

오수유 MeOH 추출물이 Cyanide에 의한 신경세포의 보호효과에 미치는 영향

김상태 · 안승희 · 김정도 · 김영균*
주암생명공학연구소, 국민대학교 삼림과학대학

Protective Effect of MeOH Extract of *Evodia officinalis* on Cyanide-induced Neurotoxicity in Cultured Neuroblastoma Cells

Sang Tae Kim, Soung Hee Ahn, Jeong Do Kim, and Young-Kyoon Kim*

Juam of Research Institute Bioscience & Biotechnology, College of Forest Science, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

Abstract – We reported that neurotoxicity may contribute to cyanide-induced neuronal injury. Cyanide stimulates the release of glutamate which can activate glutamate receptors to propagate excitotoxic processes. We examined the role of plant extracts in mediating the cyanide-induced cytotoxicity and report here that the cytotoxicity assessed in SK-N-SH cell cultures by measuring lactate dehydrogenase (LDH) in the culture media was significantly blocked by *Evodia officinalis* MeOH extract (OMU). Also, when OMU was treated in NaCN level cultures, the neurite outgrowth was regenerated as much as in the treatment of NaCN only. These results indicate that OMU treatment were not only protected the neurons against NaCN-induced damage but also regenerated the neurite outgrowth of neuroblastoma cells.

Key words – Cytotoxicity, LDH, NaCN, apoptosis, neurite outgrowth, *Evodia officinalis*

서 론

바이러스 감염, 질병, 노화, 스트레스, 외상이나 면역저하 등과 같은 요인들에 의하여 중추신경계나 척수를 구성하고 있는 지각신경세포나 운동신경세포의 손상을 초래하게 된다. 이 경우 말초신경의 손상은 회복이 가능하지만 일단 중추신경계가 손상이 되면 재생이 되지 않기 때문에 이의 손상은 지각의 소실은 물론 운동기능의 상실을 초래하여 결국 인간의 생존을 위협한다. 지금까지 신경세포를 저해하는 병인으로 알려진 것은 buthionine sulfoximine, sodium nitroprusside, ZnCl₂ 그리고 FeCl₂ 같은 것에 의해 산소자유기(free radicals)로 인한 신경상해와 excitotoxic amino acids (EAAs)¹⁻²⁾ 및 신경성장인자(neurotrophic factor, NTF)의 결핍,³⁻⁴⁾ sodium cyanide (NaCN)⁵⁻⁹⁾ 같은 환경폐수로 인한 체소류 및 오염된 농업용수로 인한 과일류의 섭취등이 있다. 특히 현대산업사회의 공해의 후유증이 민감하게 받아지고 있는 시점에서 NaCN에 의한 위해성이 잘 보고되지 않은

상태에서 신경계질환이 날로 증가되고 있다.

한편, NaCN에 의해 인체의 신경계에 미치는 영향에 대한 연구결과로는 Hutter-Paier가 chick cortical neurons에서 NaCN과 ionomycin로 microtubule-associated proteins인 MAP1, MAP2 그리고 tau기능을 밝힌 보고가 있고,¹⁰⁾ Jensen은 cyanide-induced neurotoxicity에서 미토콘드리아 기능과 chick embryonic neurons에서 cyanide유도 세포사를 연구하였고,^{11,12)} Macey가 sodium cyanide에 의한 생리현상을 규명하였고,¹³⁾ Yahagi는 고양이의 cardiac sympathetic nerves에서 cyanide의 norepinephrine efflux를 연구하였으며,¹⁴⁾ Patel는 N-methyl-D-aspartate receptors의 방해에 의해 cyanide로 유도된 신경상해를 억제한다고 보고하였다.¹⁵⁾ 또한 cyanide는 산소유리기 생성으로 세포막에서 지질과산화 반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 질소자유기의 하나인 nitric oxide (NO)와 상호 작용함으로써 독성이 강한 물질인 peroxynitrite을 생성하여 병변을 더욱 가속화시킨다고 하였다.¹¹⁾ Reactive oxygen species (ROS)나 reactive nitrogen species (RNS)와 같은 자유기는 생체내에서 여러 생리적인 반응에 관여하고 있으나,¹⁶⁾ 이들이 필요 이상 형성되는 경

