

CoCl₂로 유도된 C6 신경교세포의 사멸에 대한 抑肝散의 보호 효과

조문영¹, 신용진¹, 하예진², 우 찬¹, 김태정¹, 유주연¹, 최용석¹, 최정훈³, 신선호¹
¹원광대학교 한의과대학 내과학교실, ²한국보건산업진흥원 한의약연구지원팀, ³함소아 한의원

Protective Effects of *Ukgan-san* in CoCl₂-induced Cell Death of C6 Glial Cells

Mun-young Cho¹, Yong-jeon Shin¹, Ye-jin Ha², Chan Woo¹, Ta-jung Kim¹
Ju-yeon You¹, Yong-seok Choi¹, Jung-hoon Choi³, Sun-ho Shin¹

¹Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Won-Kwang University

²Traditional Korean medicine research support team, Korea health industry development institute

³Hamsosa Oriental Medical Clinic

ABSTRACT

Objectives : In this study, we made an effort to investigate the protective mechanism of *Ukgan-san* (UGS) extracts on hypoxia-induced C6 glial cell death.

Methods : The cell viability was assessed by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay and cell morphological changes were analysed with microscope after staining with crystal violet (CV). Reactive oxygen species (ROS) formation was assessed by flow cytometer after staining with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). We also analyzed expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1α) and p53, processing of procaspase-3 and pro-cyclic acid repetitive protein (PARP) by western blot method.

Results : We estimated the elevated cell viability by UGS extract on CoCl₂-induced C6 glial cells. UGS attenuated CoCl₂-induced ROS formation in C6 glial cells and also showed a protective activity compared to antioxidants and exhibited abrogation of LDH-released by CoCl₂. UGS suppressed the typical apoptotic cell death markers, caspase-3 and PARP activation. UGS inhibited CoCl₂-induced HIF-1α expression which is known as a major regulator for hypoxia-induced cell death, and suppressed p53 expression.

Conclusions : These results suggest that UGS extract contains protective constituents for hypoxia-induced C6 glial cell death.

Key words : CoCl₂, C6 glial cell, protective effect, *Ukgan-san* (*Yigan-san*)

1. 서 론

抑肝散은 薛己의 《保嬰撮要》¹에 최초로 기록

되어 있는 처방으로 抽搦, 發熱咬牙, 嘔吐痰涎, 腹脹少食, 睡臥不安 등을 치료한다고 기재되어 있다. 이후 抑肝散은 주로 癇證, 神經症, 神經衰弱, 히스테리, 夜啼, 不眠症 등의 질환을 치료하는데 응용되어 왔으며²⁻⁴, 최근에는 손떨림 및 운동장애가 생기는 진행성 뇌질환으로 알려진 파킨슨병(Parkinson's disease)에 유효한 효과를 보인다는 임상 결과가 발표되었다⁵.

· 교신저자: 신선호 전북 전주시 덕진구 덕진동 2가 142-1번지
원광대학교 전주한방병원 심계내과학교실
TEL: 063-270-1013 FAX: 063-270-1594
E-mail: shshin@wonkwang.ac.kr

· 이 논문은 2012년도 원광대학교 일반대학원 한의학 석사학위
논문임.

Cobalt chloride(CoCl₂)는 배양세포에서 저산소 상태(hypoxic condition)를 유도하는 물질로, 배양 세포에서 활성산소종의 생성과 더불어 분자생물학적 변화를 일으키고 DNA 손상과 함께 세포사를 초래한다. 저산소증은 세포나 조직 내 산소 농도가 무산소증과 정상 수준 사이에 있는 대사 상태로, 뇌졸중 및 퇴행성 뇌질환의 신경손상을 관찰하고 그 치료법을 연구하는 과정에 있어 중요한 요소이다⁶. 뇌질환 치료를 위해 외과적 수술 및 줄기세포 치료나 항산화제의 이용 등 다양한 방법들이 제시되고 있지만, 그에 따르는 위험부담과 부작용 및 치료의 효율성 문제는 아직 극복해야 할 과제들이다. 신경손상은 신경계통의 특성상 회복이 어렵기 때문에 손상 후 치료보다는 손상을 보호할 수 있는 방법을 연구하는 것이 더욱 중요하다. 그러나 현재까지 신경계 질환에 있어서 저산소증의 영향과 저산소증으로 인한 신경손상을 개선할 수 있는 한의학적 치료법의 연구 보고는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 저산소증으로 인한 신경세포 손상에 대한 抑肝散의 보호 효과를 알아보기 위하여 CoCl₂로 유도된 C6 신경교세포의 세포 사멸에서 抑肝散을 전처리한 후 세포생존율의 변화, 세포의 형태학적 변화, 세포 내 활성산소종의 생성 및 관련 생화학적 분자들의 변화 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 제

본 실험에 사용된 抑肝散의 처방 내용은 《保嬰撮要》¹에 수록된 약재의 구성과 용량을 기준으로 하였다. 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였으며, 1貼의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Ukgan-san*.

Herbal name	Scientific name	Dosage (g)
當 歸	Radix Angelicae Sinens	4
白 朮	Rhizoma Atractylodis Macrocephalae	4
白茯苓	Poria	4
鈞鈎藤	Ramulus Uncariae Cum Uncis	4
川 芎	Rhizoma Chuanxiong	3
柴 胡	Radix Bupleuri	2
甘 草	Radix Glycyrrhizae	2
Total amount		23

抑肝散의 구성약물 중 하나인 鈞鈎藤의 탕전시간에 따라 抑肝散 A와 抑肝散 B로 구분하였다. 抑肝散 A는 모든 구성 약재를 동시에 탕전하여 사용하였고, 抑肝散 B는 久煎則無力 或 不宜久煎 한다고 알려진⁷ 鈞鈎藤을 제외한 구성 약재를 탕전한 후 鈞鈎藤을 後下하여 추출한 것을 사용하였다.

2) 시약 및 기기

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltertrazolium bromide(MTT)는 Sigma사(Sigma, MO, USA)에서, 분광광도계(ELISA 분석기)는 Molecular Devices 사(Molecular Devices Co., CA, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. 세포생존을 관찰은 Sigma사(Sigma, MO, USA)에서 구입한 CV(crystal violet)를 이용해 염색하여 시행하였다.

LDH 분석은 Roche사(Roche, Mannheim, Germany)로부터 구입한 kit를 이용하였고, 활성산소종의 정량 분석에는 DCF-DA(2',7'-dichloro fluorescein diacetate, Sigma, MO, USA)를 이용하였다.

