

뇌해마의 장기양 조직배양을 이용한 한약물의 뇌신경세포손상 보호효능 연구

이원철*^{***}, 정혁상** , 손낙원***

동국대학교 한의과대학 심계내과학교실*, 경희대학교 한의과대학 해부학교실**,
경희대학교 동서의학대학원 신경과학교실***

Neuroprotective Effects of Medicinal Herbs in Organotypic Hippocampal Slice Cultures

Won-Chul Lee*^{***}, Hyuk-Sang Jung** , Nak-Won Sohn***

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University*,

Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University**,

Department of Neuroscience, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University***

Objectives : For the screening of neuroprotective effects of medicinal herbs, the complex system of animal models suffer some disadvantages in controlling critical parameters such as blood pressure and body temperature. Additionally, application of drugs to the appropriate brain area sometimes is difficult, due to poor permeability though the blood brain barrier, and so potential protective effects might be masked.

Methods : Organotypic hippocampal slice culture (OHSC) method has the advantages of being relatively easy to prepare and of maintaining the general structure, including tissue integrity and the connections between cells. Drugs can easily be applied and neuronal damage can easily be quantified by using tissues and culture media. This study demonstrates neuroprotective effects of Puerariae radix (葛根, PR), Salviae miltiorrhizae radix (丹蔘, SR), Rhei rhizoma (大黃, RR), and Bupleuri radix (柴胡, BR). These were screened and compared to MK-801, antagonist of NMDA receptors, by using OHSC of 1 week-old Sprague-Dawley rats. Oxygen/glucose deprivation (OGD) were conducted in an anaerobic chamber (85% N₂, 10% CO₂ and 5% H₂) in a deoxygenated glucose-free medium for 60 minutes. Water extracts of each herbs were treated to culture media with 5 µg/ml for 48 hours.

Results : Neuronal cell death in the cultures was monitored by densitometric measurements of the cellular uptake of propidium iodide (PI). PI fluorescence images were obtained at 48 hours after the OGD and medicinal herb treatment. Also TUNEL-positive cells in the CA1 and DG regions and LDH concentrations in culture media were measured at 48 hours after the OGD. According to measured data, MK-801, PR, SR and BR demonstrated significant neuroprotective effect against excessive neuronal cell death and apoptosis induced by the OGD insult. Especially, PR revealed similar neuroprotective effect to MK-801 and RR demonstrated weak neuroprotective effect.

Conclusions : These results suggest that OHSC can be a suitable method for screening of neuroprotective effects of medicinal herbs.

(This work was supported by the research program of Dongguk University and Grant 01-PJ9-PG1-01CO03-0003 from Ministry of Health & Welfare.)

Key Words: Puerariae radix(葛根, PR), Salviae miltiorrhizae radix(丹蔘, SR), Rhei rhizoma(大黃, RR), Bupleuri radix(柴胡, BR), oxygen-glucose deprivation(OGD), organotypic hippocampal slice cultures(OHSC)

· 접수 : 2004년 7월 7일 · 채택 : 2004년 7월 28일
· 교신저자 : 이원철, 서울시 강남구 논현동 37-21 동국대학교
강남한방병원 3내과
(Tel. 02-3416-9791, Fax. 02-3416-9790, E-mail :
noosa@naver.com)

* 본 연구는 동국대학교의 2003학년도 동국대학교 연구년 지원 및 보건복지부의 한방치료기술연구개발사업 연구비(01-PJ9-PG1-01CO03-0003) 지원에 의하여 이루어졌음.

1. 緒 論

한약물의 증풍에 대한 효능을 객관적으로 규명하기 위하여 뇌경색 또는 뇌허혈에 대한 다양한 실험 방법들이 동원되고 있다. 동물실험 모형은 전뇌허혈(global ischemia)과 국소뇌허혈(focal ischemia)의 방법으로 구분할 수 있으며, 세포 또는 조직배양 실험 모형에서는 신경세포나 뇌해마 조직의 장기양 조직 절편(organotypic slice)을 배양하여 산소를 차단하고 glucose를 박탈하는 방법으로 허혈손상을 유발하는 방법이 이용된다^{1,2}. 동물실험 모형에서는 실험동물의 혈압이나 체온 등 신체적인 상황이 뇌손상의 정도에 큰 영향을 미치며, 한약물의 뇌혈관문 통과가 어려운 점 등 약물의 투과성 문제 및 유효량의 문제 등이 존재한다. 또한 단일 세포주를 사용하는 세포배양 모형의 실험결과들은 동일한 효능이 동물실험에서는 관찰되지 않는 등의 문제점이 있다^{3,5}. 그러므로 입장에서 유의하다고 판단되는 많은 한약물들의 효능이 실험적으로 입증되지 못하는 예가 많았다.

이에 비하여 장기양 조직절편 배양법은 in vivo에서 볼 수 있는 신경세포간의 신경연접을 온전히 갖고 있다는 장점이 있으며, 신경세포 배양방법에서와 같이 약물의 수송이나 신경세포의 미세한 주변환경을 정확히 조절할 수 있고, 신경세포의 손상 및 회복 정도를 조직과 조직배양액을 이용하여 보다 더 쉽게 정량화 할 수 있는 장점이 있다^{6,8}.

본 연구에서는 이러한 장점이 있는 뇌해마조직의 장기양 조직배양(organotypic hippocampal slice cultures, OHSC) 방법을 이용하여 한약물의 뇌신경세포손상 보호효능을 관찰하고 NMDA receptor 길항제로서 강력한 뇌신경세포손상 보호효능이 보고된 MK-801의 효능^{9,11}과 비교해봄으로써 한약물의 효능 검증은 물론 한약물의 일차효능 검증에 있어서 OHSC 방법의 유효성을 실험하였다. 한약물은 신경세포손상 보호효능이 보고 되었거나 유효할 것으로 판단되는 葛根, 丹蔘, 大黃 및 柴胡를 선정하였으며, propidium iodide에 의하여 염색되는 신경세포사멸에

대한 효과, 신경세포의 지연사(apoptosis)를 관찰하는 TUNEL 양성반응 세포수에 대한 효과 및 조직배양액내 LDH 농도에 미치는 효과를 통하여 각 약물의 효능을 측정, 비교 관찰하였다.

