

葛根의 腦海馬 신경세포 손상보호와 抗酸化 효능에 대한 연구

김상현 · 김연섭*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학

Neuroprotective and Anti-Oxidative Effect of Puerariae Radix on Hippocampal Neurons and BV-2 Microglia Cells

Sang Hyun Kim, Youn Sub Kim*

Department of Anatomy-Pointlogy College of Oriental Medicine, Kyungwon University

This study demonstrated neuroprotective and anti-oxidative effects of Puerariae Radix for cerebral ischemia. Neuroprotective effects were studied by using oxygen/glucous deprivation of the organotypic hippocampal slice cultures to complement limitations of in vivo and in vitro models for cerebral ischemia study. Anti-oxidative effects were studied on BV-2 microglia cells damaged by H₂O₂ and nitric oxide. The results obtained are as follows; The groups treated with 0.5 and 5 μg/ml of Puerariae Radix revealed significant decreases of neuronal cell death area and cell death area percentages in CA1 region of ischemic damaged hippocampus cultures during whole 48 hours of the experiment. The groups treated with 0.5 and 5 μg/ml of Puerariae Radix revealed significant decreases of neuronal cell death area and cell death area percentages in DG region of ischemic damaged hippocampus cultures during whole 48 hours of the experiment. The groups treated with 0.5 and 5 μg/ml of Puerariae Radix revealed significant decreases of TUNEL-positive cells in both CA1 region and DG region of ischemic damaged hippocampus cultures. The group treated with 50 μg/ml of Puerariae Radix demonstrated significant decrease of TUNEL-positive cells in CA1 region. The groups treated with 0.5 and 5 μg/ml of Puerariae Radix revealed significant decreases of LDH concentrations in culture media of ischemic damaged hippocampus cultures. The groups treated with 0.5 and 5 μg/ml of Puerariae Radix revealed significant increases of cell viabilities of BV-2 microglia cells damaged by H₂O₂. The group treated with 5 μg/ml of Puerariae Radix revealed significant increase of cell viability of BV-2 microglia cells damaged by nitric oxide. These results suggested that Puerariae Radix of cerebral ischemic revealed neuroprotective effects through the control effect of apoptosis and oxidative damages.

Key words : Neuroprotection, Anti-Oxidation, Puerariae Radix, Hippocampal Neurons, BV-2

서론

葛根은 콩과(Leguminosae)에 속한 다년생 藤本인 葛 (Pueraria Thunbergiana Radix)의 뿌리를 건조한 것으로 性味가 甘辛, 平하다. 辛味가 發散透表하여 解肌除熱하는 작용이 있으므로 風寒, 風熱에 사용하며, 生津止渴의 효능이 있어 胃熱口渴, 消渴 등에 사용한다 하였다. 또한 散鬱火, 解酒毒하며, 傷寒中風과 陽明頭痛, 腸風瘡疹 등에 활용된다고 하였다¹⁻⁵⁾.

腦細胞에 혈액순환과 에너지 공급이 차단되는 腦虛血은 신경 세포가 존재하는 시간이 극히 제한되어 있기에 일정시간 이상 지속되면 腦細胞의 비가역적 손상으로 인해 뇌경색 등의 다양한 경로로 腦細胞 손상을 일으키므로 신경세포 손상을 최소화시킬 수 있는 적절한 신경보호제의 개발이 腦虛血치료의 관건으로 대두하게 되었다.

