cerebral cortex neurons (ED14) were maintained for up to 2 weeks in vitro, and we investigated the expression pattern of neuron differentiation and cytotoxicity of cell death, including LDH activity. Neuronal maturation initiated on day 7 and the susceptibility to glutamate-induced cell death was highly sensitive on Day 11 (Fig. 1).

Thus, the exposure of the neurons to glutamate caused a dose(0.1mM~1mM) and time(4h~24h)-dependent neurotoxicity(Fig. 4). Glutamate-induced neurodegeneration was prevented by Shipchondaebotang(SD), Yollyounggobondan (YG), Yugmijihwangwon(YJ) and the death of neurons exposed to glutamate was blocked by the NMDA receptor antagonist MK-801(Fig. 5).

*) 한국한의학연구원 노화양생팀 Aging and Regimen Research Team, KIOM

***) 아주대학교 의과대학 약리학교실 Dept. of Pharmacology, Ajou University School of Medicine

【Key words】 Herbal medicine, primary neuronal culture, Neurodegeneration, Neurotoxic, Glutamate

【Abbreviation】 ED(Embryonic day), LDH(Lactate dehydrogenase), NMDA(*N*-methyl-*D*-aspartate)

I. 서론

중추신경계질환인 노인성치매나 파킨슨증후군, 알츠하이머병 환자가 계속 늘어남에 따라 노화에 따른 신경계 변화 연구에 많은 관심이 집중되고 있다. 특히 치매라는 퇴행성 신경질환으로 연결되므로 노화에 따른 뇌의 변화에 대한 기초적 연구를 수행하고, 또한 한의학적인 치료법을 이용하여 이를 예방하고 치료방법을 개발할 필요가 있다.

인간의 뇌에는 적어도 천억 정도의 신경세포가 존재하여 존재하는 부위와 생성하는 신경전달 물질의 종류에 따라 특정한 신경계의 기능을 담당하게 된다. 뇌에 전반적으로 분포하는 glutamate 신경세포는 신경세포의 활성을 유도하여 신경계의 주 정보전달기능에 중요한 역할을 하며, 신경세포의 사멸을 유도하는 주 원인으로 밝혀지면서 glutamate 신경독성에 대한 연구가 진행되어 신경계 질환의 기전이 심층적으로 밝혀지고 있다¹⁾. Glutamate는 포유류 중추신경계의 주요한 신경전달물질로 넓은 범위의 신경독성을 일으키며²⁾ 배지속의 glutamine 혼합물로부터 glutamate가 생기거나³⁾ 신경세포의 glutamine에서 glutamate로 전환되기도 한다^{3·4)}.

또한 glutamate는 많은 중추, 말초 시냅스의 초기 흥분독성 신경전달물질⁵⁾로 흥분성 아미노산으로 불리기도 하며, 시냅스후부의 세포에서 억제현상을 나타내기도 한다⁶⁾. Glutamate 신경독성과정은 *N*-methyl-*D*-aspartate(NMDA) 수용체의 과도한 활성화로 칼슘이온과 같은 양이온들이 세포막을 통해 과도하게 유입되면 신경세포는 탈분극에 빠지게 되며, nitric oxide가 생성되고 nitroxic oxide는 여러 가지 단계를 거쳐 peroxynitrite로 전환되어 hydroxy radical(\cdot OH)을 만들어 신경세포를 손상시키게 된다⁷⁾. 한편, glutamate-수용체가 지나치게 자극을 받으면 신경퇴행과정이 일어나며⁸⁾ 이러한 심한 신경손상으로 인해 퇴행성신경질환, 예를 들어 국소빈혈, 산소결핍증, 저혈당증, 외상등과 같은 여러 가지 현상이 일어날 수 있다^{9·10)}. 그러므로 glutamate에 의한 신경세포의 사멸을 억제할 수 있다면 노화에 따른 뇌질환 치료에 공헌할 수 있을 것으로 사료된다. 대뇌 신경세포손상에 관한 방법과 약물기전이 현재까지도 진행중이며 많이 밝혀졌지만 한약재 처방을 통한 신

경세포의 노화과정에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 대뇌 신경세포의 초기배양은 세포분화과정¹¹⁾이나 amyloid 단백질에 대한 생물활성¹²⁾, glutamate 신경독성¹³⁾, 신경요인인자¹⁴⁾에 대한 연구를 하기에 용이한 것으로 알려져 있으므로, 본 연구에서는 노화과정 및 신경계질환에 미치는 한약재의 효능을 초기배양 시스템을 구축하여 알아보았다. 즉, 신경세포의 노화를 지연시키며 세포손상을 막을 수 있는 방법을 신경세포의 초기 배양시스템을 통해, 補益劑, 補氣劑중의 대표적인 治氣血兩虛의 八物湯, 治命門 陽虛의 八味丸, 治腎水不足의 六味地黃元, 治氣血兩虛의 十全大補湯, 治五勞七傷延 諸虛 白損 顏色 衰朽 形體羸瘦 中年陽事不舉 精神短小 未至五旬 鬚髮先白 手足癱瘓 惑脚膝痠痠疼 小腸疝氣 婦人無子 下院虛冷的 延齡固本片¹⁵⁾등을 조제하여 효능을 알아보았다.