II. 方 法

1. 약물

본 실험에 사용된 한약물은 葛根(Puerariae Radix, PR), 丹蔘(Salviae Miltiorrhizae Radix, SR), 大黃(Rhei Rhizoma, RR) 및 柴胡(Bupleuri Radix, BR)로 각각 약물 200g을 증류수 3,000ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 완전히 동결건조시켜 물추출액을 얻어 실험에 사용하였다. 또한 한약물과의 효능 비교 약물은 NMDA receptor 길항제인 MK-801을 사용하였다.

2. 뇌해마 조직배양^{12,13}

본 실험에는 Sprague-Dawley계 흰쥐의 뇌해마(hippocampus) 조직을 사용하였으며, 그 전처리 및 배양 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 7일령 흰쥐의 머리를 단두한 후 곧바로 안과용 가위로 두피와 두개골을 제거하고 대뇌를 적출하였다. 적출한 대뇌를 해부용 조직배양액(MEM 500ml + 25mM HEPE + 4mM L-glutamine, pH 7.4) 내에서 수술용 현미경을 이용하여 양쪽 대뇌반구에서 각각의 뇌해마를 적출하였다. 적출된 뇌해마를 조직절편기를 사용하여 350 μ m 두께의 조직절편으로 만들었다. 각각 분리된 뇌해마 조직절편을 조직배양망에 붙인 다음, 1ml의 조직배양액이 담겨있는 6-well 배양접시에 조직배양망을 삽입하였다. 이후 5% CO₂, 36 °C 상태의 습도가 조절되는 세포배양기에서 10일 동안 조직배양하였다. 조직배양액은 50% MEM(500ml 당 1g glucose 함유), 25% Hank's balanced salt solution(HBSS), 25% horse serum에 20 nM HEPES, 6g/l glucose, 1 mM L-glutamine을 첨가하고 여과한 다음 pH를 7.25~7.30으로 조정하였으며, 50 mg/ml의 streptomycin-

penicillin을 첨가하였다. 조직배양액은 조직을 배양하는 동안 3일에 한번씩 교환해주었다.

3. 허혈손상 유발 및 약물의 처리^{6,14}

뇌해마 조직절편에 대하여 뇌허혈과 유사한 허혈손상을 유발하기 위하여 조직절편 배양시 산소와 glucose 공급을 완전히 차단하는 방법(oxygen-glucose deprivation, OGD)을 사용하였다. 10일 동안 일반적인 조직배양 후 광학현미경을 이용하여 조직의 구조가 온전하지 않은 조직을 선별하여 제거하고, 이후 무산소실(anaerobic chamber, 85% nitrogen, 10% carbon dioxide, 5% hydrogen) 안에서 ischemia balanced salt solution(IBSS, 143.4 mM NaCl, 5 mM HEPES, 5.4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 2.0 mM CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄)이 담긴 배양접시로 뇌해마 조직절편의 배양망을 옮기고 60분 동안 산소와 glucose 공급을 차단하여 허혈손상을 유발시켰다. 정확한 시간 동안 산소와 glucose 공급을 차단한 다음 미리 준비된 propidium iodide(PI)가 첨가된 조직배양액으로 뇌해마 조직절편의 배양망을 옮긴 후 정상 산소상태(normoxia condition, 95% air-5% CO₂, 36.5 °C)에서 48시간 동안 조직절편을 재배양하였다. 한약물의 처리는 각각 물추출액을 5 µg/ml의 농도로 허혈손상 유발 45분전부터 이후 48시간 동안 각 단계의 조직배양액에 첨가시켜 배양하였으며, 효능비교 약물인 MK-801은 10 µM/ml 농도로 처치하였다.

4. Propidium iodide 염색 및 신경세포사멸 면적의 측정^{15,16}

뇌해마 조직절편을 PI이 5 mg/ml로 첨가된 조직배양액의 새로운 6 well 배양접시에 옮기고 2시간 동안 사전 배양한 다음 연속하여 위의 조직배양방법에서 설명한 각 단계별 조직배양액에 PI을 5 µM 농도로 첨가하여 조직을 배양하였다. OGD의 허혈손상과 한약물 및 MK-801 처리 전에 형광현미경(Axiovert S100, Zeiss)을 이용하여 정상적인 상태의 뇌해마조직 PI-염색영상을 얻었으며, 60분간의 OGD를 유발한 48시간 후에 신경세포가 사멸된 상태의 PI-염색

영상을 얻었다. 영상을 컴퓨터영상분석기로 옮긴 다음 NIH image software(Ver. 1.62)를 사용하여 뇌해마의 CA1 및 DG구역 전체면적과 PI에 의하여 적색으로 염색된 신경세포사멸의 면적 비율을 측정하였다.

5. TUNEL 염색 및 양성반응 신경세포 수의 측정^{17,18}

뇌해마 조직절편에 OGD에 의한 허혈손상을 유발한 48시간 후에 조직절편을 1% paraformaldehyde-(PFA)를 포함한 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 10분간 고정하고 5분간 2회 세척한 다음 ethanol-acetic acid 용액으로 -20°C에서 20분간 재고정하였다. TUNEL 염색은 3% H₂O₂-PBS에서 5분간, working strength TdT enzyme(70% reaction buffer + 30% TdT enzyme)으로 37°C에서 2시간, stop/wash buffer에서 15분간, anti-digoxigenin peroxidase conjugate에서 1시간 및 peroxidase substrate(DAB dilution buffer + DAB substrate)에서 10분간 반응시켰다. 이후 0.5% methyl green으로 5분간 배경염색하고 100% n-butanol로 세척한 다음 봉합하였다. 광학현미경이 연결된 컴퓨터영상분석기의 NIH Image software(Ver. 1.62)를 이용하여 뇌해마의 CA1 및 DG구역의 면적을 측정하고 그 면적 내에서 핵이 갈색으로 염색된 TUNEL 양성반응의 신경세포 수를 측정한 다음 각각 단위면적(1,000 µm²) 당으로 계산하였다.

