

원 저

PC12 손상 세포 및 전뇌허혈 유발 Gerbil에 對한 白芷의 細胞保護效果

이영효, 정승현, 신길조, 문일수¹⁾, 이원철

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 의과대학 해부학교실¹⁾

Protective Effect of *Angelicae Dahuri Radix* on Hypoxia Reperfusion Induced by PC12 Cell Damage and Global Ischemia in Gerbil

Yeong-Hyo Lee, 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 University¹⁾

Objective : This research was performed to investigate the protective effect of *Angelicae Dahuri Radix* against ischemic damage using PC12 cells and global ischemia in gerbils.

Methods : To observe the protective effect of *Angelicae Dahuri Radix* on ischemia damage, viability and changes in activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase and production of malondialdehyde (MDA) were observed after treating PC12 cells with *Angelicae Dahuri Radix* during ischemic insult. Gerbils were divided into three groups: a normal group, a 5-min two-vessel occlusion (2VO) group, and an *Angelicae Dahuri Radix* administered after 2VO group. The CCAs were occluded by microclip for 5 minutes. *Angelicae Dahuri Radix* was administered orally for 7 days after 2VO. The histological analysis was performed at 7 days after surgery. For histological analysis, the brain tissue was stained with 1% cresyl violet solution.

Results :

1. *Angelicae Dahuri Radix* has a protective effect against ischemia in the CA1 area of the gerbil hippocampus 7 days after 5-minute occlusion.
2. In the hypoxia/reperfusion model using PC12 cells, *Angelicae Dahuri Radix* has a protective effect against ischemia in the dose of 0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml and 20 μ g/ml.
3. *Angelicae Dahuri Radix* increased the activities of glutathione peroxidase and catalase.
4. The activity of superoxide dismutase (SOD) was increased by ischemic damage, which might represent self protection.

This study suggests that *Angelicae Dahuri Radix* has some neuroprotective effect against neuronal damage following cerebral ischemia in vivo with a widely used experimental model of cerebral ischemia in Mongolian gerbils, and it also has protective effects on a hypoxia/reperfusion cell culture model using PC12 cells.

Conclusions : *Angelicae Dahuri Radix* has protective effects against ischemic brain damage at the early stage of ischemia. (J Korean Oriental Med 2003;24(1):110-121)

Key Words: *Angelicae Dahuri Radix*, ischemia, PC12 cell, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase, malondialdehyde (MDA)

· 접수 : 2002년 12월 24일 · 채택 : 2003년 2월 5일
· 교신저자 : 정승현, 경상북도 경주시 용강동 동국대학교 경주 한방병원
(Tel. 054-770-1341-2, Fax. 054-770-1500, E-mail: wideduck@hanmail.net)

서 론

우리나라의 뇌혈관 질환 발병추세는 1980년대 이후 뇌출혈이 현저하게 감소하고, 뇌경색의 비율이 오히려 증가하는 추세이다. 또한 여러 가지 사회환경의 변화로 3-40대의 젊은 층에서 중풍이 빈발하고, 고령화에 따른 허혈성 뇌혈관장애로 인한 질환이 사회문제로 대두되고 있다¹⁾.

뇌허혈로 인해 손상을 받은 신경세포는 중심부(core)의 초기세포괴사 과정과 손상 주변부(penumbra)나 특정부위가 사망에 이르는 후기세포손상 과정으로 진행된다. 손상을 받은 중심부의 신경세포들은 짧은 시간 내에 비가역적인 손상을 입게 되지만, 주변의 대부분 신경세포들은 사고 발생 후 3일에서 1주일 후에 사망하게 되는데, 이를 지연성세포사(DND, delayed neuronal death)라고 하며 apoptosis에 의한 것으로 알려져 있다²⁾. 최근 연구에 따르면 apoptotic type의 지연성 세포사의 발생기전으로 free radicals^{3,4)}, glutamate^{5,6)}, calcium overload⁷⁾, NO^{8,9)} 및 여러 cytokines¹⁰⁻¹²⁾ 등 많은 요인들이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이와 관련된 신경보호제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

白芷는 中風初期에 자주 활용되는 星香正氣散, 蠲痛導痰湯, 清肺瀉肝湯의 주된 약재로 散風除濕, 通竅止痛, 消腫排膿하는 효능이 있어 陽明經의 風熱·濕熱을 제거하는 主藥으로 사용된다. 한의계에서도 뇌졸중 급성기에 한약을 투여하여 뇌경색의 부피, 뇌부종의 크기 및 신경세포의 조직학적, 면역학적 손상이 유의성 있게 감소되었다는 보고와 함께 한약투여의 임상적 효과를 검증하는 실험논문들이 발표되고 있는데¹³⁻¹⁸⁾, 白芷의 항산화효소 활성도의 조절을 통한 신경세포 보호효과에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 허혈성 뇌혈관 질환에서 백지의 신경세포 보호효과와 작용기전을 연구하기 위하여, 신경세포의 특징을 나타내는 PC12 세포에 허혈 상태와 유사한 조건인 serum 공급 중단에 따른 백지추출물 투여 후의 생존율과 Superoxide dismutase(SOD), Glutathione peroxidase(GPx), Catalase(CAT),

Malondialdehyde(MDA)의 효소활성을 측정하고, Mongolian Gerbil의 전뇌허혈 모델에서 지연성 신경세포 손상방지에 미치는 영향을 광학현미경(BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. PC12 세포의 세포사 및 항산화억제에 미치는 영향
1) 약물의 조제 및 투여

실험에 사용된 백지는 대한약전 및 대한약전의 한약 규격주해¹⁹⁾에 근거하여 동국대학교 강남 한방병원에서 구입하였으며, 백지 200g을 3,000ml round flask에 넣고 2,000ml의 정제수를 가하여 냉각기가 부착된 전탕기에서 1시간 30분을 가열한 후 여과지로 여과한 여액을 동결 건조하여 30.8g의 추출물을 얻었다.

백지의 PC12 세포에 대한 농도는 0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml 및 20 μ g/ml의 세가지로 나누어 실험하였다. 시약인 Bradford Reagent, assay buffer, NADPH, Bu-OOH, potassium phosphate buffer, TCA 등은 모두 SIGMA에서 구입하였다.

pharmaceutical name	<i>Angelicae dahuricae radix</i> (白芷)
scientific name	<i>Angelica dahurica</i> (白芷)

2) PC12 세포의 hypoxia/reperfusion model 에 대한 MTT assay

백지의 신경보호효과에 대한 in vitro model로서 PC12 세포를 이용한 hypoxia/reperfusion model을 사용하였다. 배양액으로는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, U.S.A), 5% Fetal Bovine Serum(Gibco BRL, U.S.A), 10% horse serum(Gibco BRL, U.S.A), 1% penicillin-streptomycin(Gibco BRL, U.S.A)으로 구성된 것을 사용하였다.