*교신저자(E-mail) : ykkim@kookmin.ac.kr
(FAX) : 02-910-5092

우는 세포막의 불포화 지방산을 과산화시켜 지질과산화 반응을 가속화시킬 뿐만 아니라, 세포질내의 protein kinase C (PKC)와 같은 이차전달자의 변성, 단백질 및 DNA 합성 억제제를 촉진시킨다고 한다.¹⁷⁾ 최근의 연구에 의하면 근위축성 측삭 경화증이 SOD-1 유전자의 돌연변이에 의하여 과량의 산소유리기가 환자의 뇌 속에 축적된다는 것이 밝혀지면서 중추나 말초신경계를 구성하고 있는 신경세포 손상의 병인으로 증명되었다. 그러나 NaCN에 의한 산소유리기의 독성효과에 대하여 아직까지 자세한 기전규명이 되어 있지 않았을 뿐만 아니라 또한 산소유리기의 산화적 손상으로 인하여 유발되는 각종 신경병변에 대한 효과적인 치료방법이 매우 미흡한 상태이다.

오수유는 운향과(Rutaceae)식물인 吳茱萸(*Evodia officinalis* Dode)의 미성숙 과실(果實)¹⁸⁾로 性味는 유소독(有毒), 신(辛), 고(苦), 열(熱) 귀경(歸經)하며 간(肝), 비(脾), 위(胃)¹⁹⁾하다. 주요 성분으로는 evodiamine, rutaecarpine, evocarpine, dehydroevodiamine 등의 활성성분인 alkaloid와 evodene, ocimene, evodin, zimonin, evodol 등이 분리되어 보고 된 바 있으며,²⁰⁻²²⁾ 오수유의 약리작용은 자궁수축작용, 이뇨작용, 항균작용, 살충작용, 중추흥분작용, 진통작용, 강압작용, 강심작용, 위액분비억제작용, 소장활동 억제작용, 혈전형성시간 연장작용 등이 알려져 있다.²³⁻²⁶⁾ 오수유가 신경계통의 진통(鎮痛), 진정(鎮靜), 항경련(抗痙攣) 작용은 있지만 신경장애에 대한 효과에 관한 과학적인 연구는 아직 수행된 바가 없다. 따라서 생약추출물을 대상으로 항산화 효과 및 신경보호효과 같은 약리적 활성을 가지고 있다는 가정하에 산화적 손상에 의하여 유발되는 신경계 질환의 치료에 대한 연구가 진행되어지고 있으며 본 연구는 뇌와 척추신경 질환에 효과가 있을 것으로 사료되는 오수유 MeOH(이하 OMU)을 이용하여 신경장애 보호효과를 규명하기 위하여 NaCN으로 유도된 신경세포 상해에 OMU를 처리시켜 본 결과 신경 상해 보호효과 및 재생효과에 유의성 있음을 확인하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

실험에 사용된 시약은 RPMI 배지, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 Gibco에서, Ethanol은 Merck사에서 구입하였고, 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (VS-9108 MS, Vision scientific Co.), light microscope (Olympus), immunofluorescence microscope (Olympus), FACScan (Becton

Dickinson, U.S.A.) 등을 사용하였다.

생약의 추출 및 시료검액조제

OMU 조제 : 吳茱萸 1 Kg을 경동시장에서 엄선하여 구입한 후, 세말한 다음 적당량의 MeOH (5 L)에 넣고 일주일간 상온에서 침출시킨 후 마포로 추출액을 여과하고 즉시 rotary evaporator에서 감압농축하였다. 농축액은 냉동보관하고 실험 직전에 0.1 M phosphate buffer (0.1 N NaCl 함유)로 1 mg/ml의 농도로 녹여 시료검액으로 사용하였다.

SK-N-SH 신경세포주의 배양

본 실험에 사용된 세포주인 SK-N-SH은 서울대학교 암연구소 한국 세포주은행으로부터 분양받아서 계대배양시켜 5% FBS가 함유한 RPMI 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask내지 cell culture용 dish에 배양하면서 10³ 세포를 6-well plate에 분주하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 80%정도 조밀하게 배양한 다음 사용하였다.