6. 조직배양액내 lactate dehydrogenase 측정^{19,20}

OGD에 의한 허혈손상을 유발한 48시간 후에 조직배양액내로 분비된 뇌해마 조직절편의 LDH 농도는 전문측정용 kit를 사용하여 측정하였다. 배양액 100 µl를 96 well dish에 넣고, diaphorase/NAD⁺ 혼합용액과 iodotetrazolium chloride-sodium lactate 용액을 100 µl 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 50 µl를 첨가하여 반응을 중지시키고, ELISA 측정기를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

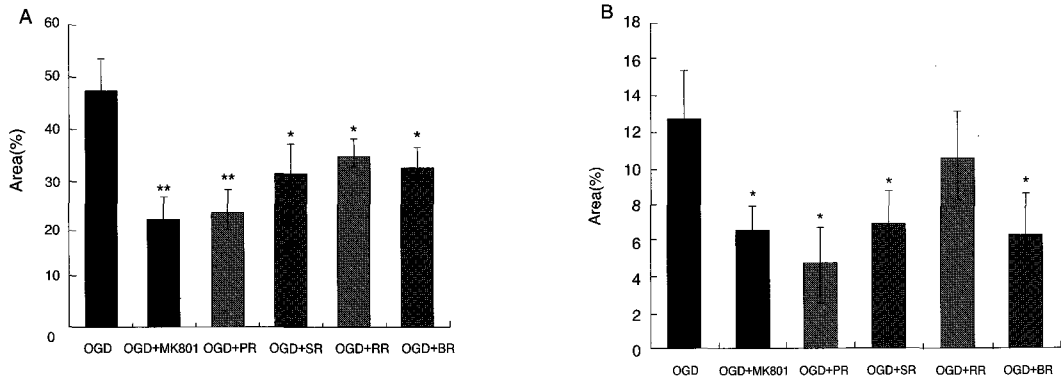


Fig. 1. Effect of herbs and MK-801 on neuronal cell death area % in CA1 of organotypic hippocampal slice cultures with oxygen-glucose deprivation(A). and Effect of herbs and MK-801 on neuronal cell death area % in DG of organotypic hippocampal slice cultures with oxygen-glucose deprivation(B).

III. 成 績

1. 세포사멸 면적비율에 미치는 영향

뇌해마 조직절편의 CA1 영역에서 신경세포 사멸의 면적비율은 산소와 glucose 공급을 완전히 차단하여 허혈손상을 유발한 OGD군에서는 46.7±6.5%였으며, OGD 후 MK-801을 처리한 군에서는 21.1±4.6%로 OGD군에 비하여 P<0.01의 유의성 있는 감소가 나타났다. OGD 후 葛根을 처리한 군은 22.3±4.9%로 OGD군에 비하여 P<0.01의 유의성 있는 감소가 나타나 MK-801과 비슷한 수준의 감소효과가 관찰되었다. OGD 후 丹蔘처리군, 大黃처리군 및 柴胡처리군에서는 각각 30.3±5.8%, 33.8±3.5% 및 31.2±4.3%로 OGD군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Table 1, Fig. 1-A, 2). 뇌해마 조직절편의 DG 영역에서 신경세포 사멸의 면적비율은 산소와 glucose 공급을 완전히 차단하여 허혈손상을 유발한 OGD군에서는 12.6±2.7% 이었으며, OGD 후 MK-801을 처리한 군과 葛根처리군, 丹蔘처리군 및 柴胡처리군은 각각 6.5±1.3%와 4.7±1.9%, 6.8±

1.8% 및 6.2±2.3%로 OGD군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 감소가 관찰되었으나, 大黃처리군에서는 10.5±2.5%로 OGD군에 비하여 감소는 되었으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 1, Fig. 1-B, 2).

2. TUNEL 양성반응 신경세포 수에 미치는 영향

뇌해마 조직절편의 CA1 영역에서 TUNEL 양성반응 신경세포 수는 산소와 glucose 공급을 완전히 차단하여 허혈손상을 유발한 OGD군에서는 28.1±4.1개였으며, OGD 후 MK-801을 처리한 군에서는 9.8±3.2개로 OGD군에 비하여 P<0.001의 유의성 있는 감소가 나타났다. OGD 후 葛根을 처리한 군은 15.7±2.3개로 OGD군에 비하여 P<0.01의 유의성 있는 감소가 관찰되었다. OGD 후 丹蔘처리군, 大黃처리군 및 柴胡처리군에서는 각각 18.1±3.9개, 20.1±2.2개 및 17.5±3.7개로 OGD군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Table 2, Fig. 3, 5, 6). 뇌해마 조직절편의 DG 영역에서 TUNEL 양성반응 신경세포 수는 산소와 glucose 공급을 완전히 차단하여 허혈손상을 유발한 OGD군에서는 14.9±1.6개였으며,

Table 1. Effect of Herbs and MK-801 on Neuronal Cell Death Area % in CA1 and DG of Organotypic Hippocampal Slice Cultures with Oxygen-Glucose Deprivation (%)

Group	cell death area %	
	CA1	DG
OGD	46.7±6.5	12.6±2.7
OGD+MK801	21.2±4.6**	6.5±1.3*
OGD+PR	22.3±4.9**	4.7±1.9*
OGD+SR	30.3±5.8*	6.8±1.8*
OGD+RR	33.8±3.5*	10.5±2.5
OGD+BR	31.2±4.3*	6.2±2.3*

Data presented mean ± standard error (n=12).

OGD ; group of ischemic damage induced with oxygen-glucose deprivation for 60 minutes.

