

원 저

저산소증으로 유발된 지연성 신경세포사에 牛黃清心元이 미치는 영향

김민석, 정승현, 신길조, 문일수¹⁾, 이원철

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 의과대학 해부학교실²⁾

The Effect of *Woohwangcheongsim-won* on Delayed Neuronal Death in Hypoxia

Min-Seok Kim, Sung-Hyun Jeong, Gil-Cho Shin, Il-Soo Moon¹⁾, Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University
Department of Anatomy, College of Medicine, Dongguk University²⁾

Objectives : The purpose of this investigation was to evaluate the effects of *Woohwangcheongsim-won* and to study the mechanism for neuronal death protection in hypoxia with Embryonic day 20 (E20) cortical cells of a rat (Sprague Dawley).

Methods : E20 cortical cells were dissociated in neurobasal media and grown for 14 days in vitro (DIV). On 14 DIV, *Woohwangcheongsim-won* was added to the culture media for 24 hrs or 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock and further incubated in normoxia for another three days. On 20 DIV, *Woohwangcheongsim-won*'s effects for neuronal death protection were evaluated by LDH assay, propidium iodide stain and phospho-H2AX immunostain and the mechanisms were studied by Bcl-2, Bak, Bax, caspase family, PKC α , calpain I.

Results & Conclusions :

1. This study indicated that *Woohwangcheongsim-won*'s effects for neuronal death protection in hypoxia were confirmed by LDH assay, propidium iodide stain and phospho-H2AX immunostain in culture method of Embryonic day 20(E20) cortical neuroblasts.

2. *Woohwangcheongsim-won*'s mechanisms for neuronal death protection in hypoxia are to reduce the membrane damage fraction, to restrain DNA truncate, to restrain inflow of cytochrome c into cellularity caused by Bak diminution, to reduce the caspase cascade initiator caspase-8 and the effector caspase-3, to reduce the calpain I activity and to increase PKC and its activity in the membrane fraction. (*J Korean Oriental Med 2002;23(3):145-163*)

Key Words: *Woohwangcheongsim-won*, Bcl-2, Bax, caspase family, PKC α , calpain I.

緒 論

뇌신경세포의 손상·사망 기전에 관해서는 허혈로

인한 중심(core)에서의 직접적인 괴사성 신경세포사(necrotic neuronal death)와 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)가 있다^{1,2)}. 지연성 신경세포사는 허혈성 손상을 받은 주변(penumbra region)이나 특정 부위의 신경세포들이 3일에서 1주일 후 손상·사망에 이르게 되는 것으로, 이는 apoptosis에 의한 것으로 알려져 있다³⁾.

· 접수 : 2002년 6월 10일 · 채택 : 2002년 7월 3일
· 교신저자 : 정승현, 경북 경주시 용강동 357번지 동국대학교
경주한방병원
(054-770-1253, E-mail : omdjeong@hanmail.net)

Apoptosis는 세포의 분해를 위해 세포내의 효소들이 활발하게 관여하는 능동적인 죽음의 기전으로 세포의 비증감소, 염색사의 농축, DNA의 분절 등의 형태학적인 변화를 특징으로 하는데, 이러한 기전의 조절 및 치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁹⁾.

자연성 신경세포사의 기전으로는 tumor necrosis factor(TNF) receptor-1, CD95(Fas) receptor와 같은 사망 수용체(death receptor)의 상호작용에 의한 경우와 pro-apoptotic 혹은 anti-apoptotic Bcl-2 family 단백질의 작용으로 mitochondria로부터의 cytochrome c의 유출에 의한 경우 및 형태학적, 생화학적 변화들에 의한 caspase family의 활성화와 specific cellular substrates의 분열이 있다²⁾. 또한 NMDA 수용체를 통하여 유입된 Ca²⁺에 의한 calpain 및 PKC의 활성화로 인한 기전이 있다⁹⁾.

牛黃清心元은 中風 中臟腑의 陽閉證에 사용되는 處方으로 <太平惠民和劑局方>⁷⁾에 風으로 인한 半身不隨, 語言蹇澁, 健忘, 恍惚去來, 頭目眩暈, 胸中煩鬱, 痰涎壅塞 등을 치한다고 기재되어 있으며, 中風 급성기의 의식장애에 常用되고 있다^{8,9)}. 자연성 신경세포사와 관련된 牛黃清心元의 실험적 연구로는 조 등^{10,11)}의 흰쥐를 이용한 허혈모델과 배양한 대뇌 신경세포 및 소뇌 신경세포를 이용한 저산소증 모델에서 자연성 신경세포사의 감소효과, 한¹²⁾의 흰쥐를 이용한 eNOS, p53 유전자의 발현 증가와 VCAM-1, TNF- α 유전자의 발현 감소를 통한 혈관의 항상성 유지효과가 있으나, 신경세포사 방지와 관련된 작용기전에 대한 연구는 없었다.

이에 본 연구에서는 牛黃清心元의 작용기전을 구명하고자 저산소증으로 apoptosis를 유발한 흰쥐의

Table 1. The Amount and Composition of *Woohwangcheongsim-won*

Species	Part used	Latin name	Weight(mg/pill)
<i>Dioscorea japonica</i> DECNE	Root	<i>Rhizoma Dioscoreae</i> (山藥)	280.0
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH(baked)	Root	<i>Radix Glycyrrhizae</i> (甘草)	200.0
<i>Panax ginseng</i> C.A. MEY.	Root	<i>Radix Ginseng</i> (人蔘)	100.0
<i>Typhae latifolia</i> L(baked)	Pollen	<i>Typhae Pollen</i> (蒲黃)	100.0
<i>Trictium sativum</i> L(baked)	Seed	<i>Massa Medicata Fermentata</i> (神麩)	100.0
<i>Rhinoceros unicornis</i> L.	Cornu	<i>Rhinoceri Cornu</i> (犀角)	80.0
<i>Glycine max</i> MERR(baked)	Seed	<i>Glycine Semen Germinatum</i> (大豆黃卷)	70.0
<i>Cinnamomum cassia</i> PRESL	Cortex	<i>Cortex Cinnamomi</i> (肉桂)	70.0
<i>Equus asinus</i> L(baked)	Gelatin	<i>Asini Gelantium</i> (阿膠)	70.0
<i>Paeonia lactiflora</i> PALL	Root	<i>Radix Paeoniae</i> (白芍藥)	60.0
<i>Liriope platyphylla</i> WANG	Root	<i>Radix Liriopeis</i> (麥門冬)	60.0
<i>Scutellaria baicalensis</i> GEORGI	Root	<i>Radix Scutellariae</i> (黃芩)	60.0
<i>Angelica gigas</i> NAKAI	Root	<i>Radix Angelicae</i> (當歸)	60.0
<i>Ledebouriella divaricata</i> HIROE	Root	<i>Radix Ledebouriellae</i> (防風)	60.0
<i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ	Root	<i>Rhizoma Atractylis</i> (白朮)	60.0
<i>Bupleurum falcatum</i> L	Root	<i>Radix Bupleuri</i> (柴胡)	50.0
<i>Platycodon grandiflorum</i> A. DC.	Root	<i>Radix Platycodi</i> (桔梗)	50.0
<i>Prunus armeniaca</i> L	semen	<i>Semen Armeniacae Amarum</i> (杏仁)	50.0
<i>Poria cocos</i> WOLF	Mycelium	<i>Poria</i> (白茯苓)	50.0
<i>Cnidium officinale</i> MAKINO	Root	<i>Rhizoma Cnidii</i> (川芎)	50.0
<i>Bos taurus domesticus</i> GMELIN	Gallstone	<i>Calculus Bovis</i> (牛黃)	48.0
<i>Saiga tatarica</i> L	Cornu	<i>Cornu Tataricae</i> (羚羊角)	40.0
<i>Moschus moschiferus</i> L	Resin	<i>Moschus</i> (麝香)	40.0
<i>Dryobalanops aromatica</i> GAERTN. f	Resin	<i>Borneolum</i> (龍腦)	40.0
<i>Ampelopsis japonica</i> MAKINO	Root	<i>Radix Ampelopsis</i> (白藜)	30.0
<i>Zingiberis officinale</i> ROSC(baked)	Root	<i>Rhizoma Zingiberis</i> (乾薑)	30.0
<i>Zizyphus jujuba</i> MILL	Fruit	<i>Jujubae Fructus</i> (大棗)	230.0
<i>Apis mellifera</i> L.		<i>Mel</i> (蜂蜜)	1,600.0
Gold		<i>Gold</i> (金箔)	q.s.
Total			3,750.0

대뇌신경세포에서 Bcl-2 family, caspase family, calpain, PKC 단백질의 표현 및 PKC 활성화에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

實驗

1. 재료

1) 동물

본 연구는 대한동물실험센터에서 구입한 체중 250~300g의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대상으로 실험을 실시하였다.

2) 약제

실험에 사용된 牛黃清心元은 東醫寶鑑³⁾에 준하여 동국대학교 한의과대학 부속 경주한방병원에서 조제된 것으로 處方 구성과 함량은 다음과 같다(Table I).

3) 牛黃清心元의 물추출액 제조

牛黃清心元 1丸(3.75g)을 125ml의 증류수에 넣어

균질화하고 상온에서 4시간, 4°C에서 18시간 혼든 후, 이를 15,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45µm)한 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의 양은 1ml 추출액 3 튜브를 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

4) 항체

본 연구에 사용한 항체를 Table II에 나타내었다.