3) 세포주

실험에 사용한 백서 C6 신경교세포주는 ATCC (American Type Cell Culture, VA, USA)에서 구입하였고, 세포 배양에 필요한 10% FBS와 DMEM/High Glucose는 Gibco사(Gibco, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 제조

抑肝散 A는 抑肝散 5 貼(총 115 g)을 증류수 1,000 ml와 함께 3,000 ml 환저 플라스크에 넣은 다음, 2시간 30분 가열하여 얻은 전탕액 419.3 ml를 여과지로 여과한 후 5,000 rpm으로 30분간 원심분리하고, 감압 농축기(rotary vacuum evaporator)에 넣어 감압 농축한 후 동결건조기로 완전히 건조하여 15.3567 g의 시료를 얻었으며, 튜브에 100 mg/ml 농도로 증류수에 녹여서 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리한 시료의 상층액을 0.2 µm filter에 통과시켜 멸균한 후 건조하여 냉장보관하면서 사용 시에는 진공 건조된 抑肝散 시료를 정제수에 용해하여 침전물을 제거한 후 10 mg/ml 저장용액과 50 mg/ml 저장용액에 조제하여 사용하였다. 抑肝散 B는 抑肝散의 구성 약재 중 鈞鉤藤을 제외한 약재를 2시간 15분간 가열한 후 鈞鉤藤을 後下하고 추가로 15분 간 가열하여 얻은 전탕액 232.7 ml를 抑肝散 A와 동일한 방법으로 동결 건조하여 11.2257 g의 시료를 얻어 실험에 사용하였다.

2) 세포 배양

백서 C6 신경교세포주는 ATCC사(American Type Cell Culture, VA, USA)에서 구입하였고 5% CO₂/95% air 배양기에서 열에 의해서 비활성된 10% FBS(Gibco, NY, USA)와 항생제가 포함된 DMEM/High Glucose (Gibco, NY, USA) 배양액으로 배양하여 실험 목적에 따라 사용하였다.

3) 세포 생존율 측정

저산소증은 다양한 세포의 성장에 영향을 주며 활성산소종을 생성시켜 세포사를 야기한다. 따라서 저산소증을 유도할 수 있는 CoCl₂를 이용하여 세포 실험을 수행하였다. C6 신경교세포를 24 well plate에 0.05×10⁶ cells/well 이 되도록 계대배양하고 12시간 후에 抑肝散(UGS) 및 CoCl₂를 농도별로 처리한 다음, CV(Sigma, MO, USA) 염색을 통해 세포 형태학적 분석을 수행하였고, 세포생존율은 MTT (Sigma, MO, USA) 분석방법을 이용하여 ELISA 분석기로 흡광도 570 nm에서 측정하였다. 50 µL의 MTT 반응용액(5 mg/ml MTT/PBS)을 각 실험군

에 250 µg/ml이 되도록 처리한 다음, 4시간 동안 배양하여 반응하지 않은 MTT 용액을 버리고 생존 세포에 의한 MTT 반응결과로 생성된 formazan을 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma, MO, USA)로 용해하여 세포생존율을 간접적으로 계산하였다.

4) LDH 방출 분석

CoCl₂에 의해 손상을 받은 실험군과 대조군에서 얻어진 배양 상층액을 모아 원침시켜 부유액을 LDH(lactate dehydrogenase) 분석에 이용하였다. LDH 분석은 Roche사(Roche, Mennheim, Germany)로부터 구입한 kit를 이용하였다. 각 실험군에서 얻어진 상층액 100 µl에 LDH 측정 반응 혼합액 100 µl를 혼합하여 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응은 빛을 차단한 상태로 진행하였으며, 반응 후 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., CA, USA)를 이용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 아래와 같은 식에 따라 활성도를 산출하였다. LDH 양은 전체 LDH 활성도에 대한 실험군에서의 LDH 활성도를 백분율(%)로 표시하였다.

세포독성(%) =

$$\frac{\text{실험군의 방출 LDH농도} - \text{대조군의 방출 LDH농도}}{\text{대조군의 총 LDH흡광도}} \times 100$$

5) 활성산소종 측정

CoCl₂는 C6 신경교세포에서 활성산소종을 생성하도록 유도하는 것으로 알려져 있고 이에 따라 세포사가 유도된다. 抑肝散에 의한 세포 보호 효과가 활성산소종의 생성억제에 기인하는지를 조사하기 위해 세포 내 활성산소종을 분석하였다. 활성산소종의 측정은 DCF-DA(2',7'-dichloro fluorescein diacetate, Sigma, MO, USA)를 이용하여 정량적 및 정성적 분석이 가능하다. 6 well plate에 C6 신경교세포를 계대배양하고 12시간 후에 CoCl₂와 抑肝散을 처리한 다음, 48시간 동안 배양하였다. 세포 내 축적된 활성산소종을 확인하기 위하여 혈청이 제외된 배지로 세포를 세척하고 100 µM DCF-DA로 30분 동안 세포를 염색한 후 유세포 분석기(Flow cytometer, BD, CA, USA) 혹은 형광현미경으로 활성산소종의 생성과 정량적 변화를 관찰하였다.

6) Western blot 분석

C6 신경교세포를 6 cm 배양용기에 계대배양하고 12시간 후에 抑肝散 및 $CoCl_2$ 를 처리한 다음, 단백질을 추출하기 위하여 세포를 PBS로 세척하고 RIPA lysis buffer로 용혈하는 방법으로 총 단백질을 얻었다. BSA(bovine serum albumin, Sigma, MO, USA)와 Bradford(Sigma, MO, USA)를 이용하여 총 단백질 양을 측정한다. 20~60 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 상에서 전기영동하여 분리하고 nitrocellulose(NC) membrane에 분리된 단백질을 흡착시켜 여러 1차 항체(HIF-1 α , p53, caspase-3, PARP1/2 및 β -actin; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)로 표지하였다. 다음으로 2차 항체로 다시 표지한 다음, 목적 단백질의 발현 정도를 ECL 용액(electrochemiluminescence solution, Roche, Mannheim, Germany)을 처리하여 분석하였다.

7) Caspase-3 activity 분석

세포 사멸 신호전달 과정에서 procaspase-3 단백질은 평상시 procaspase 형태로 존재하다가 자극시 활성화되면 active caspase의 형태로 분절되어 하위 단계의 단백질들의 분해에 관여한다. $CoCl_2$ 에 의해 유도되는 procaspase-3의 분절 및 PARP 단백질 발현을 western blot 방법으로 분석하였다. C6 신경교세포를 6 cm 배양용기에 배양한 후 48시간 동안 抑肝散 및 $CoCl_2$ 를 처리한 다음, 세포를 원침하여 RIPA buffer로 전체 단백질을 추출하고 western blot 방법을 수행하였다. Caspase-3 단백질의 활성분석은 caspase-3 activity assay kit(Roche, Mannheim, Germany)를 이용하였다. $CoCl_2$ 와 抑肝散이 처리된 실험군으로부터 세포를 모은 다음, 완충용액으로 용혈하여 단백질을 추출하고, 반응 용액과 혼합하여 실온에서 30분 동안 빛이 차단된 상태에서 반응시킨 후 형광을 측정하는 방법으로 분석하였다.