OGD+MK801 ; group treated with 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ of MK-801 for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

OGD+PR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Puerariae Radix extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

OGD+SR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Salviae Miltiorrhizae Radix extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

OGD+RR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Rhei Rhizoma extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

OGD+BR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Bupleuri Radix extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

* ; statistical significance compared with OGD group (*, P<0.05; **, P<0.01).

Table 2. Effect of Herbs and MK-801 on TUNEL Positive Cells in CA1 and DG of Organotypic Hippocampal Slice Cultures with Oxygen-Glucose Deprivation (number)

Group	TUNEL positive cells	
	CA1	DG
OGD	28.1±4.1	14.9±1.6
OGD+MK801	9.8±3.2***	11.6±1.2
OGD+PR	15.7±2.3**	10.2±1.5*
OGD+SR	18.1±3.9*	12.1±1.1
OGD+RR	20.1±2.2*	14.1±1.2
OGD+BR	17.5±3.7*	13.3±1.0

Data presented mean ± standard error (n=12).

OGD ; group of ischemic damage induced with oxygen-glucose deprivation for 60 minutes.

OGD+MK801 ; group treated with 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ of MK-801 for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

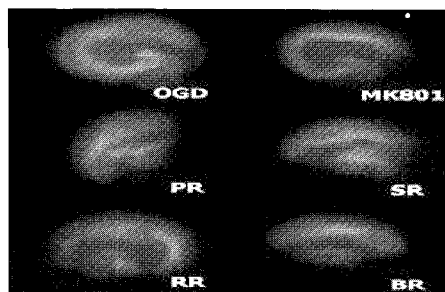
OGD+PR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Puerariae Radix extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

OGD+SR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Salviae Miltiorrhizae Radix extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

OGD+RR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Rhei Rhizoma extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

OGD+BR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Bupleuri Radix extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

* ; statistical significance compared with OGD group (*, P<0.05; **, P<0.01, ***, P<0.001).

**Fig. 2.** Propidium iodide-stained sections of organotypic hippocampal slice cultures. Red colored regions are cell death area stained with propidium iodide. Groups treated with MK-801, PR, SR, and BR after the OGD demonstrated significant decrease of cell death area % in CA1 and DG regions compared to the OGD group. But group treated with RR demonstrated significant decrease of cell death area % only in CA1 region.

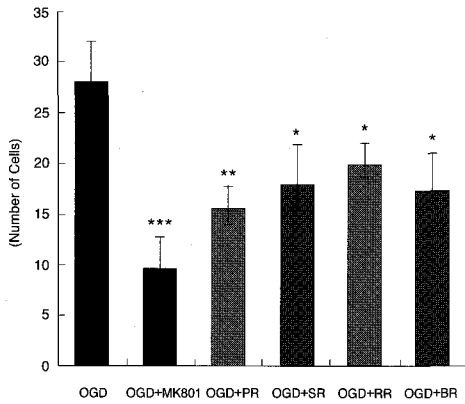


Fig. 3. Effect of herbs and MK-801 on TUNEL positive cells in CA1 of organotypic hippocampal slice cultures with oxygen-glucose deprivation.

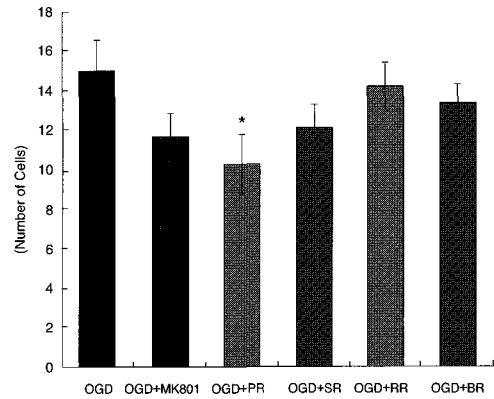


Fig. 4. Effect of herbs and MK-801 on TUNEL positive cells in DG of organotypic hippocampal slice cultures with oxygen-glucose deprivation.

Fig. 5

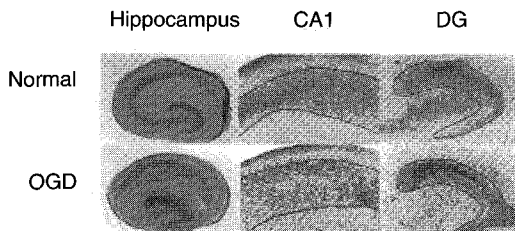


Fig. 5. TUNEL immuno-stained sections of organotypic hippocampal slice cultures. Dark brown colored spots are TUNEL positive cells. The OGD group demonstrates many spots in CA1 and DG regions because of oxygen-glucose deprivation.

Fig. 6

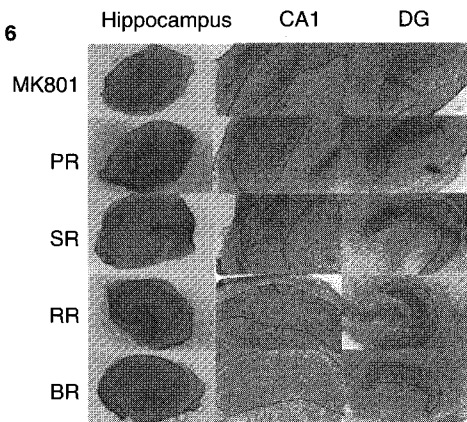


Fig. 6. TUNEL immuno-stained sections of organotypic hippocampal slice cultures in groups treated with MK-801 and herbs. In CA1, groups treated with MK-801, PR, SR, RR and BR after the OGD demonstrated significant decrease of TUNEL positive cells compared to the OGD group. In DG, group treated with PR alone demonstrated significant decrease of TUNEL positive cells.

Table 3. Effect of Herbs and MK-801 on LDH Levels in Culture Media of Organotypic Hippocampal Slice Cultures with Oxygen-Glucose Deprivation

Group	LDH levels (% of control)
OGD	118.1±26.3
OGD+MK801	51.6±8.2*
OGD+PR	56.6±19.1*
OGD+SR	69.2±15.2
OGD+RR	101.1±24.5
OGD+BR	81.5±9.8

Data presented mean ± standard error (n=12).