2. 방법

1) 신경세포배양

임신 20일(embryonic day 20 : E20)의 Sprague-Dawley계 흰쥐의 대뇌 피질신경세포는 Brewer 등의 방법에 따라 배양하였으며, 牛黃清心元은 배양 14일(14 day in vitro : DIV)에 처리하였다. 임신 20일의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아의 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37°C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1mM sodium pyruvate와 10mM HEPES(pH

Table 2. Antibodies Used in This Work

	Antibody	Host	Usage Source
Bak	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Bax	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Bcl-2	mouse	IB	monoclonal Upstate Biotechnology Inc.
CaMK II	rabbit	IB	polyclonal obtained from Dr. IS Moon
Caspase-1	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Caspase-3	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Caspase-6	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Caspase-8	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Caspase-10	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
densin-180	rabbit	IB	polyclonal obtained from Dr. IS Moon
eEF-1α	mouse	IB	monoclonal Upstate Biotechnology Inc.
eEF-1α	rabbit	IC	polyclonal obtained from Dr. IS Moon
H2AX(Serine 139)	rabbit	IC	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
NR1	mouse	IB	monoclonal PharMingen
NR2A	rabbit	IB	polyclonal obtained from Dr. IS Moon
NR2A	mouse	IB	monoclonal obtained from Dr. IS Moon
NR2B	rabbit	IB	polyclonal obtained from Dr. IS Moon
NR2B	mouse	IB	monoclonal obtained from Dr. IS Moon
NR2C	rabbit	IB	polyclonal Chemicon
PSD-95	rabbit	IB	polyclonal obtained from Dr. IS Moon
PSD-95	mouse	IC	monoclonal Upstate Biotechnology Inc.
septin 6	rabbit	IB	polyclonal obtained from Dr. IS Moon
spectrin	rabbit	IB	polyclonal Chemicon

IB ; immunoblot.IC ; immunocytochemistry

7.4)가 첨가된 HBSS용액(Gibco, BRL) 5ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1ml Hank's 용액으로 옮기고 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 이 후 분산된 세포를 모으고 세포수를 측정 한 다음 약 1,500cells/mm²되도록 B27을 첨가한 plating Neurobasal media(Gibco, BRL)(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I, 0.1ml 25mM glutamate, 0.1ml 25mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 5% CO₂ 배양조에서 배양한 다음 2~3일 간격으로 배양액을 feeding Neurobasal media(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I)로 1/3씩 교환하였다.

2) 牛黃清心元의 처리와 저산소증 유발

배양 14일에 牛黃清心元을 농도별로 첨가하고 24시간 혹은 72시간 처리하였다. 이때 24시간 처리군은 24시간 후 배양액으로 2번 세척하고 계속 배양하였다. 배양 17일에 CO₂ Water Jacketed Incubator(Forma Scientific)를 이용하여 98% N₂/5% CO₂, 37°C 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유발하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소환경 배양조에 옮기고 배양 20일에 실험을 수행하였다.

3) Propidium iodide 염색

Poly-D-lysine을 처리한 coverglass를 24-well culture plate에 넣어 E20 대뇌 신경세포를 배양하고, 300 μ l의 배지에 100 μ g/ml의 propidium iodide(PI) 3 μ l를 넣고 37°C에서 10분간 방치한 후 HBSS 용액으로 1분씩 5회 세척하여 다중초점 현미경으로 관찰하였다.

4) 면역세포화학염색 및 다중초점 현미경 관찰(confocal microscopy)

배양용기(24-well plate)를 얼음 위에 올려놓고 배양액을 500 μ l의 ice-cold D-PBS(0.1g/L CaCl₂, 0.2g/L KCl, 0.2g/L KH₂PO₄, 0.1g/L MgCl₂-6H₂O, 8.0g/L NaCl, 2.16g/L Na₂HPO₄-7H₂O)로 교환해 주었다. D-PBS를 4°C methanol(500 μ l)로 교환하고 5분

후 -20°C methanol(500 μ l)로 다시 교환한 다음 -20°C에서 20분간 두었다. Methanol을 ice-cold D-PBS(500 μ l)로 교환하고 15분 후 preblock solution[0.05% triton, 5% normal goat serum in h-PBS(20mM NaPO₄, pH 7.4, 450mM NaCl)]을 넣어 4°C에서 1시간 처리하였다. 1차항체(1:2,000~5,000)를 넣고 4°C에서 1시간 반응시킨 후 실온에서 preblock solution으로 20분씩 3회 세척하였다. 형광물질이 표지된 2차항체(1:2,000)를 넣고 1시간 더 반응시킨 후, D-PBS로 15분씩 3회 세척하고, 부산대학교 유전공학연구소(LSM 510)나 경북대학교 공동기기실의 다중초점 현미경(BioRad MRC 1024/ES)으로 관찰하였다. 영상은 PhotoShop 5.0 software를 이용하여 가공하였다.

5) 면역염색(immunoblot)

12-well culture dish에 배양한 E20 대뇌 신경세포를 수확하여 1 \times SDS-gel loading buffer를 넣고 100°C에서 5분간 처리하였다. 각각 20 μ g의 단백질을 8% 혹은 15% SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)하고, nitrocellulose(NC) membrane에 옮겨(100V, 1시간) Ponceau S용액 [0.1%(w/v) Ponceau S, 0.1% acetic acid]으로 5분간 염색한 후 증류수로 탈염색하여 표준분자량의 위치를 확인하였다. NC를 TTBS용액(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.2% Tween-20, 0.02% Na₂S₂O₃)으로 10분간 세척하고 4°C에서 16~18시간 처리한 후 1차항체(1:2,000~5,000)를 넣고 2시간 반응시켰다. NC를 TTBS용액으로 10분씩 4회 세척하고, alkaline phosphatase-conjugated 2차항체(1:2,000)를 넣어 2시간 반응시킨 후 TTBS용액으로 10분씩 2회, TBS(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.02% Na₂S₂O₃)용액으로 2회, alkaline phosphatase 완충용액(100mM Tris, pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂)으로 한번씩 각각 세척하였다. BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate P-toluidine salt) 및 NBT (p-nitro blue tetrazolium chloride)를 넣고 상온에서 발색시킨 후 증류수로 세척하여 발색을 중지하였다. 정량적 분석은 blot을 scan하여 NIH Scion Image Beta 3b software로 signal

density를 측정하였다.

6) LDH assay

배양액 20 μ l를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate(NADH 1mg/ml)를 20 μ l씩 가한 다음, 상온에서 2분간 혼든 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 더 흔들었다. 발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20 μ l씩 가하고 상온에서 20분간 혼든 후 0.4N NaOH를 100 μ l씩 가하고 상온에서 15분간 더 혼든 다음 ELISA reader로 흡광도(OD450)를 측정하였다.

7) PKC α 활성 측정

세포를 ice-cold PBS로 세척하고 0.5ml의 ice-cold hypotonic medium (1mM NaHCO₃, 5mM MgCl₂, 100 μ M PMSF)에 2분간 현탁하고 2분간 더 vortex하여 용해하였다. 핵과 용해되지 않은 세포를 600 \times g에서 5분간 원심분리하여 제거하고, 세포막과 세포질 분획을 100,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 얻었다. 세포막 분획에서 PKC α 활성은 peptide substrate [QKRPSQRSKYL]를 이용하여 측정하였다. 5 μ g의 단백질질을 assay buffer(50mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 100 μ M sodium vanadate, 100 μ M sodium pyrophosphate, 1mM sodium fluoride, 100 μ M PMSF)에 넣고 10 μ l의 750 μ M PKC α substrate peptide(50mM Tris-HCl, pH 7.5)를 첨가한 후 최종 부피가 90 μ l가 되도록 증류수를 보충하였다. 반응은 32P-ATP(10 μ Ci/reaction)를 넣음으로 시작하였고, 25 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켰다. 5% acetic acid를 10 μ l 넣어 반응을 중지시키고, 16,000 \times g에서 5분간 원심분리하여 상등액 90 μ l를 P81 Whatman paper(2cm²)에 떨어뜨린 후 5% acetic acid(10ml/cm² paper)에 넣고 10분간 가볍게 흔들여 세척하였다. Peptide에 결합된 radioactivity는 liquid scintillation counting으로 측정하였다. 32P의 P81 paper에 대한 비특이적 결합은 substrate peptide가 없는 반응으로 측정하였다.

8) Calpain I 활성 측정

Calpain I의 상대적인 활성은 기질인 spectrin의

분해산물을 면역염색하는 방법으로 측정하였다. 세포균질액을 전이시킨 NC를 anti-spectrin(Chemicon 240/235E)으로 면역하고, 분해되지 않은 spectrin인 240/235kDa와 분해산물인 155/150kDa peptide의 비율을 계산하여 牛黃清心元으로 전처리하지 않은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

9) Desitometry

면역염색이 끝나면 NC가 마르지 않은 상태에서 scanner(300 dpi)를 이용하여 이미지를 얻고, NIH Scion Image Software를 이용하여 band intensity를 측정하였다. 이때 2D Rolling Ball Mode로 background를 제거하였다.

10) 통계처리

모든 실험은 최소한 8배수로 시행하였고, 세포의 생존율은 대조군에 대한 백분율(% of control)로 표시하였다. 통계학적 유의성은 Mann-Whitney U test로 검증하였다.

結 果

1. 신경세포의 배양

1) 배양신경세포의 성숙

배양한 17 DIV E20 대뇌 신경세포의 위상차(phase-contrast) 현미경 사진을 Fig.6A에 나타내었다. 대뇌 및 소뇌의 신경세포는 배양 시작 후 2시간 정도부터 neurite를 생성하기 시작하였으며, 24시간 후에는 신경가지들이 20~30 μ m까지 자랐다. 또한 대뇌 피질신경세포는 특징적으로 여러 개의 가지 돌기를 내었다(Fig.1A). 이 연구에서는 serum이 첨가되지 않은 배지(serum-free media)를 사용하여 신경교세포는 약 10% 정도로 거의 증식이 일어나지 않아 대부분이 신경세포로 구성되어 있다.

2) 배양신경세포에서 연접단백질들의 표현

신경세포는 성숙 정도에 따라 허혈·저산소증, NMDA 등과 같은 처리에서 상당한 차이를 보인다.

따라서 배양한 신경세포의 성숙정도를 연결단백질들의 표현을 조사하여 알아보았다.

3, 4, 5, 7, 10, 14 DIV E20 대뇌 신경세포의 균질액 동일 분량을 전기영동하고 여러 가지 단백질에 대한 항체로 면역염색하여(Fig.2A) band intensity를 상대적으로 비교하였다(Fig.2B). Fig.2B에서 나타난 바와 같이 14 DIV에는 scaffold protein인 PSD-95와 세포접합단백질인 densin-180의 경우 선형으로 증가(linear increase)하는 단계이나, 대부분의 단백질들[NMDA 수용체 아단위(NR1, NR2A, NR2B, NR2C), protein translation elongation factor-1 α (eEF-1 α), Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II(CaMKII)]은 최

고의 성숙도를 보였다. 이 결과는 배양한 신경세포가 성숙하였음을 의미한다.

