

木香 및 麝香이 저산소증 유발 배양 대뇌신경세포에 미치는 영향

사

류도균, 정승현, 신길조, 이원철, 문일수*

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 해부학교실*

The Effect of Aucklandiae Radix · Moschus(木香 · 麝香)'s for Delayed Neuronal Death in Hypoxia

Do-Kyun Ryu, Sung-Hyun Jeong, Gil-Cho Shin, Won-Chu Lee, Il-Su Moon*

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

Objectives : The purpose of this investigation is to evaluate the effects of Aucklandiae Radix · Moschus(木香 · 麝香) and to study the mechanism for neuronal death protection in hypoxia with Embryonic day 20 (E20) cortical cells of a rat (Sprague Dawley).

Methods : E20 cortical cells used in this investigation were dissociated in Neurobasal media and grown for 14 days in vitro (DIV). On 14 DIV, Aucklandiae Radix · Moschus(木香 · 麝香) was added to the culture media for 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock and further incubated in normoxia for another three days. On 20 DIV, Moschus(麝香)'s effects for neuronal death protection were evaluated by LDH assay and the mechanisms were studied by Bcl-2, Bak, Bax, caspase family.

Results : This study indicate that Aucklandiae Radix(木香)'s effects for neuronal death protection in normoxia and Scutellariae Radix(麝香)'s effects for neuronal death protection in hypoxia were confirmed by LDH assay in culture method of Embryonic day 20(E20) cortical neuroblast.

Moschus(麝香)'s mechanism for neuronal death protection in hypoxia is to increase the anti-apoptosis protein Bcl-2.

Conclusions : It may be reasonable to propose that Moschus(麝香) protects delayed neuronal death in hypoxia by increasing Bcl-2, thereby reducing mitochondrial permeability transition (PT) pores, the cytochrome c channels.

Key Words: Radix, Moschus, Hypoxia, Bcl-2

1. 緒 論

뇌허혈 발생 부위의 신경세포는 뇌혈류의 감소로 인하여 수분이 경과한 후에는 비가역적 손상을 입게 되나, 뇌허혈 주변(penumbra region)의 신경세포는 경

미한 대사 장애만 있다가 일정시간이 경과한 후에 지연성 신경세포사 발생한다. 최근의 연구에 따르면 이러한 신경세포의 죽음을 초래하는 기전은 치료될 수 없는 것이 아니고 혈류를 회복시키거나 세포 내로 칼슘 유입을 막는 등, 초기 처치를 통해 신경세포를 죽음으로부터 예방할 수 있는 가능성이 제시되고 있다.

Apoptosis는 세포사의 독특한 형태로 특징적인 염색질 응집과 DNA 단절을 보이는데, 생리적으로는

· 접수 : 2003년 4월 22일 · 채택 : 2003년 6월 15일
· 교신저자 : 류도균, 서울시 은평구 진관외동 175-75
(Tel: 02-387-4298, E-mail: janus54@hanmail.net)

발생, 면역반응, 조직 성장 등에 관여하며 병적 자극에 의해 주로 유발된다. Apoptosis의 발생기전은 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.

木香은〈神農本草經〉에서 逐諸壅氣上衝하는 三焦氣分之藥으로 升降諸氣, 調諸氣, 散滯氣, 泄肺氣, 寬胸腹 散肺痰하여 주로 氣滯症狀에 활용되는데, 星香散, 星香正氣散 등 중풍 치료 처방 중 주요 구성약물로서, 鎮痙作用과 혈압 강하 작용이 있음이 보고되었다⁶.

麝香은 通諸竅 · 開經絡 · 透肌骨 등의 效能이 있어, 中風 · 中氣 · 中惡 · 痰厥 등을 치료하는 대표적인 開竅藥物로서, 中風昏倒 · 人事不省 등에 救急蘇生の 목적으로 널리 사용되고 있다. 麝香에 대한 실험적 연구로는 李 등의 뇌기능 손상 보호작용에 대한 보고가 있다.

이에 著者は 中風에 다용되는 木香과 麝香이 신경세포 손상에 보호작용이 있을 것으로 생각하여 본 실험약물로 선택하고, 신경세포사에 미치는 영향과 그 작용기전 알아보기 위하여 배양한 E20의 Sprague-Dawley계 흰쥐 대뇌 피질 신경세포를 이용하여 배양 14일에 木香, 麝香으로 3일간 약재 처리한 후 배양 17일에 저산소증을 유발하고 배양 20일에 신경세

포의 변화를 관찰 및 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

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

2) 약재

실험에 사용된 木香(*Aucklandia lappa* DECNE), 麝香(*Moschus moschiferus* Linne)는 대한약전 및 대한약전의 한약 규격주해⁹에 근거하여 동국대학교 경주한방병원에서 구입하였다.

3) 약제의 물추출액 제조

麝香 56.818mg과 木香 85mg을 각각 12.5ml의 증류수에 넣어 균질화하고 상온에서 4시간, 4℃에서 18시간 혼든 후, 이를 15,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45µm)한 후 소량씩 분주하여 -20℃에 보관하였다. 건조물의 양은 1ml 추출액 3 튜브를 동결 건조한 후 평균치를 사용하였다.