OGD ; group of ischemic damage induced with oxygen-glucose deprivation for 60 minutes.

OGD+MK801 ; group treated with 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ of MK-801 for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

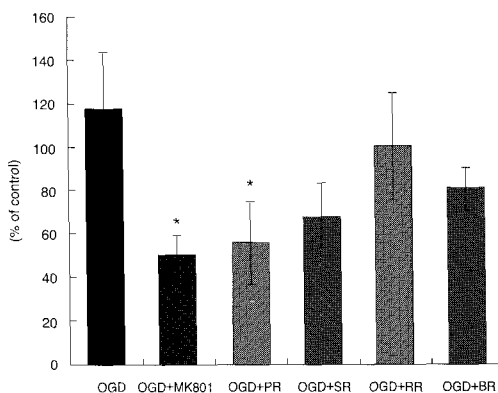
OGD+PR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Puerariae Radix extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

OGD+SR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Salviae Miltiorrhizae Radix extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

OGD+RR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Rhei Rhizoma extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

OGD+BR ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Bupleuri Radix extract for 48 hours after ischemic damage by oxygen-glucose deprivation.

* ; statistical significance compared with OGD group (*, $P<0.05$).

**Fig. 7.** Effect of herbs and MK-801 on LDH levels in culture media of organotypic hippocampal slice cultures with oxygen-glucose deprivation.

OGD 후 MK-801을 처리한 군과 丹蔘처리군, 大黃처리군 및 柴胡처리군은 각각 11.6 ± 1.2 개, 12.1 ± 1.1 개, 14.1 ± 1.2 개 및 13.3 ± 1.0 개로 모두 유의성 있는 감소가 관찰되지 않았으나, 葛根처리군에서는 10.2 ± 1.5 개로 OGD군에 비하여 $P<0.05$ 의 유의성 있는 감소가 관찰되어 MK-801 보다도 효과적이었다(Table 2, Fig. 4, 5, 6,).

3. 조직배양액내 LDH 농도에 미치는 영향

뇌해마 조직절편의 조직배양액내로 분비된 LDH 농도는 산소와 glucose 공급을 완전히 차단하여 허혈 손상을 유발한 OGD군에서는 $118.1 \pm 26.3\%$ 였으며, OGD 후 MK-801을 처리한 군에서는 $51.6 \pm 8.2\%$ 로 OGD군에 비하여 $P<0.05$ 의 유의성 있는 감소가 나타났다. OGD 후 葛根을 처리한 군 역시 $56.6 \pm 19.1\%$ 로 OGD군에 비하여 $P<0.05$ 의 유의성 있는 감소가 관찰되었다. 그러나 OGD 후 丹蔘처리군과 柴胡처리군에서는 각각 $69.2 \pm 15.2\%$ 와 $81.5 \pm 9.8\%$ 로 OGD군에 비하여 감소는 되었으나 유의성은 없었으며, 大黃처리군에서는 $101.1 \pm 24.5\%$ 로 OGD군과 비슷한 수준을 나타내었다(Table 3, Fig. 7).

IV. 考 察

뇌신경세포의 손상에 대하여 효과적인 치료약물을 개발하는데 어려운 점 중 하나가 뇌경색의 임상증상과 유사하고 약물효능을 정확히 측정할 수 있는 실험모형이 없다는 것이다⁴⁵. 중풍과 관련한 한약물의 효능 연구는 주로 동물실험 또는 세포배양실험이 대부분을 차지하고 있다. 본 연구에서는 장기양조직절편배양(organotypic slice culture)의 방법, 특히 뇌해마의 장기양조직절편배양(organotypic hippocampal slice culture; OHSC)이라는 연구방법을 사용하여 기존의 중풍연구에 이용되어 온 동물실험 및 세포배양실험의 단점들을 보완, 개선된 뇌허혈 연구모델을 소개하고자 하였다.

OHSC방법은 장기 상태에서 보유하고 있는 조직 구성이 유지되고 있다는 장점을 가지고 있으므로 살아있는 개체의 장기나 조직과 거의 같은 신경세포들

의 형태와 조직구성 상태에서 약물의 효능을 실험할 수 있다. 그러므로 OHSC방법은 신경세포간의 연결 회로에 대한 신경생리학적 또는 신경약리학적 특성을 밝히는 중요한 연구방법 중의 하나가 된다^{7,8}. 한약물의 효능 연구에 이러한 OHSC방법의 도입은 중풍에 대한 동물실험이 갖는 단점 즉, 실험조건을 표준화하기가 어렵고, 작용기전을 관찰하기 위하여 실험조건을 다양화하기가 어려우며, 한약물의 용량별 실험에 너무 많은 시간을 필요로 한다는 점 등을 보완할 수 있다. 동시에 신경세포의 배양실험에서 갖는 단점 즉, 단일세포주에 대한 실험이므로 명확한 효능을 관찰할 수는 있으나, 그 결과가 뇌의 조직, 장기 및 개체에 대해서도 같은 양상으로 관찰되지 않는 경우가 많다는 단점을 보완할 수도 있다. 그러므로 장기 또는 개체에 대하여 거시적이고 총체적인 작용에 의하여 그 효능이 발휘되는 한약물의 특성을 유의하게 반영할 수 있는 한 연구방법으로 생각된다.