3) 다중초점 현미경 관찰을 이용한 신경세포의 성숙 확인

면역염색, 효소 활성의 측정 등을 시행한 20 DIV 대뇌 신경세포를 세포조직화학 방법으로 면역형광염색하고, 다중초점 현미경으로 관찰하였다(Fig.3). 연결 표지 단백질이며 scaffold protein인 PSD-

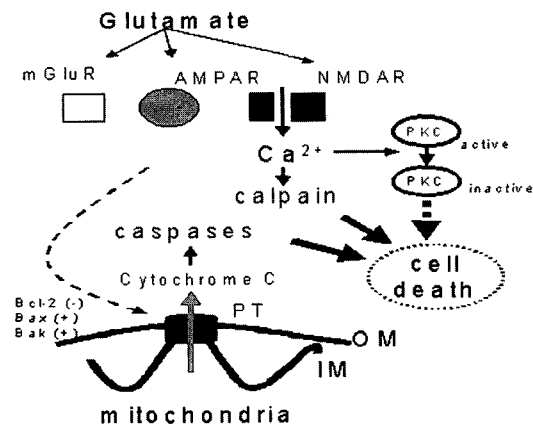


Fig. 1. A hypothesis for the delayed neuronal death by hypoxia.

Hypoxic insult causes accumulation of glutamate in the synaptic area and results in the overstimulation of NMDA-, AMPA-, and metabotropic glutamate receptors. The Ca²⁺ influx via NMDAR is known to activate calpain. Through, so far, unknown routes glutamate overstimulation results in the formation of mitochondrial permeability transition (PT) pores. The PT pores are formed by pro-apoptotic proteins such as Bax or Bak. In stead, formation of PT pores are inhibited by Bcl-2. Once PT pores are formed cytochrome c is released from mitochondria into cytosol and caspase cascade is initiated. The calpain and caspases degrade specific subsets of proteins that are essential for cellular life and eventually cause cell death. In hypoxic insult, PKC is rapidly inactivated. Therefore, activation of caspases and calpain, together with inactivation of PKC may be the main signaling pathway underlying delayed neuronal death by hypoxia. IM, mitochondrial inner membrane. OM, mitochondrial outer membrane.

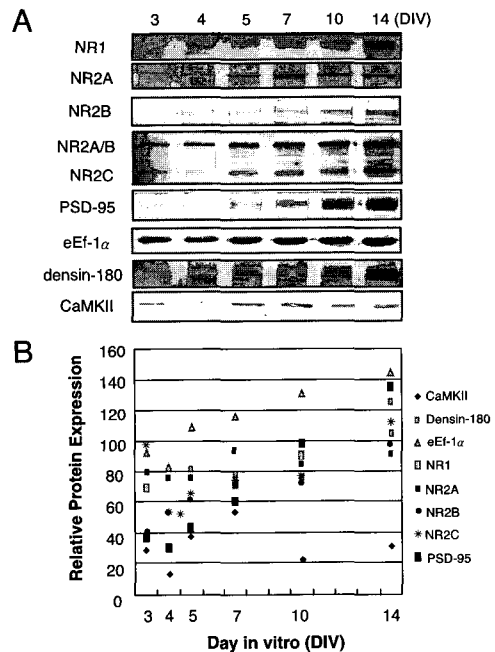


Fig. 2. Expression of synaptic proteins in dissociated neuronal cells.

A, Embryonic day 20 (E20) cortical cells of a rat (Sprague Dawley) were dissociated in Neurobasal media and grown for various days in vitro (DIV). Cells were harvested and lysed. Relatively equal volumes of each lysate were electrophoresed in 8% SDS-gel, transferred to nitrocellulose (NC) membrane, and immunoblotted with indicated antibodies. B, Images of the immunoblots were acquired by a scanner (300 dpi), signal intensities were measured as described in Materials and Methods, and relative intensities were plotted. NR1, NR2A, NR2B, and NR2C, NMDA receptor subunit 1, 2A, 2B, 2C, respectively. CaMKII, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. eEF-1 α , eukaryotic translation elongation factor-1 α .

95(Fig.3A, 3B)와 septin 6(Fig.3C), translation elongation factor-1 α (eEF-1 α)(Fig.3D)는 모두 잘 표현되어 있었으며, 특히 PSD-95의 경우 특징적인 puncta를 보였다(Fig.3B). 이는 상기의 면역염색 결과와 더불어 신경세포가 충분히 성숙하였음을 의미한다. 또한 NMDA 처리 후 MK801이 세포사를 방지하는 연구에서도 14~20 DIV 세포를 이용하여 실험을 수행한 보고¹⁹⁾가 있었으므로 본 연구에서도 이 시기의 세포를 이용하여 실험을 실시하였다.

2. 牛黃清心元이 저산소증 유발 후 지연성 신경세포사에 미치는 영향

1) LDH assay에 의한 저산소증 대뇌 신경세포 보호효과

배양한 흰쥐 태아 E20 대뇌 신경세포에 牛黃清心元으로 72시간 전처리하여 저산소증을 유발한 다음 정상산소환경에서 72시간 더 배양한 후 LDH assay를 이용하여 세포생존율을 조사하였다. 저산소증

(98% N₂/5% CO₂, 37°C, 3시간) 유발 전 72시간 牛黃清心元으로 전처리한 군은 대조군에 비하여 96-well culture plate를 사용한 경우에는 10 μ g/ml 牛黃清心元 농도에서 107.1%, 20 μ g/ml 牛黃清心元 농도에서 110.7%의 생존율을 보였다(Fig.4A). 같은 조건에서 24-well plate를 사용한 경우에는 10 μ g/ml 牛黃清心元 농도에서 113.6%, 20 μ g/ml 牛黃清心元 농도에서 109.8%의 생존율을 보였으며, 12-well plate를 사용한 경우에는 20 μ g/ml 牛黃清心元 농도에서 144.4%의 생존율을 보였다(Fig.4A). 牛黃清心元으로 24시간 전처리하여 저산소증(98% N₂/5% CO₂, 37°C, 3시간)을 유발한 경우에는 12-well plate를 사용한 경우 20 μ g/ml 牛黃清心元 농도에서 140%의 생존율을 보였다(Fig.4B). 牛黃清心元으로 72시간 전처리하여 저산소증(98% N₂/5% CO₂, 37°C, 4.5시간)을 유발한 경우에는 24-well plate를 사용한 경우 10 μ g/ml 牛黃清心元 농도에서 104.9%, 20 μ g/ml 牛黃清心元 농도에서 111.1%의 생존율을 보였다(Fig.5). 이는 牛黃清心元으로 전처리하여도 저산소증에 의한 신경세포사를 완화하는 효과가 있음을 의미한다.

2) Propidium iodide 염색에 의한 저산소증 대뇌 신경세포 보호효과

Propidium iodide는 세포막 손상이 일어나 사망한 세포에 들어가 핵산에 끼어든다. 저산소증을 유발한 신경세포를 propidium iodide로 염색하고, confocal microscope로 관찰하였다. 이를 위상차 영상과 합병한 사진을 Fig.6에 나타내었다. Propidium iodide에 염색되는 세포는 전체 세포수의 약 20%를 차지하는 것으로 보아, 본 연구에서 사용한 저산소증 모델(95% N₂/2% CO₂, 37°C)에서는 저산소증 유발 후 3일에 약 20%가 사망한 것으로 나타났다. 그러나 하나의 배양 슬라이드에서도 위치에 따라 세포사의 정도가 크게 달랐기 때문에 牛黃清心元으로 전처리한 군과 대조군과의 차이는 이 방법으로 분명히 밝혀 수 없었다.

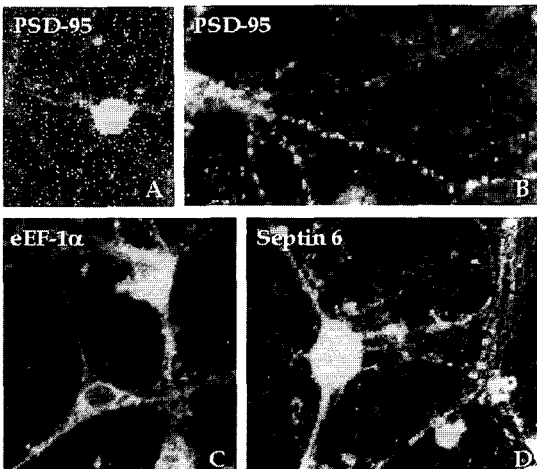


Fig. 3. Immunocytochemistry of synaptic proteins.

20 DIV rat E20 cortical cells were stained with specific primary antibodies against PSD-95 (A, B), eEF-1 α (C), and septin 6 (D). An FITC-conjugated secondary antibody was used to visualize the antigen as described in detail in Materials and Methods. Note that all these proteins were well expressed and that punctate structures, characteristics of a synapses, are readily seen in PSD-95 immunostained images (A, B)

3) H2AX 면역염색에 의한 저산소증 대뇌 신경세포 보호효과

Nucleosome의 C-말단에 특이하게 존재하는 H2AX는 DNA에 손상이 생길 경우 Serine 139번에서 심하게 인산화를 유발하는데, 이것은 DNA가 조

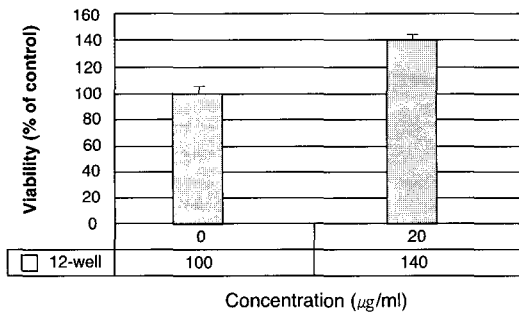
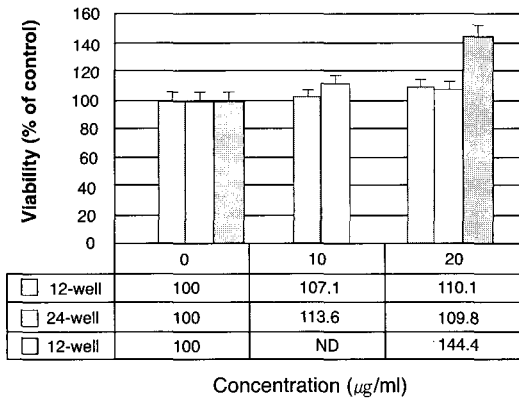


Fig. 4. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on neuronal protection in hypoxia.