Sodium cyanide (NaCN)처리에 의한 신경 상해방법

세포만 배양한 정상군, sodium cyanide를 500 μM 농도로 첨가하여 신경상해를 유도한 대조군 그리고 여기에 OMU를 처리한 실험군으로 신경상해의 억제유무를 관찰하기 위해 30분간 처리하였다. Sodium cyanide로 처리한 SK-N-SH cell lines를 10³ 세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 약물군의 25, 50 μg/ml 농도별로 처리하여 상기 신경세포의 신경상해 및 세포사를 억제하는지 조사하기 위해 현미경하에서 관찰하였다. 세포사 관찰은 현미경의 200배율에서 세포사가 유도된 200개정도 세포수를 촬영한 다음 신경상해 및 세포사가 억제되는 정도 조사하였다.

LDH assay에 의한 신경세포 생존율

NaCN의 상해 보호효과를 조사하기 위해 신경세포만 배양한 정상군, sodium cyanide를 500 μM 농도로 첨가하여 신경상해를 유도한 대조군 그리고 여기에 OMU를 처리한 실험군을 대상으로 96-well plate에 pyruvate substrate (NADH 1 mg/ml)를 20 μl를 가한 다음, 상온에서 2분간 혼합 후 37°C에서 30분간 더 흔들었다. 발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20 μl씩 가한 후 상온에서 20분간 혼합 다음 0.4 N NaOH를 100 μl씩 가하고 상온에서 15분간 더 혼합 후 ELISA reader로 흡광도(A₅₇₀/A₆₃₀)를 측정하였다.

DNA fragmentation 분석

Neuroblastoma cells를 10³ 세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 OMU의 25, 50 μg/ml 농도로 처리하여 DNA

fragmentation를 유도하는 정도를 파악하기 위해 세포 용해액인 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 200 μ l를 첨가한 후 30 min간 얼음에 유지한 다음 proteinase K (100 μ g/ml)를 첨가하고 50°C에서 5시간동안 항온조에 유지한 다음 이를 phenol/chloroform의 동량을 넣고 잘 혼합후 상기와 같이 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한다. 상등액을 취해 100% EtOH로 침전시켜 침전물을 건조시켜 이를 RNase (50 μ g/ml)가 함유한 distilled H₂O 35 μ l를 첨가하여 녹인 후 이 용액을 2% agarose gel을 제조하여 전기영동을 실시한 다음 DNA fragmentation의 유무를 조사하였다.

Flow cytometry analysis

Neuroblastoma를 10³ 세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 대조군과 약물군인 OSU를 25, 50 μ g/ml를 5시간 처리한 후 PBS로 세척하고 trypsin을 처리하고 세포를 모아서 1.5 ml eppendorf tube에 넣은 다음 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 100% EtOH를 1 ml 첨가하여 고정한다. 이때 propidium iodide 5 μ g/ml와 RNase를 혼합해서 준비하고 상기 고정된 세포를 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 PBS로 한번 세척한다. 동시에 상기 고정된 DNA에 염색시약을 첨가하여 37°C에서 30분간 항온조에서 가온시킨 다음 propidium iodide로 염색한 세포는 알루미늄 호일에 밀봉하여 4°C에 보관하고 유세포 검색분석을 실시하였다.

Neurite outgrowth의 분석

정상군, NaCN처리군 그리고 OMU처리군으로 나누어 neuroblastoma를 10³ 세포수로 laminin coated 6-well (BECTON DICKINSON)에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 NGF를 50 ng/ml이 되게 하여 첨가하고 5시간동안 자극을 가한 다음 약물군의 25, 50 μ g/ml 농도로 처리하여 100개의 세포에서 neurite outgrowth 신장유무를 현미경하에서 관찰하였다.

통계처리

모든 실험은 최소한 3회 수행하였으며 세포의 대조군은 백분율로 (% Control)로 표시하였으며 통계학적 유의성은 Student's *t*-test에 의한 $p < 0.05$ 의 유의성으로 나타내었다.

