

원 저

## 배양 대뇌신경세포의 저당-저산소증 모델에서 牛黃清心元에 의한 세포사 방지 연구

원철환, 정승현, 신길조, 문일수<sup>1)</sup>, 이원철

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 의과대학 해부학교실<sup>1)</sup>

### The Effect of *Woohwangcheongsim-won* for Delayed Neuronal Death in OGD (Oxygen-Glucose Deprivation) Model

Cheol-Hwan Won, Sung-Hyun Jeong, Gil-Cho Shin, Il-Soo Moon<sup>1)</sup> Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University,  
Department of Anatomy, College of Medicine, Dongguk University<sup>1)</sup>

**Objectives:** The purpose of this investigation is to evaluate the effects of *Woohwangcheongsim-won* and to study the mechanism for neuronal death protection in OGD (oxygen-glucose deprivation) model 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 72 hrs. On 17 DIV, cells were given an oxygen-glucose deprivation shock (2hrs and 4hrs) 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 and the mechanisms were studied by Bcl-2, Bak, Bax, caspase family.

**Results & Conclusions:**

1. This study indicates that *Woohwangcheongsim-won*'s effects for neuronal death protection in OGD model is confirmed by LDH assay in culture method of embryonic day 20(E20) cortical neuroblasts.
2. *Woohwangcheongsim-won*'s mechanisms for neuronal death protection in OGD model are to restrain inflow of cytochrome c into cellularity caused by Bcl-2 increase (2hrs and 4hrs), to reduce the caspase cascade initiator caspase-8 (4hrs). (*J Korean Oriental Med* 2002;23(4):125-139)

**Key Words:** *Woohwangcheongsim-won*, Bcl-2, Bax, Bak, caspase, OGD.

## 서 론

신경세포의 사멸현상에 대한 연구 초점은 내·외

부의 자극에 의한 여러 형태의 병리적인 세포 사멸에 모아지고 있다. 특히 중추신경계 질환들의 상당수가 apoptosis와 관련이 있는 것으로 속속 밝혀지고 있어 '신경계 질환의 발생과 apoptosis의 연관 관계'를 밝히려는 연구가 급증하고 있는 추세이다<sup>1)</sup>.

Apoptosis는 형태학적인 변화뿐만 아니라 여러 가지 생화학적 변화를 동반한다. Apoptosis는 세포사

· 접수 : 2002년 8월 2일 · 채택 : 2002년 10월 22일  
· 교신저자 : 정승현, 경상북도 경주시 용강동 동국대학교 경주 한방병원  
(Tel. 054-770-1341-2, Fax : 054-770-1500, E-mail : wideduck@hanmail.net(이지훈))

신이 선택한 능동적인 과정으로 많은 에너지가 필요하며, 세포사멸의 조절에 직·간접적으로 관여하는 단백질의 합성이 필요하다<sup>2)</sup>. 이와는 달리 새로운 단백질의 합성이 없이도 apoptosis로 진행될 수 있는 예들이 밝혀지고 있는데, 이 경우에는 세포질 내에 이미 존재하고 있는 세포사멸 관련 단백질이나 기구의 활성화에 의한다. 이때 중요한 역할을 하고 있는 단백질로서 여러 형태의 단백질분해효소(cysteine proteases인 interleukin-1- $\beta$ -converting enzyme(ICE)-like caspases와 calpain 등과 같은 non-caspases류)가 주목을 받고 있으며<sup>3)</sup>, 미토콘드리아로부터 분비되는 apoptosis 유도물질(예, cytochrome c, apoptosis-inducing factor)<sup>4)</sup> 등에 관한 연구도 최근에 많이 이루어지고 있는 핵심 분야이다.

Apoptosis의 발생기전에는 몇 개의 중요한 단계가 있다. 첫째, apoptosis를 유발하는 여러 경로의 신호 체계가 있는 단계 둘째, apoptosis를 조절하는 단계로 이 단계에는 Bcl-2 family를 포함한 apoptosis를 유발 또는 유도하는 물질이 있으며 이 물질들의 비율에 의해 apoptosis와 생존이 조절된다. 셋째, 실행 caspase가 활성화되어 단백 분해를 일으키는 단계 넷째, apoptotic body가 주위 세포에 의해 탐식되는 처리단계로 나뉘는데, 이런 단계에 장애가 있으면 질병이 발생하게 된다<sup>2)</sup>.

牛黃清心元은 風으로 인한 癱瘓不隨, 語言蹇澁, 心忪健忘, 恍惚去來, 頭目眩冒, 胸中煩鬱, 痰涎壅塞, 精神昏憤 등에 사용되며 가지며, 현대에서는 中風 급성기의 의식장애에 常用되고 있는 실정이다<sup>5,8)</sup>.

이에 본 연구에서는 배양한 대뇌 신경세포의 저당-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 3일간 약제 처리한 후 배양 17일에 저당-저산소증을 유발하고 배양 20일에 신경세포의 변화를 관찰하였으며, 저당 및 저산소로 인한 세포손상의 순서에 따라 세포사의 정도를 관찰하기 위하여, 저당-저산소증 모델과 유사한 실험 모델인 저산소증 모델, 선저당 유발 후 저산

소 유발 모델, 선저산소 유발 후 저당 유발 모델 및 가짜 저당 유발 후 저산소 유발 모델에 대한 牛黃清心元의 대뇌 신경세포사 방지 효과를 비교하였다. 牛黃清心元의 신경세포사 방지기전에 관해서는 apoptosis와 관련된 단백질인 Bcl-2, Bak, Bax, caspase family의 표현을 통하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## 실 험

### 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<sup>6)</sup>에 준하여 동국대학교 한의과대학 부속 경주한방병원에서 조제된 것으로 處方 구성과 함량은 다음과 같다(Table 1).

#### 3) 牛黃清心元의 물추출액 제조

牛黃清心元 1丸(3.75g)을 100ml의 증류수에 넣어 균질화하고 상온에서 4시간, 4°C에서 18시간 혼든 후, 이를 15,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45 $\mu$ m)한 후 1ml씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의 양(dry weight)은 1ml 추출액 3 튜브를 동결건조한 후 무게를 측정하여 평균치(19.95mg/ml)를 사용하였다.

#### 4) 항체

본 연구에 사용한 항체를 Table 2에 나타내었다.