A, 72 hrs treatment of *Woohwangcheongsim-won*. E20 cortical cells were grown in 12-, 24-, and 96-well plates. On 14 DIV, *Woohwangcheongsim-won* was added to the culture media at various concentrations and incubated for 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (98% N₂/5% CO₂, 37° C, 3 hrs) and further incubated in normoxia for another three days. Cell viabilities were measured by LDH assay and expressed as % of control. B, 24 hrs treatment of *Woohwangcheongsim-won*. E20 cortical cells were grown in 12-well plates. On 14 DIV, *Woohwangcheongsim-won* was added to the culture media at various concentrations and incubated for 24 hrs. After treatment, *Woohwangcheongsim-won* was removed by washing cells twice with culture media. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (98% N₂/5% CO₂, 37° C, 3 hrs) and further incubated in normoxia for another three days. Cell viabilities were measured by LDH assay and expressed as % of control.

각조각으로 잘려지고 있다는 표시가 된다. 이것을 phospho-H2AX (Serine 139) 항체를 이용하여 염색함으로써 apoptosis를 보다 신속하고 쉽게 확인할 수 있다. 배양한 흰쥐 태아 E20 대뇌 신경세포에 牛黃清心元으로 72시간 전처리하여 저산소증을 유발한 다음 정상산소환경에서 72시간 더 배양한 후 phospho-H2AX (Serine 139) 항체를 이용하여 세포의 핵을 면역염색한 결과를 Fig.7에 나타내었다. 대조군

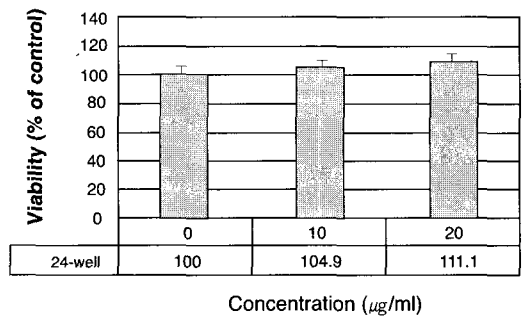


Fig. 5. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on neuronal protection in severe hypoxia. *Woohwangcheongsim-won* was added to 14 DIV E20 cortical cultures in 24-well plate for 72 hrs. Hypoxic shock were given for 4.5 hrs and cell viabilities were measured by LDH assay.images (A, B)

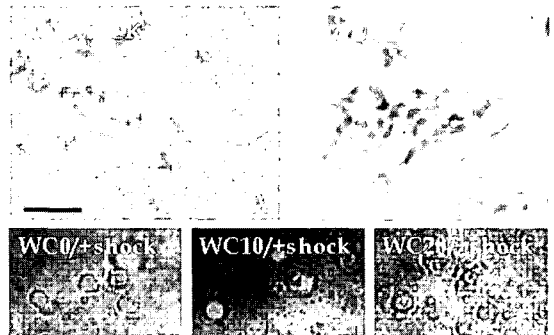


Fig. 6. Phase-contrast and confocal images of neurons in hypoxia.

Woohwangcheongsim-won was added to 14 DIV E20 cortical cultures in 24-well plate for 72 hrs. Phase-contrast images were taken before (A) and 3 days after shock (98% N₂/5% CO₂, 37° C, 3 hrs) (B). On 3 days after shock, i.e. on 20 DIV, cells were stained with propidium iodide (PI). Composites of phase-contrast and confocal images of cultures without (C), with 10 µg/ml *Woohwangcheongsim-won* (D), or with 20 µg/ml *Woohwangcheongsim-won* were shown. Bar; 20 µm.

에 비하여 10 μ g/ml의 牛黃清心元으로 전처리한 경우에는 immunostain puncta의 수가 약 10% 감소되었고(Fig.7B), 20 μ g/ml의 牛黃清心元으로 전처리한 경우에는 약 40%가 감소되었다(Fig.7C). 또한 전반적으로 puncta의 intensity도 牛黃清心元의 농도가 증가함에 따라 감소되었다. 이 결과는 牛黃清心元이 DNA의 절단을 완화시키는 효과가 있음을 의미한다.

3. 牛黃清心元이 저산소증에서 apoptosis와 관련된 단백질의 표현에 미치는 영향

1) Anti-apoptotic protein Bcl-2의 표현에 미치는 영향

Mitochondria로부터 cytochrome c의 세포질내 유리는 mitochondrial permeability transition(PT) pore를 통하여 일어나며, 유리된 cytochrome c는 caspase를 활성화시켜 세포사를 유발한다. 흰쥐 태아 E20 대뇌 신경세포 배양(12-well plate) 14일에 牛黃清心元으로 72시간 전처리하고 저산소증(98% N₂/5% CO₂, 37°

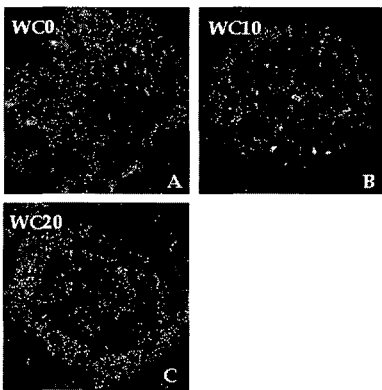


Fig. 7. Confocal microscopic images of phospho-H2AX immunocytochemistry.

Woohwangcheongsim-won was added to 14 DIV E20 cortical cultures in 24-well plate for 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (98% N₂/5% CO₂, 37° C, 3 hrs) and further incubated in normoxia for 3 days. On 20 DIV, cells were immunostained with an antibody against phospho-H2AX and visualized with an FITC-labeled secondary antibody. Each image represents a typical nucleus of a neuron shocked in the absence (A, *Woohwangcheongsim-won* 0), with 10 μ g / ml *Woohwangcheongsim-won* (B, *Woohwangcheongsim-won* 10) or with 20 μ g / ml *Woohwangcheongsim-won* (C, *Woohwangcheongsim-won* 20).

C, 3시간)을 유발한 다음 3일 후에 세포를 수확하여 SDS-gel loading 완충용액으로 세포를 용해시켜 전기영동하였고(15% SDS-gel, 40 μ g/lane), 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮겨 Bcl-2의 표현을 면역

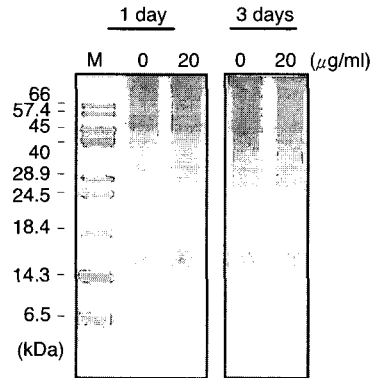


Fig. 8. Electrophoretic profiles of proteins in cell lysates. *Woohwangcheongsim-won* was added to 14 DIV E20 cortical cultures in 24-well plate for 24 or 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (98% N₂/5% CO₂, 37° C, 3 hrs) and further incubated in normoxia for 3 days. On 20 DIV, cells were harvested by scraping, equal amount of proteins (20 μ g) were electrophoresed in 15% SDS-gels and stained with Coomassie-R250. M, Molecular sizes in kDa.

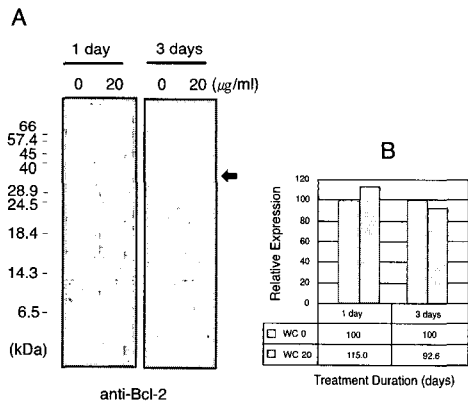


Fig. 9. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the expression Bcl-2.

A, 15% SDS gels were prepared as in Fig.8. Proteins were transferred to NC and immunoblotted with antibodies against Bcl-2. B, Immunoblot signals were analyzed as described in Materials and Methods, and relative amounts of Bcl-2 were expressed in % of control. The position of anti-Bcl-2 marked as an arrow. Molecular sizes were shown in far left in kDa.

염색하여 조사하였다.

대조군과 牛黃清心元 처리군의 동일한 분량(equal relative volume)을 전기영동하고 Coomassie 염색한 결과를 Fig.8에 나타내었다. 단백질의 양을 densitometer로 측정된 결과 牛黃清心元으로 72시간 전처리한 군이 24시간 처리한 군보다 약 30% 더 많았는데, 이는 24시간 처리 후 세척하는 과정에서 세포들이 죽은 것으로 보인다. 그러나 대조군과 牛黃清心元으로 전처리한 군 간의 차이는 없었다.

면역염색방법으로 Bcl-2의 표현을 조사한 결과 24시간 20 μ g/ml 牛黃清心元으로 전처리한 경우에는 대조군에 비하여 115%, 72시간 처리한 경우에는 92.6%의 표현을 보였다(Fig.9).

2) Pro-apoptotic protein Bak, Bax의 표현에 미치는 영향

상기와 같은 조건에서 면역염색방법으로 apoptosis 촉진 단백질로 알려진 Bak과 Bax의 표현을 조사하였다. Bak는 대조군에 비하여 24시간 牛黃清心元으로 전처리한 경우에는 대조군에 비하여 88.8%, 72시간 처리한 경우에는 90.7%의 표현을 보였다(Fig.10).