4) 항체

본 연구에 사용한 항체를 Table 1에 나타내었다.

2. 방법

1) 신경세포 배양

임신 20일(embryonic day 20 : E20)된 Sprague-Dawley계 흰쥐의 대뇌 피질신경세포를 Brewer 등¹⁰

Table 1. 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.

IB ; immunoblot

의 방법에 따라 배양하였으며, 木香과 麝香은 배양 14일(day 14 in vitro : DIV)에 처리하였다. 임신 20일의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아의 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37℃에서 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 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 이 후 분산된 세포를 모으고 세포 수를 측정된 다음 약 1,500cells/mm² 되도록 B27을 첨가한 plating Neurobasal media(Gibco, BRL) (100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I, 0.1ml 25mM glutamate, 0.1ml 25mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 5% CO₂ 배양조에서 배양한 다음 2~3일 간격으로 배양액을 feeding Neurobasal media(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I)로 1/3씩 교환하였다.

2) 약재의 처리

배양 14일(14 DIV)에 농도별로 약재를 첨가하고 3일 더 배양한 후 각각의 실험을 실시하였다.

3) 저산소증 모델

배양 14일(day 14 in vitro, DIV)에 약재를 20 μ g/ml 농도로 첨가하고 72시간 처리하였다. 배양 17일에 CO₂ Water Jacketed Incubator(Forma Scientific)를 이용하여 98% N₂/5% CO₂ 환경에서 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상 산소 환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

4) 세포생존율 조사; LDH assay

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

5) 면역염색(immunoblot)

12-well culture dish에 배양한 E20 대뇌 신경세포를 수확하여 1 × SDS-gel loading buffer를 넣고 100℃에서 5분간 처리하였다. 각각 20 μ g의 단백질을 8% 혹은 15% SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)하고, nitrocellulose(NC) membrane에 옮겨 (100V, 1시간) Ponceau S용액[0.1%(w/v) Ponceau S, 0.1% acetic acid]으로 5분간 염색한 후 증류수로 탈염색하여 표준 분자량의 위치를 확인하였다. NC를 TTBS용액(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.2% Tween-20, 0.02% NaN₃)으로 10분간 세척하고 4℃에서 16~18시간 처리한 후 1차 항체(1:2,000~5,000)를 넣고 2시간 반응시켰다. NC를 TTBS용액으로 10분씩 4회 세척하고, alkaline phosphatase-conjugated 2차 항체(1:2,000)를 넣어 2시간 반응시킨 후 TTBS용액으로 10분씩 2회, TBS(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.02% NaN₃) 용액으로 2회, alkaline phosphatase 완충 용액(100mM Tris, pH9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂)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 중지시켰다. 정량적 분석은 blot을 scan하여 NIH Scion Image Beta 3b software로 signal density를 측정하였다.

6) 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 배경을 제거하였다.

7) 통계처리

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

III. 結果

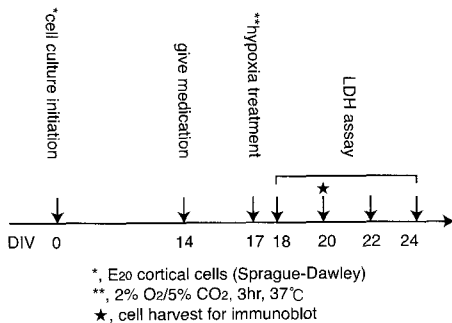
1. 신경세포 배양

배양한 17 DIV E20 대뇌 신경세포의 위상차(phase-contrast) 현미경 사진을 Fig. 2A에 나타내었다. 대뇌 및 소뇌의 신경세포는 배양 시작 후 2시간 정도부터 가지돌기를 내기 시작하며, 24시간 후에는 신경가지들이 20~30 μ m까지 자란다. 이 연구에서 사용한 neurobasal 배지는 serum이 첨가되지 않은(serum-free) 배지로서 신경교세포는 약 10% 정도로 거의 증식이 일어나지 않아 대부분이 신경세포로 구성되었다.

2. 木香이 정상산소 환경에서 신경세포에 미치는 영향
먼저 농도에 따른 木香 자체의 세포독성을 조사하고자, 14 DIV에 木香의 물추출물(water extract) 0, 0.34, 0.68, 2.0, 3.4, 및 4.76 μ g/ml을 첨가하고 3일간 더 배양한 후, 18 DIV(18 DIV를 day 1으로 표시함)에서부터 1, 3, 5, 7일에 각각 신경세포의 생존율을 LDH assay로 조사하였다.(Fig. 3) 대뇌신경세포는 4.76 μ g/ml까지의 농도에서는 세포독성이 없었으며, 최고 22%까지 세포사를 방지하였다.