## 2. 방법

### 1) 신경세포 배양

임신 20일(embryonic day 20 : E20)된 Sprague-Dawley계 흰쥐의 대뇌 피질신경세포를 Brewer 등<sup>9)</sup>의 방법에 따라 배양하였으며, 牛黃清心元은 배양 14일(day 14 in vitro : DIV)에 처리하였다. 임신 20일된 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아의 뇌를 잘라내었

다. 대뇌피질 조직을 37°C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1mM sodium pyruvate와 10mM HEPES(pH 7.4)가 첨가된 HBSS용액(Gibco, BRL) 5ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을

1ml Hank's 용액으로 옮기고 끝을 볼에 달구어 구멍을 작게한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 이 후 분산된 세포를 모으고 세포수를 측정된 다음 약 1,500cells/mm<sup>2</sup>되도록 B27

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

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

We examined that *Rhinoceri Cornu*(犀角) was obtained before 5 years and *Moschus*(麝香) was consisted of *muscone*(C16H30O) above 0.5~2%.

**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.
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.
PSD-95	mouse	IC	monoclonal Upstate Biotechnology Inc.
septin 6	rabbit	IB	polyclonal obtained from Dr. IS Moon

IB ; immunoblot. IC ; immunocytochemistry

을 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% CO<sub>2</sub> 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 처리

배양 14일(14 DIV)에 牛黃清心元을 20 µg/ml의 농도로 첨가하고 3일 더 배양한 후 각각의 실험을 실시하였다.

3) 저산소증 모델

배양 14일(14 day in vitro, DIV)에 약재를 20 µg/ml 농도로 첨가하고 72시간 처리하였다. 배양 17일에 CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator(Forma Scientific)를 이용하여 2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 4 hrs 환경에서 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

4) 저당-저산소증 모델(oxygen-glucose deprivation)

17 DIV에 배양액을 1.1mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS(Table 3)로 교체하고 CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator(Forma Scientific)에 넣어 2%O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 환경에서 2시간 또는 4시간 저산소 처리한 후, 원래의 배양액과 새로운 배양액을 반반씩 회복시키고 정상 산소환경에서 계속 배양하였다.

5) 선저당 유발 후 저산소 유발 모델

17 DIV에 배양액을 1.1mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS로 교체하여 2시간 또는 4시간 유지한 후에, 25mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS로 Glucose를 회복시켜준 상태에서 2시간 또는 4시간 저산소 처리

하였다. 그 후 원래의 배양액과 새로운 배양액을 반반씩 회복시키고 정상산소환경에서 계속 배양하였다.

6) 선저산소 유발 후 저당 유발 모델

17 DIV에 2시간 또는 4시간 저산소 처리한 후 1.1 mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS로 저당 상태를 2 시간 유지하고(4시간은 없음), 원래의 배양액과 새로운 배양액을 반반씩 회복시키고 정상산소환경에서 계속 배양하였다.

7) 가짜 저당 유발 후 저산소 유발 모델

17 DIV에 배양액을 새로운 배지로 교체하여 2시간 또는 4시간 유지한 후에 2시간 또는 4시간 저산소 처리하고 정상산소 환경에서 계속 배양하였다.

8) 면역세포화학염색 및 다중초점 현미경 관찰 (confocal microscopy)

배양용기(24-well plate)를 얼음 위에 올려놓고 배양액을 500 µl의 ice-cold D-PBS(0.1g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.2g/L KCl, 0.2g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1g/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 8.0g/L NaCl, 2.16g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)로 교환해 주었다.

D-PBS를 4°C methanol(500 µl)로 교환하고 5분 후 -20°C methanol(500 µl)로 다시 교환한 다음 -20°C에서 20분간 두었다. Methanol을 ice-cold D-PBS(500 µl)로 교환하고 15분 후 preblock solution[0.05% triton, 5% normal goat serum in h-PBS(20mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 450mM NaCl)]을 넣어 4°C에서 1시간 처리하였다. 1차항체(PSD95, 1:2000, mouse monoclonal; anti-septin, 1:5,000 rabbit polyclonal)를 넣고 4°C에서 1시간 반응시킨 후 실온에서 preblock solution으로 20분씩 3회 세척하였다. 형광물질이 표지된 2차항체(anti-mouse IgG, FITC-labeled, 1:2,000; anti-rabbit IgG, TRITC-labeled, 1:2,000)를 넣고 1시간 더 반응

Table 3. Earle's Balanced Salt Solution

Components	Conc. (mg/L)	농도 (mM)
Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> )	199.80	1.84
Potassium Chloride (KCl)	397.50	5.37
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ) · 7H <sub>2</sub> O	200.65	0.81
Sodium Chloride (NaCl)	6799.92	116.40
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	2200.80	26.19
Sodium Phosphate-H <sub>2</sub> O (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O)	139.38	1.01

시킨 후, D-PBS로 15분씩 3회 세척하고 다중촬영 현미경(BioRad MRC 1024/ES)으로 관찰하였다. 영상은 PhotoShop 5.0 software를 이용하여 가공하였다.

9) 면역염색(immunoblot)

12-well culture dish에 배양한 E20 대뇌 신경세포를 수확하여 1 × SDS-gel loading buffer를 넣고 100°C에서 5분간 처리하였다. 각각 20µg 의 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% NaN<sub>3</sub>)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% NaN<sub>3</sub>)용액으로 2회, alkaline phosphatase 완충용액(100mM Tris, pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>)으로 한번씩 각각 세척하였다. BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate P-toluedine 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.

10) LDH assay

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

11) 신호강도측정(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.