결과 및 고찰

신경세포의 세포형태학적 영향 - 신경세포가 외부환경에 민감하게 자극을 받으면 신경상해를 입는 것과 동시에 세

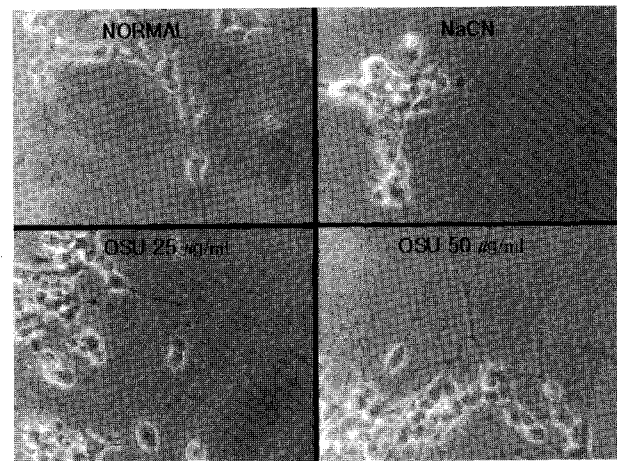


Fig. 1. Morphological pattern of neuroblastoma cells by OMU. Survival cells of NaCN-induced neuroblastoma cells were observed by morphological characteristic of survival cells and inhibited by OMU. Similar results were found in at least three separate experiments. Survival cells were determined by phase-contrast microscopy. The panel indicated with A) Normal, B) NaCN, C) NaCN+OMU 25 μ g/ml, and D) NaCN+OMU 50 μ g/ml. The scale bar's is 5 μ m.

포사가 발생하기 때문에 일어나는 신경세포의 세포사는 신경장애를 초래하는데 곧 신경의 마비를 초래한다. 따라서 NaCN에 의한 신경세포의 최종적인 현상으로 신경세포의 세포사를 확인하기 위해 광학현미경하에서 관찰한 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 정상군에 비해 대조군은 신경세포 세포사는 형태학적으로 큰 변화를 유도되었는데 세포사에 관련한 apoptotic body가 출현하고 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보였으나 OMU는 25 μ g/ml에서 신경세포의 생존이 확인됨과 동시에 신경돌기의 출현을 유도하였다. 아마도 OMU의 성분에는 산소유리기를 소거하는 효과를 지닌 성분이 함유하여 이와 같은 신경세포의 보호효과를 나타낸다고 사료된다.²²⁻²⁵ 따라서 OMU군에는 NaCN에 의한 신경상해를 억제하거나 보호하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

NaCN의 신경상해로 신경세포사의 영향 - NaCN에 의한 신경세포의 세포사가 OMU에 의해 얼마나 억제시키는지 세포사의 ratio를 조사한 결과 Fig. 2에서처럼 신경세포의 최종적인 현상으로 NaCN에 의한 신경세포의 세포사는 정상군경우 4 \pm 3.5%에 비해 NaCN로 인한 세포사의 비율은 약 92 \pm 2.0%이고, NaCN와 OMU를 처리한 실험군 25, 50 μ g/ml에서는 약 82, 17 \pm 2.5%이었는데 특히 50 μ g/ml에서는 NaCN처리군에서보다 OMU군에서 신경상해과정을 억제하거나 지연시키는 효과가 유의성($p < 0.05$) 있게 나타났다. 이는 Jensen가 cyanide-induced neurotoxicity에서 미토콘드리아 기능과 chick embryonic neurons에서 cyanide로 세포사를 유도한 결과와 유사하였다.^{11,12)}

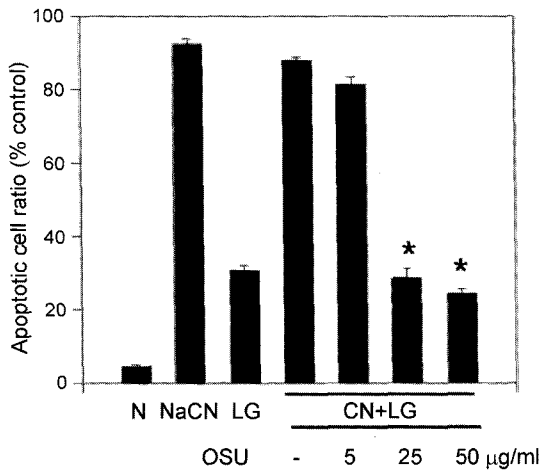


Fig. 2. Inhibitory effect of apoptotic ratio by OMU. Apoptotic ratio of NaCN-induced neuroblastoma cells were observed by ELISA reader and phase-microscopy in medium. Similar results were found in at least three separate experiments. N: Normal, NaCN: sodium cyanide. *; Significantly different from normal are indicated ($p<0.05$). **; Significantly different from normal are indicated ($p<0.05$).