PC12 cell을 96 well plate에 8×104개씩 접종하고 24시간 동안 37°C incubator (5% CO₂, humid atmosphere, Forma, U.S.A)에서 배양하였다. 배양 후 실험군은 실험 약재를 PBS에 녹여서 최종 농도가 0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml 및 20 μ g/ml가 되도록 2시간 전에 전

처리 하였다. 2시간 후 세포를 hypoxic chamber(CO2 5%, H2 10%, N2 85%, Forma, U.S.A)에 넣어 무산소 상태로 48시간 배양하여 저산소 상태를 유발한 후 정상적인 37°C incubator로 옮겨 6시간동안 배양하여 재관류를 유발하였다. 대조군은 백지 대신 PBS를 동량 넣어 주었고 같은 시간 동안 CO2 incubator에 넣어 정상산소상태를 유지시켜 주었다. 세포 생존율은 conventional MTT dye reduction assay를 사용하여 측정하였다. 재관류가 유발된 후 각 well마다 MTT solution(final concentration, 1mg/ml)을 넣은 후 1시간 동안 37°C incubator에서 반응시켰다. 1시간 후 죽은 cell과 반응하여 생성된 formazan을 DMSO 150µl 넣은 후 60°C incubator에서 10분간 녹인 후 ELISA reader로 570, 650nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험군의 측정된 흡광도 값은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

3) 생화학적 측정

(1) 세포처리 및 단백질 정량

백지의 신경보호효과에 대한 PC12 세포를 이용한 생화학적측정에서 hypoxia/reperfusion model의 조건은 위의 MTT assay와 동일하게 적용하였고, 뇌허혈과 비슷한 상태인 e 배지에서 세포를 배양하였다. 백지의 배양액내 농도는 세가지(0.2µg/ml, 2µg/ml 및 20 µg/ml)로 하였으며, 단백질 정량은 Bradford 방법²⁰⁾에 따라 측정하였다. Diluted dye 980µl에 sample 20µl를 반응시켜서 spectrophotometer로 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) SOD 활성도 측정

SOD 활성도 측정은 McCord와 Fridovich의 cytochrom c 방법²¹⁾을 이용하였다. SOD 측정을 위한 반응액에는 50mM의 potassium phosphate buffer(0.1 mM EDTA를 포함, pH 7.8)와 0.05mM의 xanthine, ferricytochrome c를 가하여 25°C에서 10분간 항온시킨 후, 조제된 효소액을 가하고 xanthine oxidase (XOD)의 첨가로 반응이 개시되었다. SOD 효소액을 넣기 전에 혼합액과의 반응에서 흡광도의 변화가 적어도 분당 0.025가 되도록 XOD의 양을 조절하는 과정을 먼저 수행하였다. 흡광도의 변화는 550nm에서

UV/Vis spectrophotometer로 측정하였다. SOD의 1unit은 550nm에서 흡광도를 측정하였을 때, cytochrom c의 환원속도를 50% 억제하는 양으로 정하였다.

(3) CAT 활성도 측정

CAT 활성도는 Hugo Abei의 방법²²⁾에 따라 이 효소에 의해 H2O2가 H2O와 O2로 분해되는 원리를 이용하여 측정하였다. 0.1M potassium phosphate buffer에 19mM H2O2인 반응액과 효소액을 가하여 20°C 240nm에서 흡광도의 변화를 3분간 10초 간격으로 측정하였다. CAT의 활성도는 1분 동안에 1mmol의 H2O2를 분해시키는 효소의 양을 1unit으로 하였다.

(4) GPx 활성도 측정

GPx 활성도는 t-butyl hydroperoxide를 기질로 사용하여 NADPH의 산화정도를 측정한 Del Maestro와 McDonald의 방법²³⁾을 이용하였다. 각각의 sample에는 Assay buffer(900µl + NADPH 50µl + sample 50 µl + t-Bu-OOH 10µl)를, blank에는 assay buffer(950 µl + NADPH 50µl + t-Bu-OOH 10µl)를 각각 넣고, 340nm에서 2분간 10초 간격으로 측정하였다. GPx 활성도는 1분간 NADPH 1µmol이 산화되는 양을 1unit으로 정하였다.

(5) MDA 활성도 측정

과산화지질함량은 Ohkawa 등의 방법²⁴⁾을 이용하여 thiobarbituric acid(TBA)와 과산화지질이 반응하여 생성되는 malondialdehyde를 흡광도로 측정하는 TBARS법으로 측정하였다. Sample 200µl에 차가운 10% TCA를 400µl 넣고 4°C에서 10분 동안 원심분리시킨 후, 상층액 500µl를 0.67% TCA 500µl와 섞어, 10분 동안 끓여 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. Gerbil의 전뇌허혈에 미치는 영향

1) 약물의 조제 및 투여

백지 200g을 3,000ml round flask에 넣고 2,000ml의 정제수를 가하여 냉각기가 부착된 전탕기에서 1시간 30분을 가열한 후 여과지로 여과한 여액을 동결 건조하여 30.8g의 추출물을 얻었다.

Gerbil에 백지 투여는 실험동물의 체중을 측정하여 3차 증류수에 102.9mg/kg의 농도로 전뇌허혈 유발 후 2시간부터 7일까지 매일 같은 시간에 경구투여하였다.

Gerbil을 무작위로 두 군으로 나누어 각각 생리식염수를 투여하는 대조군(n=7)과 백지 추출물을 투여하는 실험군(n=3)으로 나누어 실험을 진행하였다.

2) 동물

동물은 Biogenomics에서 구입한 male Mongolian gerbils(*Meriones unguiculatus*)을 사용하였다. 물과 펠렛사료(Biogenomics)는 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실 내의 온도는 21-24℃, 습도는 40-60%로 유지하였고 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다. 실험실 환경에 2주간 적응시킨 후 사용하였으며 실험시 gerbil의 체중은 60-80g이었다.