3. 木香이 저산소증(hypoxia)에서 신경세포에 미치는 영향

배양한 흰쥐 태아 E20 대뇌 신경세포에 木香(0, 0.34, 0.68, 2.0, 3.4, 및 4.76 μ g/ml)을 첨가하고 72시간



* E20 cortical cells (Sprague-Dawley)
** 2% O₂/5% CO₂, 3hr, 37°C
★, cell harvest for immunoblot

Fig. 1. Experimental schemes. LDH, lactate dehydrogenase.

전처리한 후 저산소증(2% O₂/5% CO₂, 37°C, 3 hrs)을 유발한 다음, 다시 정상 산소 환경에서 배양하고 LDH assay를 이용하여 세포 생존율을 조사하였다.(Fig. 4) 저산소증 유발 전 72시간 木香으로 전처리한 군은 대조군에 비하여 특별한 효과를 나타내지 않았으며, 독성도 없었다.(Fig. 4)

4. 麝香이 정상산소 환경에서 신경세포에 미치는 영향
먼저 농도에 따른 麝香 자체의 세포독성을 조사하고자, 14 DIV에 麝香의 물추출물 0, 0.45, 1.35, 2.25, 및 3.15 μ g/ml을 첨가하고 3일간 더 배양한 후, 18 DIV(18 DIV를 day 1로 표시함)에서부터 1, 3, 5, 7일에 각각 신경세포의 생존율을 LDH assay로 조사하였다.(Fig. 5) 麝香은 1.35 μ g/ml 이상의 농도에서는 대뇌신경세포에 독성을 나타내었다.

5. 麝香이 저산소증(hypoxia)에서 신경세포에 미치는 영향

배양한 흰쥐 태아 E20 대뇌 신경세포에 麝香 물추출물 0, 0.45, 1.35, 2.25, 및 3.15 μ g/ml을 각각 첨가하고 72시간 전처리한 후 저산소증(2% O₂/5% CO₂, 37°C, 3 hrs)을 유발한 다음, 다시 정상산소환경에서

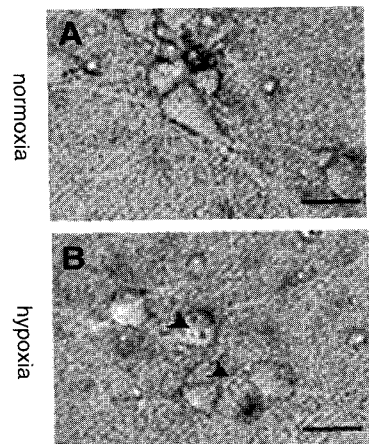


Fig. 2. Cortical cells in culture.

A, 17 DIV cortical cells in normoxia. Phase-contrast microscopy. B, Sister cells as in panel A on 3 days after hypoxia. Note vacuoles formed in soma (arrowheads). Phase-contrast microscopy. Bar, 20 μ m.

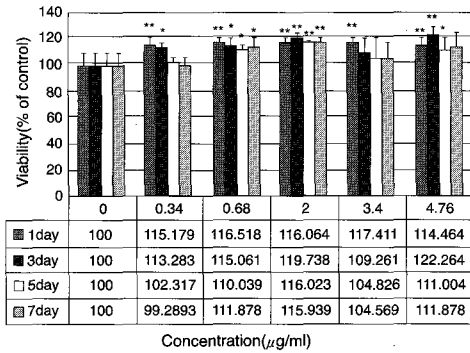


Fig. 3. Neuroprotective effect of Aucklandiae Radix(木香) in normoxia. (* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001)

A, E20 cortical cells were grown in 24-well plates. On 14 DIV, Aucklandiae Radix(木香) was added 0, 0.34, 0.68, 2.0, 3.4, and 4.76 $\mu\text{g/ml}$ to the culture media and incubated for 72 hrs. On 18, 20, 22, 24 DIV (day 1, 3, 5, 7, respectively), cell viability was measured by LDH assay and expressed as % of control. Fig. 4. Neuroprotective effect of Aucklandiae Radix(木香) in normoxia.

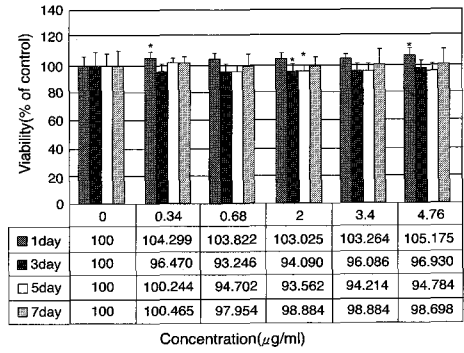


Fig. 4. Neuroprotective effect of Aucklandiae Radix(木香) in hypoxia. (* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001)

E20 cortical cells were grown in 24-well plates. On 14 DIV, Aucklandiae Radix(木香) was added to the culture media at 0, 0.34, 0.68, 2.0, 3.4, and 4.76 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (2% O_2 / 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$, 3 hrs) and further incubated in normoxia. Cell viabilities were measured on 1, 3, 5, 7 days after shock by LDH assay and expressed as % of control.