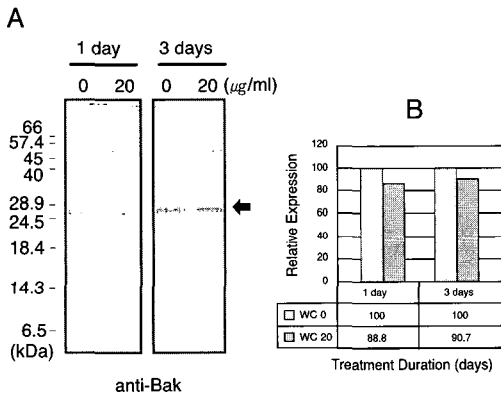


Fig. 10. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the expression Bak.

A, 15% SDS gels were prepared as in Fig.8. Proteins were transferred to NC and immunoblotted with antibodies against Bak. B, Immunoblot signals were analyzed as described in Materials and Methods, and relative amounts of Bak were expressed in % of control. The position of anti-Bak marked as an arrow. Molecular sizes were shown in far left in kDa.

Bax의 표현은 면역염색 방법에 의하여 검색할 수 없었다(Fig.11).

3) Caspase cascade initiator(caspase-1, -8, -10)의 표현에 미치는 영향

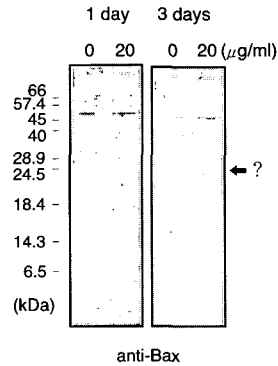


Fig. 11. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the expression Bax.

A, 15% SDS gels were prepared as in Fig.8. Proteins were transferred to NC and immunoblotted with antibodies against Bax. B, Immunoblot signals were analyzed as described in Materials and Methods, and relative amounts of Bax were expressed in % of control. The position of anti-Bax marked as an arrow. Molecular sizes were shown in far left in kDa.

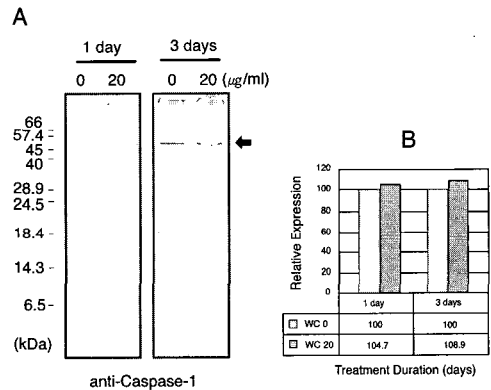


Fig. 12. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the expression caspase-1.

A, 15% SDS gels were prepared as in Fig.8. Proteins were transferred to NC and immunoblotted with antibodies against caspase-1. B, Immunoblot signals were analyzed as described in Materials and Methods, and relative amounts of caspase-1 were expressed in % of control. The position of anti-caspase-1 marked as an arrow. Molecular sizes were shown in far left in kDa.

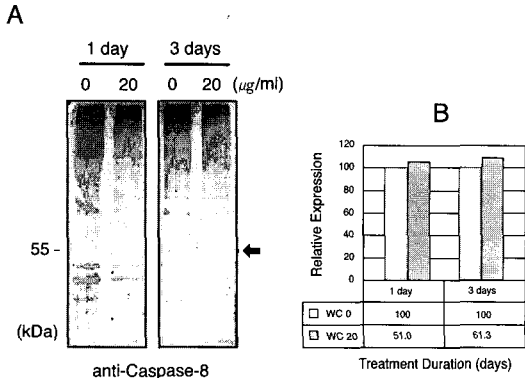


Fig. 13. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the expression caspase-8.

A, 8% SDS gels were prepared as in Fig.8. Proteins were transferred to NC and immunoblotted with antibodies against caspase-8. B, Immunoblot signals were analyzed as described in Materials and Methods, and relative amounts of caspase-8 were expressed in % of control. The position of anti-caspase-8 marked as an arrow. Molecular size was shown in far left in kDa.

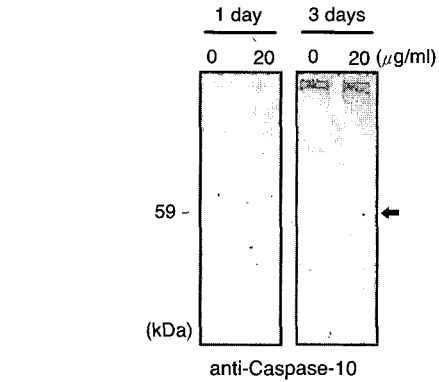


Fig. 14. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the expression caspase-10.

A, 8% SDS gels were prepared as in Fig.8. Proteins were transferred to NC and immunoblotted with antibodies against caspase-10. B, Immunoblot signals were analyzed as described in Materials and Methods, and relative amounts of caspase-10 were expressed in % of control. The position of anti-caspase-10 marked as an arrow. Molecular size was shown in far left in kDa.

상기와 같은 조건에서 면역염색방법으로 apoptosis 촉진 단백질로서 caspase-3를 활성화 시키는 것으로 알려진 caspase-1, -8, -10의 표현을 조사하였다. Caspase-1은 대조군에 비하여 24시간 牛黃清心元으로 전처리한 경우에는 104.7%, 72시간 처리한 경우에는 108.9%의 표현을 보였다(Fig.12). Caspase-8은 대조군에 비하여 24시간 牛黃清心元으로 전처리한 경우에는 60.0%, 72시간 처리한 경우에는 61.3%의 표현을 보였다(Fig.13). Caspase-10은 면역염색 방법에 의하여 검색할 수 없었다(Fig.14).

4) Caspase cascade effector(caspase-3, -6)의 표현에 미치는 영향

상기와 같은 조건에서 면역염색방법으로 apoptosis 촉진 단백질인 caspase-3의 표현을 조사하였다. Caspase-3는 대조군에 비하여 24시간 牛黃清心元으로 전처리한 경우에는 85.2%, 72시간 처리한 경우에는 58.4%의 표현을 보였다(Fig.15). Caspase-6는 대조군에 비하여 24시간 牛黃清心元으로 전처리한 경우에는 98.6%, 72시간 처리한 경우에는 87.0%의 표현을 보였다(Fig.16).

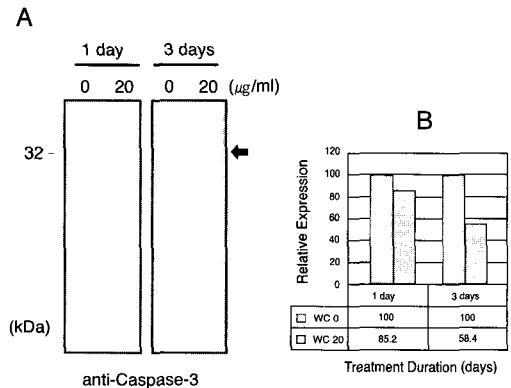


Fig. 15. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the expression caspase-3.

A, 8% SDS gels were prepared as in Fig.8. Proteins were transferred to NC and immunoblotted with antibodies against caspase-3. B, Immunoblot signals were analyzed as described in Materials and Methods, and relative amounts of caspase-3 were expressed in % of control. The position of anti-caspase-3 marked as an arrow. Molecular size was shown in far left in kDa.

4. 牛黃清心元이 저산소증에서 PKC α 의 표현과 활성화에 미치는 영향

상기와 같은 조건으로 처리한 배양신경세포로부터 세포막 분획과 세포질 분획을 얻고 면역염색방법으로

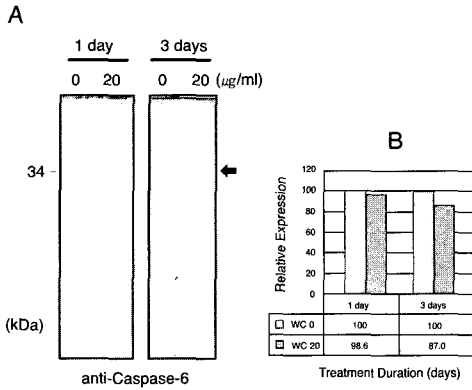


Fig. 16. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the expression caspase-6.

A, 15% SDS gels were prepared as in Fig.8. Proteins were transferred to NC and immunoblotted with antibodies against caspase-6. B, Immunoblot signals were analyzed as described in Materials and Methods, and relative amounts of caspase-6 were expressed in % of control. The position of anti-caspase-6 marked as an arrow. Molecular size was shown in far left in kDa.

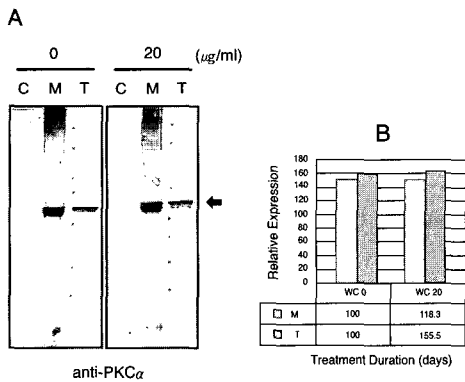


Fig. 17. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the expression of PKC α .

Woohwangcheongsim-won was added to 14 DIV E20 cortical cultures in 24-well plate for 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (98% N₂/5% CO₂, 37° C, 3 hrs) and further incubated in normoxia for 3 days. On 20 DIV, membrane (M), cytosol (C), and total (T) fractions of cells were electrophoresed in 8% SDS-gels and transferred to nitrocellulose membranes. A, NC membranes were immunoblotted with antibodies against PKC α . B, Immunoblot signals were analyzed as described in Materials and Methods, and relative amounts of PKC α were expressed in % of control. The position of anti-PKC α marked as an arrow.

로 PKC α 의 단백질표현을 조사하였다. PKC α 는 대부분 세포막 분획에 존재하였는데, 72시간 처리한 경우에는 대조군에 비하여 세포막 분획에서는 118.3%, 총 PKC α 의 양은 155.5%의 표현을 보였다(Fig.17). 또한 세포막 분획을 이용하여 PKC α 의 활성을 조사한 결과 24시간 처리한 경우에는 대조군에 비하여 85.1%, 72시간 처리한 경우에는 114.5%의 활성을 나타내었다(Fig.18).