3) 가역성 전뇌허혈 유발

체중 60-80g의 male Mongolian gerbil(*Meriones unguiculatus*)을 2-vessel occlusion 방법으로 시술하였다. 마취는 처음에 질소와 산소의 혼합가스(질소 70%, 산소 30%)에 포함된 5% isoflurane으로 유도하고 그 후에는 1.5% isoflurane으로 계속 유지시켰다. 마취 후 수술용 현미경(Zeiss, Germany)을 사용하여 목의 정중선을 2cm정도 절개한 후 총경동맥이 노출되면 미주신경을 분리해내고 5분간 microaneurysmal clip으로 폐색한 후 microaneurysmal clip을 제거하고 봉합하였다. Gerbil에 허혈을 유발, 재관류 및 회복기 동안 신경보호 효과를 유발하는 저체온증을 방지하기 위하여 직장온도를 이용한 자동 온도 조절 전열기로 37℃로 고정시켜서 실험하였다. 체온측정은 직장속으로 최소한 3cm 들어가게 probe를 삽입하므로써 뇌온도를 반영하는 직장체온을 측정하였다.

4) 전자현미경 관찰을 위한 표본제작

면역조직화학적 평가를 위해 허혈 유발 후 3일과 조직화학적 평가를 위해 허혈 유발 1주일 후 gerbil에 pentobarbital(중의제약)을 복강주사하여 희생시킨 후 단두하였다. 곧 뇌를 적출한 후 rat brain matrix(ASI, U.S.A.)를 이용하여 rat brain atlas의 interaural distance에 따라 3mm 두께의 뇌절편을 만

들었다. 뇌절편을 Carnoy's solution에 고정시켜서 paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 해마(hippocampus)를 포함하는 부분을 8μm로 section하였다. 표본제작을 위한 조직절편은 30μm마다 수집하였다.

5) 신경세포수 관찰

허혈유발 1주일 후에 gerbil을 희생시켜 8μm로 자른 뇌조직 절편에서 dorsal hippocampus를 포함하는 조직을 cresyl violet에 10분간 염색하여 dorsal hippocampus CA1 중 가장 지연성 세포사에 손상받기 쉬운 부분인 middle zone의 500 μm길이에서 신경세포수를 관찰하였다. 세포수의 관찰은 광학현미경으로 고배율(×200)에서 동일시야(2.33 mm)내 CA1 영역의 정상 pyramidal cell의 수를 측정하였다.

3. 통계처리

실험결과와 분석은 동물실험의 경우 약물투여군을 허혈유발 대조군과, PC12 세포실험의 경우 농도별 약물투여군을 허혈후 재관류 대조군과 각각 비교하는 Student's t-test를 사용하였다.

실험결과

1. PC12 세포를 이용한 세포사로부터의 세포보호효과 실험결과 0.2μg/ml의 농도에서 백지를 투여한 실험군이 투여하지 않은 대조군에 비해 121.40%의 효과율을 보였으며, 2μg/ml 농도에서는 103.72%, 20μg/ml의 농도에서는 100.12%로 효과율이 증가함을 보였다(Tabel 1). 백지의 농도가 증가함에 따라 백지의 PC12 세포 보호 효과가 감소하는 것을 알 수 있어 0.2μg/ml 농도에서 신경세포 사멸의 방어효과가 가장 높음을 보였다(Fig. 1.).

2. 생화학적 측정결과

PC12세포에 백지 추출물을 투여한 경우, 세포배양액 50μl에 대해 백지 추출물 0.2μg/ml, 2μg/ml, 20μg/ml씩 가하여 활성도를 측정하였다.

Table 1. The Protective Effect of *Angelicae Dahuri Radix* on Hypoxia Reperfusion Induced PC12 Cell Damage

	Effective Ratio (%)
H/R + ADR I	121.40
H/R + ADR II	103.72
H/R + ADR III	100.12

The number are shown percentage for control
 H/R(Hypoxia/Reperfusion) : Control. Incubated at hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h incubation at normoxic chamber
 ADR I : *Angelicae Dahuri Radix* 0.2 μ g/ μ l
 ADR II : *Angelicae Dahuri Radix* 2 μ g/ μ l
 ADR III : *Angelicae Dahuri Radix* 20 μ g/ μ l

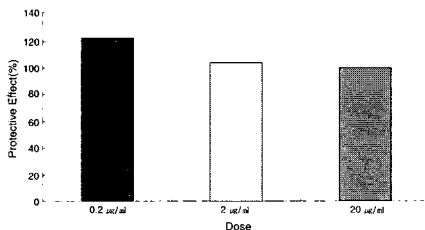


Fig. 1. Concentration dependent effect of *Angelicae Dahuri Radix* extract on ischemia induced by hypoxia/reperfusion model with PC12 cell. PC12 cell were treated with 0.2 μ g/ μ l, 2 μ g/ μ l and 20 μ g/ μ l of *Angelicae Dahuri Radix* extract and incubated at hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h incubation at normoxic chamber. Cell viability was measured by MTT assay as described previously.

1) SOD 활성도 측정

단백질 mg 당 SOD 활성도는 백지 추출물을 투여하지 않은 대조군의 경우 142.5 \pm 3.2 nitrite unit (NU), 백지 추출물을 투여한 실험군 중 0.2 μ g/ μ l 농도에서 125.6 \pm 2.4 NU(P<0.01), 2 μ g/ μ l 농도에서 124.3 \pm 2.7 NU(P<0.01), 20 μ g/ μ l 농도에서 98.7 \pm 2.5 NU(P<0.01)로, 대조군이 가장 높았고 20 μ g/ μ l 농도의 실험군이 가장 낮았다(Table 2, Fig. 2.). 따라서, 백지의 투여농도에 따른 결과 20 μ g/ μ l 농도의 실험군이 0.2 μ g/ μ l 및 2 μ g/ μ l에 비해 SOD 활성 억제효과가 더 큰 것으로 나타났다.

2) CAT 활성도 측정

단백질 mg 당 CAT 활성도는 대조군의 경우 68.4 \pm 1.1 nitrite unit (NU), 실험군 중 0.2 μ g/ μ l 농도에서 87.9 \pm 3.3 NU(P<0.01), 2 μ g/ μ l 농도에서 78.5 \pm 1.8

Table 2. Catalytic Activities of Superoxide Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase(GPx), and Catalase. Enzyme Activities are Measured after Treated with *Angelicae Dahuri Radix* at 0.2 μ g/ μ l, 2 μ g/ μ l, and 20 μ g/ μ l Concentrations.