12) 통계처리

모든 실험은 최소한 8배수로 시행하였고, 세포의 생존율은 대조군에 대한 백분율(% of control)로 표시하였다. 통계학적 유의성은 Mann-Whitney U test로 검증하여 P<0.05를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 신경세포의 배양

1) 배양신경세포의 성숙

배양한 17 DIV E20 대뇌 신경세포의 위상차(phase-contrast) 현미경 사진을 Fig.3A에 나타내었다. 대뇌 및 소뇌의 신경세포는 배양 시작 후 2시간 정도

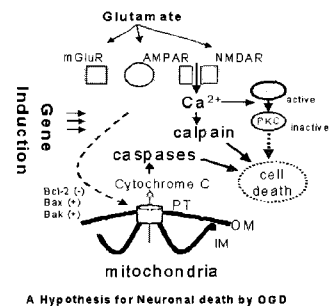
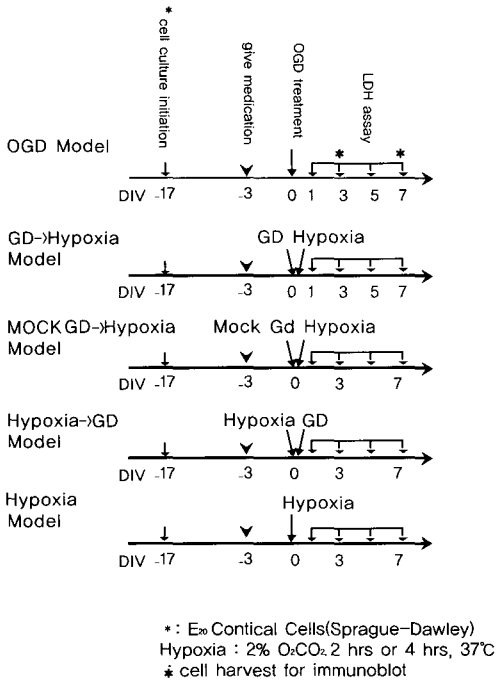


Fig. 1. A hypothesis for the delayed neuronal death by oxygen-glucose deprivation.

Low glucose and oxygen causes accumulation of excessive glutamate in the synaptic area and results in the overstimulation of NMDA-, AMPA-, and metabotropic glutamate receptors. The Ca<sup>2+</sup> influx via NMDA 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.



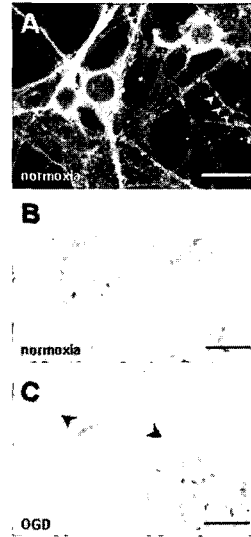
**Fig. 2.** Experimental schemes.

GD, glucose deprivation. OGD, oxygen-glucose deprivation. LDH, lactate dehydrogenase.

부터 가치를 내기 시작하며, 24시간 후에는 신경가지들이 20~30 $\mu$ m까지 자란다. 이 연구에서 사용한 Neurobasal 배지는 serum이 첨가되지 않은(serum-free) 배지로서 신경교세포는 약 10% 정도로 거의 증식이 일어나지 않아 대부분이 신경세포로 구성되어 있다.

2) 다중초점 현미경 관찰을 이용한 신경세포의 성숙 확인

실험에 사용한 신경세포는 흰쥐 태령 E20의 대뇌 피질세포로서 시험관 내에서의 성숙을 조사하였다. 실험에서 약재를 처리한 시기인 14 DIV의 신경세포를 세포조직화학 방법으로 면역형광염색하고, 다중초점 현미경으로 관찰하였다(Fig.3). 연결 표지 단백질인 PSD-95와 septin 6로 세포를 이중염색하고 다중초점 현미경으로 관찰한 결과 신경세포들은 많은 신경가지를 자유롭게 내고 있었으며 이중염색을 중첩



**Fig. 3.** Cortical cells in culture.

A, immunocytochemistry. E20 rat cortical cells on 14 DIV were stained with specific primary antibodies against PSD-95, and septin 6. FITC-, and TRITC-conjugated secondary antibodies was used to visualize the antigen as described in detail in Materials and Methods. Note the punctate staining (arrowheads) along dendrites when two images were superimposed. B, Sister cells as in panel A in normoxia. Phase-contrast microscopy. C, Sister cells as in panel A in hypoxia. Note vacuoles formed in soma (arrowheads). Phase-contrast microscopy. Bar, 20  $\mu$ m(micrometer).

시켜 보았을 때 노란색의 점(puncta)들을 흔히 볼 수 있었다(Fig.3A, arrowheads). 이는 신경세포가 충분히 성숙하였음을 의미한다. 또한 NMDA 처리 후 MK801이 세포사를 방지하는 연구에서도 14~20 DIV 세포를 이용하여 실험을 수행한 보고가 있었으므로 본 연구에서도 이 시기의 세포를 이용하여 실험을 실시하였다.

2. 牛黃清心元이 지연성 신경세포사에 미치는 영향

1) 저산소증(hypoxia)에서 대뇌 신경세포의 보호효과 배양한 흰쥐 태아 E20 대뇌 신경세포에 牛黃清心元(20 $\mu$ g/ml)을 첨가하고 72시간 전처리한 후 저산소증(2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37°C)을 유발한 다음, 다시 정상

산소환경에서 배양하고 LDH assay를 이용하여 세포 생존율을 조사하였다. 저산소증 유발 전 72시간 牛黃清心元으로 전처리한 군은 대조군에 비하여 저산소증 유발 후 1, 3, 5, 7일에 각각 114.12, 108.40, 128.18, 124.54%의 생존율을 나타내었다(Fig. 4). 이는 김<sup>10)</sup>의 결과와 유사하였다.

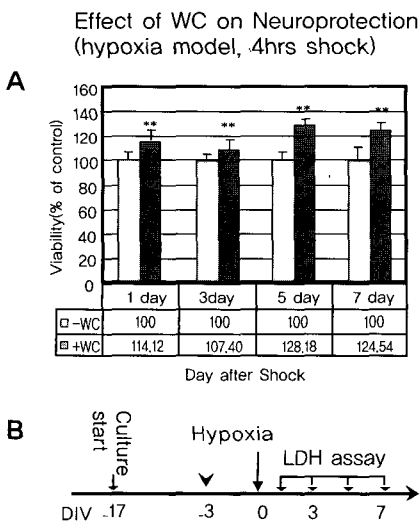
2) 가짜 저당 유발 후 저산소 유발 모델에서 대뇌 신경세포의 보호효과

신경세포를 공기중에 노출시키는 것은 신경세포에 매우 큰 스트레스이며 배지를 교환하는 과정보다 스트레스로 작용한다. 본 연구에서 수행하고자 하는 저당-저산소증 모델에서는 배양신경세포의 배지를 여러 차례 바꿔주어야 하는 과정이 필요하다. 따라서 이 과정 자체가 신경세포에 미치는 영향을 상기 저산소증 모델에서 조사하였다. 17 DIV에 배양액을 새로운 배지로 3~4회 교체하여 2시간 또는 4시간 유

지한 후에 2시간 또는 4시간 저산소 처리하고 정상 산소 환경에서 계속 배양하였다. 2시간 처리 후 2시간 저산소에 노출할 경우 1, 3, 5, 7일 후에 세포의 생존율은 牛黃清心元을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 101.27, 102.90, 105.63, 98.27%이었다(Fig. 5). 4시간 유지한 후 4시간 저산소에 노출한 경우에는 1, 3, 5, 7일 후에 세포의 생존율은 牛黃清心元을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 각각 96.34, 104.25, 104.01, 98.27%를 나타내었다(Fig. 5).