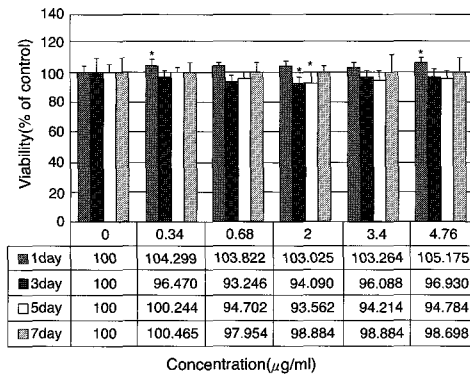


Fig. 5. Neuroprotective effect of Moschus(麝香) in normoxia. (* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001)

A, E20 cortical cells were grown in 24-well plates. On 14 DIV, SaHyang was added 0, 0.34, 0.68, 2.0, 3.4, and 4.76 $\mu\text{g/ml}$ to the culture media and incubated for 72 hrs. On 18, 20, 22, 24 DIV (day 1, 3, 5, 7, respectively), cell viability was measured by LDH assay and expressed as % of control.

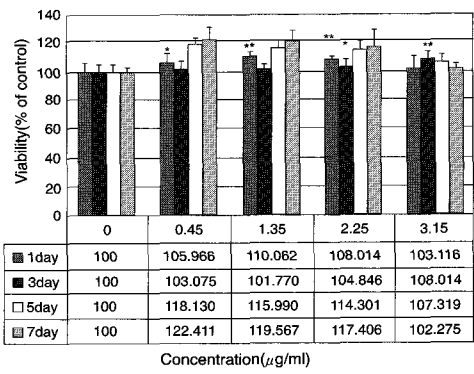


Fig. 6. Neuroprotective effect of Moschus(麝香) in hypoxia (* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001)

E20 cortical cells were grown in 24-well plates. On 14 DIV, Moschus(麝香) was added to the culture media at 0, 0.34, 0.68, 2.0, 3.4, and 4.76 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (2% O_2 / 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$, 3 hrs) and further incubated in normoxia. Cell viabilities were measured on 1, 3, 5, 7 days after shock by LDH assay and expressed as % of control.

배양하고 LDH assay를 이용하여 세포 생존율을 조사하였다.(Fig. 6) 저산소증 유발 전 72시간 麝香을 전처리한 군은 대조군에 비하여 최고 22%의 세포사 방지 효과를 나타내었다.(Fig. 6)

6. 麝香이 저산소증에서 apoptosis와 관련된 단백질의 표현에 미치는 영향

흰쥐 태아 E20 대뇌 신경세포 배양(12-well plate) 14일에 麝香 1.35 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가하고 72시간 더 배양

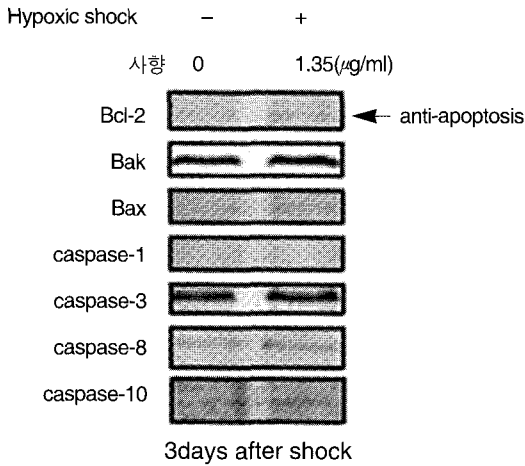


Fig. 7. Effects of Moschus(麝香) on the expression of apoptosis-related proteins in the hypoxia model.

An hypoxic shock was given for 3 hrs in the presence or absence of 1.35 µg/ml of Moschus(麝香). 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 (arrowhead).

하였다. 17 DIV에 저산소증(2% O₂/5% CO₂, 37°C)을 유발한 다음 3일 후에 세포를 수확하여 SDS-gel loading 완충용액으로 세포를 용해시켜 전기영동하고 (8 혹은 15% SDS-gel, 40 µg/lane), 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮겨 각 단백질들의 표현을 면역염색하여 조사하였다. anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2는 대조군에 비하여 약 20% 증가되었다.(Fig. 7, Bcl-2) pro-apoptosis 단백질인 Bak, Bax도 약간 증가되었으며, caspase cascade의 initiator 가운데 caspase-1은 약간 감소되었으나 매우 약하게 표현되었으며, caspase-3, -8, -10도 약간 증가되었다.(Fig. 7)

IV. 考 察

木香은 菊花科(Compositae)에 속한 다년생 초본인 운목향 *Aucklandia lappa* DECNE.의 뿌리를 건조한 것으로¹¹, <神農本草經>에서 “木香 味辛溫 無毒. 治邪氣 辟毒疫 溫鬼強志 治淋露 久服不夢寤 癡寐” 한다 하

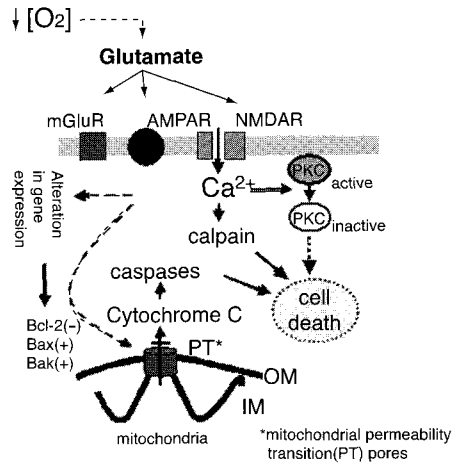


Fig. 8. A model for the mechanism for neuronal protection by Moschus(麝香) in hypoxia.