8) 통계처리

모든 실험은 3회 이상의 독립적인 실험의 결과이며, 통계처리는 Wilcoxon's signed rank test 방법

으로 처리하였고, *p*-value가 0.05 이하의 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 抑肝散 A와 B의 농도에 따른 C6 신경교세포의 세포생존율 변화

저산소증에 의한 신경세포의 손상을 분석하기에 앞서 연구하고자 하는 抑肝散 A와 B 자체의 세포독성 여부를 분석하였다. C6 신경교세포에 抑肝散 A와 B를 농도별(0~1,000 μ g/ml)로 처리한 다음, 48시간 후에 세포생존율을 조사하였다. Fig. 1에 나타난 것과 같이 抑肝散 A와 B는 분석한 모든 농도의 범위에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

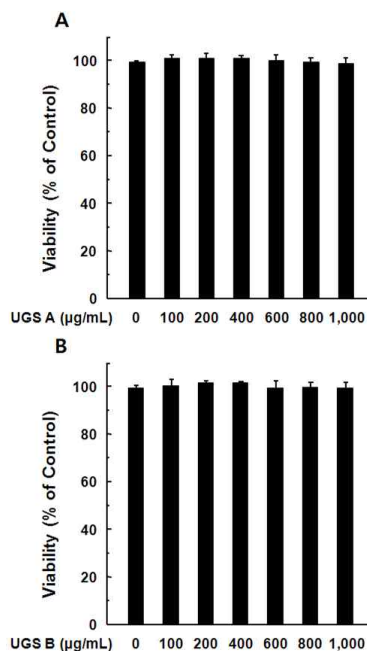


Fig. 1. Effect of UGS A and B on growth of C6 glial cells.

C6 glial cells were incubated for 48 hr with UGS A and B indicated concentrations. The cell viability was measured by MTT assay. Data represent the mean \pm S.E.M. of three individual experiments.

2. CoCl₂ 농도에 따른 C6 신경교세포의 세포생존율 변화

CoCl₂에 의한 세포사를 확인하기 위하여 농도별로(50~500 μM) CoCl₂를 C6 신경교세포에 처리한 다음, 48 시간 후에 세포생존율을 조사하였다. CoCl₂ 농도 의존적으로 C6 신경교세포의 세포생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 200 μM에서는 약 70%의 세포생존율을 보였고, 300 μM에서는 약 50%의 세포생존율을 보였다(Fig. 2A). 본 연구에서는 300 μM의 CoCl₂를 모든 분석에 사용하였다. 한편, CoCl₂에 의한 세포 형태학적 변화를 확인하기 위하여 CoCl₂를 처리하지 않은 대조군과 500 μM의 CoCl₂가 처리된 실험군의 세포형태를 비교한 결과, Fig. 2B에 나타난 것과 같이 CoCl₂가 처리된 실험군에서는 세포사가 진행되어 세포 밀도가 감소됨을 확인할 수 있었다.

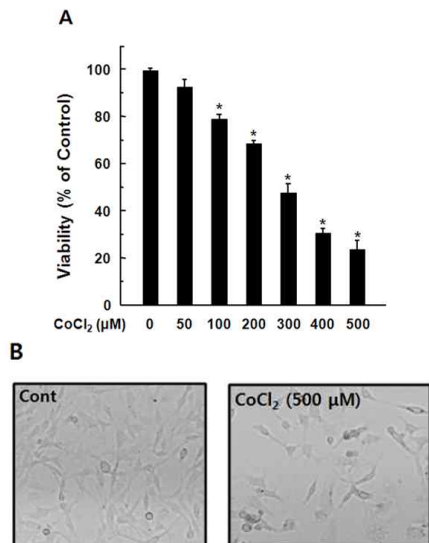


Fig. 2. CoCl₂-induced C6 glial cell death.

C6 glial cells were incubated for 48 hr with CoCl₂ at indicated concentrations (A). The cell viability was measured by MTT assay. Data represent the mean±S.E.M. of three individual experiments. **p*<0.05 by Wilcoxon's signed rank test compared with the control group. And morphological changes were taken by light microscope (B).

3. 抑肝散이 CoCl₂로 유도된 C6 신경교세포의 사멸에 미치는 영향

CoCl₂에 의해 유도된 C6 신경교세포의 사멸에 미치는 抑肝散 A와 B의 보호 효과를 조사하여 보았다. 抑肝散 A와 B를 농도별(100~800 μg/ml)로 2시간 전처리한 다음, 300 μM CoCl₂를 48시간 동안 처리한 후 세포생존율을 조사하였다. Fig. 3A에서 나타난 것과 같이 抑肝散 A는 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었고 100 μg/ml에서는 약 58%, 200 μg/ml에서는 약 72%, 400 μg/ml에서는 93% 이상의 세포 보호 효과를 확인할 수 있었다. 한편, 抑肝散 B의 세포 보호 효과를 분석하기 위하여 동일한 방법으로 抑肝散 B와 CoCl₂를 처리하고 48시간 후에 세포생존율을 조사하여 Fig. 3B에 나타내었다. 抑肝散 B 100 μg/ml에서 세포생존율은 약 57%, 200 μg/ml에서는 약 70%, 그리고 400 μg/ml에서는 91% 정도의 세포생존율을 보였다. 본 결과로부터 抑肝散 A는 B보다 세포 보호 효과가 경미하게 더 높은 것으로 보여지나 유의성은 없는 것으로 확인되었다. 따라서 이후 진행한 모든 실험에서 400 μg/ml의 抑肝散 A를 적용하였다. 또한 抑肝散 A와 B의 세포 보호 효과를 직접적으로 비교하여 Fig. 4에 나타내었다. 세포의 형태학적 변화를 확인하기 위하여 抑肝散 A와 CoCl₂ 처리 후 크리스탈바이올렛(CV, crystal violet) 염색을 수행하였으며, CoCl₂로 유도된 C6 신경교세포의 사멸이 抑肝散에 의해 보호되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B).

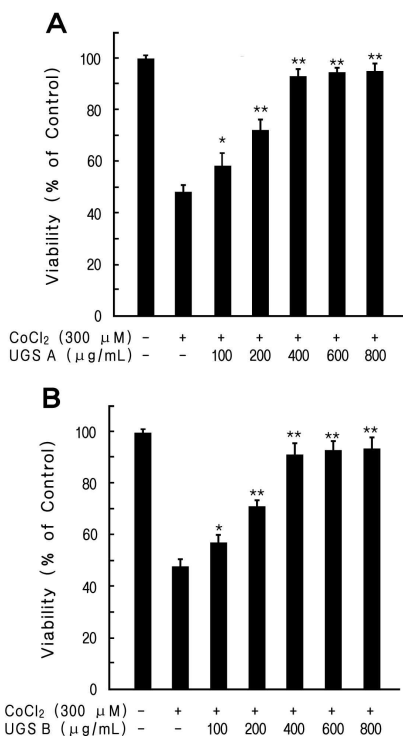


Fig. 3. Effect of UGS A and B on CoCl₂-treated C6 glial cells.

C6 glial cells were pretreated with UGS A and B for 2 hr and 300 µM CoCl₂ was treated for 48 hr. The cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean±S.E.M. of three individual experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01 by Wilcoxon's signed rank test compared with the control group.

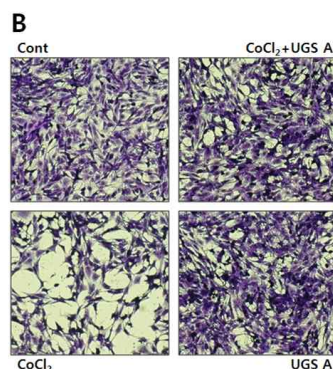
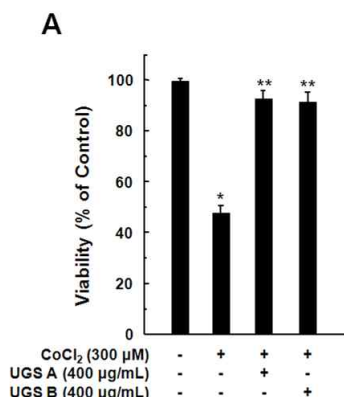


Fig. 4. Comparison of the protective effects of UGS A and B on CoCl₂-induced C6 glial cell death.