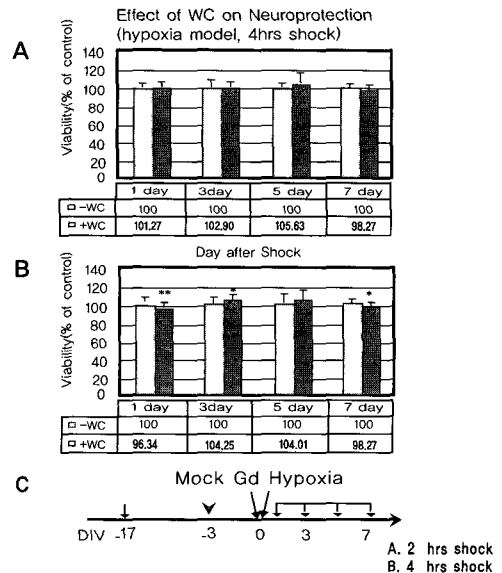
3) 저당-저산소증 모델에서 대뇌 신경세포의 보호효과

당과 산소를 동시에 낮춘 경우에 牛黃清心元의 대뇌 신경세포 보호효과를 조사하였다. 17 DIV에 배양액을 1.1mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS로 교체



**Fig. 4.** Neuroprotective effect of *Woohwangcheongsim-won* in hypoxia (4 hrs shock).

A, E20 cortical cells were grown in 24-well plates. On 14 DIV, *Woohwangcheongsim-won* was added to the culture media at 20 ug/ml and incubated for 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, 4 hrs) and further incubated in normoxia. Cell viabilities were measured by LDH assay and expressed as % of control. B, experimental scheme.



**Fig. 5.** Neuroprotective effect of *Woohwangcheongsim-won* in hypoxia (4 hrs shock).

A, E20 cortical cells were grown in 24-well plates. On 14 DIV, *Woohwangcheongsim-won* was added to the culture media at 20 ug/ml and incubated for 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37 °C, 4 hrs) and further incubated in normoxia. Cell viabilities were measured by LDH assay and expressed as % of control. B, experimental scheme.

하고 CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator(Forma Scientific)에 넣어 2%O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 환경에서 2시간 또는 4시간 저산소 처리한 후, 원래의 배양액과 새로운 배양액을 반반씩 회복시키고 정상산소환경에서 계속 배양하였다. 2시간 처리한 경우 1, 3, 5, 7일 후에 세포의 생존율은 牛黃清心元을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 각각 105.80, 100.42, 103.77, 101.02%이었으며(Fig. 6), 4시간 처리한 경우에는 각각 97.62, 103.60, 108.56, 99.95%였다(Fig. 6).

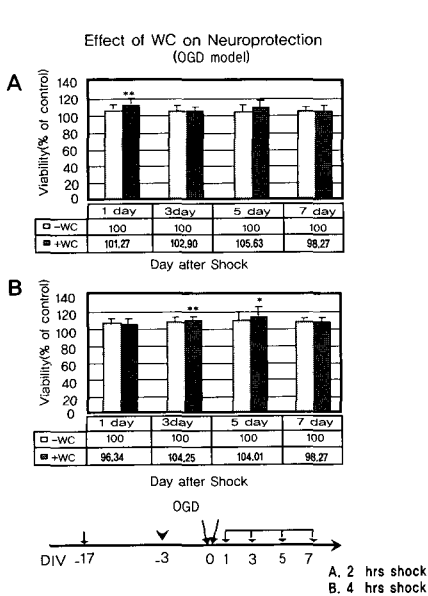
4) 선저당 유발 후 저산소 유발 모델에서 대뇌 신경세포의 보호효과

당과 산소들 각각 따로 줄이는 경우 어떠한 효과가 나타나는지를 조사하였다. 먼저 당을 먼저 줄인 후 저산소 처리한 경우를 조사하였다. 17 DIV에 배양액

을 1.1mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS로 교체하여 2시간 유지한 후 저산소 처리를 2시간 한 경우 1, 3, 5, 7일 후에 세포의 생존율은 대조군에 비하여 각각 103.43, 94.77, 95.88 97.52%이었으며(Fig. 7), 저당에서 4시간 유지한 후 저산소 처리를 4시간 한 경우에는 각각 100.62, 100.29, 104.60, 97.83%이었다(Fig. 7).

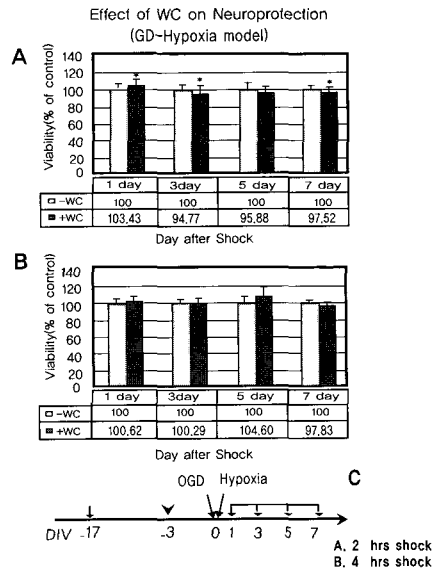
5) 선저산소 유발 후 저당 유발 모델에서 대뇌 신경세포의 보호효과

산소를 먼저 낮춘 후 이어서 당을 낮춘 경우에 牛黃清心元의 세포보호효과를 조사하였다. 17 DIV에 2시간 또는 4시간 저산소 처리한 후 1.1 mM D-(+)-Glucose를 포함한 EBSS로 저당 상태를 2시간 유지하고(4시간은 너무 심한 독성을 나타내어 실험을 진



**Fig. 6.** Effect of *Woohwangcheongsim-won* on neuronal protection in the OGD model.

A, 2 hrs OGD. E20 cortical cells were grown in 24-well plates. On 14 DIV, *Woohwangcheongsim-won* was added to the culture media at 20 ug/ml and incubated for 72 hrs. On 17 DIV, cells were washed with EBSS containing 1.1 mM D-(+)-Glucose. Then, an immediate hypoxic shock was given for 2 hrs and further incubated in normoxia. Cell viabilities were measured by LDH assay and expressed as % of control. B, 4 hrs OGD. C, experimental scheme.