5. 牛黃清心元이 저산소증에서 calpain I의 활성에 미치는 영향

Calpain I의 활성을 기질인 spectrin의 분해를 이용하여 측정하였다. 상기와 같은 방법으로 준비한 NC를 240/235kDa spectrin과 그 분해산물인 155/15kDa spectrin peptide를 인식하는 항체로 면역염색하고, 240/235 spectrin의 양과 분해산물의 양을 백분율로 계산하였다. Calpain I은 20µg/ml의 牛黃清心元으로 24시간 전처리한 경우에는 대조군에 비하여 77.4%, 72시간 처리한 경우에는 81.6%의 활성을 나타내었다(Fig.19).

이상의 결과들을 Table 3에 정리하였다.

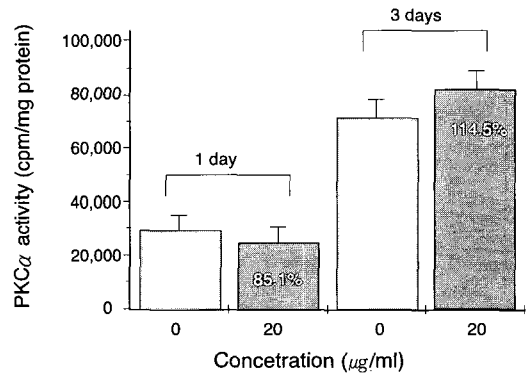


Fig. 18. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the PKC α activity.

Woohwangcheongsim-won (20 µg/ml) was added to 14 DIV E20 cortical cultures in 24-well plate for 24 or 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (98% N₂/5% CO₂, 37° C, 3 hrs) and further incubated in normoxia for 3 days. On 20 DIV, membrane fractions were prepared and assayed for PKC α activities as described in Materials and Methods.

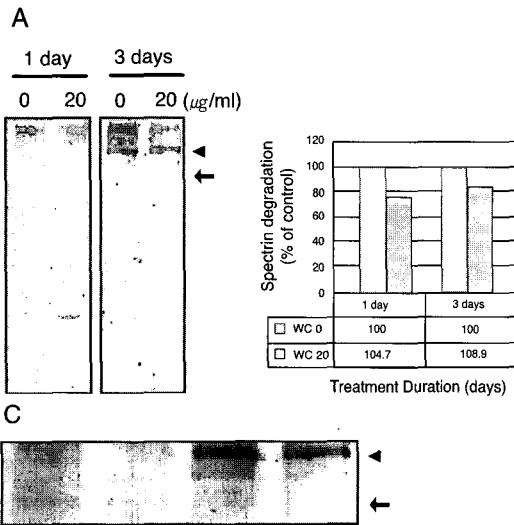


Fig. 19. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the calpain I activities.

Woohwangcheongsim-won was added to 14 DIV E20 cortical cultures in 24-well plate for 24 or 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (98% N₂/5% CO₂, 37° C, 3 hrs) and further incubated in normoxia for 3 days. A, On 20 DIV, NC membranes were prepared as in Fig.8, and immunostained with an antibody against spectrin 240/235. B, An enlarged image of a portion of panel A. C, The ratios of degraded products (155/150 kDa) and intact peptides (240/235 kDa) were compared and expressed as % of control. Arrowhead, position of 240/235 peptides. Arrow, position of 155/150 peptides.

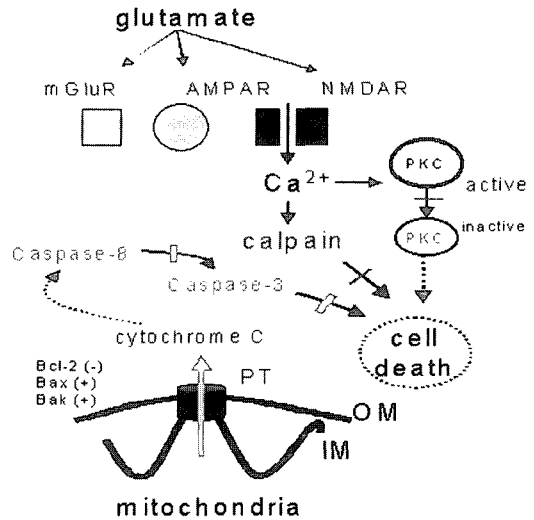


Fig. 20. A model for the mechanism for neuronal protection by *Woohwangcheongsim-won* in hypoxia.

Data from this work indicate that the caspase cascade initiator caspase-8 and the effector caspase-3 are significantly reduced by *Woohwangcheongsim-won* in hypoxia. *Woohwangcheongsim-won* also reduced the calpain I activity but increased PKC α and its activity in the membrane fraction. Therefore, I propose that *Woohwangcheongsim-won* protects delayed neuronal death reducing caspase-8, -3, and calpain I activities, and by increasing PKC α and its activity.

Table 3. Changes in the Protein Expression or Activities in Hypoxia in the Presence or Absence of *Woohwangcheongsim-won*

	Treatment duration		assay	function
	24 h	72 h		
Bcl-2	115	92.6	protein	anti-apoptosis
Bak	88.8	90.7	protein	pro-apoptosis
Bax	ND	ND	protein	pro-apoptosis
caspase-1	104.7	108.9	protein	caspase cascade initiator
caspase-3	85.2	58.4	protein	caspase cascade effector
caspase-6	98.6	87	protein	caspase cascade effector
caspase-8	51	61.3	protein	caspase cascade initiator
caspase-10	ND	ND	protein	caspase cascade initiator
calpain I	77.4	81.6	activity	pro-apoptosis
PKC α (M)		118.3	protein	anti-apoptosis
PKC α (T)		155.5	protein	anti-apoptosis
	85.1	114.5	activity	anti-apoptosis

ND; not detectable. M; membrane. T; total

考 察

뇌신경세포의 손상·사망 기전에 관해서는 허혈로 인한 중심에서의 직접적인 괴사성 신경세포사(necrotic neuronal death)이외에도 1980년대 초반 Kirino의 연구에 의해서 후기 신경세포사 또는 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)로 불리는 세포사망 기전이 밝혀졌다¹²⁾.

지연성 신경세포사는 허혈성 손상을 받은 중심의 조직 괴사(necrotic process) 이후에 주변에서 glutamate의 흥분독성, 단백질 합성장애, 열충격 단백질(heat shock protein) 유전자 발현장애, 유리 산소기 및 apoptosis 등이 관계되어 일어난다¹⁴⁾.

허혈·저산소증에 의한 신경세포의 손상에는 흥분성 아미노산인 glutamate가 가장 중요한 역할을 하며, ionotropic glutamate 수용체인 AMPA 수용체와 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체의 과다한 활성화 세포사의 주된 원인이 된다. 이 경우 대부분의 신경세포들은 apoptosis에 의한 지연성 신경세포사가 일어난다^{3,5,15)}.

牛黃清心元은 中風의 中臟腑 陽閉證에 사용되는 대표적 처방으로⁹⁾ 清熱瀉下, 解毒, 開竅化痰, 養血生津, 補脾胃, 安神 등의 효능이 있으며¹⁶⁾, 주로 卒中風으로 인한 不省人事, 痰涎壅塞, 精神昏潰, 言語蹇澀, 口眼喎斜, 半身不遂 등을 치료하는데 활용되고 있다⁹⁾. 또한 실제 임상에서 뇌졸중 급성기의 의식장애, 전조기의 手足麻木, 頭痛, 眩暈 등의 증상에 상용되고 있다⁹⁾.

뇌허혈과 관련된 牛黃清心元의 실험적 연구로는 홍 등¹⁷⁾의 뇌허혈 발생시 혼수시간의 단축과 무산소부하시 생존시간의 연장효과, 조 등¹⁸⁾의 뇌허혈로 인한 조직손상의 예방효과와 신경학적 증상의 개선효과, 문¹⁹⁾의 전사활성 촉진작용(transcriptional activating effect)에 의한 eNOS 유전자 발현촉진과 VCAM-1 유전자의 발현억제 효과, 한²⁰⁾의 흰쥐를 이용한 eNOS, p53 유전자의 발현 증가와 VCAM-1, TNF- α 유전자의 발현 감소를 통한 혈관의 항상성 유지효과, 조 등

^{10,11)}의 흰쥐를 이용한 허혈모델과 배양한 대뇌 신경세포 및 소뇌 신경세포를 이용한 저산소증 모델에서 지연성 신경세포사의 억제효과에 관한 연구 등이 있었으나, 牛黃清心元의 저산소증으로 인한 대뇌 신경세포사 방지와 관련된 작용기전에 대한 연구는 없었다.

본 연구에서 사용한 세포는 흰쥐(Sprague Dawley)의 배양 20일된 대뇌 신경세포로 serum이 첨가되지 않은 배지를 사용하였기 때문에 신경교세포는 약 10% 정도로 거의 증식이 일어나지 않아 대부분이 신경세포로 구성되어 있다. 또한 본 연구실의 경험에 의하면 牛黃清心元이 첨가된 배지에서 자란 신경세포들은 그렇지 않은 세포들에 비하여 저산소증에 의한 사망이 낮았으며 이러한 효과는 1,500 cells/mm²에서 자란 세포들에 가장 현저히 나타난다.

신경세포는 성숙 정도에 따라 허혈·저산소증, NMDA 등과 같은 처리에서 상당한 차이를 보이기 때문에¹³⁾, 배양한 신경세포의 성숙정도를 연접단백질들의 표현을 조사하여 알아보았다. 3, 4, 5, 7, 10, 14 DIV E20 대뇌신경세포에서 여러 가지 단백질의 표현을 면역염색으로 조사한 결과 14 DIV에는 scaffold protein인 PSD-95와 세포접합단백질인 densin-180과 같이 선형으로 증가하는 단백질도 있었으나, 대부분의 단백질들[NMDA 수용체 아단위(NR1, NR2A, NR2B, NR2C), protein translation elongation factor-1 α (eEF-1 α), Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II(CaMKII)]은 최고의 성숙도를 보였다. 또한 20 DIV 세포를 면역형광염색하고 다중초점 현미경으로 관찰한 결과 연접표지단백질이며 scaffold protein인 PSD-95, septin 6, translation elongation factor-1 α (eEF-1 α)는 모두 잘 표현되어 있었으며, 특히 PSD-95의 경우 특징적인 puncta를 보여주고 있었다. 이 결과는 본 연구에서 사용한 신경세포가 성숙하였음을 의미한다.