C6 glial cells were incubated with 400 µg/mL UGS A and B for 2 hr and CoCl₂ for 48 hr (A). The cell viability was measured by MTT assay. Data represent the mean±S.E.M. of three individual experiments (**p*<0.05, ***p*<0.01). Cell morphological changes were analyzed with light microscope after staining with CV (B).

4. 抑肝散이 CoCl₂로 유도된 C6 신경교세포에서 활성산소종의 생성에 미치는 영향

활성산소종은 저산소 조건에서 C6 신경교세포에 과량으로 생성되어 세포에 치명적인 영향을 미칠 수 있다⁶. CoCl₂는 C6 신경교세포에서 활성산소종을 생성하도록 유도하는 것으로 알려져 있고 이에 따라 세포사가 유도된다. 抑肝散에 의한 세포 보호 효과가 CoCl₂에 의한 C6 신경교세포의 활성산소종의 생성억제에 기인하는지를 조사하였다. DCF-DA를 염색과 유세포 분석기를 통하여 분석한 결과, Fig. 5A에 나타낸 것과 같이 CoCl₂는 C6 신경교세포에서 다량의 활성산소종 생성을 유도하고 抑肝散 A는 이러한 활성산소종 생성을 억제하는 것으로 확인할 수 있었다. 정량적인 비교를 위하여 활성산소종의 양을 DCF-DA peak shift로 나타내었다(Fig. 5B). CoCl₂에 의한 현저한 활성산소종 증가가 抑肝散에 의하여 억제됨을 관찰하였다.

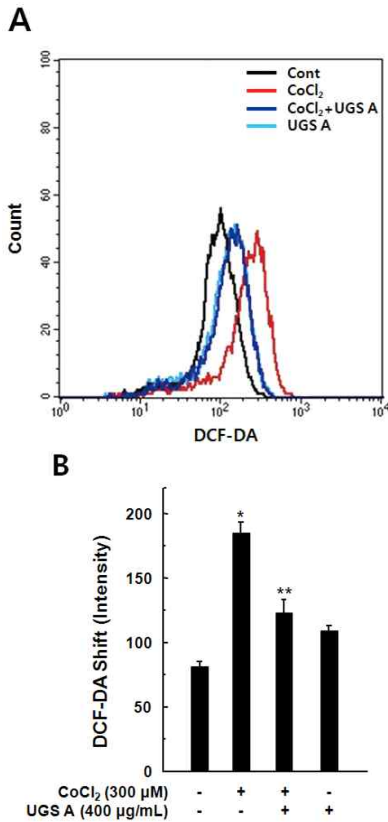


Fig. 5. Effect of UGS A on CoCl₂-induced ROS formation in C6 glial cells.

UGS A and CoCl₂ were incubated for 48 hr (A). ROS formation was assessed by flow cytometer after staining with DCF-DA. For the quantitative analysis, DCF-DA shifts were compared in B. Data represent the mean±S.E.M. of three individual experiments (**p*<0.05, ***p*<0.01).

5. CoCl₂로 유도된 C6 신경교세포 사멸에 대한 抑肝散과 항산화제의 보호 효과

호흡 과정에서 생성될 수 있는 소량의 활성산소종은 세포 내 자정작용, 즉 다양한 항산화물질(GSH, SOD 등)에 의해 제거될 수 있다. 따라서 CoCl₂에 의해 유도된 세포사가 항산화제 및 활성산소종 제거제(NAC, N-acetyl cystein)에 의해 조절될 수 있는지를 확인하고 그 효과를 抑肝散과 비교하였다. C6 신경교세포에 400 μg/ml 抑肝散과 10 mM NAC

(ROS scavenger) 및 10 mM GSH(glutathione)를 전처리하고 300 μm CoCl₂를 48시간 동안 처리한 다음, 세포생존율을 분석하였다. Fig. 6에 나타난 것과 같이 CoCl₂는 47% 정도의 세포생존율을 나타내었고, 抑肝散은 92%, NAC과 GSH는 90% 정도의 세포생존율을 나타내어 세포 사멸 억제 효과를 확인할 수 있었다.

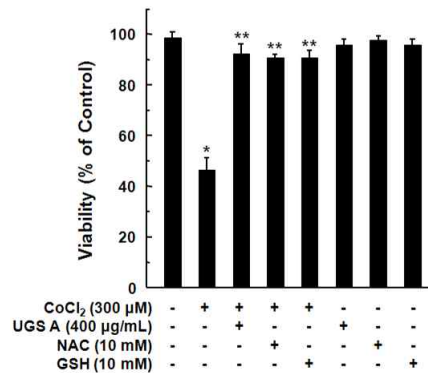


Fig. 6. Effects of antioxidants on CoCl₂-induced C6 glial cell death.

C6 glial cells were pretreated UGS A, NAC and GSH and then CoCl₂ was treated for 48 hr. Data represent the mean±S.E.M. of three individual experiments (**p*<0.05, ***p*<0.01).

6. 抑肝散이 CoCl₂로 유도된 LDH 방출에 미치는 영향

CoCl₂로 유도된 저산소증은 C6 신경교세포의 세포사를 유도할 뿐만 아니라 lactate dehydrogenase (LDH)의 방출을 야기하여 세포사에 이르게 된다. 따라서 CoCl₂에 의해 유도되는 LDH를 확인하고 抑肝散 처리시 CoCl₂에 의한 LDH 방출을 조절할 수 있는지를 조사하였다. C6 신경교세포를 CoCl₂로 48시간 동안 처리한 경우, 대조군 대비 약 200%의 방출량을 보였으나, 抑肝散 처리에 의하여 LDH 방출량이 대조군의 수준으로 조절되는 것을 확인하였다. 抑肝散 단독 처리군은 대조군과 유사한 수준을 보였다(Fig. 7).

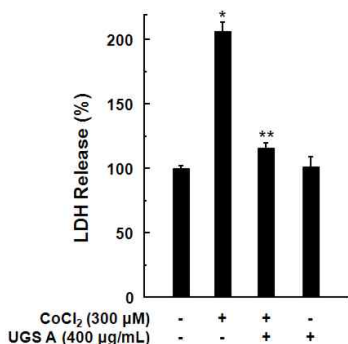


Fig. 7. Effect of UGS A on CoCl₂-induced LDH release from C6 glial cells.

C6 glial cells were pretreated with 400 μg/mL UGS A for 2 hr and then 300 μM CoCl₂ was treated for 48 hr. LDH was assessed from 100 uL culture media. Data represent the mean± S.E.M. of three individual experiments (**p*<0.05, ***p*<0.01).