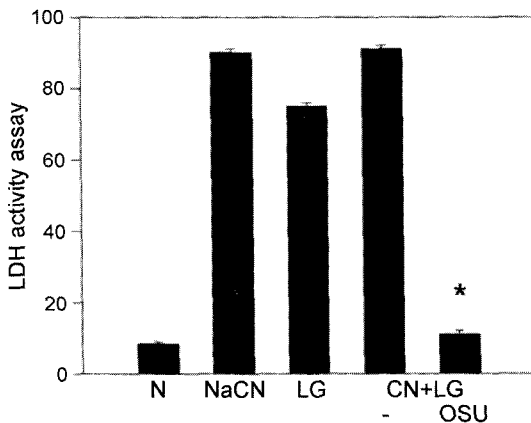


Fig. 3. Survival effects of OMU on LDH activity. Survival cell ratio of NaCN-induced neuroblastoma cells were observed by morphological characteristic of survival cells and inhibited by OMU. Similar results were found in at least three separate experiments. Survival cell was determined by LDH detection kit from ELISA reader. N: Normal, NaCN: sodium cyanide. *; Significantly different from normal are indicated ($p<0.05$). **; Significantly different from normal are indicated ($p<0.05$).

LDH활성에 미치는 영향 - 보통 신경세포의 세포사는 중추신경이나 척추신경의 신경의 상에 의해 유발되는데 NaCN에 의한 신경세포의 상해는 신경세포의 생존에 밀접한 관계가 있다. 따라서 신경세포의 최종적인 현상으로 NaCN에 의한 신경세포의 세포사의 관련성을 확인하기 위해 LDH의 활성도를 측정하여 관찰한 결과 Fig. 3에서처럼 정상군에 비해 NaCN에 의한 신경세포는 정상군 경우에는

$8\pm 3.5\%$ 에 비해 NaCN에 의한 세포사의 비율은 약 $90\pm 2.0\%$ 이고, NaCN와 OMU처리한 실험군 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 각각 72 ± 2.5 , 11 ± 4.5 이었는데 이는 NaCN에 의해 유도되는 신경상해는 OMU군에서 신경상해 과정을 억제하는 유의성이 ($p<0.05$) 있으며 세포사의 지연을 유도하는 것으로 사료된다. 한편 cyanide는 미토콘드리아내 산소유리기 생성을 유도하여 세포막에서 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 질소자유기의 하나인 nitric oxide (NO)와 상호 작용함으로써 독성이 강한 물질인 peroxynitrite을 생성하여 세포사를 초래한다는 결과와 유사하였다.¹¹⁾

신경세포의 DNA fragmentation에 미치는 영향 - 세포사가 일어날 경우 자가효소에 의해 세포내의 염색체가 잘라지게 되면 약 200-400 bp만큼씩 불연속적인 절편이 존재하게 되는데 세포사의 일차적인 과정인 세포핵의 변화를 관찰할 필요가 있기 때문에 OMU 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 해서 6 well에 10^3 cell 세포수의 하룻밤 배양한 세포사를 억제되는 정도를 DNA를 분리하여 DNA fragmentation를 조사하여 본 결과 Fig. 4에서처럼 정상군에서는 ladder가 보이지 않지만 대조군의 경우에는 1 Kbp 이하에서 불연속적인 band가 존재하였고 OMU군에서는 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도이상 처리시 ladder가 강하게 소멸되는 경향으로 보였는데, cyanide가 세포막의 불포화지방산을 과산화시켜 지질과산화반응을 가속화시킬 뿐만 아니라, 세포질내의 protein kinase C (PKC)와 같은 이차전달자의 변성, 단백질 및 DNA 합성억제를 촉진시켜서 신경세포 사멸을 초래하지만 OMU가 이를 미토콘드리아내의 산소유리기를 소거하여 세포사멸을 보호효과를 가진다고 사료된다.¹⁷⁾

세포주기에 미치는 영향 - NaCN에 의한 신경상해가 유도된 신경아세포암 neuroblastoma cell lines에서 OMU가 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 분석한 결과는 Fig. 5에서처럼 세포사가 유도될 경

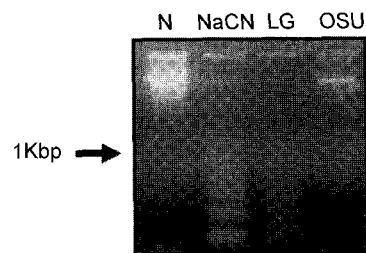


Fig. 4. Effects of OMU on DNA fragmentation. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from cells. M, DNA-HindIII digest was used as molecular weight markers. Cells were treated with 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ of OMU for 12 h. Cells were incubated for 12 h. To initiate DNA fragmentation. The result of a typical experiment of three replicates is shown. DNA fragments were analyzed by 2.0% agarose gel electrophoresis.