OHSC방법을 사용하여 한약물의 뇌신경세포손상 보호효능을 관찰하기 위하여 선택한 한약물은 葛根(Puerariae Radix), 丹蔘(Salviae Miltiorrhizae Radix), 大黃(Rhei Rhizoma) 및 柴胡(Bupleuri Radix)이며, 비교약물로는 NMDA receptor 길항제로서 강력한 뇌신경세포손상 보호효능이 있다고 잘 알려진 MK-801을 사용하였다. 본 실험에서 산소와 glucose 공급을 차단하는 방법으로 허혈손상을 유발하고 MK-801의 효능을 관찰한바 신경세포사멸 면적 감소효과는 CA1 영역에서는 P<0.01, DG 영역에서는 P<0.05의 유의한 감소가 관찰되었으며, TUNEL 양성반응 신경세포 수는 CA1 영역에서는 P<0.001의 유의성 있는 감소가 관찰되었으나, DG 구역에서는 유의한 변화를 나타내지 못하였다. 조직배양액내 LDH 농도는 역시 P<0.05의 유의한 감소가 관찰되었다. 뇌해마의 DG 영역에서 유의한 결과가 관찰되지 않은 것은 MK-801이 작용하는 NMDA receptor의 분포가 CA1과 DG 영역에서 차이가 나기 때문으로 생각되며²¹, 전체적으로 MK-801에 대한 기존의 연구보고들과 일치하는 결과를 보여주었다^{9-11,21}.

葛根은 약리학적으로 alcohol 대사 및 alcohol로 인

한 간손상에 대한 연구들이 많이 수행되었다^{22,24}. 또한 葛根이 흰쥐 뇌해마에서 alcohol 손상으로 인한 c-Fos 발현을 유의하게 감소시키고, 신경세포의 분화를 증가시켰다는 보고가 있다^{25,26}. 이러한 연구 결과들은 葛根이 뇌허혈에 의한 뇌해마의 손상에 대하여도 유의한 효능을 나타낼 수 있음을 추측케 하는 보고들이며, 중대뇌동맥 폐쇄에 의하여 유발되는 뇌부종을 유의하게 감소시키고, glutamate에 의한 대뇌피질 신경세포의 손상에 대하여 보호효능이 있다는 보고^{27,28} 등도 있다.

본 실험에서 葛根처리군은 산소와 glucose 공급을 차단한 허혈손상의 OGD군에 비하여 신경세포사멸 면적 감소효과는 CA1 영역에서 P<0.01, DG 영역에서는 P<0.05의 유의한 감소가 관찰되었으며, TUNEL 양성반응 신경세포 수는 CA1 영역에서는 P<0.01의 유의성 있는 감소가 관찰되었고, DG 구역에서도 P<0.05의 유의한 감소가 관찰되었다. 조직배양액내 LDH 농도 역시 P<0.05의 유의한 감소가 관찰되었다. 이러한 결과는 비교약물인 MK-801의 효능과 비슷한 수준으로, 특히 MK-801은 효능을 보이지 못한 DG 영역의 TUNEL 양성반응 세포 수의 감소효과도 나타난 것으로 보아 葛根은 NMDA receptor 뿐만 아니라 보다 광범위하게 glutamate receptor에 작용하는 것으로 생각된다.

丹蔘은 심근허혈 및 심장 관상동맥 질환에 대한 효능^{29,30}은 물론 뇌허혈에 대한 다수의 연구로 발표되어 있다. 전뇌허혈에 대해서는 신경학적 결함 감소와 시간적 지연 효과 및 뇌부종 감소 등이 보고와^{31,32}, 뇌조직 손상에 직간접적으로 관여하는 monoamine성 신경전달물질의 부조화를 억제한다는 보고가 있다³³. 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈에 대해서는 丹蔘의 성분인 tanshinone IIA와 IIB가 유의하게 뇌경색 부피를 감소시키고, 신경학적 지표들을 유의하게 호전시켰다는 보고가 있다³⁴. 또한 뇌해마 신경세포에 무산소(anoxia) 손상을 가하였을 때 丹蔘 투여는 신경세포의 생존율을 증가시키고, 손상의 회복에 관련된 heat shock protein 70 발현을 증가시켰다고 하였다³⁵.

柴胡는 유해 nitric oxide 발생을 현저히 감소시키며, apoptosis를 억제함으로써 암세포증식을 억제하는 항종양 작용이 있다³⁶고 보고되어 있으나柴胡의 중추신경계에 대한 보고는 매우 드물다.柴胡의 약리 성분인 linoleic acid의 항경련 효능과, receptor binding 연구에 의하면 dopamine, serotonin 및 GABA receptor에 작용할 것이라는 연구보고가 있다³⁷.

본 실험 결과 丹蔘처리군과 柴胡처리군은 비슷한 경향의 뇌신경세포손상 보호효능을 나타내었다. 산소와 glucose 공급을 차단한 허혈손상의 OGD군에 비하여 두 군 모두 신경세포사멸 면적 감소효과는 CA1 영역에서 $P<0.05$, DG 영역에서도 $P<0.05$ 의 유의한 감소가 관찰되었으며, TUNEL 양성반응 신경세포 수는 CA1 영역에서는 $P<0.05$ 의 유의성 있는 감소가 관찰되었으나, DG 구역에서는 유의한 감소가 관찰되지 않았고, 조직배양액내 LDH 농도 역시 유의한 감소가 관찰되지 않았다. 丹蔘과 柴胡가 비슷한 경향의 뇌신경세포손상 보호효능을 나타낸 것에 대한 명확한 작용기전의 설명은 본 연구만으로는 충분하지 않으나, 본 실험 결과는 丹蔘과 柴胡에 대한 기존의 연구보고에서 설명하고 있는 작용 이외에 glutamate의 NMDA receptor에 대한 작용 가능성을 보여주는 것으로 생각된다.

大黃은 유해한 활성산소를 제거하는 superoxide dismutase의 활성을 증가시키고, 유해한 nitric oxide의 제거효능이 있어 항염증 작용 및 항산화 효능을 갖는다고 하였으며³⁸, endotoxin으로 유발된 어혈병태 모형에 대해서도 유의한 효과를 나타낸다고 하였다³⁹. 총경동맥과 추골동맥의 폐쇄에 의한 전뇌허혈의 동물실험에 대하여 신경세포 손상에 대한 방어효과가 있다고 보고된 바도 있다⁴⁰.