7. 抑肝散이 CoCl₂로 유도된 C6 신경교세포에서 HIF-1α 및 p53 단백질 발현에 미치는 영향

Hypoxia-inducible factor-1(HIF-1) 단백질은 저산소증 조건에서 세포 내 발현이 증가되는 것으로 알려져 있으며, 조직이나 조건에 따라서 다양한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다⁸. 본 연구에서는 CoCl₂로 유도된 저산소증 조건에서 HIF-1α의 발현을 확인하였으며, 抑肝散이 그에 미치는 영향을 조사하였다. C6 신경교세포에 抑肝散 및 CoCl₂를 처리하고 48 시간 후에 총 단백질을 추출하여 HIF-1α 단백질 발현을 western blot 방법으로 조사하였다. Fig. 8에 나타낸 것과 같이 CoCl₂가 처리된 세포는 HIF-1α 단백질의 발현을 증대시켰으며, 抑肝散 처리시 이와 같은 발현이 현저하게 억제되는 것을 확인하였다. 한편 p53 단백질은 종양단백질로서 정상적인 조건에서는 MDM2(Murine double minute 2)와 결합해 있지만 세포가 손상을 받거나 저산소 상태에 노출되면 활성화되어 세포 사멸을 유도한다. 본 연구에서 CoCl₂에 의한 p53 단백질의 발현 변화와 抑肝散의 영향을 조사한 결과, C6 신경교세포에 CoCl₂를 48시간 동안 처리 후에 p53 단백

질의 발현 증가를 확인할 수 있었던 반면, 抑肝散이 함께 처리된 군에서는 대조군과 유사한 수준으로 CoCl₂에 의한 p53 단백질 발현이 조절되는 것을 확인할 수 있었고, 抑肝散 단독 처리군에서는 대조군과 유사한 수준으로 나타났다(Fig. 9).

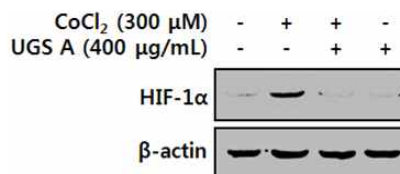


Fig. 8. Effect of UGS A on CoCl₂-induced expression of HIF-1α in C6 glial cells.

C6 glial cells were treated with UGS A and/or CoCl₂ for 48 hr. After stimulation cells were harvested and lysed with RIPA and analyzed with Western blot method.

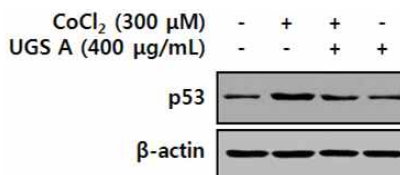


Fig. 9. Effect of UGS A on CoCl₂-induced expression of p53 in C6 glial cells.

C6 glial cells were treated with UGS A and/or CoCl₂ for 48 hr. After stimulation cells were harvested and lysed with RIPA and analyzed with Western blot method.

8. 抑肝散이 CoCl₂로 유도된 C6 신경교세포에서 caspase-3 및 PARP 단백질 발현에 미치는 영향
활성산소종에 의한 세포 사멸 과정에 있어서 pro-apoptotic 단백질인 procaspase-3의 processing 및 PARP 단백질의 분절은 전형적으로 나타나는 중요한 현상으로 알려져 있다⁹. 따라서 CoCl₂에 의해 유도되는 procaspase-3의 분절 및 PARP 단백질 발현을 분석하였다. Fig. 10에 나타난 것과 같이 CoCl₂ 처리군에서 단백질 분절에 의한 procaspase-3 단백질의 감소를 확인할 수 있었고, 抑肝散 처리에

의해 이러한 분절이 억제됨을 알 수 있었다. 抑肝散 단독 처리군은 대조군과 비슷한 수준의 발현을 보였다. Procaspase-3의 분절은 효소 활성 증가를 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 CoCl₂ 처리군 및 抑肝散이 처리된 군에서 procaspase-3 단백질의 감소로 인한 caspase-3 활성 증가가 유발되는지 분석하였다. Fig. 11에 나타난 것과 같이 CoCl₂는 caspase-3의 활성을 6배 정도 증가시켰으며, 抑肝散은 이러한 활성을 대조군과 유사하게 조절하는 것을 확인하였다. 한편 PARP 단백질 역시 동일한 116 kDa의 full length 단백질이 활성화되면서 89 kDa의 크기로 분절되는 것으로 알려져 있다. CoCl₂에 의해 유도된 PARP 분절이 抑肝散에 의해 조절되는지를 확인한 결과, Fig. 12에 나타난 것과 같이 CoCl₂는 PARP 분절을 유도하였으며, 이는 抑肝散 처리에 의해 현저하게 억제되었다.

Fig. 10. Effect of UGS A on CoCl₂-induced cleavage of procaspase-3 in C6 glial cells.

C6 glial cells were treated with UGS A and/or CoCl₂ for 48 hr. After stimulation cells were harvested and lysed with RIPA and analyzed with Western blot method.

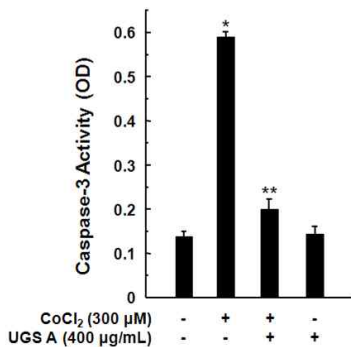


Fig. 11. Effect of UGS A on CoCl₂-induced caspase-3

enzyme activity in C6 glial cells.

C6 glial cells were treated with UGS A and/or CoCl₂ for 48 hr. After stimulation cells were harvested and analyzed for caspase-3 enzyme activity assay (**p*<0.05, ***p*<0.01).

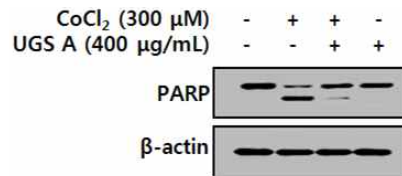


Fig. 12. Effect of UGS A on CoCl₂-induced expression of PARP in C6 glial cells.

C6 glial cells were treated with UGS A and/or CoCl₂ for 48 hr. After stimulation cells were harvested and lysed with RIPA and analyzed with Western blot method.

IV. 고찰

저산소증은 세포나 조직 내 산소 농도가 무산소증과 정상 수준 사이에 있는 대사 상태로 정의되며, 조직 내에 병적으로 낮은 산소 농도를 측정하는 것은 뇌졸중, 허혈성 심장질환 및 종양의 치료 방안이나 예후를 평가하는데 매우 중요한 의미를 갖는다. 한편 파킨슨질환, 알츠하이머질환, 헌팅턴 병과 같은 다양한 퇴행성 신경질환들은 주요한 노인성 치매의 원인으로 알려져 있으며, 이러한 질환들을 연구하는 과정에 있어 저산소증의 역할 규명이 중요할 것으로 보이며 신경질환의 발병에도 연관될 것으로 생각된다¹⁰⁻¹⁴.

저산소증은 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 증가해 세포 내 다양한 신호전달 과정을 활성화시켜 세포 사멸을 초래해 조직 및 인체에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 세포고사는 연관 유전자에 의해 조절되는 계획된 세포사(programmed cell death)로서 발생학, 생리학 및 병리학적으로 중요한 과정의 하나이다. 활성산소종은 세포 호흡 과정에서 세포 내 미토콘드리아나

세포막에서 필연적으로 생성되는 화학종으로 정상적인 항상성 유지 과정에서는 소량만이 생성되며 세포는 다양한 항산화제를 발현함으로써 이를 적절히 제거하게 된다. 그러나 세포 내외의 다양한 자극에 의하여 과량으로 생성된 활성산소종은 세포사에 영향을 미치며, 저산소증에 의한 세포손상은 허혈성 질환이나 조직 이식 과정 등에서 중요한 요인이 된다.