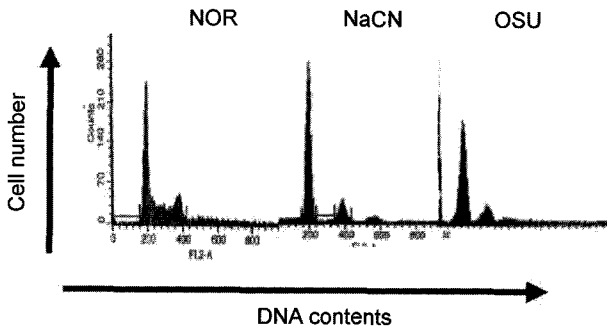


Fig. 5. Effect of OMU on the cell cycle distribution of NaCN-induced neurotoxicity in cultured neuroblastoma cells. Representative examples of the cell cycle effects of OMU. The cells were treated with OMU as indicated, stained with propidium iodide, and the DNA content was analyzed by fluorescence flow cytometry. Arrest of position of the G₀/G₁ peak, progressed by apoptotic cells. The experiment was repeated four times and representative histograms are presented. Cellular DNA content was determined by flow cytometry of propidium iodide-stained cells as described under 'Experimental Procedures.' The left peak in each profile reflects cells with 2N DNA content, and the right peak cells with 4N DNA content. Cells were suspended in PBS, pH 7.4, and analyzed by flow cytometry for a total of 20,000 events.

우 세포주기에서 일차적으로 변화를 보이는데 보통 세포사나 G₀/G₁의 정지 내지 sub G₀/G₂가 유도되는 경우와 일반적인 현상으로 NaCN에 의한 세포사가 발생시 세포주기의 특정단계에서 세포주기를 flow cytometry로 조사한 결과로 정상군에서는 G₀/G₁단계에서는 59.2%, S단계는 10%이었으며 G₂/M단계는 25.5%정도로 대조군 경우 G₀/G₁단계에서는 71.4%, S단계는 5%이었으며, G₂/M단계는 21.5% 정도로 나타 내었는데 반해 50 µg/ml 농도처리시 G₀/G₁ 단계에서는 59.7%, S단계는 7%이었으며 G₂/M단계는 23%로 나타내었 으며 OMU군이 NaCN에 의한 신경세포의 신경상해로 G₀/G₁ 단계에서 정지시키는 세포주기의 진행을 촉진시키므로 세포 증식을 촉진하기 때문이라 사료된다. 따라서 OMU는 NaCN에 의한 신경세포의 세포주기를 정지시키는 상태를 다시 회복시켜 세포사를 억제하거나 개선시키는 효과를 유도하는 것으로 시사되어지며 이는 신경상해 치료에 적용될 수 있으리라 사료되어진다.

Neurite outgrowth 길이 변화에 미치는 영향 - NaCN에 의한 신경세포의 신경돌기 상해가 신장 세포사에 영향을 주기 때문에 신경이 손상을 입은 세포의 신경돌기는 정상군에서의 신경돌기는 잘 발달되어 분지되어 있으나, NaCN에 의한 신경돌기가 손상을 입은 경우는 신장이 억제되는 상태로 나타내고 있으며, OMU에 의한 25, 50 µg/ml로 처리시 신경돌기 가 자라게 되는 양상을 neurite outgrowth length로

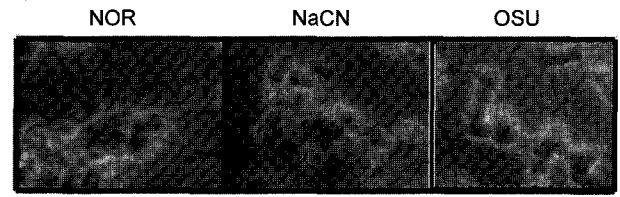


Fig. 6. OMU induces neurite outgrowth length. NaCN-induced neurotoxicity in cultured neuroblastoma cells were cultured for 5 h in the presence of the NGF (50 ng/ml) and OMU. Neurite outgrowth was visualized by phase-contrast microscope. All results are the means±S.D from 200 cells. *, Significantly different from normal are indicated ($p<0.05$). **, Significantly different from normal are indicated ($p<0.05$).