II. 연구방법

1. 시약

FBS, glucose, sodium bicarbonate, trypan blue, poly-L-lysine, laminin, cytosine arabinoside, glucose, sodium bicarbonate, Trinton X-100, LDH OPT(Sigma, St. Louis, U.S.A), MEM, penicillin-streptomycin, insulin-transferrin-serenium A, horse serum(Gibco BRL, NY, USA), paraformaldehyde(Kanto chem., Tokyo, Japan), Avidin biotin complex reagen, 3,3'-diaminobenzidine(Vector, Burlingame, U.S.A.)

2. 한약재 시료제조

Table 1의 각 약재를 경동시장에서 구입하여 상온에 보관하였고, 일반적인 추출 방법으로 약재부피 3배의 증류수에 18시간동안 수침한 후, 전자약탕기 (대웅약탕기, 한국)에서 30분간 열수추출한 후, 다시 재탕으로 2시간동안 열수추출 하였다. Mesh (#100, $\Phi 150\mu m$)로 걸러낸후, 회전농축기 (R-124, Buchi)에서 농축한 후, 3,000g로 원심분리하여 상층액을 수거했다. 이 상층액을 여과지($\Phi 90mm$, Toyo, Japan)로 여과시킨후 동결건조시켜 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

3. 신경세포배양

배아상태 14일의 ICR mouse로부터 뇌막를 제거하고 대뇌피질을 Minimal

Essential Medium (MEM)에서 분리하였다. 분리한 세포를 200 g, 3 min간 원심분리하고 작은 구경으로 만든 pasteur pipet로 세포를 분쇄하였다. 10 % fetal bovine serum (FBS)과 50 U penicillin streptomycin, 21 mM glucose, 38 mM sodium bicarbonate를 함유한 MEM 배지에 세포를 $\phi 150 \mu\text{m}$ 의 mesh로 통과시켜 0.4 % trypan blue로 살아있는 세포를 확인하고, 0.1mg/ml poly-L-lysine과 0.1mg/ml laminin으로 표면처리한 24 well (15 mm) culture dish (Becton Dickinson, New Jersey, U.S.A.)에 $2\sim 2.5 \times 10^6$ cells/ml 씩 세포를 분주하여 37 °C, 95% air/5 % CO²조건에서 배양하였다¹⁶⁾. 3일 후 10 μM cytosine arabinoside를 첨가해 주어 정상세포증식을 억제시키고 5 % FBS를 함유한 MEM 배지에 insulin-transferrin-serenium A를 첨가하여 배양하였다.

4. Immunostaining

배양시킨 신경세포를 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 3회 세척한 후 4 % (v/v) paraformaldehyde로 30분간 상온에서 세포를 고정시키고 0.25 % (w/v) Triton X-100으로 세포막을 투과시킨 후 10 % (v/v) horse serum으로 비특이적인 결합을 막는다. 1차 항체로 microtubule associated protein-2(MAP-2)에 특이적인 anti-MAP-2 (1:200)를 1 % (v/v) horse serum과 함께 4°C에서 2시간 배양시키고 2차 항체로는 anti-mouse IgG (1:200)를 사용하여 1시간동안 상온에서 배양하였다. Avidin biotin complex reagent를 사용하여 2차항체를 측정하고 3,3'-diaminobenzidine으로 발색시킨 후 현미경으로 관찰하였다. 각 단계마다 PBS로 세 번 세척하였다¹⁷⁾.

Table1. Components of prescriptions

Prescriptions	Component	Weight(g)	Source
Sagunjatang(SD) 四君子湯	Ginseng radix	4.68	금산
	Hoelen	4.68	인제
	Atractylodis Alba rhizoma	4.68	중국
	Glycyrrhizae radix	4.68	중국
Samultang(SM) 四物湯	Rehmanniae Preparata rhizoma	4.68	군위
	Paeoniae radix	4.68	의성
	Cnidii rhizoma	4.68	천궁
	Angelicae Gigantis radix	4.68	진부