본 실험에서 大黃처리군은 산소와 glucose 공급을 차단한 허혈손상의 OGD군에 비하여 신경세포사멸 면적 감소효과와 TUNEL 양성반응 신경세포 수 모두 CA1 영역에서만 $P<0.05$ 의 유의성 있는 감소가 관찰되었으나, DG 구역에서는 유의한 감소가 관찰되지 않았고, 조직배양액내 LDH 농도 역시 유의한 감소가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 大黃이 일정한 뇌신

경세포손상 보호효능을 가지고 있음을 추측할 수는 있으나 기존의 in vivo 실험에서 관찰된 유의한 효과는 비교되는 결과이다. 따라서 大黃의 뇌신경세포손상 보호효능은 뇌신경세포에 직접적으로 작용하기 보다는 개체에 대한 전신적인 작용에 의하여 나타나는 효능으로 추측된다.

이상의 결과들을 종합하면 실험적 뇌허혈 손상에 대하여 葛根이 가장 우수한 뇌신경세포손상 보호효능을 나타내었으며, 丹蔘과 柴胡 역시 일정한 뇌신경세포손상 보호효능을 나타내었다. 大黃은 동물실험에서 관찰된 효능에는 미치지 못하는 미약한 효능을 나타낸 것으로 생각된다. 아울러 OHSC방법은 세포 수준 뿐 아니라 조직 수준에서 한약물의 치료효과를 객관적으로 증명할 수 있는 작용기전과 우수한 치료 효과가 있는 한약물의 기존 효능 검증 및 새로운 효능의 연구 개발에 타당성 있는 연구방법으로 활용될 수 있을 것이다.

V. 結 論

葛根, 丹蔘, 大黃, 柴胡 및 MK-801의 뇌신경세포손상 보호효능을 관찰하고, 한약물의 효능 검증은 물론 한약물의 일차효능 검증에 있어서 뇌해마조직의 장기양 조직배양 방법의 유효성을 실험하고자 산소와 glucose를 차단하는 방법으로 허혈손상을 유발하고, propidium iodide에 의하여 염색되는 신경세포사멸에 대한 효과, 신경세포의 자연사를 관찰하는 TUNEL 양성반응 세포 수에 대한 효과 및 조직배양액내 LDH 농도에 미치는 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 뇌해마조직의 허혈손상에 대한 MK-801의 신경세포사멸 면적 감소효과는 CA1과 DG 영역 모두에서 관찰되었으나, TUNEL 양성반응 신경세포 수의 감소효과는 CA1 영역에서만 관찰되었고, DG 구역에서는 유의한 변화를 나타내지 못하였다. 조직배양액내 LDH 농도는 유의하게 감소시켰다.

2. 뇌해마조직의 허혈손상에 대한 葛根치리군의 신경세포사멸 면적과 TUNEL 양성반응 신경세포 수의 감소효과는 CA1과 DG 영역 모두에서 관찰되었고, 조직배양액내 LDH 농도 역시 유의하게 감소시켜 MK-801과 비슷하거나 오히려 우수한 효과를 나타내었다.

3. 뇌해마조직의 허혈손상에 대한 丹蔘치리군과 柴胡치리군의 신경세포사멸 면적 감소효과는 CA1과 DG 영역 모두에서 관찰되었으나, TUNEL 양성반응 신경세포 수의 감소효과는 CA1 영역에서만 관찰되었고, DG 구역에서는 유의한 변화를 나타내지 못하였다. 또한 조직배양액내 LDH 농도 역시 유의하게 감소시키지 못하였다.

4. 뇌해마조직의 허혈손상에 대한 大黃치리군의 신경세포사멸 면적, TUNEL 양성반응 신경세포 수 모두 CA1 영역에서만 관찰되었고 DG 구역에서는 유의한 변화를 나타내지 못하였다. 또한 조직배양액내 LDH 농도 역시 유의하게 감소시키지 못하였다.

이상의 결과들로 보아 뇌해마조직의 장기양 조직배양 방법은 기존의 실험방법들이 가지고 있는 장점과 단점들을 보완하는, 한약물의 효능을 구체적으로 탐색하고 그 기전을 연구하는데 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

參 考 文 獻

1. Lipton P : Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Reviews*, 1999;79(4):1431-568.
2. Chauhan N, Zhao Z, Barber PA, Buchan AM : Lessons in experimental ischemia for clinical stroke medicine. *Current Opinion Neurol*, 2003;16:65-71.
3. DeGraba TJ, Pettigrew LC : Why do neuroprotective drugs work in animals but not in humans. *Neurol Clin*, 2000;18:475-93.
4. Wiebers DO, Adams Jr. HP, Whisnant JP : Animal models of stroke: are they relevant to human disease. *Stroke*, 1990;21:1-3.
5. Zivin JA, Grotta JC : Animal models of stroke: are they relevant to human disease. *Stroke*, 1990;21:981-3.
6. Xu GP, Dave KR, Vivero R, Schmidt-Kastner R, Sick TJ, Porez-Pinzon MA : Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res*, 2002;952:153-8.
7. Hsu SS, Newell DW, Tucker A, Malouf AT, Winn HR : Adenosinergic modulation of CA1 neuronal tolerance to glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neurosci Lett*, 1994;178:189-92.
8. Kristensen BW, Noraberg J, Zimmer J : Comparison of excitotoxic profiles of ATPA, AMPA, KA and NMDA in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res*, 2001;917:21-4.
9. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Kaps M, Bachmann G, Fisher M : Neuroprotective effects of MK-801 in different rat stroke models for permanent middle cerebral artery occlusion: adverse effects of hypothalamic damage and strategies for its avoidance. *Stroke*, 2003;34(9):2234-9.
10. Suzuki Y, Takagi Y, Nakamura R, Hashimoto K, Umemura K : Ability of NMDA and non-NMDA receptor antagonists to inhibit cerebral ischemic damage in aged rats. *Brain Res*, 2003;964(1):116-20.
11. Bertorelli R, Adami M, Di Santo E, Ghezzi P : MK 801 and dexamethasone reduce both tumor necrosis factor levels and infarct volume after focal cerebral ischemia in the rat brain. *Neurosci Lett*, 1998;246(1):41-4.
12. Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM : Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci*, 1997;20:471-7.
13. Noraberg J, Kristensen BW, Zimmer J : Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Protoc*, 1999;3:278-90.
14. Bonde C, Sarup A, Schousboe A, Gegelashvili G, Zimmer J, Noraberg J : Neurotoxic and neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor L-threo-beta-

- benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions. *Neurochem Int*, 2003;43(4-5):371-80.
15. Brana C, Benham C, Sundstrom L : A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. *Brain Res Protoc*, 2002;10:109-14.
 16. Monette R, Small DL, Mealing G, Morley P : A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Res Protoc*, 1998;2:99-108.
 17. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 1992;119:493-501.
 18. Hilton DA, Love S, Barber R : Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by in situ hybridization using digoxigenin-labeled poly(A) oligonucleotide probes to detect thymidine-rich DNA sequences. *J Histochem Cytochem*, 1997;45:13-20.
 19. Lobner D : Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis. *J Neurosci Methods*, 2000;96:147-52.
 20. Ahlemeyer B, Klumpp S, Kriegstein J : Release of cytochrome c into the extracellular space contributes to neuronal apoptosis induced by staurosporine. *Brain Res*, 2002;934:107-16.
 21. Zimmer J, Kristensen BW, Jakobsen B, Norberg J : Excitatory amino acid neurotoxicity and modulation of glutamate receptor expression in organotypic brain slice cultures. *Amino Acids*, 2000;19(1):7-21.
 22. Lee MK, Cho SY, Jang JY, Cho MS, Jeon SM, Jang MK, Kim MJ, Park YB : Effects of Puerariae Flos and Puerariae Radix extracts on antioxidant enzymes in ethanol-treated rats. *Am J Chin Med*, 2001;29(2):343-54.
 23. Keung WM : Anti-dipsotropic isoflavones: The potential therapeutic agents for alcohol dependence. *Med Res Rev*, 2003;23(6):669-96.
 24. Arai T, Udayama M, Kinjo J, Nohara T : Preventive effects of saponins from the Pueraria lobata root on in vitro immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures. *Planta Med*, 1998;64(5):413-6.
 25. Jang MH, Shin MC, Lee TH, Bahn GH, Shin HS, Lim S, Kim EH, Kim CJ : Effect of Puerariae radix on c-Fos expression in hippocampus of alcohol-intoxicated juvenile rats. *Biol Pharm Bull*, 2003;26(1):37-40.
 26. Jang MH, Shin MC, Chung JH, Shin HD, Kim Y, Kim EH, Kim CJ : Effects of Puerariae radix on cell proliferation and nitric oxide synthase expression in dentate gyrus of alcohol-intoxicated Sprague-Dawley rats. *Jpn J Pharmacol*, 2002;88(3):355-8.
 27. Wang L, Zhao A, Wang F, Chai Q, Chai X : Protective effect of puerarin on acute cerebral ischemia in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 1997;22(12):752-54.
 28. Dong LP, Wang TY : Effects of puerarin against glutamate excitotoxicity on cultured mouse cerebral cortical neurons. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1998;19(4):339-42.
 29. Zhou W, Ruigrok TJ : Protective effect of danshen during myocardial ischemia and reperfusion: an isolated rat heart study. *Am J Chin Med*, 1990;18(1-2):19-24.
 30. Chun-sheng L, Hsiao-meng Y, Yun-hsiang H, Chun P, Chifen S : Radix salviae miltiorrhizae and Rhizoma ligustici wallichii in coronary heart disease. *Chin Med J (Engl)*, 1978;4(1):43-6.
 31. Kuang P, Li Z, Zhang F, Tao Y, Liu J, Wu W : Protective effect of radix Salviae Miltiorrhizae Composita on cerebral ischemia. *J Tradit Chin Med*, 1995;15(2):135-40.
 32. Kuang P, Xiang J : Effect of radix salviae miltiorrhizae on EAA and IAA during cerebral ischemia in gerbils: a microdialysis study. *J Tradit Chin Med*, 1994;14(1):45-50.
 33. Cheng J, Kuang P, Wu W, Zhang F : Effects of transient forebrain ischemia and radix Salviae miltiorrhizae(RSM) on extracellular levels of monoamine neurotransmitters and metabolites in the gerbil striatum-an in vivo microdialysis study. *J Tradit Chin Med*, 1999;19(2):135-40.
 34. Lam BY, Lo AC, Sun X, Luo HW, Chung SK, Sucher NJ : Neuroprotective effects of tanshinones in transient focal cerebral ischemia in mice. *Phytomedicine*, 2003;10(4):286-91.
 35. Liu J, Kuang P, Wu W, Zhang F, Liu J, Wan F, Huang Y,

- Ding A : Radix Salviae miltiorrhizae protects rat hippocampal neuron in culture from anoxic damage. J Tradit Chin Med, 1998;18(1):49-54.
36. Kok LD, Wong CK, Leung KN, Tsang SF, Fung KP, Choy YM : Activation of the anti-tumor effector cells by Radix bupleuri. Immunopharmacology, 1995;30(1):79-87.
37. Liu Y, Wu H, Ge F : Chemical constituents analysis on anticonvulsive effect of three extracts from radix bupleuri. Zhong Yao Cai, 2002;25(9):635-37.
38. Tian J, Du H, Yang H, Liu X, Li Z : A clinical study on compound da huang (radix et rhizoma rhei) preparations for improvement od senile persons' memory ability. J Tradit Chin Med, 1997;17(3);168-73.
39. 김도완, 박창국 : 전탕시간에 따른 생대황(生大黃) 및 주대황(酒大黃)이 어혈병태모형에 미치는 영향. 대한한방내과학회지, 1998;19(1);114-33.
40. 안덕균, 원도희, 김종호 : 4-vessel occlusion으로 유발한 흰쥐 전뇌허혈의 신경세포 손상에 대한 대황의 방어 효과. 대한본초학회지, 1999;14(1);111-20.