Data from this work indicate that Moschus(麝香) increases the anti-apoptosis protein Bcl-2. Therefore, it may be reasonable to propose that Moschus(麝香) protects delayed neuronal death in hypoxia by increasing Bcl-2, thereby reducing mitochondrial permeability transition (PT) pores, the cytochrome c channels.

였다¹². 秦¹³은 木香正氣散의 효능에 관한 실험적 연구에서 진통, 진정, 진경작용 및 혈압강화, 고지혈증억제에 효과가 인정되어 임상적으로 고혈압, 중풍, 동맥경화 치료에 효능이 있다고 하였다.

麝香은 鹿科(사슴과; Cervidae)에 속한 동물인 麝香노루 *Moschus moschiferus* L와 林麝 *M. berezovskii* FLEROV. 및 馬麝 *M. sifanicus* PRZEWALSKI의 성숙한 雄體의 香囊中 분비물을 건조한 것으로¹¹, <神農本草經>에서 “麝香 味辛溫無毒 主辟惡氣 殺鬼精物 溫瘧 蠱毒癰瘡 去三蟲 療諸凶邪 鬼氣中惡 心腹暴痛 脹急 ... 久服除邪 不夢寤 癡寐 通神仙”이라고 하였다¹². 許 등¹⁴은 麝香이 호흡중추·혈관운동중추의 흥분작용 및 강심작용, 혈소관응집억제 작용, 항트롬빈 작용, 뇌허혈상태 개선작용 등이 있어 중풍 급성기에 사용한다고 하였으며, 李 등¹⁵은 흰쥐의 뇌기능 손상에 보호작용이 있음을 보고하였다.

기존의 연구로 木香은 뇌손상에 대한 연구는 없었고 麝香은 뇌기능 손상 보호작용 및 뇌허혈 개선작

용에 대한 검증만 있었을 뿐 신경세포사 방지의 기전에 대한 보고는 없었다. 따라서 木酢과 麩香의 신경세포사 보호작용과 그 기전에 대한 연구는 의미있는 일이라고 사료된다.

이에 저자는 卒中風에 다용되는 木酢과 麩香이 신경세포 손상에 보호작용이 있을 것으로 생각하여 본 실험약물로 선택하였다.

1980년대 중반 이후 apoptosis는 무한한 응용가능성으로 인하여 많은 학자들의 관심을 불러 일으켰다. 초기연구는 형태학적, 현상학적 연구가 대부분이었으나, 최근에는 세포사멸현상의 생화학적, 분자생물학적 조절기전이 점차 밝혀짐에 따라 이와 관련된 여러 조절인자들에 관심이 집중되고 있다¹⁵.

Apoptosis는 세포의 분해를 위해 세포내의 효소들이 활발하게 관여하는 능동적인 죽음의 기작이다. 이 과정은 형태학적으로 세포의 비중감소, 세포막의 파괴, 염색체의 응축 등과 더불어 세포내부의 물질들이 apoptotic body라는 포낭을 형성하면서 식세포 작용을 거치는 작용과 함께 진행된다¹⁶. 중추신경세포의 손상에 대한 민감성은 glutamate에 의해 매개되는 흥분성 신경 전달계의 발현을 통하여 점차 설명이 가능해지기 시작하였다.

즉 glutamate의 과다한 방출 또는 glutamate receptor의 과다한 흥분에 의하여 비교적 짧은 시간에 신경세포의 비가역적 손상이 초래된다는 것이다¹⁷. Glutamate와 그 유사체들은 glutamate 고유의 수용체에 결합하여 이온 통로를 열어 이온들의 직접적인 세포 내 유입을 유발하거나, G-protein을 통하여 이차 신호전달 물질체계에 변화를 일으켜 신호 전달을 매개한다. 이중 전자의 수용체를 이온성 수용체라 하고, 후자를 대사성 수용체라 부른다. 전자는 다시 N-methyl-D-aspartate (NMDA)수용체와 non-NMDA, 또한 AMPA/kainate 수용체로 나뉘어지는데, 이 두 종류의 수용체가 glutamate에 의한 흥분독성을 매개한다¹⁷.