抑肝散은清代薛己의《保嬰撮要》¹에“治肝經虛熱 抽搐 或發熱咬牙 或驚悸寒熱 或木乘土而嘔吐痰涎 腹膨少食 睡臥不安”이라고 처음 수록된 이후癩證, 神經症, 神經衰弱, 히스테리, 夜啼, 不眠症 등을 치료하는데 응용되어 왔다^{2,3,15}. 抑肝散은 肝氣火旺에 의한 興奮을 抑制 鎮靜시킨다는 뜻에서 命名된 것으로, 疏肝火熱, 清熱鎮痙의 효능이 있어 肝經虛熱로 인한 질환들에 사용되어 왔으며¹⁶, 그동안 국내에 보고된 抑肝散의 효능에 관한 실험적 연구는 주로 항간질¹⁶ 및 진경, 진통 효과⁴에 초점을 맞춰왔다.

그러나 근래에는 박¹⁷이 抑肝散이 갑상샘 기능저하증에 미치는 영향에 대하여 실험적 연구 성과를 거두어 보고한 바 있으며, 정 등¹⁸이 뚜렛장애에 대한 유의한 치료 효과를, 또한 박 등¹⁹이 포클린진도에 대한 유의한 치료효과를 보고하여 다양한 방면에서의 응용 가능성을 보여주었다. 특히 최근 정⁵은 파킨슨병으로 인한 신경손상에 대한 抑肝散의 보호 효과를 발표하여 신경세포의 손상으로 인한 다양한 질환의 치료 및 예방에 기대되는 抑肝散의 가능성에 주목하게 하였다. 따라서 본 연구에서는 다양한 퇴행성 신경질환에서 중요한 역할을 하는 저산소증에 의한 세포사의 기전과 이에 관련된 생화학적 분자들의 작용을 究明하고, 이 과정에서 抑肝散의 신경세포 보호 효과를 밝히고자 본 연구를 시행하였다.

抑肝散의 구성 약제는 當歸, 白朮, 白茯苓, 鈞鈎藤, 川芎, 柴胡, 甘草로 구성되어 있으며, 當歸의 補血活血 調經止痛, 白朮의 補脾益氣 燥濕利水, 白茯

苓의 利水滲濕 健脾補中 寧心安神的 효능에 鈞鈎藤의 清熱平肝 熄風止癢 효과가 더해지고, 더불어 川芎의 活血行水 祛風止痛과 柴胡의 和解退熱 疏肝解鬱, 甘草의 緩急止痛 清熱解毒하는 작용이 더해져 疏肝火熱, 清熱鎮痙하는 효과를 내는 것으로 보여진다³. 그 중 특히 鈞鈎藤은 임상에서 고혈압과 중풍에 널리 사용되는 약재로서²⁰, 강²¹, 강²², 김²³, 이²⁴, 이²⁵, 이 등²⁶에 의해 뇌허혈에 대한 신경방어 효과, 중추신경계 손상회복에 미치는 영향 및 항치매 효과와 Alzheimer's disease 病態모델에 미치는 영향 등이 보고되어, 다양한 신경계 질환에 미치는 鈞鈎藤의 효능이 여러 차례 입증되었다.

鈞鈎藤의 주요 성분은 tetracyclic 또는 pentacyclic heteroyohimbine계, oxyndole계의 알칼로이드라고 보고되었으며²⁷, 박 등²⁸에 따르면 그 중 corynoxine, rhyncophylline, isocorynoxine, isorhyncophylline의 성분은 열을 가하는 시간을 19~23분으로 했을 때 추출되는 함량이 가장 높은 것으로 밝혀져, 鈞鈎藤은 久煎則無力 或 不宜久煎⁷ 한다고 알려진 것과 일관성이 있는 것으로 생각된다. 그러나 이러한 박²⁸ 등의 연구는 鈞鈎藤을 메탄올추출법으로 분석한 것으로, 일반적인 수침 탕전법으로 鈞鈎藤을 가열했을 경우에도 동일한 결과를 기대할 수 있는지에 대해서는 보다 구체적인 연구가 추가로 이루어져야 할 것으로 보인다. 또한 상기 성분들은 주로 鈞鈎藤의 혈압강하효과에 작용하는 성분들로, 저산소증에 의한 세포사에 대한 신경 보호 효과를 관찰하기 위한 본 연구에서는 鈞鈎藤을 가열한 시간과 신경 보호 효과 사이에는 유의한 차이가 없는 것으로 보여져(Fig. 3, 4), 鈞鈎藤이 가지고 있는 다양한 효능에 따른 적합한 탕전 시간에 관한 연구 또한 추가적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

본 실험에서는 저산소증으로 인한 C6 신경교세포의 세포사에서 抑肝散 추출물에 의한 세포 보호 효과 및 기전을 究明하고자 하였으며, 저산소증을 유도하기 위하여 cobalt chloride(CoCl₂)를 사용하였다. CoCl₂가 C6 신경교세포에 나타내는 세포독

성을 알아보기 위하여 농도별(50~500 μm)로 CoCl₂를 C6 신경교세포에 처리한 다음, 48시간 후에 MTT 방법으로 세포생존율을 조사한 결과, CoCl₂ 농도의존적으로 C6 신경교세포의 세포생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 300 μM에서 약 50%의 세포생존율을 보였다(Fig. 2A). CoCl₂는 세포 모델에서 저산소증을 유도하는 화학종으로 알려져 있으며, 다양한 종류의 모델 시스템, 골격근 세포(L6C5, C2C12), 신경세포(PC12, Neuro2A, C6 glial cell), 신장 및 간세포에서 저산소증에 의한 활성산소종의 역할 등에 관한 연구들에 사용되었다^{6,8,29-32}. 또한 CoCl₂에 의한 세포사멸에 대한 抑肝散 추출물의 보호 효과를 조사하기 위하여 抑肝散 A와 B를 농도별로(100~800 μg/ml)로 처리한 후 세포생존율을 조사한 결과, 抑肝散 A와 B 모두에서 농도의존적으로 세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 鈞鈎藤의 탕전 시간을 달리한 抑肝散 A와 B에서 각각 관찰된 세포 보호 효과를 비교한 결과에서는 抑肝散 A가 B보다 약간 더 높은 세포생존율을 보였으나 유의성 있는 차이는 아닌 것으로 나타나, 본 연구에서는 鈞鈎藤을 가열한 시간과 抑肝散의 신경 보호 효과의 유의한 상관성은 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

저산소증은 생리적 및 병리적 상태에서 쉽게 발생할 수 있으며, 다양한 신경질환의 유도 과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 정상적인 세포들은 호흡 과정 동안 다양한 활성산소종(O₂⁻, H₂O₂, OH⁻)을 내지만 이는 세포 자체가 가지고 있는 항산화 시스템(GSH, SOD, catalase)에 의해 조절된다. 그러나 저산소 환경이나 다양한 자극에 의해 과량의 활성산소종이 발현되었을 경우에는 활성산소종이 세포 자체에 해로운 신호전달의 시발점이 되어 이는 결국 세포 사멸로 이어지게 되고, 분자생물학적 변화와 세포손상을 일으킨다. 과량의 활성산소종은 세포막의 인지질을 자극하여 지질 과산화(lipid peroxidation)반응을 유도하여 세포막을 파괴하는 한편, DNA 손상을 유도하고, 저산소 상태에서 선

택적으로 발현되는 HIF-1α 단백질의 발현과 기능 상승을 일으킨다. HIF-1α 또한 전사인자로서 또 다른 다양한 유전자 발현을 유도하게 된다.