배양한 흰쥐 태아 E20 대뇌 신경세포에 저산소증(98% N₂/5% CO₂, 37°C, 3시간)을 유발한 결과 牛黃清心元으로 전처리한 군은 대조군에 비하여 12-, 24-, 96-well culture plate에서 모두 생존율이 증가되었다. 특히 12-well plate를 사용한 경우 가장 높은 144.4%의 생존율을 나타내었다. 이는 배양조건에 따라 효과

의 차이가 있음을 의미한다. 즉 *in vitro*에서는 *microenvironment*의 차이에 의하여 신경세포의 생존과 牛黃清心元의 효과가 달라진다.

저산소증(98% N₂/5% CO₂, 37°C, 3시간, 12-well plate) 유발 전 3일에 24시간 牛黃清心元으로 전처리한 군의 경우 140%의 생존율을 보였으며, 보다 심한 저산소증을 유발한 경우(98% N₂/5% CO₂, 37°C, 4.5시간, 24-well plate)에서는 정도는 낮지만(10µg/ml 牛黃清心元의 경우 104.9%, 20µg/ml 牛黃清心元 농도에서는 111.1%) 생존율의 증가를 나타내었다. 또한 propidium iodide와 H2AX를 이용한 염색에서도 牛黃清心元이 세포손상을 완화하는 것으로 나타났다.

Propidium iodide는 세포막 손상이 일어난 세포에 들어가 핵산에 끼어드는 형광물질로 세포막 손상의 지표가 된다. 본 연구에서는 하나의 배양 슬라이드에서도 위치에 따라 세포사의 정도가 크게 달랐기 때문에 牛黃清心元으로 전처리한 군과 대조군과의 차이는 분명히 밝힐 수 없었으나 牛黃清心元으로 전처리한 경우 전반적으로 염색되는 세포의 수가 줄어들었다.

Apoptosis나 nonapoptosis의 초기에 DNA 이중나선의 잘림이 일어나며, DNA가 잘라지면 histone 단백질인 H2AX의 Serine 139번에 심한 인산화가 유발된다. Nucleosome의 C-말단에 특이하게 존재하는 H2AX는 DNA에 손상이 생길 경우 Serine 139번에 심한 인산화를 유발하게 되는데, 이것은 DNA가 조각조각으로 잘려지고 있다는 표시로 phospho-H2AX (Serine 139) 항체를 이용하여 염색하면 apoptosis의 초기 단계를 알 수 있다. 본 연구에서는 H2AX의 immunostain puncta의 수가 대조군에 비하여 10µg/ml의 牛黃清心元으로 전처리한 경우에는 약 10% 감소하였고, 20µg/ml의 牛黃清心元으로 전처리한 경우에는 약 40%가 감소하였다. 또한 전반적으로 puncta의 intensity도 牛黃清心元의 농도가 증가함에 따라 감소하였다. 따라서 저산소증에서 牛黃清心元이 DNA의 절단을 완화하여 세포사를 감소시킴을 알 수 있었다.

Apoptosis는 유전적으로 계획된, 형태학적인 특징

을 지닌 세포사로서 다양한 생리적, 병리적 자극에 의하여 일어난다⁴⁾. Apoptosis의 형태학적 특징은 세포질의 위축(cytoplasmic shrinkage), 세포막의 수포화(active membrane blebbing), 염색체 농축(chromatin condensation), 세포막으로 둘러싸여진 조각(apoptotic bodies) 등이 있다. 이러한 형태학적 특징은 여러 가지 생화학적 변화를 동반하는데, 세포표면에는 phosphatidylserine의 외재화(externalization)를 포함한 여러 가지 변화가 일어나 포식세포(phagocyte)의 인식을 촉진한다. 세포내 변화로는 chromosomal DNA가 큰 분자량인 oligonucleosomal fragment로 잘라지며, 특정 그룹의 단백질 분해가 일어난다. 이러한 단백질 분해는 cysteine aspartic acid-specific proteases인 caspases에 의하여 일어난다^{20,21)}.

선충류인 *Caenorhabditis elegans*에서 인간에 이르기까지 apoptosis는 다세포 생물세포의 세포주기 결정에 중요한 요인이 된다. Apoptosis의 조절과 시작은 매우 복잡하고 미묘하게 얽힌 조절 과정으로서 apoptosis가 태생기 발생, 발생 및 면역계 기능 등에 관여한다. 이러한 apoptosis의 과정은 caspases에 의하여 일어난다^{4,22)}.

Caspases는 비활성 전구체(inactive precursors)로 존재하다가 adaptor protein에 의하여 apoptosis가 시작되면 활성화된다. 지금까지 14개의 mammalian caspases가 발견되었는데 이 가운데 일부는 apoptosis의 조절에 관여하고 나머지는 pro-inflammatory cytokines의 processing에 관여한다⁴⁾. Apoptosis에 관여하는 caspase들은 크게 initiator(upstream)와 effector(downstream) caspases로 구분된다^{4, 23)}. Initiator caspases(주로 caspases-1, -8, -10)는 apoptosis를 촉진하는 자극(proapoptotic stimulus)에 반응하여 effector caspases를 활성화시키며, effector caspases(주로 caspases-3, -6)는 apoptosis 과정 동안에 대부분의 단백질 분해에 관여한다. 따라서 여러 경우에 있어 caspase 활성화와 caspase 활성을 조절하는 단백질들이 세포의 삶과 죽음을 결정하는데 중요한 역할을 한다.

본 연구에서는 initiator caspase 가운데 caspase-8은

크게 감소(대조군의 51~61.3%)하였으며, caspase-1은 약간의 증가(대조군의 104.7~108.9%)를 보였고, caspase-10은 검출되지 않았다. Effector caspase 가운데는 caspase-3가 가장 크게 감소(대조군의 58.4~85.2%)하였으며, caspase-6도 감소(대조군의 87~98.6%)하였다. 따라서 牛黃淸心元은 initiator인 caspase-8과 effector인 caspase-3의 표현을 억제함으로써 저산소증에 의한 대뇌 신경세포사를 방지하는 것으로 생각된다.

Caspase들은 apoptosis를 직접 실행하는 단백질들로서, effector caspase들은 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)와 같은 세포에 필수적인 단백질을 분해하고, CAD와 같은 endonucleases를 활성화시켜 세포사를 일으킨다. Caspase activation의 조절 기전으로 tumor necrosis factor(TNF) receptor family의 신호전달에 관한 것이 많이 알려져 있었으나, 최근에는 mitochondria에 있는 신호전달 단백질 기구에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 mitochondria에서의 신호전달은 DNA 손상, heat shock, oxidative stress 등과 같은 조건에서도 비슷하게 일어나며, 이 과정 중에 mitochondria-derived cytochrome c의 세포질내 유출은 세포사에 매우 중요한 역할을 한다²⁴⁾.

Mitochondria로부터 cytochrome c의 유출은 apoptosis를 유발하는 결정적인 역할을 하며, cytochrome c에 의하여 mitochondrial apoptosome이라고 불리는 매우 큰 분자량의 caspase-activating complex가 세포질에 형성된다. 즉, cytochrome c는 caspase 활성화를 유발하는데, 세포질에서 cytochrome c가 apoptotic protease activating factor-1(Apaf-1)과 결합하면 Apaf-1은 caspase-9을 모집하여 활성화시킨다²⁵⁾.

Caspases는 apoptosis가 시작되면 Bcl-2 family 단백질들에 의하여 형성되는 mitochondrial permeability transition(PT) pores를 통하여 유리된 cytochrome c에 의하여 활성화된다. 최근의 연구결과들은 cytochrome c의 세포질내 유리에 Bcl-2 family 단백질, 특히 'BH3-only' members가 다양한 apoptosis 촉

진 자극에 의해 가장 중요한 역할을 하고있음을 말하고 있다. 그 중 Bcl-2와 Bcl-XL은 잘 알려진 apoptosis 억제제로 mitochondrial cytochrome c 유리를 방지한다. 이 단백질들은 apoptosis를 촉진하는 Bax와 같은 단백질과 결합하여 Bax-Bax가 mitochondrial permeability transition(PT) pores를 만들지 못하게 중성화시킴으로써 cytochrome c의 유리를 막는다. Bcl-2 family 가운데 'BH3-only' members(Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Hrk, Noxa)는 Bcl-2 및 Bcl-XL과 반대로 작용한다. 이러한 다양한 mammalian 'BH3-only' protein들은 각각의 유해 작용에 특이하며 세포손상의 sensor로 작용하여 cytochrome c의 유리를 촉진한다²⁶⁾.

본 연구에서는 Bcl-2의 표현은 牛黃淸心元으로 24시간 전처리한 군에서는 증가(대조군의 115%)되었으나, 牛黃淸心元으로 72시간 전처리한 군에서는 감소(대조군의 92.6%)되었다. 그러나 Bak의 표현은 두 경우 모두 감소하였으며, Bax는 검출되지 않았다. 따라서 牛黃淸心元은 Bak의 표현을 감소시켜 mitochondrial permeability transition(PT) pores의 생성을 줄임으로써 세포사를 완화하는 것으로 생각된다.

최근의 연구에 의하면 단백질 인산화 효소 C(protein kinase C : PKC) 활성의 소실은 많은 허혈·저산소증 실험모델에서 신경세포의 특징적인 반응이다. PKC는 serine/threonine kinases family로서 10~12가지의 isoform으로 존재하며, 세포성장(proliferation), 분화(differentiation), 분비(secretion), 주화성(chemotaxis), 세포사망 등 수 많은 세포내 신호전달에 관여한다. 또한 신경전달물질의 분비, 연접신호전달, long-term potential/long-term depression(LTP/LTD)의 시작과 유지에 관여한다. 그리고 PKC는 허혈, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis(ALS)에 의한 신경세포의 퇴행성 병리에도 관여하는 것으로 알려져 있다^{27,28)}.