Glutamate에 의한 신경세포독성은 대체적으로 NMDA 수용체에 의해 유도되는 신경세포의 비정상적인 활성화에 기인된다. NMDA 수용체는 일종의 칼슘이온채널로 NMDA 수용체를 통하여 비정상적으로

높아진 세포 내 칼슘이온의 증가로 신경세포의 사멸을 유발하는 여러 단백질들의 기능이 변화된다¹⁸.

Chopp 등¹⁹이 초기 necrosis와 delayed apoptosis를 구분한 이후, 경색주위에서 서서히 진행되는 apoptosis가 기술되기 시작하였다. 세포 배양체의 허혈 모델에서도 early excitotoxic necrosis를 차단하는 경우 delayed apoptosis가 관찰되었으며, 약한 허혈 (mild ischemia)에서 아주 늦게 나타나는 신경세포사 apoptosis 기전에 의해 일어난다고 보고되었다²⁰. 이러한 형태학적, 약리학적 연구 이외에도 분자생물학적으로도, apoptosis를 방지하는 유전자인 bcl-2를 과발현하는 형질전환 생쥐에서 국소적 허혈에 의한 경색 크기가 줄어들고, apoptosis를 최종 매개하는 것으로 알려진 caspase를 억제하여도 경색 크기가 줄어든다는 보고²¹들이 apoptosis의 연구를 통해 허혈성뇌질환의 치료 가능성을 더욱 크게 하고 있다.

Apoptosis는 세포자신이 선택한 능동적인 과정으로 에너지가 필요하며, 상당히 많은 경우 세포사멸의 조절에 직·간접적으로 관여하는 단백질의 합성이 필요한데²², 이와는 별도로 새로운 단백질의 합성이 없이도 apoptosis로 진행될 수 있는 예들이 많이 밝혀지고 있다. 이와 관련하여 세포질 내에 이미 존재하고 있는 세포사멸관련 단백질 분해효소(cysteine proteases인 interleukin-1-beta-converting enzyme (ICE)-like caspases와 calpain 등과 같은 non-caspases류)가 주목을 받고 있다²³. 이 이외에도 미토콘드리아로부터 분비되는 apoptosis 유도물질(예, cytochrome c, apoptosis-inducing factor) 등²⁴도 최근에 많은 연구가 이루어지고 있는 핵심분야이다.

Bcl-2 family는 이들 구성원간이나 다른 종류의 단백질과 다양한 물리적 결합(physical interaction)을 이루는데, 결합의 종류나 특성에 따라서 apoptosis 진행의 방향성(apoptosis가 일어날 것인가의 여부를 포함)이 조절된다. 1993년 Korsmeyer 등²⁵은 배양쥐 림프구세포에서 Bcl-2와 heterodimer를 이루는 단백질인 Bax homodimer가 apoptosis를 유도한다고 하였다. Bcl-2와 Bax는 서로 heterodimer를 이룰 수 있는데, 만일 Bax가 주종 단백질로 heterodimer를 만들면

apoptosis를 촉진시키고 Bcl-2가 주종이면 apoptosis가 억제된다. 즉, apoptosis의 억제는 Bcl-2에 의해 일어나고 Bax는 이를 촉진시키는데 서로 heterodimer를 이루므로써 미세한 양의 차이로써 이 현상을 조절하는 것으로 추정된다²⁵.

Bcl-2, Bax와 같은 단백질간의 결합은 Bcl-2 family나 Bcl-2 family와 기타의 단백질간에서도 이루어지고 있으며, 더욱이 이와 같은 결합을 조절하는 신호 전달체계도 존재(예, 단백질의 인산화)하는 것으로 밝혀지고 있다²⁶. Caspase 집단은 새로운 계열의 cystine 단백질 분해효소로서 고등동물에서 apoptosis를 유도하는 중요한 생리매개체이다. 이에 대한 실험적 증거로는 첫째 척추동물에서 추가로 발견된 여러 종류의 caspase들은 척추동물 세포의 사멸을 시작하는데 중요하게 작용하는 새로운 계열의 단백질 분해효소 군을 형성하며, 둘째 caspase 유전자들을 포유동물 세포나 곤충세포에서 과 발현시킬 경우 apoptosis가 유도되며 이러한 apoptosis는 Bcl-2에 의해서 억제되고, 셋째 caspase 활성화를 억제시키는 매우 제한적이며 특이적인 펩타이드 저해제나 바이러스 단백질 저해제(예: CrmA)에 의해 고등척추동물에서의 다양한 apoptosis가 억제되는 사실²⁷들은 고등척추동물의 apoptosis에서 caspase가 중요하게 작용함을 보여주는 예이다²⁸.

이들은 cascade를 이루어 단계별로 활성화된다. 세포 외부로부터 세포사멸신호가 세포 내부의 caspase로 전달되면 caspase를 활성화시키는 경로에서 몇몇 caspase의 N-말단에 존재하는 앞 부위가 단백질-단백질 결합을 통하여 사멸신호를 전달하고 caspase를 활성화시킨다. 활성화된 caspase는 다음 caspase를 활성화시킬 수 있다²⁹.