Prescriptions	Component	Weight(g)	Source
Yungmijihwangwon(YJ) 六味地黃元	Rehmanniae Preparata rhizoma	30	군위
	Corni fructus	15	구례
	Dioscorea tuber	15	온양
	Alismatis rhizoma	11.25	순천
	Paeoniae radix	11.25	의성
	Hoelen	11.25	인제
Palmihwan(PL) 八味丸	Rehmanniae Preparata rhizoma	30	군위
	Corni fructus	15	구례
	Dioscorea tuber	15	온양
	Alismatis rhizoma	11.25	순천
	Paeoniae radix	11.25	의성
	Hoelen	11.25	인제
	Cinnamomi cortex	3.75	중국
Palmultang(PM) 八物湯	Aconiti tuber	3.75	중국
	Ginseng radix	4.68	금산
	Hoelen	4.68	인제
	Atractylodis Alba rhizoma	4.68	중국
	Glycyrrhizae radix	4.68	중국
	Rehmanniae Preparata rhizoma	4.68	군위
	Paeoniae radix	4.68	의성
Shipchondaebotang(SD) 十全大補湯	Cnidii rhizoma	4.68	영양
	Angelicae Gigantis radix	4.68	진부
	Ginseng radix	3.75	금산
	Hoelen	3.75	인제
	Atractylodis Alba rhizoma	3.75	중국
	Glycyrrhizae radix	3.75	중국
	Rehmanniae rhizoma preparata	3.75	군위
	Paeoniae radix	3.75	의성
	Cnidii rhizoma	3.75	영양
	Angelicae Gigantis radix	3.75	진부
Astragali radix	3.75	제천	
Cinnamomi cortex	3.75	중국	

Prescriptions	Component	Weight(g)	Source
	Cuscutae semen	15	중국
	Cistanchis herba	15	중국
	Asparagi tuber	7.5	중국
	Liriopsis tuber	7.5	공주
	Rehmanniae rhizoma preparata	7.5	균위
	Dioscorea tuber	7.5	온양
	Achyranthis radix	7.5	중국
	Eucommiae cortex	7.5	영주
	Morindae radix	7.5	중국
	Lycii fructus	7.5	청양
	Corni fructus	7.5	구례
Yollyounggobondan (YJ)	Hoelen	7.5	인제
延齡固本丹	Schizandrae fructus	7.5	정선
	Ginseng radix	7.5	금산
	Saussureae radix	7.5	중국
	Thujae semen	7.5	중국
	Rubi fructus	7.5	영천
	Plantaginis semen	7.5	중국
	Lycii cortex	7.5	청양
	Acori graminei rhizoma	7.5	중국
	Zanthoxyli pericarpium	7.5	영천
	Polygalae radix	7.5	중국
	Glycyrrhizae radix	7.5	중국
	Alismatis rhizoma	7.5	순천

5. Lactate Dehydrogenase(LDH) 측정

LDH(lactate dehydrogenase)는 세포질에 존재하는 효소로서 정상의 경우 세포막을 투과하지 않지만, 세포막이 손상을 입을 경우 세포밖으로 분비되어 배지내로 방출된다. 방출된 LDH는 젖산과 NAD⁺로 부터 피루빈산과 NADH를 생성시키며, 이때 NAD⁺가 산화됨에 따라 340 nm에서 흡광도가 변화하는 것으로부터 세포밖

에 방출된 LDH의 활성도를 측정할 수 있다¹⁸⁾. 각각의 시료 50 μ L를 취하여 100 μ L의 LDH OPT와 함께 반응시켜 spectrophotometer (Molecular devices, California, U.S.A.)로 흡광도의 변화율을 측정하였다. 세포의 LDH level을 glutamate로 자극을 주기전에 측정하고, glutamate와 한약재를 처리한 뒤 세포손상률을 측정하여 한약재의 세포보호효과를 확인하였고, 세포의 LDH 최대방출은 Trinton X-100으로 처리한 뒤, 이에 대한 백분율로 나타내었다.

6. 세포손상을 측정

퇴행성신경질환을 위한 모델로 glutamate를 처리하여 세포내 손상을 유도하였다. 발달된 신경세포 양상을 나타내는 11~13일의 신경세포배양액에 0.1 mM, 0.2 mM, 0.5 mM, 1 mM 농도의 glutamate를 MEM에 각각 처리하여 4시간, 6시간, 12시간, 24시간 동안 배양하고 뒤에 기술된 LDH법으로 세포손상률을 측정하였다. Glutamate로 인해 유도된 신경세포의 손상에 대한 세포보호작용은 팔물탕, 팔미환, 육미지황원, 십전대보탕, 연령고본단등 5가지 건조분말을 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml로 희석하여 glutamate와 함께 12시간 동안 배양하여 측정하였다. Glutamate 억제효과로는 NMDA 수용체 길항제인 MK-801 1 μ M을 glutamate와 함께 24시간 처리하여 신경세포 손상률을 보았다. 실험결과의 통계처리는 SPSS 8.0 프로그램으로 Independent *t*-test와 one-way ANOVA를 통해 Scheffe방법으로 $P < 0.05$ 값을 유의성있는 수준으로 하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 신경세포 형태변화