	GPx	Catalase	SOD
Normal	100.4 \pm 3.9	100.2 \pm 3.0	100.6 \pm 1.8
H/R	32.6 \pm 2.4	68.4 \pm 1.1	142.5 \pm 3.2
H/R + ADR I	78.4 \pm 1.9**	87.9 \pm 3.3**	125.6 \pm 2.4**
H/R + ADR II	75.6 \pm 2.4**	78.5 \pm 1.8**	124.3 \pm 2.7**
H/R + ADR III	56.1 \pm 2.0**	73.6 \pm 1.9	98.7 \pm 2.5**

The number are shown as mean (Unit/mg) \pm SEM.
 * and ** indicate that their statistical significances are P<0.05 and P<0.01, compared to the value for H/R group, respectively.

Normal : no treated
 H/R : Control. Incubation at hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h incubation at normoxic chamber

ADR I : *Angelicae Dahuri Radix* 0.2 μ g/ μ l
 ADR II : *Angelicae Dahuri Radix* 2 μ g/ μ l
 ADR III : *Angelicae Dahuri Radix* 20 μ g/ μ l

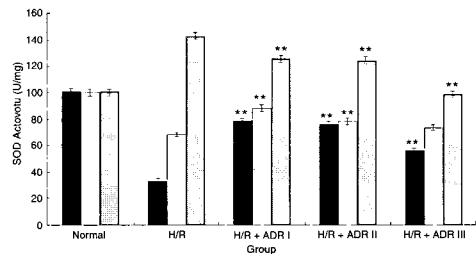


Fig. 2. Catalytic activities of Superoxide Dismutase(SOD), Glutathione Peroxidase(GPx), and Catalase. Enzyme activities are measured after treated with *Angelicae Dahuri Radix* at 0.2 μ g/ μ l, 2 μ g/ μ l, and 20 μ g/ μ l concentrations.

NU(P<0.01), 20 μ g/ μ l 농도에서 73.6 \pm 1.9 NU로, 대조군이 가장 낮고 0.2 μ g/ μ l 농도의 실험군이 가장 높았다(Table 2, Fig. 2.). 특히 백지의 투여농도에 따른 결과 0.2 μ g/ μ l 농도에서 CAT 효소 활성 감소가 더 높은 것으로 나타났다.

3) GPx 활성도 측정

단백질 mg당 GPx 활성도는 대조군의 경우 32.6 \pm 2.4 nitrite unit (NU), 실험군 중 0.2 μ g/ μ l 농도에서 78.4 \pm 1.9 NU(P<0.01), 2 μ g/ μ l 농도에서 75.6 \pm 2.4 NU(P<0.01), 20 μ g/ μ l 농도에서 56.1 \pm 2.0 NU(P<0.01)로, 대조군이 가장 낮고 0.2 μ g/ μ l 농도의 실험군이 가장 높았다(Table 2, Fig. 2.). 특히 백지의 농도별 관찰

에서 0.2 μ g/ml 농도의 실험군이 GPx의 활성을 가장 증가시킨 것으로 나타났다.

4) MDA 활성도 측정

단백질 mg당 MDA 활성도는 대조군의 경우 125.4 \pm 1.1 nmol, 실험군 중 0.2 μ g/ml 농도에서 115.4 \pm 1.5 nmol(P<0.01), 2 μ g/ml 농도에서 113.4 \pm 2.3 nmol(P<0.01), 20 μ g/ml 농도에서 99.8 \pm 2.1 nmol(P<0.01)로, 대조군이 가장 높고 20 μ g/ml 농도의 실험군이 가장 낮았다(Table 3, Fig. 3.). 특히 농도별 관찰에서 20 μ g/ml 농도의 실험군이 MDA 활성을 가장 감소시킨 것으로 나타났다.

3. 뇌허혈 손상 후 신경세포 손상의 형태학적 관찰
해마 CA1 영역에서의 신경세포 손상이 완전히 일

어난 시점인 재관류 후 1주일에 gerbil을 희생시켜 양쪽 해마의 조직 절편을 광학 현미경하에서 관찰하였다. 정상군 gerbil에서는 정상적인 형태의 해마 pyramidal neuron이 관찰되었다(Fig. 4: A, B). 5분간의 ischemia 유발 후 saline을 경구투여한 대조군의 경우는 CA1 영역의 신경세포들이 주변 세포로부터 분리되어 유리되고 세포체 또한 정상적인 형태를 잃고 응축되어 단일 세포의 형태로 되어있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4: C, D).

반면에 백지를 1주일간 경구투여한 gerbil의 해마 CA1 영역에서는 정상 조직과 유사한 형태의 신경세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 4: E, F). 또한 이 세포들은 잘 뺄어나가는 perikaryon과 중앙에 위치하는 등근 핵으로 인하여 쉽게 구분할 수 있었고, 비교적 온전한 상태로 관찰되었다.

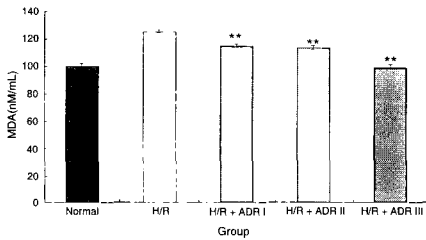


Fig. 3. The effect of *Angelicae Dahuri Radix* on the production of MDA. The level of MDA was measured in PC12 cells after treated with various concentrations of *Angelicae Dahuri Radix*.

Table 3. The Effect of *Angelicae Dahuri Radix* on the Production of MDA. The Level of MDA was Measured in PC12 Cells after Treated with Various Concentrations of *Angelicae Dahuri Radix*

Group	MDA
Normal	100.0 \pm 1.8
H/R	125.4 \pm 1.1
H/R + ADR I	115.4 \pm 1.5**
H/R + ADR II	113.4 \pm 2.3**
H/R + ADR III	99.8 \pm 2.1**

The number are shown as mean (nmol/ml) \pm SEM.
* and ** indicate that their statistical significances are P<0.05 and P<0.01, compared to the value for H/R group, respectively.