CoCl₂는 C6 신경교세포에서 활성산소종을 생성하도록 유도하여 세포사를 일으킨다. 抑肝散에 의한 세포 보호 효과가 활성산소종의 생성 억제에 기인하는지를 조사하고자 C6 신경교세포에 CoCl₂와 抑肝散을 처리하여 관찰한 결과, CoCl₂에 의한 현저한 활성산소종 증가가 抑肝散에 의하여 억제됨을 관찰하였다. 따라서 抑肝散은 저산소증에 의한 C6 신경교세포의 활성산소종 생성 억제효과를 나타내는 것으로 생각된다(Fig. 5). 한편 NAC 및 환원형의 GSH는 Thiol 유도체로서 활성산소종을 제거하는 기능이 있다고 알려져 있는 항산화물질이다. 抑肝散에 의한 세포 보호 효과가 과량으로 생성되는 활성산소종을 억제하는 방법으로 C6 신경교세포를 보호하는지를 확인한 바, 抑肝散 처리군에서 NAC나 GSH를 처리한 군과 유사한 세포 보호 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이러한 결과는 CoCl₂로 유도된 세포독성에 대한 抑肝散의 보호 효과가 활성산소종의 억제와 관련이 있음을 시사한다.

또한 CoCl₂로 유도된 저산소증은 C6 신경교세포의 세포사를 유도할 뿐만 아니라 lactate dehydrogenase (LDH)의 방출을 야기하여 세포사에 이르는 것으로 알려져 있어, 抑肝散을 전처리한 후의 CoCl₂에 의한 LDH 방출량을 관찰한 결과, CoCl₂에 의해 약 200% 정도 늘어난 LDH 방출량이 抑肝散 처리에 의해 대조군의 수준으로 조절되는 것을 확인하였다(Fig. 7).

세포가 이용 가능한 산소의 양이 감소되는 저산소증임을 인지한 경우, 이러한 조건을 견뎌내고 생존하기 위하여 세포는 적응반응을 가동하게 된다. 하지만 이러한 저산소 조건이 지속되거나 그 정도가 매우 극심한 경우, 세포는 사멸하게 된다. HIF-1 및 p53 단백질은 본래 세포 스트레스를 인지하고 극복하는 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으나, 과도

한 스트레스 조건이나 post translational modification 등에 의해서 세포사를 유도할 수 있다. 여러 연구에서 저산소증이 세포 내 활성산소종의 증가를 유도하고 HIF-1 및 p53 단백질 발현을 증가시키는 것으로 보고하였다^{6,30-32}. 본 연구에서도 CoCl₂로 유도된 C6 신경교세포에서 HIF-1α 단백질의 발현이 증가되는 것으로 확인되었으며, 抑肝散이 그에 미치는 영향을 조사하기 위하여 C6 신경교세포에 抑肝散 및 CoCl₂를 처리하고 48시간 후에 총 단백질을 추출하여 HIF-1α 단백질 발현을 조사한 결과, CoCl₂가 처리된 세포에서는 HIF-1α 단백질의 발현을 증가시켰으나, 抑肝散 처리시 이와 같은 단백질 발현이 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

p53 단백질의 전사는 세포가 저산소 조건에 있을 때 HIF-1에 의해 활성화되어 세포 사멸을 유도하는 물질로 알려져 있다³³. CoCl₂에 의해 유도된 p53 단백질의 발현을 확인한 바 C6 신경교세포에 CoCl₂를 48시간 동안 처리한 후 p53 단백질의 발현 증가를 확인할 수 있었으며, 抑肝散이 처리된 군에서는 대조군과 유사한 수준의 단백 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 9). 이상의 결과로부터 抑肝散은 CoCl₂에 의한 p53 단백질의 발현을 억제할 수 있는 것으로 보여진다.

한편, 세포사의 과정에서 나타나는 생화학적 변화에는 다양한 단백질들이 복잡한 네트워크를 형성하여 관여하고 있다. Pro-apoptotic 단백질인 procaspase-3의 processing 및 PARP 단백질의 분절은 활성산소종에 의한 세포 사멸 과정에 있어 전형적으로 나타나는 현상으로, 내적 혹은 외적 자극에 따라 발생된 세포 사멸 신호전달 경로가 진행되는 과정에서 관찰되는 대표적인 과정으로 알려져 있다³⁴. 본 실험에서 procaspase-3의 분절과 PARP 단백질의 발현 변화를 조사한 결과, CoCl₂는 C6 신경교세포에 작용하여 procsapase-3의 분절을 유도하였으며, 이는 抑肝散 처리에 의해 억제됨을 확인하였다. Procsapase-3 단백질의 감소는 caspase-3

활성 증가를 유발하여 caspase-3의 활성을 6배 정도 증대시켰으며, 抑肝散은 이러한 활성을 대조군과 유사한 수준으로 조절하였다(Fig. 10, 11). PARP 단백질 역시 CoCl₂에 의해 PARP 분절이 유도되었으며 이는 抑肝散 처리에 의해 현저하게 억제되었다(Fig. 12).

이상의 결과들을 보면, 抑肝散은 CoCl₂로 유도된 저산소증으로 인한 C6 신경교세포의 사멸을 억제하였으며, 활성산소종의 생성을 억제하여 CoCl₂에 의해 유발된 산화적 손상에 대해 보호 효과를 나타내었고, C6 신경교세포 사멸 과정에서 활성화되는 다양한 물질들을 조절하였다. 이러한 抑肝散의 세포 보호 효과는 뇌졸중 및 다양한 퇴행성 뇌질환을 치료하는 데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

抑肝散이 저산소 조건에서 유도된 C6 신경교세포 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CoCl₂로 C6 신경교세포의 세포 사멸을 유도한 다음, 抑肝散을 처리하여 세포 사멸 과정에서 보이는 활성산소종의 생성, LDH의 방출 및 관련 단백질의 발현 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CoCl₂는 농도 의존적으로 C6 신경교세포의 사멸을 유의하게 유도하였다.
2. 抑肝散 추출물 抑肝散 A와 抑肝散 B는 농도 의존적으로 CoCl₂에 의해 유도된 C6 신경교세포의 사멸을 유의하게 억제하였다.
3. 抑肝散 추출물 중 抑肝散 A에서 抑肝散 B보다 경미하게 높은 세포보호 효과를 나타내었으나, 유의성은 없었다.
4. 抑肝散 A는 C6 신경교세포에서 CoCl₂에 의해 유도된 활성산소종의 생성을 유의하게 억제하였다.