**Fig. 7.** Effect of *Woohwangcheongsim-won* on neuronal protection in the GD-hypoxia model.

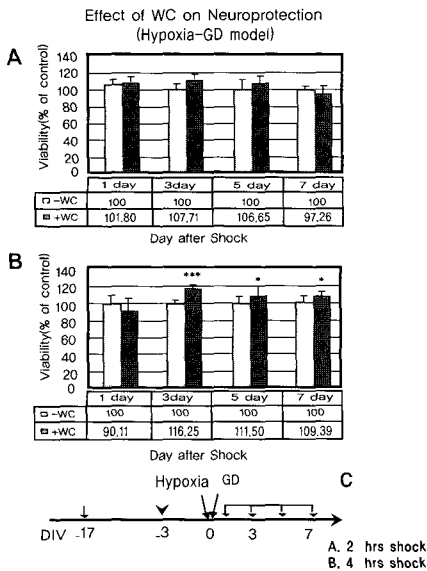
A, GD (2 hrs) - hypoxia (2 hrs). E20 cortical cells were grown in 24-well plates. On 14 DIV, *Woohwangcheongsim-won* was added to the culture media at 20 ug/ml and incubated for 72 hrs. On 17 DIV, cells were washed with EBSS containing 1.1 mM D-(+)-Glucose and incubated for 2 hrs. Then, a hypoxic shock was given for 2 hrs and further incubated in normoxia. Cell viabilities were measured by LDH assay and expressed as % of control. B, GD (4 hrs) - hypoxia (4 hrs). C, experimental scheme



행하지 않았음), 원래의 배양액과 새로운 배양액을 반반씩 회복시키고 정상산소환경에서 계속 배양하였다. 2시간 저산소 처리 후 저당에서 2시간 유지한 경우, 1, 3, 5, 7일 후에 세포의 생존율은 대조군에 비하여 각각 101.80, 107.71, 106.65, 97.26%이었으며 (Fig. 8), 4시간 저산소 처리 후 저당에서 2시간 유지한 경우에는 각각 90.11, 116.25, 111.50, 109.39%였다(Fig. 8).

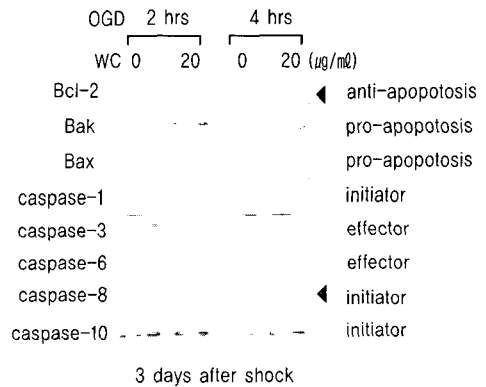
3. 牛黃清心元이 저당-저산소증 모델에서 apoptosis와 관련된 단백질의 표현에 미치는 영향

Mitochondria로부터 cytochrome c의 세포질내 유리는 mitochondrial permeability transition(PT) pore를



**Fig. 8.** Effect of *Wooh wangcheongsim-won* on neuronal protection in the hypoxia-GD model. A, hypoxia (2 hrs) - DG (2 hrs). E20 cortical cells were grown in 24-well plates. On 14 DIV, *Woohwangcheongsim-won* was added to the culture media at 20  $\mu$ g/ml and incubated for 72 hrs. On 17 DIV, a hypoxic shock was given for 2 hrs. Then, cells were washed with EBSS containing 1.1 mM D-(+)-Glucose and incubated for 2 hrs, followed by further incubation in normoxia. Cell viabilities were measured by LDH assay and expressed as % of control. B, hypoxia (4 hrs) - GD (2 hrs). C, experimental scheme..

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 17 DIV에 저당-저산소증(2% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>, 37°C)을 유발한 다음 3일 후에 세포를 수확하여 SDS-gel loading 완충용액으로 세포를 용해시켜 전기영동하고(8 혹은 15% SDS-gel, 40 $\mu$ g/lane), 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮겨 각 단백질들의 표현을 면역염색하여 조사하였다. anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2는 대조군에 비하여 2시간 및 4시간 처리하였을 경우 약 50% 증가하였으며(Fig. 9, Bcl-2), caspase cascade의 initiator인 caspase-8은 2시간 처리의 경우에는 이렇다할 변화가 없었으나 4시간 처리한 경우에는 약 50% 정도 감소하였다(Fig. 9, caspase-8). PT pore를 구성하는 것으로 알려진 Bak과 Bax, 그리고 caspase-1, -3, -6, -10의 표현도 변화가 없었다 (Fig. 9).



**Fig. 9.** Effects of *Woohwangcheongsim-won* on the expression of apoptosis-related proteins in the OGD model. OGD shock was given for 2 hrs or 4 hrs in the presence or absence of 20  $\mu$ g/ml WC. On the third day after shock, cells were harvested, proteins were electrophoresed in SDS-gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membrane and blotted with various antibodies. Note that anti-apoptosis protein Bcl-2 was increased while pro-apoptosis protein caspase-8 (initiator of the caspase cascade) was decreased (arrowheads).

## 고 찰

인간의 뇌에는 적어도 천억 정도의 신경세포(neuron)가 존재하는 것으로 알려져 있는데, 존재 부위와 생성되는 신경전달 물질의 종류에 따라 특정한 신경계의 기능을 담당하게 된다. 최근 들어 의학과 생명과학의 발전으로 인간의 평균수명이 늘어나면서, 중추신경계 질환으로 인한 사망률 및 후유증으로 인한 기능장애의 증가 추세가 심각한 사회적인 문제로 대두되고 있다.

뇌허혈은 신경조직까지의 혈액공급에 손상을 주어 산소와 포도당 결핍에 의한 ATP대사의 장애로 인한 급성 신경세포의 사멸을 수반하는 치명적인 신경계 질환이다. 성숙한 신경세포는 분열에 의한 재생능력이 없기 때문에 신경세포의 사멸은 치명적인 뇌기능 손상으로 나타난다.