1.1. 신경세포 분화과정 관찰

대뇌신경세포를 초기배양하여 신경세포의 분화과정을 관찰하였다. Fig. 1에서와 같이 세포를 접종시킨 후 몇시간 이내에 바닥 표면에 부착하여 신경돌기가 생기기 시작하고 배양후 3일인 DIV (days *in vitro*) 3에는 세포체가 커지면서 신경돌기가 더욱 많아지는 것을 볼 수 있으며 DIV 7 부터는 세포체와 신경돌기가 왕성하게 자라 서로 엉기는 모습을 볼 수 있다. DIV 11 무렵에는 신경세포가 발달한 뚜렷한 양상을 나타낸다. 그러나 DIV 15부터는 세포체는 온전하게 보이거나 신경돌기들

이 점점 퇴화하는 모습을 나타내었다. 배양후 13일에 MAP-2로 신경세포를 면역염색한 결과 신경세포가 MAP-2에 양성적인 반응을 보여 신경세포임을 확인하였다 (Fig. 2).

1.2. 혈청제거로 인한 세포손상 변화

본 실험은 세포손상을 일으키는 요인중의 하나인 배지내 혈청을 제거하여 신경세포들의 형태학적인 변화를 관찰하였다. 신경세포들이 왕성하게 분화하기 시작하는 DIV 7에 24시간동안 성장요인을 제거하여 배양할 경우 대부분 세포들의 세포체가 팽창하였고 신경돌기가 거의 없어지는 괴사현상을 나타내었다 (Fig. 3).

2. Glutamate에 의한 신경세포의 시간, 농도의존적 효과

과도하게 glutamate수용체가 자극을 받으면 신경퇴행과정을 일으킨다고 보고되어 있다^{9,10}. 따라서 적정농도와 시간을 구하기 위해 시간과 농도에 따른 신경세포의 glutamate 세포손상률을 보았을 때, 농도의존적으로는 0.1mM에서 24시간 배양할 경우 유의적인 반응이 나타났으며, 시간의존적으로는 0.5mM에서 4시간 배양하였을 때 세포사멸률이 유의적인 반응을 나타냈다($P < 0.01$). 따라서 최고 세포사멸률을 보인 0.5 mM의 glutamate농도로 12시간 배양한 경우와 50% 신경세포손상률을 보인 0.25mM의 glutamate로 12시간 배양하여 세포손상률을 유도하였다(Fig. 4).

3. 신경세포손상에 대한 한약재 효과

한약재 보호효과에 사용된 당제로는 팔물탕, 팔미환, 십전대보탕, 육미지황원, 연령고본단등으로 glutamate에 의한 신경세포손상에 대한 한약재의 보호효과를 보았다. 50% 세포손상률을 보인 0.25 mM의 glutamate와 함께 0.25 mg/ml의 한약탕제 건조분말로 세포내 효과를 보았을 때 십전대보탕과 연령고본단, 육미지황원이 신경세포손상 억제에 유의적인 효과를 나타내었다. Glutamate 0.5 mM과 각각의 한약탕제 건조분말 0.5 mg/ml을 12시간 배양하였을 때에는 십전대보탕과 연령고본단이 유의적인 효과가 있었으며 다른 약재 또한 유의적인 차는 없었지만 대체로 효과가 있는 것으로 나타났다. 또한 glutamate에 의한 최대 손상률의 5가지 한약탕제의 보호효과를 보았을때 0.25 mM glutamate, 0.25 mg/ml의 한약탕제보다는 0.5mM glutamate, 0.5mg/ml 한약탕제농도가 더 좋은 효과를 보였고, 육미지황원을 제외한 다른 당제에서는 농도의존적으로 비슷한 경향의 세포손상에 대한 약효가 있었다.

또한 신경세포의 손상을 Glutamate로 유도하였으므로 non-competitive NMDA antagonist인 MK-801로 glutamate에 대한 세포손상억제효과를 보았을 때, glutamate에 대한 억제현상이 유의성있게 나타났으며 대조군보다 세포사멸율이 더 낮았다(Fig. 5).