Normal : no treated

H/R : Control. Incubation at hypoxia chamber for 48hrs followed by 6h incubation at normoxic chamber

ADR I : *Angelicae Dahuri Radix* 0.2 μ g/ μ l

ADR II : *Angelicae Dahuri Radix* 2 μ g/ μ l

ADR III : *Angelicae Dahuri Radix* 20 μ g/ μ l

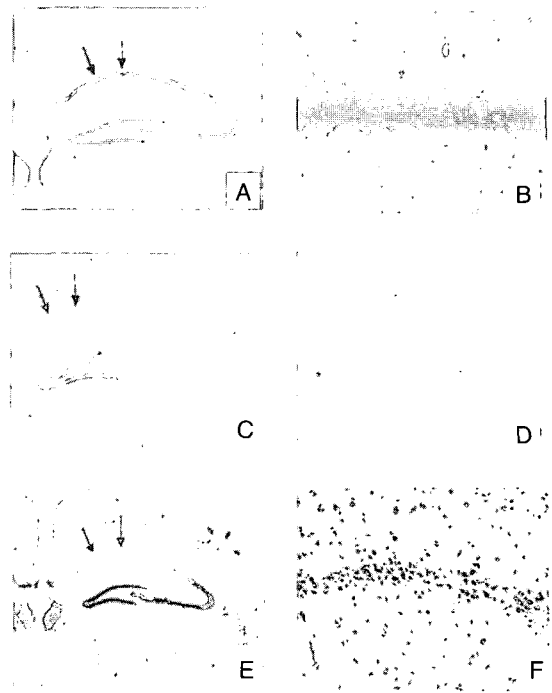


Fig. 4. Cresyl violet staining of the gerbil hippocampus CA1 area 7 days after 5-minute ischemia in the normal (A, B), vehicle-treated group (C, D), *Aurantii Immaturus Fructus* extract treated group (E, F). Arrows indicate pyramidal neurons in CA1 area.

4. CA1 영역의 pyramidal neuron의 개체수 측정
 허혈 시술 후 7일째에 희생시킨 gerbil의 뇌조직 절편을 cresyl violet으로 염색하여 해마 CA1영역 중앙부 500 μ m길이에서 정상적인 형태의 pyramidal neuron 수를 측정하였다. 아무런 처치도 가하지 않은 정상군의 경우 정상 neuron의 수는 153.5 \pm 4.9개였다. 허혈 유발 후 saline을 투여한 대조군에서는 51.0 \pm 2.5개였으며 ischemia 유발 후 백지 전탕액을 7일간 경구투여한 실험군의 경우 91.7 \pm 2.8개로 유의한 ($p<0.01$) 방어효과가 있음을 관찰할 수 있었다(Table 4, Fig. 5).

정상군의 CA1영역에서의 pyramidal neuron의 생존률을 100%로 계산한다면, 상대적으로 saline 투여한 대조군의 경우 생존률이 33.2%이며, 백지를 투여한 실험군의 경우 59.7%로 백지를 투여한 실험군이 saline을 투여한 대조군에 비하여 유의한 방어효과가 있음을 알 수 있었다.

고 찰

白芷는 繖形科에 속한 2~3년생 초목인 구릿대의 뿌리를 건조한 것으로, 芳香, 苳薘, 澤芬, 香白芷 등의 異名으로 불린다. <神農本草經>²³⁾에 “味苦, 溫, 主女人漏下赤白, 血閉陰腫, 寒熱, 風頭, 侵目淚出, 長肌膚, 潤澤”의 효능이 있음이 최초로 수록되어 있으며, 散風除濕·通竅止痛, 消腫排膿하는 효능이 있어 陽明經

의 風熱·濕熱을 제거하는 主藥으로 사용되어 왔다.

백지에 대한 연구로는 김 등²⁶⁾이 백지의 물 추출물에서 항균효과, 혈액 및 혈관계 개선효과 그리고 간장보호효과가 유의성 있게 나타남을 보고하였고, 권²⁷⁾이 백지의 성분 중 항균활성이 인식되는 성분을 분리하여 조성을 밝힌 연구보고가 있었으나, 허혈성 뇌혈관 질환에 있어서의 신경세포보호효과와 작용기전에 대한 연구는 없었다.

최근 뇌졸중과 퇴행성신경계 질환에 대한 국내외 연구에 따르면 신경세포의 사멸을 유도하는 경로로 excitotoxicity, oxidative stress 및 apoptosis가 알려져 있다.

Excitotoxicity는 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 N-methyl-D-aspartate(NMDA), kainate 수용체의 활성을 통하여 세포내에 Ca²⁺과 Na²⁺등 양이온들의 과도유입을 유도하여 신경세포의 사멸을 유도하는 것으로, glutamate neurotoxicity라고도 한다. 특히 세포내 Ca²⁺이 쌓이면 Calpain(a calcium-activated neutral protease family) 등의 고분자 분해를 촉진하는 효소가 활성화되거나, nitric oxide synthase(NOS)가 활성화되어 NO가 생성되고, NO는 superoxide(O₂⁻)와 반응하여 peroxinitrite(ONOO⁻)를 만들며 신경세포의 사멸을 유도한다.

신경세포에서 꼭 필요로 하는 산소는 생존에 가장 필수적인 물질로 전자전달계의 최종 전자수용체가 되며 여러 대사과정에 관여한다. 그러나 산소의 대사

Table 4. The Neuroprotective Effects of *Angelicae Dahuri Radix* in the Neuronal density of Gerbils in the CA1 Region of the Hippocampus 7 Days after 5-minute Occlusion

	Normal	Control	Sample
Normal	100.4 \pm 3.9	100.2 \pm 3.0	100.6 \pm 1.8
n	7	7	3
Cell counts ¹⁾	153.5 \pm 4.9	51.0 \pm 2.5	91.7** \pm 2.8
Viability percent	100	33.2	59.7
Damaged percent	-	66.8	40.3

¹⁾ expressed as mean \pm SEM

**; P<0.01

Normal: Intact group

Control: vehicle-treated group at 7days after ischemia

Sample: *Angelicae Dahuri Radix* extract-treated group at 7days after ischemia

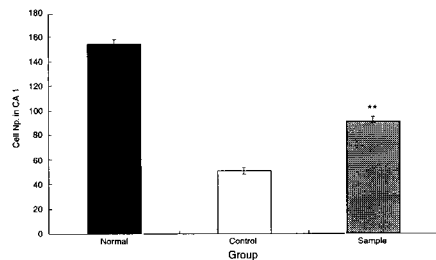


Fig. 5. The counts of intact pyramidal cell in the CA1 area of the gerbil hippocampus 7 days after 5-min occlusion induced ischemia. (*; P<0.01) Normal; Intact group, Control; Vehicle-treated group at 7 days after ischemia, Sample; *Angelicae Dahuri Radix* extract-treated group at 7 days after ischemia

과정에서 생체에 독성을 나타낼 수 있는 중간대사 산물들이 나타날 수 있는데, 이러한 물질로는 superoxide radical(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical(OH^\cdot), singlet oxygen(O_2) 등이 있다. 이 중 superoxide radical은 산소분자에 전자 하나가 더 부가된 음이온 형태로서 oxygen radical 독성작용의 중추적인 역할을 한다.