Caspase는 앞 부위의 길이에 따라 두 그룹으로 분류할 수 있다. Caspase-1, -2, -4, -5, -8 -10은 긴 앞(long pro-domain)부위를 지니며, caspase-3, -6, -7, -9는 짧은 앞(short pro-domain)부위를 지닌다. Caspase의 긴 앞 부위는 세포내에서의 위치와 자신의 활성화를 조절하는데 관여하며, Caspase-8, 10의 앞 부위에 60개의 아미노산으로 구성된 죽음특이부위(DED:

death effector domain)는 caspase가 다른 단백질과 단백질-단백질 결합을 하는데 관여한다³⁰.

이에 저자는 木香, 麝香의 지연성 신경세포사 방지 효과를 알아보기 위하여 배양한 E20의 Sprague-Dawley계 흰쥐 대뇌 피질신경세포를 이용하여 배양 14일에 木香, 麝香으로 3일간 약제 처리한 후 배양 17일에 저산소증을 유발하고 배양 20일에 신경세포의 변화를 관찰 및 조사하였다. 木香, 麝香의 신경세포사 방지효과에 관해서는 LDH assay를 이용하여 관찰하였고, 麝香의 신경세포사 방지기전에 관해서는 apoptosis와 관련된 단백질인 Bcl-2, Bak, Bax, caspase family의 표현을 통하여 조사하였다.

본 연구에 사용한 세포는 흰쥐(Sprague Dawley)의 배양 20일된 대뇌신경세포로 serum이 첨가되지 않은 배지를 사용하였기 때문에 신경교세포는 약 10% 정도로 거의 증식이 일어나지 않아 대부분이 신경세포로 구성되었다.

木香이 정상산소 환경에서 신경세포에 미치는 영향을 알아보기 위해, 14 DIV에 木香의 추출물(water extract) 0, 0.34, 0.68, 2.0, 3.4, 및 4.76 μ g/ml을 첨가하고 3일간 더 배양한 후, 18 DIV(18 DIV를 day 1으로 표시함)에서부터 1, 3, 5, 7일에 신경세포의 생존율을 LDH assay로 조사하였다. E20 대뇌신경세포는 4.76 μ g/ml의 농도까지 세포독성이 없었으며, 최고 22%까지 세포사를 방지하였다. 麝香은 정상산소 환경에서 1.35 μ g/ml 이상의 농도에서는 대뇌신경세포에 독성을 나타내었다.

배양한 흰쥐 태아 E20 대뇌 신경세포에 저산소증 모델에서 신경세포사 방지에 대한 木香과 麝香의 영향을 알아보기 위해, 14 DIV에 木香 물추출물 0, 0.34, 0.68, 2.0, 3.4 및 4.76 μ g/ml 및 0, 0.45, 1.35, 2.25 및 3.15 μ g/ml을 각각 첨가하고 3일간 더 배양한 후, 17 DIV에 저산소 처리하고(2% O₂/5%CO₂, 3 hr) 1, 3, 5, 7일 후에 신경세포의 생존율을 LDH assay로 조사하였다. 木香은 저산소증에서 신경세포 보호효과가 없었으며, 麝香은 다양한 농도에서 최고 23%의 세포사 방지 효과를 나타내었다.

또한 麝香이 저산소증에서 apoptosis와 관련된 단

백질의 표현에 미치는 영향을 알아보기 위해, 흰쥐 태아 E20 대뇌 신경세포 배양(12-well plate) 14일에 麝香을 1.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가하고 72시간 더 배양한 후 17 DIV에 저산소증(2% O_2 /5% CO_2 , 37°C)을 유발하였다. 3일 후에 세포를 수확하여 SDS-gel loading 완충 용액으로 세포를 용해시켜 전기영동하고(8 혹은 15% SDS-gel, 40 $\mu\text{g}/\text{lane}$), 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮겨 각 단백질들의 표현을 면역염색한 결과, caspase-10의 표현은 변화가 없었으나 anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2는 대조군에 비하여 약 20% 증가되었고, pro-apoptosis 단백질인 Bak, Bax도 약간 증가되었으며, caspase cascade의 initiator 가운데 caspase-1은 약간 감소되었으나 매우 약하게 표현되었으며, caspase-3, -8, -10도 약간 증가되었다.

이상의 실험 결과로 木香은 정상 산소 환경에서 신경세포사를 감소시켰으며, 麝香은 저산소증에서 신경세포사를 감소시켰다. 麝香이 저산소증에서 신경세포사를 억제하는 기전은 apoptosis를 억제하는 Bcl-2의 표현을 증가시켜 mitochondrial permeability transition(PT) pore의 생성을 저하시킴으로써 cytochrome c의 세포질 내 유출을 억제하여 나타나는 것으로 추정할 수 있었다. 따라서 麝香이 뇌졸중 발병 후 발생하는 대뇌 신경세포사 방지에 예방효과가 있는 것으로 생각되며 木香은 본 연구에서 그 효과가 입증되지 않았다. 향후 麝香의 저당 저산소증 모델에 대한 신경세포사 방지 기전에 대한 연구도 이루어져야 할 것으로 생각되며 더불어 중풍에 효과가 있다고 알려진 약물에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

V. 結 論

본 연구에서는 木香, 麝香의 지연성 신경세포사 방지 효과를 알아보기 위하여 배양한 E20의 Sprague-Dawley계 흰쥐 대뇌 피질신경세포를 이용하여 배양 14일에 木香, 麝香으로 3일간 약재 처리한 후 배양 17일에 저산소증을 유발하고 배양 20일에 신경세포의 변화를 관찰 및 조사하였다.