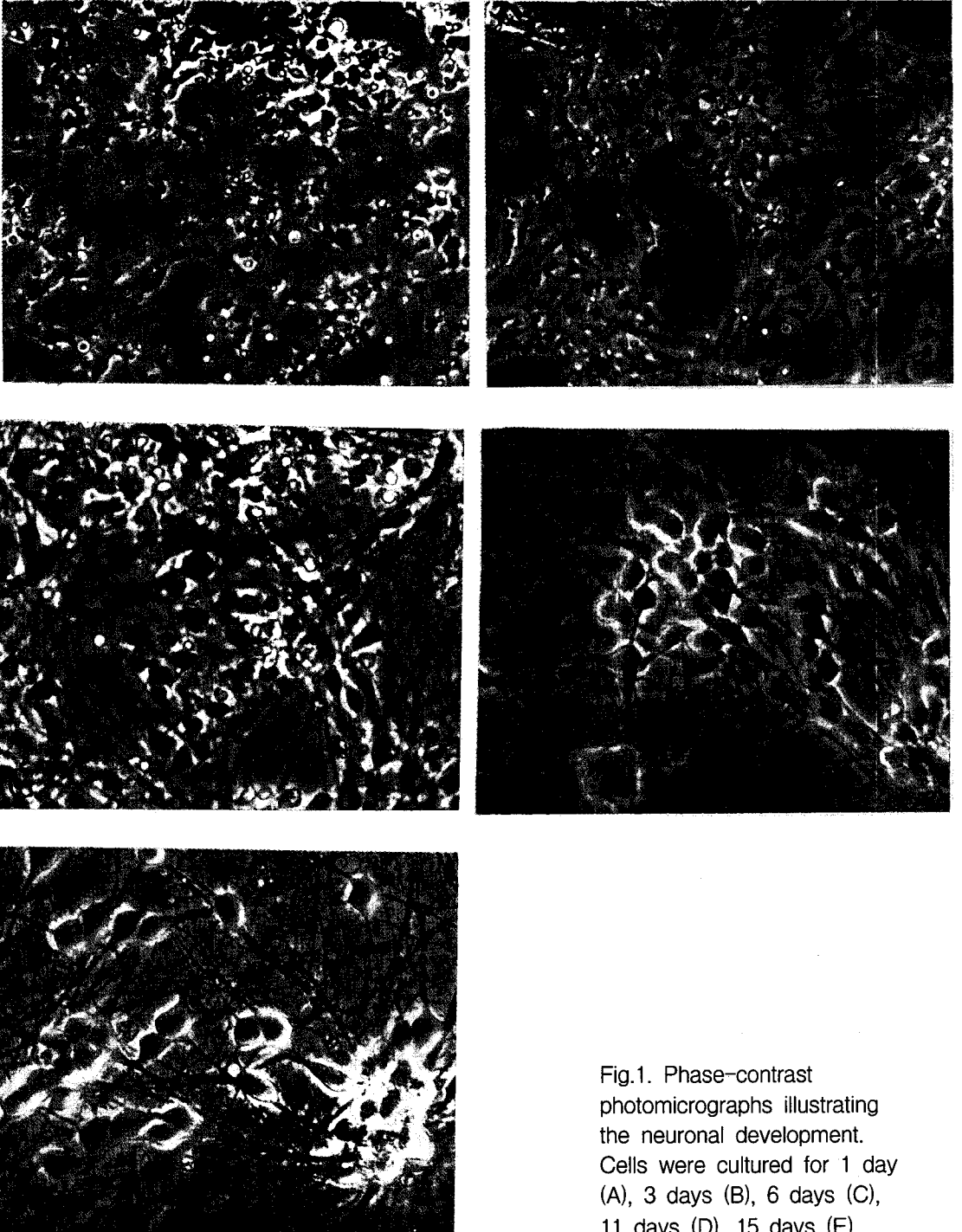


Fig.1. Phase-contrast photomicrographs illustrating the neuronal development. Cells were cultured for 1 day (A), 3 days (B), 6 days (C), 11 days (D), 15 days (E).



Fig. 2. MAP-2 staining demonstration that nearly all cell are MAP-2-positive neurons on the 13th day in culture

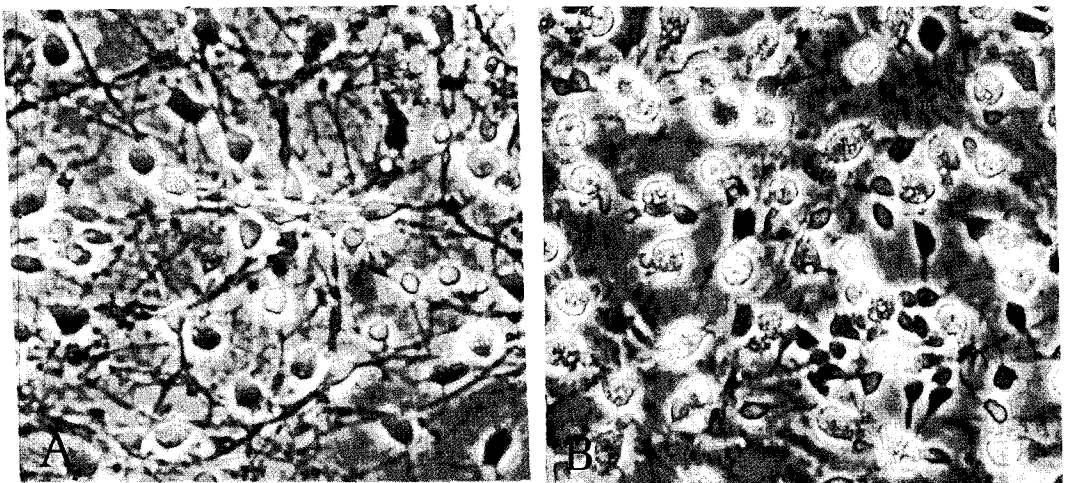


Fig. 3. The Photomicrograph of cerebral cortical neurons treated with serum-free conditions for 24hr. Cells were presence (A) or absence (B) of serum