환산하여 조사한 결과, Fig. 6에서처럼 대조군을 0.55±0.2로 환산시 정상군은 4.25±2.5이고 OMU의 농도를 25, 50 µg/ml로 증가하면 할수록 수치가 각각 약 1.55±0.35 4.15±3.5의 수치를 보였는데, OMU의 농도가 증가할수록 neurite outgrowth length가 유의성 있게 증가한다는 것을 알 수 있었다. 한편, Yahagi는 고양이의 cardiac sympathetic nerves에서 cyanide의 norepinephrine efflux를 통해 신경세포의 사멸에 대해 보고하였는데,¹⁴⁾ NaCN로 인한 세포사는 neurite outgrowth의 신장을 억제하여 신경상해를 초래하거나 기능을 상실하게 되지만 OMU가 신경돌기를 신장시켜서 신경상해를 개선 내지 보호하는 성분이 함유하리라 사료된다.

결론

OMU에 대한 NaCN에 의해 유도된 酸素自由基의 산화적 손상에 의하여 유발되는 신경장애에 준하여 신경세포의 신경보호 및 재생효과를 확인하였다. 신경아세포암 세포주는 오수유 MeOH추출액 (OMU)로부터 신경세포의 상해유도로 인한 세포사와 신경세포 파괴에 대한 보호효과는 형태학적으로 큰 변화를 유도하고 25 µg/ml에서 신경세포의 생존과 신경돌기의 출현을 유도하였다. 신경세포의 세포사는 정상군 경우 4±3.5%인데 반해 약 92±2.0%이고, NaCN와 OMU를 처리한 실험군 25, 50 µg/ml에서는 약 82, 17±2.5%이었고 신경세포의 생존에 대한 LDH의 활성도는 NaCN에 의한 세포사의 비율은 약 90±2.0이고, NaCN와 OMU처리한 실험군 25, 50 µg/ml에서는 각각 72±2.5, 11±4.5이었다. DNA fragmentation는 OMU군에서 25 µg/ml농도이상 처리시 ladder가 강하게 소멸되는 경향으로 보였고 flow cytometry로 50 µg/ml 농도처리시 G₀/G₁단계에서는 59.7%, S단계는 7%이었으며 G₂/M단계는 23%로 나타내어 세포주기의 진행을 촉진시켜서 세포 증식을 증가시켰음을 알 수 있었다. Neurite outgrowth length신장 경우 대조군을 0.55±0.2로 환산시 정

상군은 4.25 ± 2.5 이고 OMU의 농도를 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하면 할수록 수치가 각각 약 1.55 ± 0.35 4.15 ± 3.5 의 수치를 보여 OMU의 농도가 증가할수록 neurite outgrowth length가 유의성 있게 증가한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 NaCN로 인한 세포사로 신경상해를 초래하거나 기능을 상실하게 되는데 OMU는 신경돌기를 신장시켜서 신경상해를 개선 내지 보호하는 성분이 함유하리라 사료된다.

사 사

본 연구는 2003년도 국민대학교 학술연구비에 의하여 수행되었으며, 이에 감사사를 드립니다.