5. 抑肝散 A는 C6 신경교세포에서 CoCl₂에 의해 유도된 LDH 방출을 유의하게 억제하였다.
6. 抑肝散 A는 CoCl₂에 의해 유도된 HIF-1α 및 p53의 발현을 억제하였다.
7. 抑肝散 A는 C6 신경교세포에서 CoCl₂에 의해 유도된 caspase-3 활성을 유의하게 억제하였으며, PARP 분절을 억제하였다.

이상의 결과로부터 抑肝散 추출물은 C6 신경교세포 보호 효과는 활성산소종 생성 억제, HIF-1α 및 p53 단백질의 발현 조절과 caspase-3 단백질의 활성 억제 및 PARP 분절을 조절하는 경로를 통하여 저산소증으로 유도된 세포 사멸에 대한 보호 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 원광대학교 교내 학술연구비 지원을 받아 수행하였음.

참고문헌

1. 薛己. 薛氏保嬰撮要 圖書集成醫部全錄(卷四百二十九). 서울: 醫聖堂; 1993, p. 87.
2. 失數道明. 漢方處方解說. 서울: 東洋綜合通信教育院出版部; 1982, p. 596-9.
3. 丁圭萬. 東醫小兒科學. 서울: 杏林出版社; 1990, p. 695.
4. 玄禹天, 李相龍. 抑肝散과 抑肝散加味方の 鎮痙 및 鎮痛 效果에 關한 實驗的 研究. 동의신경정신과학회지 1994;5(1):69-79.
5. 정재한. Neuroprotective Effects of Uk-Gan San on the Parkinson's disease model. 학위논문(박사). 경희대학교 대학원; 2011.
6. Chen JX, Zhao T, Huang DX. Protective effects of edaravone against cobalt chloride-induced

- apoptosis in PC12 cells. *Neurosci Bull* 2009; 25(2):67-74.
7. 이성우 노승현. 鈞鈎藤에 關한 文獻的 研究. 대한초학회지 1987;2(1):53-8.
8. BelAiba RS, Djordjevic T, Bonello S, Flugel D, Hess J, Kietzmann T, et al. Redox-sensitive regulation of the HIF pathway under non-hypoxic conditions in pulmonary artery smooth muscle cells. *Biol Chem* 2004;385(3-4):249-57.
9. Go HS, Seo JE, Kim KC, Han SM, Kim P, Kang YS, et al. Valproic acid inhibits neural progenitor cell death by activation of NF-κB signaling pathway and up-regulation of Bcl-XL. *J Biomed Sci* 2011;18(1):48.
10. Carvalho C, Correia SC, Santos RX, Cardoso S, Moreira PI, Clark TA, et al. Role of mitochondrial-mediated signaling pathways in Alzheimer disease and hypoxia. *J Bioenerg Biomembr* 2009;41(5):433-40.
11. Pandey AK, Patnaik R, Muresanu DF, Sharma A, Sharma HS. Quercetin in hypoxia-induced oxidative stress: novel target for neuroprotection. *Int Rev Neurobiol* 2012;102:107-46.
12. Peers C, Dallas ML, Boycott HE, Scragg JL, Pearson HA, Boyle JP. Hypoxia and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1177:169-77.
13. Stanimirovic D, Friedman A. Pathophysiology of the neurovascular unit : disease cause or consequence? *J cereb Blood Flow Metab* 2012; 32(7):1207-21.
14. Zhang X, Le W. Pathological role of hypoxia in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2010;223(2):299-303.
15. 江克明 外. 簡明方劑辭典. 上海: 上海科學技術出版社; 1990, p. 521.
16. 金庚錫, 成疆慶, 文炳淳. 抑肝散의 抗痙疾性 效果에 對한 實驗的 研究. 대한한방내과학회지

- 1998;19(1):57-72.
17. 박규열. 억간산이 PTU (6-n-propyl-2-thiouracil)로 유발된 Rat 갑상샘 기능저하증에 미치는 영향. 학위논문(박사). 대구한의대학교 대학원; 2011.
 18. 정효창, 성우용, 이승현, 손지형, 한승혜. 뚜렛장애(Tourett's disorder) 환자(患者) 1례(例)에 대한 증례보고(症例報告). 동의신경정신과학회지 2003;14(2):213-8.
 19. 박민철, 홍승욱. 억간산가미방(抑肝散加味方) 투여(投與)와 구치료(灸治療)를 위주로 한 포륜진도(胞輪振跳) 치험2례(治驗2例). 한방안이비인후피부과학회지 2007;20(3):236-42.
 20. 辛民敎. 臨床本草學. 서울: 永林社; 2002. p. 172, 236, 649, 179, 354, 625, 530.
 21. 강상렬, 강승준, 금현수, 전연이, 이은주, 박치상, 등. 鈞鈎藤이 뇌허혈을 유발시킨 백서에서의 뇌신경보호효과. 대한한의학회지 2002;23(1):1-10.
 22. 강형원, 김상태, 류영수. pCT105로 원격 유도된 PC12 세포에서 조구등으로부터 분리한 corynoxine의 항치매 효과. 동의생리병리학회지 2004;18(4):1111-9.
 23. 김형수, 이용숙, 오석규, 이강창, 이건목, 이 정, 등. 조구등이 Glucose Oxidase로 손상된 대뇌신경세포에 미치는 효과. 동의생리병리학회지 2002;16(5):1016-9.
 24. 이은주, 박치상, 박창국. 鈞鈎藤이 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 病態모델에 미치는 영향. 대한본초학회지 2003;18(2):157-67.
 25. 이인환, 임강현, 이종석, 석경호, 안덕균, 박호균, 등. 조구등(鈞鈎藤)의 4-VO로 유발한 흰쥐 뇌허혈에 대한 신경방어효과. 대한본초학회지 1999;14(2):97-103.
 26. 이진구, 박형진, 김동웅, 송봉근. 중추신경계 손상 회복에 미치는 조구등의 영향. 대한약침학회지 2009;12(1):67-76.
 27. 박만기, 김종문, 황귀서. 조구등의 성분. 대한약학회지 1996;40(1):36-40.
 28. 박만기, 박정이, 김종문, 한상범, 한방희, 강종성. 조구등 중의 알칼로이드 분석. *Anal Sci Technol* 1993;6(4):395-9.
 29. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome a review. *Cardiovasc Surg* 2002;10(6):620-30.
 30. Stenger C, Naves T, Verdier M, Ratinaud MH. The cell death response to the ROS inducer, cobalt chloride, in neuroblastoma cell lines according to p53 status. *Int J Oncol* 2011;39(3):601-9.
 31. Xiao L, Lan A, Mo L, Xu W, Jiang N, Hu F, et al. Hydrogen sulfide protects PC12 cells against reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated downregulation of glutamate transporter-1 expression induced by chemical hypoxia. *Int J Mol Med* 2012;30(5):1126-32.
 32. Yang Z, Yang C, Xiao L, Liao X, Lan A, Wang X, et al. Novel insights into the role of HSP90 in cytoprotection of H2S against chemical hypoxia-induced injury in H9c2 cardiac myocytes. *Int J Mol Med* 2011;28(3):397-403.
 33. Sermeus A, Michiels C. Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death Disease* 2011;2:e164.
 34. Dawson VL, Dawson TM. Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 2004;36(4):287-94.