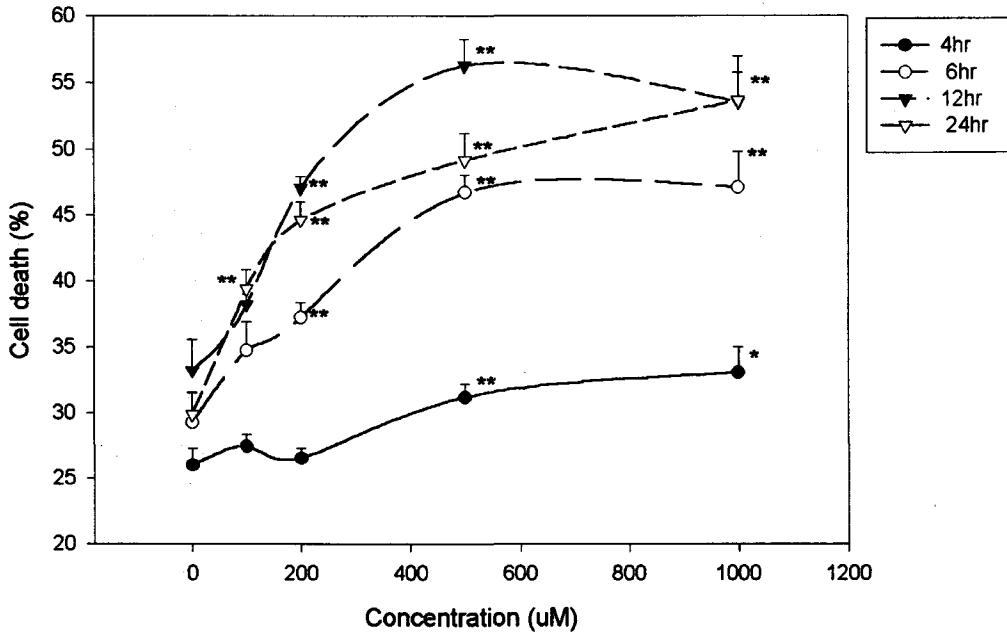


Fig. 4. Dose response curves for glutamate-induced LDH release in primary neuronal culture. The results are expressed as percentage of the cell death with Triton X-100. Inhibitory effects of significantly different when compared to control group. * P<0.5, ** P<0.01. Mean \pm SEM (bars).

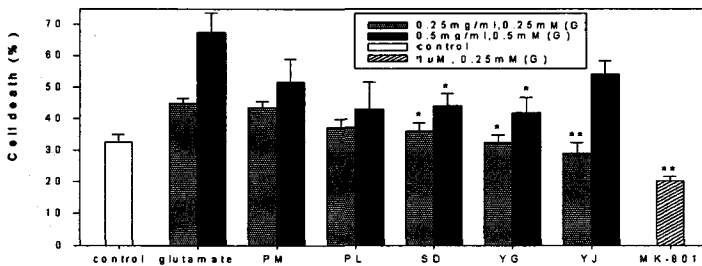


Fig. 5. Inhibitory effects of Korean traditional prescriptions on glutamate-induced neuronal death. Cultures were exposed to 0.25 mM glutamate(G) with 0.25 mg/ml prescription and 0.5 mM glutamate with 0.5 mg/ml prescription for 12 hr, and effects of MK-801 (1 μ M) on glutamate (0.25mM) - induced neuronal death. Inhibitory effects of significantly different when compared to glutamate-induced group. * P<0.5, ** P<0.01. Mean \pm SEM (bars).

IV. 고 찰

본 연구에서는 補益劑, 補氣劑를 중심으로 일반적으로 쉽게 접근할 수 있는 전탕 방법을 통해 생체내의 노화현상으로 일어나는 신경계 질환을 유도하여 이에 대한 한약재 효능을 알아보았다. 신경세포를 초대배양하여 배양 초기부터 신경세포가 퇴화되는 과정을 관찰하여 보았을 때, 신경돌기가 세포접종 후부터 몇시간내에 생기기 시작하고 7일 동안 신경돌기의 숫자가 증가하기 시작하며 11일에는 신경돌기형성이 왕성하고 세포체의 크기가 증가하기 시작한다는 보고^{17, 19)}와 일치하는 결과를 보았다(Fig. 1). 또한 초대배양에서 신경세포의 발달은 배양후 12일 혹은 14일에 나타난 결과²⁰⁾와 마찬가지로 배양후 13일에 MAP-2로 신경세포를 면역염색하였을 때 양성적인 반응을 보인 것으로 보아 신경세포가 발달한것임을 확신할 수 있었다(Fig. 2), 실험결과에 제시하지는 않았지만 DIV 7의 방출물이 DIV 11~13의 glutamate에 대한 LDH 변화를 보다 더 낮은 것으로 보아 DIV 7은 glutamate에 의한 신경세포 손상에 덜 민감한 것을 짐작할 수 있다. 이러한 사실은 형태학적인 분화단계와 glutamate 신경독성에 예민한 성숙한 신경세포의 결과²⁴⁾와 일치함을 볼 수 있으며, 이러한 사실에서 신경세포 발달의 생리학적인 기준은 흥분성 신경독성에 민감한 때로 정의할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 약물 또는 한약재의 효과를 신경세포가 발달한 DIV 11~13에 실시하였다.