인용문헌

- Ha, H.J., Kwon, Y.S., Park, S.M., Shin, T., Park, J.H., Kim, H.C., Kwon, M.S., and Wie, M.B. (2003) Quercetin attenuates oxygen-glucose deprivation- and excitotoxin-induced neurotoxicity in primary cortical cell cultures. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 544-6.
- Luo, X., Weber, G.A., Zheng, J., Gendelman, H.E., and Ikezu, T. (2003) C1q-calreticulin induced oxidative neurotoxicity: Relevance for the neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.* **135**: 62-71.
- Marco, S., Canudas, A.M., Canals, J.M., Gavaldà, N., Perez-Navarro, E., and Alberch, J. (2002) Excitatory amino acids differentially regulate the expression of GDNF, neurturin, and their receptors in the adult rat striatum. *Exp. Neurol.* **174**: 243-52.
- Scott, H.L., Pow, D.V., Tannenberg, A.E., and Dodd, P.R. (2002) Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **22**: RC206.
- Gao, X.D., Ye, W.C., Yu, A.C., Zhang, Y., Tan, R.X., Li, M., and Hsiao, W.L. (2003) Pulsatilloside A and anemoside A3 protect PC12 cells from apoptosis induced by sodium cyanide and glucose deprivation. *Planta Med.* **69**: 171-4.
- Warke, V.G., Nambiar, M.P., Krishnan, S., Tenbrock, K., Geller, D.A., Koritschoner, N.P., Atkins, J.L., Farber, D.L., and Tsokos, G.C. (2003) Transcriptional Activation of the Human Inducible Nitric-oxide Synthase Promoter by Kruppel-like Factor 6. *J. Biol. Chem.* **278**: 14812-14819.
- Lees, G.J. and Sandberg, M. (1991) Evoked field potential changes in the rat hippocampus produced by toxic doses of glutamate agonists and metabolic inhibitors: correlation with subsequent neuronal death. *Exp. Brain Res.* **85**: 625-30.
- Peruche, B., Ahlemeyer, B., Brungs, H., and Kriegelstein, J. (1990) Cultured neurons for testing antihypoxic drug effects. *J. Pharmacol. Methods* **23**: 63-77.
- Weiss, J., Goldberg, M.P., and Choi, D.W. (1986) Ketamine protects cultured neocortical neurons from hypoxic injury. *Brain Res.* **380**: 186-90.
- Hutter-Paier, B., Grygar, E., Loibner, M., Skofitsch, G., and Windisch, M. (2000) Effects of NaCN and ionomycin on neuronal viability and on the abundance of microtubule-associated proteins MAP1, MAP2, and tau in isolated chick cortical neurons. *Cell Tissue Res.*, **302**: 39-47.
- Jensen, M.S., Ahlemeyer, B., Ravati, A., Thakur, P., Mennel, H.D., and Kriegelstein, J. (2002) Preconditioning-induced protection against cyanide-induced neurotoxicity is mediated by preserving mitochondrial function. *Neurochem. Int.*, **40**: 285-93.
- Jensen, M.S., Nyborg, N.C., and Thomsen, E.S. (2000) Various nitric oxide donors protect chick embryonic neurons from cyanide-induced apoptosis. *Toxicol. Sci.*, **58**: 127-34.
- Macey, P.M., Richard, C.A., Rector, D.M., Harper, R.K., and Harper, R.M. (2000) State influences on ventral medullary surface and physiological responses to sodium cyanide challenges. *J. Appl. Physiol.*, **89**: 1919-27.
- Yahagi, N., Yamazaki, T., and Akiyama, T. (2000) Either desipramine or TMB-8 suppresses cyanide-induced norepinephrine efflux from *in vivo* cardiac sympathetic nerves of cats. *Brain Res.*, **864**: 157-61.
- Patel, M.N., Peoples, R.W., Yim, G.K., and Isom, G.E. (1994) Enhancement of NMDA-mediated responses by cyanide. *Neurochem. Res.*, **19**: 1319-23.
- Kawai, Y., Qi, J., Comer, A.M., Gibbons, H., Win, J., and Lipski, J. (1999) Effects of cyanide and hypoxia on membrane currents in neurons acutely dissociated from the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Brain Res.*, **830**: 246-57.
- Motie, M., Kassner, R.J., Meyer, T.E., and Cusanovich, M.A. (1990) Kinetics of cyanide binding to Chromatium vinosum ferricytochrome c. *Biochemistry*, **20**: 1932-6.
- 육창수(1997) 아세아생약도감, 서울, 도서출판경원: p. 307.
- 김혜자(1995) 오수유로부터 Acetylcholinesterase활성저해 성분의 분리 및 그 작용기전, 서울, 서울대학교.
- 김태정(1996) 한국의 자원식물 II, 서울, 서울대학교 출판부: p. 134.
- 이상인(1981): 본초학, 서울, 수서원: p. 412.
- 이상인, 안덕균, 신민교(1982) 한약림상응용, 서울, 정보사: p. 234.
- 정보섭, 신민교(1990) 향약대사전, 서울, 영림사: p. 786
- 중약대사전(1982) 서울, 정보사: p. 1118.
- 중초약학(1983) 향향, 상무인서관: p. 299.
- 왕본상(1997) 현대중약약리학, 천진, 천진과학기술출판사: p. 608.

(2003년 6월 16일 접수)