1980년에 들어서면서 신경세포 사멸의 원인으로 흥분성 신경전달 물질인 glutamate가 신경세포의 사멸을 유도하는 주원인으로 밝혀져, glutamate neurotoxicity(excitotoxicity, 흥분독성)라고 명명되었고<sup>11)</sup>, 이외에도 활성산소(reactive oxygen species)에 의한 신경독성 및 특정 유전자의 상대적인 작용에 의해 유도되는 apoptosis<sup>12)</sup>가 신경세포 사멸의 새로운 유형으로 보고되면서, 신경계 질환의 기전이 심층적으로 밝혀지고 있다.

허혈 후 신경조직으로 산소·포도당의 공급이 줄어들면, ATP-dependent ion channels의 기능 손실로 세포막을 통한 Ca<sup>2+</sup>과 같은 양이온들의 유입으로 신경세포는 depolarization에 빠지며, 신경말단에서 glutamate 등을 포함하는 신경전달물질의 유리가 증가하고, 신경교세포(glia)에 의한 glutamate reuptake가 줄어들면서, 결과적으로 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 신경연접 부위에 쌓이게 된다. 이처럼 glutamate가 과도 축적되면, 이온성 수용체인 N-methyl-D-aspartate(NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-iso-azolepropionic acid(AMPA)/kainate 수용체의 활성화에 의해 여러 단백질들의 기능에 변화가 나타나고, 대부분의 신경세포들에서 apoptosis에 의

한 지연성 신경세포사가 일어난다<sup>13-15)</sup>.

牛黃清心元은 中風에 사용되는 대표적인 처방으로 5) 清熱瀉下, 解毒, 開竅化痰, 養血生津, 安神 등의 효능이 있어<sup>16)</sup>, 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 있다<sup>6)</sup>. 실제 임상에서는 뇌졸중 급성기의 의식장애, 전조기의 手足麻木, 頭痛, 眩暈 등의 증상에 광범위하게 사용되고 있다<sup>8,17)</sup>.

뇌허혈과 관련된 牛黃清心元의 실험적 연구로는 홍 등<sup>18)</sup>의 뇌허혈 발생시 혼수시간의 단축과 무산소 부하시 생존시간의 연장효과, 조 등<sup>19)</sup>의 뇌허혈로 인한 조직손상의 예방효과와 신경학적 증상의 개선효과, 문<sup>20)</sup>의 전사활성 촉진작용(transcriptional activating effect)에 의한 eNOS 유전자 발현촉진과 VCAM-1 유전자의 발현억제 효과, 한<sup>21)</sup>의 eNOS, p53 유전자의 발현 증가와 VCAM-1, TNF- $\alpha$  유전자의 발현 감소를 통한 혈관의 항상성 유지효과, 조 등<sup>22,23)</sup>, 김<sup>10)</sup>지연성 신경세포사의 억제효과에 관한 연구 등이 있으나, 牛黃清心元의 당과 산소를 동시에 낮춘 저당·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. 본 실험에 의하면 牛黃清心元이 첨가된 배지에서 자란 신경세포들은 그렇지 않은 세포들에 비하여 저산소증에 의한 사망율이 낮았으며, 이러한 효과는 1,500 cells/mm<sup>2</sup>에서 자란 세포들에서 현저히 나타났다.

신경세포는 성숙 정도에 따라 허혈·저산소증, NMDA 등과 같은 처리에서 상당한 차이를 보이기 때문에<sup>24)</sup> 성숙한 신경세포를 이용하여 본 실험을 실행하였다. 김<sup>10)</sup>신경세포를 배양하여 3, 4, 5, 7, 10, 14 DIV서 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 $\alpha$ (eEF-1 $\alpha$ ), Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)은 최고의 성숙도를 보였다고 하였으며, 20 DIV 세포를 면역형광염색하고 다중축점 현미경으로 관찰한 결과 연접표지단백질이며 scaffold protein인 PSD-95, septin 6, translation elongation factor-1 $\alpha$ (eEF-1 $\alpha$ )는 모두 잘 표현되었으며, 특히 PSD-95의 경우 특징적인 puncta를 보여주었다고 하였다. 본 연구에서도 14 DIV 신경세포를 PSD-95와 septin 6로 이중염색한 결과 신경세포의 수상가지에 따라 puncta가 흔히 나타나는 것을 볼 수 있어 사용한 신경세포가 성숙하였음을 알 수 있었다.

배양한 흰쥐 태아 E20 대뇌 신경세포에 저산소증(2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 4 hrs)을 유발한 결과 牛黃淸心元으로 3일간 전처리한 군은 대조군에 비하여 약 108~128%의 생존율을 나타내었다. 김<sup>10)</sup>세포막 손상을 측정하는 propidium iodide 염색과 DNA 손상에 의한 histone 단백질 H2AX의 serine-139 인산화를 검색하는 염색에서도 牛黃淸心元이 세포손상을 완화한다고 하였다.

본 연구에서 당과 산소를 동시에 저하시킨 경우에도 牛黃淸心元이 신경세포 보호효과가 있는지를 조사하였다. 즉, 牛黃淸心元을 3일간 처리한 17 DIV 신경세포 배양액을 저당[1.1 mM D-(+)-Glucose]를 포함한 EBSS로 교체하고 동시에 저산소 처리하였다. 이런 조건으로 2시간 혹은 4시간 처리한 결과 牛黃淸心元은 세포의 생존률을 대조군에 비하여 약간 증가시켰다(최고 8.6%). 이 증가효과는 저산소증만을 유도한 경우(보통 110-120%)에 비하여 상당히 낮았다.