이러한 oxygen free radical에 관한 연구는 1969년 McCord와 Fridovich²⁸⁾에 의해 superoxide dismutase (SOD)가 발견됨에 따라 활발하게 진행되었고, 이후 여러 질환과의 관련성에 대해 많은 연구가 진행되고 있는데, 최근에는 특히 뇌경색, 뇌외상 등과 같은 뇌 손상후의 뇌기능 장애에 미치는 free radical의 역할이 주목을 받고 있다. Free radical은 허혈후 조직에 lipid peroxidation의 대사가 증가되면서 specific membrane associated protein에 손상을 주고, 이렇게 손상받은 세포막은 정상상태에서는 투과시키지 않던 물질들에 대한 투과성이 증가되어 궁극적으로 세포 손상이 야기된다고 하며, 뇌손상 후 free radical이 내피세포와 혈뇌관문에 손상을 주고 직접 뇌세포에 작용하여 뇌부종 및 뉴런, 신경교세포의 구조적인 변화를 초래한다고 주장하였다. 특히 중추신경계는 세포막에 불포화지방산이 풍부하며 free radical을 제거하는 SOD, CAT, GPx 등의 효소가 적고, 또한 free radical을 형성하는 iron이 풍부하여 free radical에 의해 비교적 손상받기가 쉽다.

Oxidative stress는 최근 연구에 따르면 apoptosis를 통해 cell death를 유발하는 것으로 밝혀졌다²⁹⁾.

Apoptosis는 최근 들어 신경계 질환의 주 사멸 기전으로 부각되고 있다. Apoptosis라고 명명되는 세포 사멸 과정 중에는 세포막과 핵 내에 특이한 형태학적인 변화가 동반되는 특징을 가진다. 세포막 융기의 돌출(membrane blebbing) 및 여러 형태의 세포내용물이 세포막으로 쌓여져 세포로부터 떨어져 나온 apoptosis 소포체(apoptotic body)라는 특수한 구조를 형성하고, mitochondria 등과 같은 대개의 세포내 소기관들은 자신의 원형 구조를 유지하는데 비해 핵 내에서는 염색사 응축, 핵분절, DNA 분절 등과 같은

특이한 변화가 동반된다³⁰⁾.

이에 본 연구에서는 백지가 뇌허혈 초기의 신경세포 손상에 미치는 방어효과를 알아보기 위하여 PC12 세포를 이용한 hypoxia/reperfusion model을 사용하여 신경세포 생존율과 항산화제인 SOD, CAT, GPx, MDA의 활성도를 측정하고, 2-V.O.의 방법으로 전뇌허혈을 유발시킨 Mongolian Gerbil에 백지추출액을 투여한 후 광학현미경을 통해 신경 세포의 조직학적 변화를 관찰하였다.

세포 생존력에 미치는 효과 실험에서는 백지가 신경세포 손상에 미치는 영향을 실험적으로 연구하기 위하여 뇌허혈과 비슷한 상태인 저산소 상태로 배양한 직후 정상적인 배양기로 옮겨 6시간동안 배양하여 재관류를 유발한 상태와 정상상태에서 각각 세포 생존효과를 측정해 보았고, 백지를 0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml, 20 μ g/ml의 세가지 농도로 처리한 후 세포생존효과를 측정해 보았다. 세포생존효과 측정은 MTT assay방법을 이용하였다. 원리는 MTT 시약이 tetrazolium salt로써 세포내의 미토콘드리아의 기능이 정상적일 때 대사적 환원이 일어나 푸른색의 formazan 침전물을 형성하며 이의 흡광도를 측정하여 세포 생존력을 간접적으로 알 수 있는 방법이다.

백지가 세포생존에 미치는 효과는 0.2 μ g/ml, 2 μ g/ml, 20 μ g/ml의 모든 농도에서 높게 나타났다. 백지의 농도가 20 μ g/ml일 때는 효과가 100.12%가 나왔으며, 2 μ g/ml일 때는 103.72%, 0.2 μ g/ml일 때는 121.40%로 농도에 따라서 현저한 차이가 나타나 0.2 μ g/ml일 때 가장 높은 효능을 보였으며 고농도로 갈수록 오히려 세포생존에 미치는 효능이 떨어지는 것을 알 수 있었다.

생화학적실험에서는 뇌세포를 손상시키는 free radical을 제거하는 SOD, CAT, GPx, MDA 등의 효소를 이용해 효소 활성도를 측정하였다.

항산화 효소 중 SOD는 산소대사과정 중 생성되는 유리 superoxide radical(O_2^-)을 H^+ 와 반응시켜 O_2^- 와 H_2O_2 로 변화시키는($O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$) 효소이다. superoxide radical은 mitochondria에서 일어나는 산소대사과정 중 전자전달계로 전자가 이동되는 과

정에서 산소분자가 효소를 통하지 않고 직접 전자 1 개를 받음으로써 만들어지며 이차적으로 다른 oxygen radical도 생기게 된다³¹⁾. 이러한 superoxide radical이 증가하면 세포막에 손상을 입힐 수 있는데, mitochondria에서 생성된 superoxide radical의 대부분은 mitochondria 기질에 있는 SOD에 의해 제거되고 mitochondria에서 유리되어 나온 일부 superoxide radical은 cytosol에 있는 SOD에 의해 제거된다. 대사 과정 중 생성된 반응성을 가진 free radical이 SOD에 의해 안정화되지 못하여 세포막 지질과산화물을 일으켜 세포가 손상되면 치매와 같은 퇴행성질환이 유발될 수 있으며, 알츠하이머형 치매환자의 경우 과산화로 인해 반응성이 큰 O₂⁻와 H₂O₂같은 물질들이 많이 생성되기 때문에 이를 안정화시켜주기 위해 SOD의 활성도가 더욱 높게 나타난다. SOD의 활성도는 cytochrom c가 superoxide radical에 의해 환원되는 반응이 SOD 활성에 비례하여 억제되는 원리를 이용한 것으로 ferricytochrome c가 파장 550nm 에서 최대의 흡광도를 나타내는 ferricytochrome c로의 전환이 억제되어 생기는 흡광도의 차이를 이용한 방법이다.