허혈·저산소증에 의한 신경세포의 손상에서 흥분성 아미노산인 glutamate가 가장 중요한 역할을 하며, ionotropic glutamate receptors의 과다한 활성이 세포사의 주된 원인이 되는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 또한

in vitro 흥분성 세포사의 기전은 in vivo의 경우와 매우 유사하며 membrane PKC activity의 소실은 in vivo transient global ischemia나 in vitro hypoxia에서 glutamate receptors의 과도한 활성화에 기인한다^{13,29}. 또한 AMPA glutamate receptor는 membrane-associated PKC의 소실과 직접적인 관련이 있는 것으로 보인다^{5,30}.

본 연구에서 저산소증을 유발시킨 결과 牛黃清心元은 membrane fraction(대조군의 118%)과 총 PKC α (대조군의 155%)의 단백질 표현을 증가시켰으며, 효소의 활성도 牛黃清心元으로 72시간 전처리한 경우 증가(대조군의 114.5%)시켰다. Membrane PKC α activity의 증가(대조군의 114.5%)는 immunoblot에 의한 단백질 표현의 증가(대조군의 155%)가 있었는데, 이 차이는 측정방법의 차이이거나, 세포막에서 PKC α 의 활성 억제가 일어났을 것으로 추정된다. 최근 연구에 의하면 murine neuroblastoma cell은 membrane-associated PKC inhibitory factor를 갖는데 membrane PKC를 매우 효과적으로 억제하는 것으로 알려졌다³¹, 이와 유사한 PKC-inhibitory activity가 primary cortical neurons과 rat hippocampus에서도 밝혀졌다²⁹. 따라서 세포의 수축과 효소활성의 측정기간 사이에 PKC α 의 활성이 억제되었을 가능성이 있으므로 牛黃清心元에 의한 membrane PKC α 활성의 증가가 실제 생체내에서는 더 높을 수 있다.

Calpain은 apoptosis에 관여하는 neutral protease로 특정 그룹의 단백질을 분해하여³², 뇌신경세포의 구조적 변형과 기능적 결손을 유발한다^{33,34}. 최근까지 알려진 mammalian calpain은 14개이며²³, 그 중 calpain I과 calpain II의 활성이 뇌졸중, 외상성 뇌손상과 같은 신경학적인 질환과 연관성이 있다고 한다³⁵. Calpain은 Ca²⁺의존성으로 NMDA 수용체를 통하여 들어오는 Ca²⁺에 의하여 활성화되어 대뇌 신경세포 사멸에 관여한다³². 그러나 대뇌 신경세포에서 voltage-dependent calcium channel이나 ionomycin과 같은 이온통로를 통하여 들어오는 Ca²⁺은 calpain 활성화나 세포사멸을 초래하지 않으므로 calpain의 활성화는 NMDA 수용체를 통한 대뇌 신경세포의 사멸에 매우 중요한 역할을 한다³⁶.

본 연구에서 spectrin의 분해를 이용하여 calpain I 활성을 측정한 결과 활성이 감소(대조군의 77.4~81.6%)되는 것으로 보아 牛黃清心元이 저산소증에서 calpain I의 활성을 감소시켜 단백질 분해를 줄임을 알 수 있다.

이상의 실험 결과로 牛黃清心元이 저산소증으로 인한 대뇌 신경세포의 apoptosis 기전 중 Bak의 표현 감소, cytochrome c의 세포내 유출 억제, caspase의 표현 감소, calpain I의 활성 감소, PKC α 의 활성 증가에 모두 유효하게 작용하였다. 따라서 牛黃清心元은 뇌졸중 발병 후 발생하는 지연성 대뇌신경 세포사 방지에 효과가 있는 것으로 생각된다.

結 論

본 연구에서는 배양한 대뇌 신경세포의 저산소증 모델에서 牛黃清心元에 의한 신경세포사 방지 효과 및 기전을 알아보기 위하여 배양한 E20의 Sprague-Dawley계 흰쥐 대뇌 피질신경세포를 이용하여 배양 14일에 牛黃清心元으로 1일 또는 3일간 약제 처리한 후 배양 17일에 저산소증을 유발하고 배양 20일에 신경세포의 변화를 관찰 및 조사하였다. 牛黃清心元의 신경세포사 방지효과에 관해서는 LDH assay, propidium 염색, H2AX 면역염색을 이용하여 관찰하였고, 牛黃清心元의 신경세포사 방지기전에 관해서는 apoptosis와 관련된 단백질인 Bcl-2, Bak, Bax, caspase family, PKC α , calpain I의 표현을 통하여 조사하였다.

1. E20 대뇌 신경세포 배양을 이용한 경우 牛黃清心元은 저산소증에서 신경세포 보호작용이 있음을 LDH assay, propidium 염색, H2AX 면역염색을 통하여 확인하였다.

2. 牛黃清心元이 저산소증에서 신경세포사를 억제하는 기전은 첫째 세포막 손상을 감소시키고, DNA 이중나선의 절단을 억제하며, 둘째 apoptosis를 촉진하는 Bak의 표현을 감소시켜 mitochondrial permeability transition(PT) pore의 생성을 저하시킴

로써 cytochrome c의 세포질 내 유출을 억제하고 caspase cascade의 시발자인 caspase-8과 실행자인 caspase-3의 표현을 감소시켜 단백질분해를 줄이며, 셋째 calpain I의 활성을 감소시켜 단백질의 분해를 줄이고, PKC α 의 활성을 증가시킴으로써 세포사를 줄이는 것으로 추정되었다.

參考文獻

1. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982;239(1):57-69.
2. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: Apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(4 Pt 2):99-103.
3. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol.* 2000;62(3):215-249.
4. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1999;68:383-424.
5. Durkin JP, Tremblay R, Buchan A, Blosser J, Chakravarthy B, Mealing G, Morley P, Song D. An early loss in membrane protein kinase C activity precedes the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J Neurochem.* 1996;66(3):951-962.
6. 김영석. 중풍(뇌졸중). 중풍학술대회논문집. 1995:1-56.
7. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北: 旋風出版社. 1975:3,25,26.
8. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 대성문화사. 1981:171-173.
9. 김동용, 오승환, 안일희, 이연정, 이형균, 이승무, 나성수. 의식장애를 동반한 졸중풍 급성기 환자에서 우황청심원 투여에 관한 고찰. 대한한의학회지. 1994;15(1):203-210.
10. 조규선, 정승현, 신길조, 이원철. 우황청심원이 중대

뇌동맥 결찰로 유발된 뇌허혈에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(1):78-89.

11. 조규선, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. 우황청심원이 저산소증 유발 배양신경세포에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(2):135-144.
12. 한창호. 우황청심원이 eNOS, 세포유착분자, TNF- α 및 p53 유전자 발현에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2001.
13. Iijima T. The pathophysiology of ischemic neuronal injury: an overview. *Masui.* 1998;47(6):662-677.
14. Tremblay R, Chakravarthy B, Hewitt K, Tauskela J, Morley P, Atkinson T, Durkin JP. Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals. *J Neurosci.* 2000;20(19):7183-7192.
15. Durkin JP, Tremblay R, Chakravarthy B, Mealing G, Morley P, Small D, Song D. Evidence that the early loss of membrane protein kinase C is a necessary step in the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J Neurochem.* 1997;68(4):1400-1412.
16. 남상경, 이경섭. 우황청심원과 소합향원의 효능에 대한 연구. 경희의학. 1990; 19:220-237.
17. 홍남두, 김남재, 김규섭. 우황청심원이 순환기계에 미치는 영향. 생약학회지. 1988;18(4):241-248.
18. 조태순, 이선미, 이은방, 조성익, 김용기, 신대회, 박대규. 우황청심원의 뇌허혈 및 중추신경계에 대한 약효. 약학회지. 1998;41(6):817-828.
19. 문상관. 우황청심원이 인체내피세포의 NOS 및 세포 부착인자 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 분자생물학적 연구. 경희대학교 대학원. 2000.
20. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000;407(6805):784-788.
21. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996;87(2):171.
22. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts *Cell.* 1995;82(3):

- 349-352.
23. Creagh EM, Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans.* 2001;29(6):696-701.
 24. Zhao X, Bausano B, Pike BR, Newcomb-Fernandez JK, Wang KK, Shohami E, Ringger NC, DeFord SM, Anderson DK, Hayes RL. TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. *J Neurosci Res.* 2001;64(2):121-131.
 25. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem.* 1999;274(25):17941-17945.
 26. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 2000;14(16):2060-2071.
 27. Fowler CJ, Cowburn RF, Garlind A, Winblad B, O'Neill C. Disturbances in signal transduction mechanisms in Alzheimer's disease. *Mol Cell Biochem.* 1995;149-150:287-292.
 28. Lanius RA, Paddon HB, Mezei M, Wagey R, Krieger C, Pelech SL, Shaw CA. A role for amplified protein kinase C activity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 1995;65(2):927-930.
 29. Fujii T, Garcia-Bermejo ML, Bernabo JL, Caamano J, Ohba M, Kuroki T, Li L, Yuspa SH, Kazanietz MG. Involvement of protein kinase C delta (PKCdelta) in phorbol ester-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. Lack of proteolytic cleavage of PKCdelta. *J Biol Chem.* 2000;275(11):7574-7582.
 30. Izawa M, Teramachi K. Down-regulation of protein kinase C activity by sorbitol rapidly induces apoptosis in human gastric cancer cell lines. *Apoptosis.* 2001;6(5):353-358.
 31. Chakravarthy BR, Wong J, Durkin JP. Evidence that the modulation of membrane-associated protein kinase C activity by an endogenous inhibitor plays a role in N1E-115 murine neuroblastoma cell differentiation. *J Neurochem.* 1995;65(4):1569-1579.
 32. Rami A, Ferger D, Krieglstein J. Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci Res.* 1997;27(1):93-97.
 33. Neumar RW, Meng FH, Mills AM, Xu YA, Zhang C, Welsh FA, Siman R. Calpain activity in the rat brain after transient forebrain ischemia. *Exp Neurol.* 2001;170(1):27-35.
 34. Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 2000;23(1):20-26.
 35. Huang Y, Wang KK. The calpain family and human disease. *Trends Mol Med.* 2001;7(8):355-362.
 36. Hewitt KE, Lesiuk HJ, Tauskela JS, Morley P, Durkin JP. Selective coupling of mu-calpain activation with the NMDA receptor is independent of translocation and autolysis in primary cortical neurons. *J Neurosci Res.* 1998;54(2):223-232.