배지나 혈청에 있는 glutamate는 신경독성을 나타내기에 충분한 요인을 가지고 있다²¹⁾. 혈청은 세포증식, 분화, 세포의 형태에 깊은 영향을 미치며 세포생존을 결정짓는데 관여²²⁾하고, 일반적으로 세포의 성장에 유익하지만 배지를 정기적으로 교환하면 신경세포배양에 유해하다²³⁾고 하였다. 혈청에는 신경세포에 독성있는 요인들을 가지고²⁴⁾있기 때문에 이러한 신경독성을 줄이기 위해 혈청이 없는 배지를 사용하기도 한다^{3, 25)}. 본 실험에서는 신경세포배양의 가장 보편적인 성장요인을 제거하여 생리학적인 세포사멸을 형태학적인 양상으로 보았을 때 세포가 피사되는 현상을 보였다(Fig. 3). 또한 노화현상중의 하나인 퇴행성신경질환을 유도하기 위한 glutamate의 적정 농도와 시간을 multiple comparisons test를 통한 Scheffe방법으로 알아보았을 때 4시간에서는 0.1mM, 6시간 배양에서는 0.5mM, 12시간 배양은 0.2mM로 대체로 일정하게 $P < 0.05$ 의 유의성있는 차이를 보였으며, 24시간 배양에서는 일정농도 이상이 아닌 다양한 농도에서 높은 차이를 보였다. 따라서 12시간 배양으로 0.25mM과 0.5mM의 glutamate농도를 정한후 이에 대한 한약재 효과를 알아보았다. 대체로 연령고본단과 십전대보탕, 육미지황원이 신경세포손상에 보호 효과가 좋았다. 0.5mM glutamate와 0.5 mg/ml의 한약재농도에서는 십전대보탕, 연

령고분단등이 신경세포손상에 대한 효과($P < 0.05$)가 있었으며, 0.25 mM glutamate와 0.25 mg/ml 각각의 탕제에서는 십전대보탕($P < 0.05$)과 연령고분단($P < 0.05$), 육미지황원($P < 0.01$)에서 세포손상에 대한 유의성있는 효과를 보였다(Fig. 5).

퇴행성 신경질환에 관련된 glutamate 신경독성에 있어서 NMDA 수용체 길항제인 MK-801과 nitric oxide synthase 억제제인 N-nitro-L-arginine (N-Arg)를 처리하였을 때 glutamate 첨가여부에 따라 MK-801이 더욱 강한 보호효과를 나타낸 것으로 보아 glutamate에 의한 신경독성은 NMDA 수용체의 작용으로 인해 나타난다고 보고되어 있다¹⁹⁾. MK-801과 ketamine은 산소결핍증 손상과 NMDA 수용체를 매개로 한 신경독성을 보호²⁶⁾하므로 NMDA 수용체는 대부분의 대뇌피질 신경세포에서 glutamate에 의한 신경세포손상의 주된 역할을 매개하고 있는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 따라서 MK-801을 처리하여 glutamate에 대한 억제효과가 있음을 확인하였다(Fig. 9).

한약탕제의 신경세포손상에 관한 보호작용의 기전이 밝혀져 있지 않으므로 앞으로 Bcl-2와 같은 세포사멸억제 단백질의 발현정도를 확인하고²⁸⁾, β -amyloid peptide(A β P)으로 신경세포의 퇴행과정을 유도하여 한약제의 신경세포사멸 억제 효과를 알아볼 필요가 있다고 생각된다. 이상의 신경세포 퇴행과정에 미치는 한약탕제 보호효과를 토대로 노화에 관련된 뇌신경세포의 손상억제 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 생각되며 퇴행성 질환이나 뇌질환연구의 치료제 개발 및 효능검색에 이바지할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Gwag BJ. 「Neuronal apoptosis and amyloid-induced cell death trends in medical research.」 『Korean Society of medical biochemistry and molecular biology news』 1998; 5(2): 15-20.
2. Thomas RJ. 「Excitatory amino acids in health and disease(review).」 『J. Am. Geriatr. Soc.』 1995; 43: 1279-1289.
3. Driscoll BF, Deibler GE, Law MJ and Crane AM. 「Damage to neurons in culture following medium change: Role of glutamine and extracellular generation of glutamate.」 『J. Neurochem.』 1993; 61: 1795-1800.
4. Rosenberg PA, 「Accumulation of extracellular glutamate and neuronal