CAT는 SOD로부터 생성된 H₂O₂를 물과 산소로 전환(2H₂O₂→2H₂O+O₂)시키는 효소로서 주로 동물의 간이나 적혈구, 신장세포의 cytosol에 존재한다³²⁾.

GPx는 selenium(Se)을 함유하는 selenoenzyme으로서 cytosol에서 생체 이물질의 형성을 억제시키고, 활성을 띤 superoxide radical을 안정화시켜주는 역할을 하는 glutathione(GSH)을 oxidized glutathione(GSSG) 형태로 산화시키면서³³⁾ H₂O₂와 같은 free radical은 환원시켜 안정화 시킴으로써 과산화물의 생성을 억제하는 역할을 한다. Glutathione reductase(GR)는 GPx와 함께 각종 산화환원반응에 관여하여 세포내부에 GSH의 수준을 일정하게 유지시키는 역할을 하는 효소이다^{34,35)}.

이와같이 대사과정에서 생성된 superoxide radical이 SOD에 의해 H₂O₂, OH· 등으로 전환이 되어 CAT와 GPx, GR 등의 작용에 의해 산소와 물로 전환되어 안정화되면 free radical의 공격으로 인한 세포 손상은 줄어든다. 그러나 이러한 효소의 작용이 원활

하지 않아 free radical이 안정화되지 못해 세포가 손상되면 항산화 효소의 생성과 분비가 원활하게 이루어지지 않게 되고, 따라서 free radical의 생성은 더욱 증가되어 세포 손상이 가속화된다.

본 연구에서는 우선 정상적인 PC12 세포를 serum과 glucose를 제거한 세포배양액으로 교체한 후 백지를 0.2μg/ml, 2μg/ml, 20μg/ml의 농도별로 분주하고, 48시간을 너허혈과 비슷한 상태인 저산소 상태로 배양하여 유발하였고, 이후 정상적인 배양기로 옮겨 6시간동안 배양하여 재관류를 유발시켜, 각각 SOD, CAT, GPx, MDA의 효소 활성도를 측정하였다.

본 연구결과 SOD의 활성도는 대조군이 높았는데, 이는 허혈후 재관류에 의한 superoxide radical(O₂⁻)의 생성이 증가하여 oxidative stress 상태가 되었음을 의미한다. 대사과정이 이루어지면서 superoxide radical은 계속적으로 생성되며 일부 제거되지 않은 superoxide radical이 지속적으로 세포에 손상을 가하게 되는데, 만약 허혈이 oxidative stress에 의해 발생하는 것이라면 허혈이 진행됨에 따라서 체내 free radical의 생성이 증가하고 이에 대한 방어작용으로 항산화 효소인 SOD의 활성도는 증가한다.

본 연구에서는 대조군에서 활성도가 높게 나타났는데, 이는 허혈에서 생성된 superoxide radical의 제거를 위한 방어기전이라 생각하며, superoxide radical의 제거가 지속됨으로서 높은 상태의 활성도를 유지하고 있는 것 같다. 20μg/ml 처리한 경우가 SOD 활성을 가장 억제하였다.

CAT와 GPx의 활성도는 대조군이 보다 유의하게 낮았는데, 이는 허혈시 생성된 superoxide radical에 의해 CAT와 GPx의 활성도가 억제된 것으로 생각된다. 또한 백지로 처리하였을 때 CAT와 GPx의 활성도가 대조군보다 높았는데, 이는 백지추출물이 hypoxia/reperfusion으로 인한 세포독성으로부터 세포를 보호하고, CAT와 GPx 효소의 활성 감소를 막는 것으로 밝혀졌다. CAT와 GPx 실험에서는 SOD의 경우와는 달리 백지를 0.2μg/ml 처리한 경우 효소 활성도가 가장 높았으며, 고농도로 갈수록 활성도를 감소시켰다.

MDA 또한 대조군에서 활성도가 보다 유의하게 높았고, 백지를 농도별로 처리한 경우 superoxide radical의 과잉생산을 막아 MDA 활성도를 감소시켰다. MDA 실험에서는 SOD의 경우와 마찬가지로 농도를 20 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 경우 활성을 가장 억제시켰다.

in vitro 실험에 사용한 Mongolian Gerbil은 후대뇌 교통동맥(posterior communicating artery)의 결손으로 인하여 뇌에 혈액을 공급하는 대뇌동맥륜(willis circle)이 불완전하게 형성되어 있기 때문에, 양쪽 총경동맥에 일시적인 폐색을 일으키기 쉽고 좋은 재현성을 보여 허혈성 뇌손상(ischemic brain damage)의 기전 연구 및 뇌허혈에 대한 약물의 신경세포보호작용(neuro protection)을 평가하는 동물모델로서 자주 사용되고 있다.

저자는 Mongolian Gerbil의 양쪽 총경동맥을 5분 동안 결찰한 후 재관류시켜 전뇌허혈을 유발한 후 7 일째 hippocampus CA1지역의 pyramidal neuron의 상해정도를 관찰하였다. 수분 이내의 일시적 허혈은 뇌 세포 가운데 특정 취약 집단의 사망을 유도하게 된다. 그러나 CA1지역의 pyramidal neuron들은 일시적 허혈 이후 바로 사망하지 않고, 며칠이 지난 후 지연성으로 사망하게 된다³⁶⁾. 여러 동물실험에서 뇌의 기능 및 형태 관찰 결과, 짧은 전뇌허혈이 있을 후 24시간까지는 CA1지역 pyramidal neuron은 energy crisis 나 morphological change가 없이 정상인 것으로 알려져 있다. 2~4일에는 hippocampus형성체 CA1지역의 pyramidal neuron이 지연성 신경세포사를 시작하여³⁷⁾ 3주 뒤에는 약 5%의 신경세포만이 생존한다고 보고³⁸⁾ 되고 있다. 이러한 현상을 설명하기 위하여 많은 가설들이 제시되었으나, 그 기전은 아직 명확하지 않다.