腦의 신경세포와 관련된 葛根의 효능에 대한 연구들을 살펴 보면, 葛根이 alcohol로 손상을 준 흰쥐의 腦海馬에서 c-Fos 발현을 유의하게 감소시키고 신경세포의 분화를 증가시켰다고 하였으며^{12,13)}, 葛根의 유효성분인 puerarin은 抗酸化작용을 통하여 기억력 감퇴에 유의한 효능이 있다고 하였다¹⁴⁾. 직접적으로 腦虛血 또는 신경세포 손상의 보호작용을 살펴본 것으로는 葛根의

* 교신저자 : 김연섭, 성남시 수정구 복정동 산65 경원대학교 한의과대학

· E-mail : ysk@kyungwon.ac.kr, · Tel : 031-750-5420

· 접수 : 2005/01/27 · 수정 : 2005/02/28 · 채택 : 2005/03/25

유효성분인 puerarin이 中大腦動脈 폐쇄에 의한 腦浮腫을 유의하게 감소시켜 腦虛血의 신경병리학적 손상에 유의한 효능이 있다는 보고¹⁵⁾와 大腦皮質 신경세포의 glutamate에 의한 손상에 대하여 손상보호 효능이 있다는 보고¹⁶⁾ 등이 있었다. 이런 보고들이 葛根이 뇌허혈로 인한 신경세포사멸에 억제 효과가 있음을 추측케 하는 결과이다.

이에 저자는 韓方臨床에서 腦虛血의 목적으로 사용하지 않고 있는 葛根 單味劑로 腦虛血을 유발한 후 신경세포 손상보호와 抗酸化 효능이 있는지를 살펴봄으로써 향후 臨床에서 中風 관련 질환에 활용해볼 수 있는 근거를 제시할 필요가 있다고 생각하였다. 따라서 저자는 腦虛血에 대한 葛根의 효능을 관찰하기 위하여 腦海馬의 臟器樣 組織培養 (organotypic hippocampal slice culture, OHSC) 방법¹⁷⁾을 이용하여 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷¹⁸⁾에 대한 신경세포 손상보호 효능을 관찰하였으며, 또한 腦組織의 손상시 일어나는 炎症反應 및 免疫反應과 관련된 신경아교세포¹⁹⁾에 대한 葛根의 抗酸化 효능을 관찰하기 위하여 미교세포 세포주인 BV-2 세포에 H₂O₂ 및 nitric oxide 손상²⁰⁾을 일으켜 이에 대한 抗酸化 효능을 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 약물

실험에 사용한 한약물은 葛根 (Pueraria Thunbergiana Radix, 진흥약업사, 한국)으로 200g을 증류수 3,000ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 완전히 동결건조시켜 한약물 추출액 75g을 얻어 실험에 사용하였다.

2. 腦海馬 組織 채취 및 배양^{21,22)}

실험에 사용한 腦組織은 7일령 Sprague-Dawley계 흰쥐의 腦海馬 (hippocampus)로 조직의 전처리 및 배양 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 흰쥐의 머리를 단두한 후 곧바로 안과용 가위로 頭皮와 頭蓋骨을 제거하고 大腦를 적출하였다. 적출한 大腦를 해부용 조직배양액 (MEM 500ml + 25mM HEPE + 4mM L-glutamine, pH 7.4)이 담긴 실험쟁반에 옮기고 수술용 현미경을 이용하여 양쪽 大腦半球에서 각각의 腦海馬를 적출하였다. 적출된 腦海馬를 조심스럽게 조직절편기의 상관에 올려놓은 후 350 μ m 두께로 조직절편을 만들었다. 각각 분리된 腦海馬 조직을 조직배양망에 붙인 다음, 1ml의 조직배양액이 담겨있는 6-well culture dish에 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 20mM HEPES, 6g/L glucose, 1mM L-glutamine을 첨가하고 여과한 다음 pH를 7.25~7.30으로 조정하였으며, 50mg/ml의 streptomycin-penicillin을 첨가하였다. 조직배양액은 조직을 배양하는 동안 3일에 한번씩 교환해 주었다.