Barrett<sup>25)</sup>는 3주 동안 배양한 기저핵(basal ganglia) 신경세포에서 glucose를 제거하고 94% N<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub>에서 5시간(37°C) 처리한 후 24시간 회복기간이 경과한 후 세포생존율을 조사한 결과, 세포의 70% 이상이 손상을 입었다고 하였다. 또한 Vizi<sup>26)</sup>는 흰쥐의 선조체 절편(striatal slice)에서 저산소 상태는 glutamate와 dopamine의 evoked release를 증가시키

고 resting release에는 영향을 주지 않았으며, 저당 처리는 dopamine의 resting release를 증가시켰다고 하였다. Birrell 등<sup>27)</sup>은 대뇌피질세포 배양에서 산소 제거와 저당처리(1.7에서 0.6 mM로)를 동시에 시행하면 12 혹은 24시간 후에 Ca<sup>2+</sup> uptake와 LDH release가 상당히 증가되나, glucose를 동시에 낮추지 않을 경우에는 Ca<sup>2+</sup> influx가 지연되며 24시간 내에는 LDH release가 일어나지 않는다고 하였다. 이러한 보고들은 당과 산소를 동시에 제거한 경우 세포에 매우 심한 스트레스로 작용함을 의미하는 것으로 따라서 牛黃淸心元의 세포보호효과가 상대적으로 미약하게 나타나는 것도 이와 관련이 있는 것으로 추정된다. 牛黃淸心元의 세포보호효과가 상대적으로 미약하게 나타나는 다른 이유로는 저당 처리하는 과정 자체가 신경세포에게 상당한 스트레스를 주기 때문일 것으로 추정된다. 저당 처리는 배양신경세포의 배지를 여러 차례 바꿔주어야 하는 과정이 필요한데, 이 과정 자체가 신경세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 가짜 저당 유발 후 저산소 유발 모델에서 조사한 결과 牛黃淸心元의 신경세포 보호효과는 최고 5.6%였다. 이는 실제로 저당을 처리한 선저당 유발 후 저산소 유발 모델에서의 최고 효과인 4.6% 보다는 높지만 그 차이는 미미하다. 흥미로운 점은 저산소 처리를 먼저 한 선저산소 유발 후 저당 유발 모델에서는 그 효과가 더 잘 나타난다는 것인데(최고 16.5%), 이는 저산소 및 저당으로 인한 세포손상의 순서에 따라 세포사의 과정이 다르며 따라서 약재의 효과도 달라짐을 시사한다. 그러나 이 경우의 효과는 저산소 처리만을 한 경우에 비하여 낮았는데 아마도 牛黃淸心元의 보호 효과가 저당 처리과정에서 상쇄되는 것으로 보인다.

저당·저산소 처리와 같은 에너지 고갈(energy deprivation)은 세포의 glutamate 농도의 증가를 일으키며 결국 신경세포사를 일으키는 것으로 알려져 있다. 즉, 이러한 경우 과도한 세포막 탈분극(excessive membrane depolarization)이 일어나며, 이어서 세포내 sodium 및 calcium의 농도가 증가된다<sup>28)</sup>. 저당·저산소 처리 과정에서 배지의 Ca<sup>2+</sup>을 제거하거나 sodium

channel blocker인 tetrodotoxin(1 microM)과 N-methyl-D-aspartate receptor antagonist인 MK-801(3 microM)를 처리하면 세포사를 현저히 줄일 수 있다<sup>25,26</sup>. 또한 쥐의 외측시상하부(lateral hypothalamus)의 orexin 세포에서 glucose 농도를 8.3 mM에서 2.8 mM로 낮추면 세포질 내의  $Ca^{2+}$ 이 증가된다고 한다<sup>29</sup>. 이러한 보고들은 저당이나 저당-저산소증에서 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 과다한 유입이 세포사의 원인이 됨을 시사한다. 따라서 본 연구에서는 牛黃清心元이 저당-저산소증 모델에서 apoptosis와 관련된 단백질의 표현에 미치는 영향을 조사하였다.

저당-저산소증 모델에서 牛黃清心元은 anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2의 표현을 증가시켰으며, caspase cascade의 initiator인 caspase-8의 표현은 감소시켰다.

Caspases는 비활성 전구체(inactive precursors)로 존재하다가 adaptor protein에 의하여 apoptosis가 시작되면 활성화된다. 지금까지 14개의 mammalian caspases가 발견되었는데, 크게 initiator(upstream)와 effector (downstream) caspases로 구분된다<sup>30</sup>. 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-8이 감소(대조군의 약 50%)되었는데, 이는 김<sup>10</sup>의 결과와 일치하였다. 따라서 牛黃清心元은 저당-저산소증 모델에서 initiator인 caspase-8의 표현을 억제함으로써 대뇌 신경세포사를 방지하는 것으로 생각된다.

Caspases는 apoptosis를 직접 실행하는 단백질들로서, effector caspase들은 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)와 같은 세포에 필수적인 단백질을 분해하고, CAD와 같은 endonucleases를 활성화 시켜 세포사를 일으킨다<sup>31</sup>. Caspase activation의 조절 기전

으로 tumor necrosis factor(TNF) receptor family의 신호전달에 관한 것이 많이 알려져 있었으나<sup>32</sup>, 최근에는 mitochondria에 있는 신호전달 단백질 기구에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다<sup>33</sup>. 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 한다<sup>34</sup>.

Mitochondria로부터 유출된 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 활성화 시킨다<sup>35,36</sup>.

Caspases는 apoptosis가 시작되면 Bcl-2 family 단백질들에 의하여 형성되는 mitochondrial permeability transition(PT) pores를 통하여 유리된 cytochrome c에 의하여 활성화된다<sup>37-9</sup>. 최근의 연구결과들은 cytochrome c의 세포질내 유리에 Bcl-2 family 단백질, 특히 'BH3-only' members가 다양한 apoptosis 촉진 자극에 의해 가장 중요한 역할을 하고있음을 말하고 있다<sup>37</sup>. 그 중 Bcl-2와 Bcl-XL은 잘 알려진 apoptosis 억제제로 mitochondrial cytochrome c 유리를 방지한다<sup>40</sup>. 이 단백질들은 apoptosis를 촉진하는 Bax와 같은 단백질과 결합하여 Bax-Bax가 mitochondrial permeability transition(PT) pores를 만들지 못하게 중성화시킴으로써 cytochrome c의 유리를 막는다<sup>37-9</sup>. Bcl-2 family 가운데 'BH3-only' members(Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, hrsk, 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 촉진한다.

본 연구에서 Bcl-2의 표현은 牛黃清心元에 의하여 증가(대조군의 약50%)됨을 알 수 있었다. 이는 김<sup>10</sup>이 저산소증에서 조사한 결과와 일치한다(이 경우

약 100% 증가). 따라서 牛黃清心元이 저당-저산소증 모델에서 신경세포사를 억제하는 또 다른 하나의 기전은 Bcl-2의 표현을 증가시켜 mitochondrial permeability transition(PT) pores의 생성을 줄이는 것으로 보인다.