木香, 麝香의 신경세포사 방지효과에 관해서는 LDH assay를 이용하여 관찰하였고, 麝香의 신경세포사 방지기전에 관해서는 apoptosis와 관련된 단백질인 Bcl-2, Bak, Bax, caspase family의 표현을 통하여 조사하였다.

1. E20 대뇌 신경세포 배양을 이용한 경우 木香은 정상 산소 환경에서 신경세포 보호작용이 있으며, 麝香은 저산소증에서 신경세포 보호작용이 있음을 LDH assay를 통하여 확인하였다.
2. 저산소증 모델에서 麝香은 apoptosis를 억제하는 단백질인 Bcl-2의 표현을 증가시켰다. 따라서 麝香이 저산소증에서 신경세포사를 억제하는 기전은 apoptosis를 억제하는 Bcl-2의 표현을 증가시켜 mitochondrial permeability transition(PT) pore의 생성을 저하시킴으로써 cytochrome c의 세포질 내 유출을 억제하여 나타나는 것으로 추정된다.

參考文獻

1. Arai H, Passonneau JV, Lust WD. Energy metabolism in delayed neural death of CA1 neurons of hippocampal following transient ischemia in the gerbil. *Brain Res* 1986;1:263-78.
2. 최의주. Apoptotic Signaling Pathways. *Experimental & Molecular Medicine*. 33. 2001, p.85-95.
3. 오영준, 최원석. apoptosis의 조절인자: Bcl-2 계열. *유전 제2권*. 서울:월드사이언스:1998, p.92-105.
4. 甄權. 藥性論. 臺北:文光圖書有限公司:1981, p.53-4.
5. 李時珍. 本草綱目. 北京:人民衛生出版社:1982, p.854,1185,2867-70.
6. 柳浩龍. 木香의 血壓降下 및 抗血栓作用에 대한 實驗的 研究. 大田大學校大學院. 2000.
7. 上海中醫學院. 中草藥學. 香港:商務印書館香港分館:1977, p.309-10.
8. 이보영, 강석봉. 麝香이 생쥐의 뇌손상에 미치는 영향. *大韓韓醫學會誌* 1995;16(2):299-311.
9. 지형준, 이상인. 대한약전의 한약(생약) 규격집 주해서. 서울:한국메디칼인텍스사:1997, p.506,533.
10. Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., and Price, P. J. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medi-

- um combination. *J. Neurosci. Res.* 1993;35:567-76.
11. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 서울;永林社:1991, p.294,353.
 12. 馬繼興. 神農本草經輯注. 北京;人民衛生出版社:1995, p.66,319.
 13. 秦炯碩. 木香正氣散의 效能에 관한 實驗的 研究. 서울;慶熙大學校 大學院:1993, p.34-5.
 14. 허재혁, 김세길, 문병순, 안일희, 성강경, 신선호. 中風急性期에 활용되는 麝香에 관한 文獻의 考察. 大韓韓醫學會誌 1995;16(2):100-14.
 15. 최의주. SPAK 신호전달계와 세포사멸. 유전 제2권. 서울;월드사이언스:1998, p.79-91.
 16. Wylie, A.H., Kerr, J.F.R. and Curie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev. Cytol* 1980; 68:251-305.
 17. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci* 1987;7:357-68.
 18. Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Gotoh Y, and Nishida E. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* 1997;272:18518-21.
 19. Li Y, Chopp M, Powers C, Jiang N. Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 15 1997;765(2):301-12.
 20. Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16(2):195-201.
 21. Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18(3):238-47.
 22. Oppenheim RV, Prevette 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;138:104-13.
 23. Cryns V, J Yuan. Proteases to die for. *Gene. Deve* 1998;12:1551-70.
 24. Kroemer G, Dallaporta B, M Resche-Rigon. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol* 1998;60:619-42.
 25. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 27 1993;74(4):609-19.
 26. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 17 1997;91(2):231-41.
 27. Gagliardini V, Fernandez PA, Lee RK, Drexler HC, Rotello RJ, Fishman MC, Yuan J. Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science* 11 1994;263(5148):826-8.
 28. 정용근. apoptosis의 실행자: CASPASE를 통하여. 유전 제2권. 서울;월드사이언스:1998, p.108-9.
 29. Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J. Biol. Chem* 1997;272:2952-6.
 30. Muzio, M. et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/Ced-3-like protease, is recruited to the CD95(Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996;85:817-27.