본 연구에서는 gerbil에 전뇌허혈 유발 7일 후 hippocampus CA1영역내에서 cresyl violet으로 염색된 정상 pyramidal neuron의 수를 측정하고 세포형태에 대해 광학 현미경으로 관찰한 결과 유의성 있는 보호효과가 있음을 관찰하여 전뇌허혈로 유발된 apoptosis 과정 중의 지연성 세포사과정에서 시호가 신경보호효과가 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때 백지가 허혈로 유발된 뇌손

상에 방어적인 효과가 있어 뇌허혈 손상의 방에 유용한 치료약물로 쓰일 수 있는 가능성을 제시하고 있으며, 향후 구체적인 신경세포손상의 보호기전에 대한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

결론

일시적인 뇌허혈로 손상받은 신경세포에 백지가 어떤 작용을 하는지 알아보기 위하여, PC12 세포를 이용한 hypoxia/reperfusion model을 사용하여 MTT assay를 통한 신경세포 생존율과 항산화제인 SOD, CAT, GPx, MDA의 활성을 측정하고, 2-V.O.의 방법으로 전뇌허혈을 유발시킨 Mongolian Gerbil에 백지 추출물을 투여하고 광학현미경으로 신경 세포의 조직학적 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PC12 cell을 이용한 hypoxia/reperfusion model에서 백지가 허혈성 세포사에 방어효과가 있음을 관찰하였다.
2. 허혈성 세포사에 관여하는 SOD, CAT, GPx 및 MDA 활성도를 관찰한 결과 SOD와 MDA의 활성도는 억제하고 GPx와 CAT 활성도의 감소를 막아, hypoxia/reperfusion로 인하여 증가하는 superoxide radical의 과잉생산을 억제하였다.
3. Gerbil에서 5분간의 전뇌허혈 유발 후 hippocampus CA1영역내 pyramidal cell의 수를 관찰한 결과, 백지 추출물을 투여한 실험군에서 대조군에 비해 높은 생존율을 보여 백지가 신경세포사 방어효과가 있음을 관찰하였다.

이상으로 본 연구 결과 백지가 전뇌허혈로 유발된 뇌허혈 손상을 억제하는 효과가 있으며 oxidative stress에 의한 세포독성을 억제하는 효과가 있는 것으로 추정된다.

참고문헌

1. 金永錫 臨床中風學. 서울:書苑堂.1997: 317-29, 431.
2. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of

- the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Progress in Brain Res.* 1985;63:39-58.
3. Kitagawa K, Matsumoto M, Oda T, Niinobe M, Hata R, Handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, Maeda H, Mikoshiba K, Kamada T. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. *Neuroscience.* 1990;35:551-8.
 4. Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J. Physiol.* 1992;263:1356-62.
 5. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron.* 1988;2:623-34.
 6. Rothman SM. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J. Neurosci.* 1984;4:1884-91.
 7. Simon RP, Griffith t, Evans MC, Swan JH, Meldrum BS. Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia. an electron microscopy study in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1984;4:350-61.
 8. Dawson DA. Nitric oxide and focal cerebral ischemia : multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab. Rev.* 1994;6:299-324.
 9. Iadecola C. Dark and bright sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 1997;20:132-9.
 10. Liu T, McDonnell PC, Young PR, White RF, Siren AL, Hallenbeck JM, Barone FC, Feurestein GZ. Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke.* 1993;24:1746-50.
 11. Schielke GP, Yang GY, Shivers BD, Betz AL. Reduced ischemic brain injury in Interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. *J. cereb. Blood Flow Metabol.* 1998;18:180-5.
 12. Szaflarski J, Burtrum D, Silverstein F. Cerebral hypoxia ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. *Stroke.* 1995;26:1093-1100.
 13. 김순신. 蘇合香元이 白鼠의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1993.
 14. 정승현, 신길조, 이원철. 六一順氣湯 抽出物이 생쥐의 全腦虛血에 미치는 영향. 동국한의학회 연구소논문집. 1997;7(2):149-154.
 15. 최은정, 신길조, 이원철. 蘇合香元이 실험적 뇌경색 흰 쥐의 국소뇌혈류량 및 경색 면적에 미치는 영향. 한의학회지. 1997;18(1):462-465.
 16. 조규선, 이원철, 윤상협. 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄후 大造丸 투여가 대뇌반구 및 시상위축에 미치는 영향. 한방성인병학회지. 1998;4(1):163-175.
 17. 김선영, 윤상협, 이원철. 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄후 黃連解毒湯 투여가 대뇌반구 및 시상위축에 미치는 영향. 동국노총. 1998;37:229-246.
 18. 유종삼. 星香正氣散이 흰쥐의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1992.
 19. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인덱스사. 1998: 577-8.
 20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
 21. Mccord JM and Fridovich LJ. *Biol. Chem.* 1969; 244:6049-55.
 22. Hugo A. Catalase in vitro. *Methods in enzymatic analysis.* 1984:673-84.
 23. Maestro RD, McDonald W. Oxidative enzymes in tissue homogenate. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* 1985:291-6.
 24. Ohkawa H, Ohishi K, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.
 25. 孫星衍 輯. 神農本草經. 臺北:文光圖書有限公司. 1979: 48.
 26. Kim CM, Heo MY, Kim HP, Sin KS, P. Pachaly. Pharmacological Activities of Water Extracts of Mitotic Poisons, *Arch. Pharm. Res.* 1991;14:87-92.
 27. 권용수. 구릿대뿌리(白芷)의 抗菌活性 成分에 關한 研究. 강원대학교 대학원. 1997.
 28. 오영준, 최원석. Apoptosis의 조절인자:Bcl-2계열. 유전계2권. 서울:월드사이언스. 1998:92-105.
 29. Islekel H, Islekel S, Guner G, Ozdamar N. Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia reperfusion. *Brain Res.* 1999;843:18-24.
 30. Hussain S, W slikker, Ali SF. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Devl Neurosci.* 1995;13: 811-817.
 31. Ruis H. The biosynthesis of catalase, *Canadian Journal*

- of Biochemistry. 1979;57:1122-1130.
32. Marcel Zamocky, Franz Koller. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis, Progress in Biophysics and Molecular Biology. 1999;72:19-65.
33. Harding JJ, Blakytyn R, Ganea E. Glutathione in disease, Biochemical Society Transactions. 1996;24: 881-884.
34. Griffith OW. Glutathione and glutathione disulphide. Methods in Enzymatic Analysis. 1985;8:521-529.
35. Harding JJ, Blakytyn R, Ganea E. Glutathione in disease, Biochemical Society Transactions. 1996;24: 881-884.
36. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res. 1982;239:57-69.
37. Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed hippocampal damage in human following cardiorespiratory arrest. Neurology. 1987;37:1281-6.
38. Bonnekoh P, Barbier A, Oschlies U, Hossmann KA. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus: morphological change after 5-min ischemia and long survival times. Acta Neuropathol(Berl). 1990;80:18-25.