## 결론

본 연구에서는 배양한 대뇌 신경세포의 저당·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 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 assay를 이용하여 관찰하였고, 牛黃清心元의 신경세포사 방지기전에 관해서는 apoptosis와 관련된 단백질인 Bcl-2, Bak, Bax, caspase family의 표현을 통하여 조사하였다.

1. 牛黃清心元은 E20 대뇌 신경세포 배양을 이용한 저당·저산소증 모델에서 신경세포 보호작용이 있음을 LDH assay 면역염색을 통하여 확인하였다.
2. 牛黃清心元이 저당·저산소증 모델에서 신경세포사를 억제하는 기전은 apoptosis를 촉진하는 Bcl-2의 표현을 증가시켜 mitochondrial permeability transition pore의 생성을 저하시킴으로써 cytochrome c의 세포질 내 유출을 억제하고 caspase cascade의 시발자인 caspase-8의 표현을 감소시켜 단백질분해를 줄임으로써 세포사를 감소시키는 것으로 추정되었다.

이상의 실험 결과로 牛黃清心元이 저당·저산소증으로 인한 대뇌 신경세포의 apoptosis 기전 중 Bcl-2의 증가에 의한 cytochrome c의 세포내 유출 억제, 그리고 caspase-8의 감소에 의한 caspase cascade의 활성을 억제시킴으로써 apoptosis를 감소시키는 것으로 보인다. 따라서 牛黃清心元은 뇌손상으로 발생되

는 지연성 대뇌신경 세포사 방지에 효과가 있는 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267:1456-1462.
2. Oppenheim RV, Prevet D, Tytell M, s Homma. Naturally occurring and induced neuronal cell death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis. evidence for the role of ccell death genes. *Dev. Biol*. 1990;138:104-113.
3. Cryns V, J Yuan. Proteases to die for. *Gene. Devel*. 1998;12:1551-1570.
4. Kroemer G, Dallaporta B, M Resche-Rigon. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol*. 1998; 60:619-642.
5. 김영석. 중풍(뇌졸중). 중풍학술대회논문집. 1995;1:56.
6. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:대성문화사. 1981:171-173.
7. 康命吉. 濟衆新編. 서울:여강출판사. 1992:44.
8. 김동웅, 오승환, 안일희, 이인정, 이형균, 이승무 등. 의식장애를 동반한 졸중풍 급성기 환자에서 우황청심원 투여에 관한 고찰. 대한한의학회지. 1994;15(1):203-210.
9. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res*. 1993;35:5767-5761.
10. 김민석. 우황청심원이 저산소증으로 유발된 지연성 신경세포사에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2001.
11. Dennis W. Choi. Glutamate Neurotoxicity and Diseases of the Nervous System. *Neuron*. 1988;1:623-634.
12. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*. 1982;239(1):57-69.
13. Durkin JP, Tremblay R, Chakravarthy B, Mealing G, Morley P, Small D, et al. 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.
14. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol.* 2000;62(3):215-249.
  15. Durkin JP, Tremblay R, Buchan A, Blosser J, Chakravarthy B, Mealing G, et al. 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.
  16. 남상경, 이경섭. 우황청심원과 소합황원의 효능에 대한 연구. *경희의학.* 1990;19:220-237.
  17. 이종형. 청강의감. 서울:성보사. 1990:215-219.
  18. 홍남두, 김남재, 김규섭. 우황청심원이 순환기계에 미치는 영향. *생약학회지.* 1988;18(4):241-248.
  19. 조태순, 이선미, 이은방, 조성익, 김용기, 신대회, 박대규. 우황청심원의 뇌허혈 및 중추신경계에 대한 약효. *약학회지.* 1998;41(6):817-828.
  20. 문상관. 우황청심원이 인체내피세포의 NOS 및 세포 부착인자 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 분자생물학적 연구. *경희대학교 대학원.* 2000.
  21. 한창호. 우황청심원이 eNOS, 세포유착분자, TNF- $\alpha$  및 p53 유전자 발현에 미치는 영향. *경희대학교 대학원.* 2001.
  22. 조규선, 정승현, 신길조, 이원철. 우황청심원이 중대뇌 동맥 결찰로 유발된 뇌허혈에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 2001;22(1):78-89.
  23. 조규선, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. 우황청심원이 저산소증 유발 배양신경세포에 미치는 영향. *대한방내과학회지.* 2001;22(2):135-144.
  24. Iijima T. The pathophysiology of ischemic neuronal injury: an overview. *Masui.* 1998;47(6):662-677.
  25. Goldberg WJ, Kadingo RM, Barrett JN. Effects of ischemia-like conditions on cultured neurons, protection by low Na<sup>+</sup>, low Ca<sup>2+</sup> solutions. *J Neurosci.* 1986;6(11):3144-3151.
  26. Milusheva E, Doda M, Pasztor E, Lajtha A, Sershen H, Vizi ES. Regulatory interactions among axon terminals affecting the release of different transmitters from rat striatal slices under hypoxic and hypoglycemic conditions. *J Neurochem.* 1992;59(3):946-952.
  27. Birrell GJ, Marcoux FW. Effect of varying levels of glucose on oxygen deprivation-induced delayed neuronal cell death in primary cerebrocortical cultures. *Brain Res.* 1993;607(1-2):337-340.
  28. Mercuri NB. Hypoglycemia enhances ionotropic but reduces metabotropic glutamate responses in substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurophysiol.* 2001;85(3):1159-1166.
  29. Yada T. Lowering glucose concentrations increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> in orexin neurons of the rat lateral hypothalamus. *Neurosci Lett.* 2001;309(3):165-166.
  30. Creagh EM, Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans.* 2001;29(6):696-701.
  31. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998;281(5381):1312-1316.
  32. 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 septohippocampal cultures. *J Neurosci Res.* 2001;64(2):121-131.
  33. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998;281(5381):1309-1312.
  34. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996;86(1):147-157.
  35. 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.
  36. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 1999;13(24):3179-3184.
  37. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13(15):1899-1911.
  38. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, et al. tBID, a membrane-targeted death ligand,

- oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 2000;14(16):2060-2071.
39. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, et al. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol.* 1999;144(5):891-901.
40. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997; 275(5303):1132-1136.