- death in astrocyte-poor cortical cultures exposed to glutamine.」 『Glia』, 1991; 4: 91-100.
5. Brundell P, Goodnow RJ, Kerry CJ, Nakanishi K, Sudan HL. 「Quisqualate-sensitive glutamate receptors of the locust *Schistocerca gregaria* are antagonized by intracellularly applied philanthotoxin and spermine.」 『Neurosci. Lett.』 1991; 131: 196-200.
 6. Nawy S, Jahr CE. 「Suppression by glutamate of a GMP-activated conductance in retinal bipolar cells.」 『Nature Lond.』 1990; 346: 269-271.
 7. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS V, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamier JS. 「A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compound s.」 『Nature』 1993; 364: 626-632.
 8. Meldrum B, Garthwaite J. 「Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease.」 『Trends Pharmacol Sci』 1990; 11: 379-387.
 9. Rothman SM, Olney JW, 「Excitotoxicity and the NMDA receptor.」 『Trends Neurosci』 1987; 10: 299-302.
 10. Choi DW. 「Calcium-mediated neurotoxicity relationship to specific channel types and role in ischemic damage.」 『Trends Neurosci.』 1988; 11: 465-469.
 11. Davis AA, and Temple S. 「A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex.」 『Nature』 1994; 372: 263-266.
 12. Araki W, Kitaguchi N, Tokusima Y, Ishii K, Aratake H, Shimohama S, Nakamura S, Kimura J. 「Trophic effect of beta-amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture.」 『J. Biochem. Biophys.』 Res. Commun 1991; 181: 265-271.
 13. Kaku DA, Giffard RG, Choi DW. 「Neuroprotective effects of glutamate antagonists and extracellular acidity.」 『Science』 1993; 260: 1516-1518.
 14. Ishii K, Inoue H, Hakura A, Araki W, Masuda T. 「Immortalization of fetal mouse brain glial cells by human papillomavirus type 16 E7 genes」. 『Cell Struct. Funct.』 1992; 17: 197-202.
 15. 黃度淵. 『證脈·方藥合編』. 서울: 南山堂, 1988.
 16. Gwag BJ, Koh JY, Demaro JA, Ying HS, Jacquin, Choi DW. 「Slowly triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures.」 『Neuroscience』 1997; 77(2): 393-401.
 17. Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 「The establishment of polarity by

- hippocampal neurons in culture.」 『J. Neurosci』 1988; 8: 1454-1468.
18. Koh JY, Choi DW. 「Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay.」 『Journal of Neuroscience Methods』, 1987; 20: 83-90.
19. Katayama M, Mizuta I, Sakoyama Y, Kohyama-Koganeya A, Akagawa K, Uyemura K, Ishii K. 「Differential expression of neuroD in primary cultures of cerebral cortical neurons.」 『Experimental cell research』 1997; 236: 412-417.
20. Peterson C, Neal JH, Cotman CW. 「Development of N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in cultured hippocampal neurons.」 『Dev. Brain Res』 1989; 48: 187-195.
21. Cambier D, Ait-Ikhlef A, Parvy P, Hantaz-Ambroise D, Murawsky M and Rieger F. 「Excess extracellular and low intracellular glutamate in poorly differentiation wobbler astrocytes and astrocyte recovery in glutamine-depleted culture medium.」 『J. Neurochem.』 1995; 65: 1199-1204.
22. Ye ZC and Sontheimer H. 「Astrocytes protect neurons from neurotoxic injury by serum glutamate.」 『Glia』 1998; 22: 237-248.
23. Rosenberg PA, and Aizenman E. 「Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex」 [published erratum appears in Neurosci. Lett., 1990, 116: 399]. 『Neurosci.』
24. Buchhalter JR and Dichter MA. Neurons. In: A.A. Boulton, G.B. Baker, and W. Walz, eds. 『Practical Cell Culture Techniques.』 Totowa, New Jersey: The Human Press, Inc., 1992; 241-268.
25. Bottenstein JE. 『Environmental influences on cells in culture. In: Practical Cell Culture Techniques.』 A.A. Boulton GB. Baker, and W. Walz, eds. Totowa, New Jersey: The Human Press, Inc., 1992; 63-85.
26. Weiss J, Goldberg MP, Choi DW. 「Ketamine protects cultured neocortical neurons from hypoxic injury.」 『Brain Res.』 1986; 380: 186-190.
27. Yamauchi M, Omote K, Ninomiya T. 「Direct evidence for the role of nitric oxide on the glutamate-induced neuronal death in cultured cortical neurons」, 『Brain Research.』 1998; 780; 253-259.
28. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.」 『Nature』 1990; 22: 348(6299).