3. 虛血損傷 유발 및 葛根의 처리²³⁾

腦海馬組織에서 腦虛血과 유사한 虛血損傷은 산소와 glucose 공급을 완전히 차단하는 방법 (oxygen-glucose deprivation, OGD)을 사용하였으며, 그 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 10일 동안 일반적인 조직배양 후 광학현미경을 이용하여 조직의 구조가 온전하지 않은 조직을 선별하여 제거하고, 이후 無酸素 chamber (85% nitrogen, 10% carbon dioxide, 5% hydrogen) 안에서 ischemia balanced salt solution (IBSS, 143.4mM NaCl, 5mM HEPES, 5.4mM KCl, 1.2mM MgSO₄, 2.0mM CaCl₂, 1.2mM NaH₂PO₄)가 담긴 culture dish로 腦海馬組織의 insert를 옮기고 60분 동안 산소와 glucose 공급이 차단된 OGD에 의한 虛血損傷을 유발시켰다. IBSS는 無酸素 chamber 안에 propidium iodide (PI)가 첨가되고 glucose가 없는 조건에서 OGD 유발 12시간 전에 넣어둠으로써 안에 녹아있는 여분의 O₂를 완전히 제거시켰다. 정확한 시간동안 산소와 glucose 공급을 차단한 다음 미리 준비된 PI가 들어있는 신선한 혈청이 포함되지 않은 조직배양액으로 腦海馬組織의 조직배양망을 옮긴 후 정상산소상태 (normoxia condition, 95% air-5% CO, 36.5°C)에서 48시간 동안 조직을 재배양하였다. 한약물의 처리는 갈근추출액을 0.5, 5 및 50 μ g/ml의 농도로 虛血損傷 유발 45분전부터 이후 48시간 동안 각 단계의 조직배양액에 첨가시켰다.

4. Propidium iodide 염색 및 신경세포사멸 면적의 측정²⁴⁾

腦海馬組織을 PI가 5mg/ml로 첨가된 조직배양액의 새로운 6 well culture dish에 옮기고 2시간 동안 사전 배양한 다음 연속하여 위의 조직배양방법에서 설명한 각 단계별 조직배양액에 PI를 5 μ M 농도로 첨가하여 조직을 배양하였다. OGD의 虛血損傷과 한약물 처리 전에 형광현미경 (Axiovert S100, Zeiss)을 이용하여 정상적인 상태의 腦海馬組織 PI염색 영상을 얻었으며, 60분간의 OGD 후 6, 18, 24 및 48시간 후에 각각 형광현미경을 사용하여 PI염색 영상을 얻었다. 형광현미경의 UV filter는 rhodamine filter를 사용하였다. 저장된 PI염색 영상을 컴퓨터 영상분석기로 옮긴 다음 NIH image software (Ver. 1.62)를 사용하여 腦海馬의 CA1 및 DG구역 전체면적과 PI에 의하여 적색으로 염색된 신경세포사멸의 면적 및 그 비율을 측정하였다.

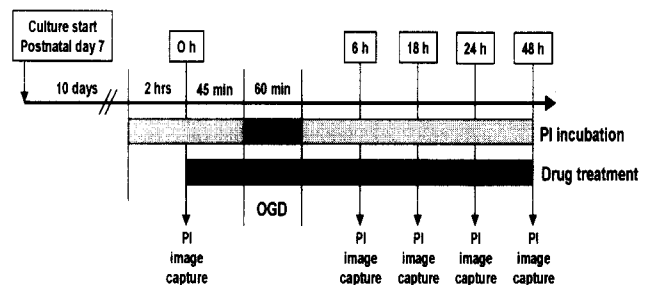


Fig. 1. Time schedule of drug treatment and PI stained image capture during organotypic hippocampal slice culture

5. TUNEL 염색 및 양성반응 신경세포 수의 측정²⁵⁾

腦海馬組織에 OGD에 의한 虛血損傷을 유발한 48시간 후에

腦海馬組織을 1% paraformaldehyde (PFA)를 포함한 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 10분간 고정하고 5분간 2회 세척한 다음 ethanol-acetic acid 용액으로 -20℃에서 20분간 재고정하였다. TUNEL 염색은 3% H₂O₂-PBS에서 5분간, working strength TdT enzyme (70% reaction buffer + 30% TdT enzyme)으로 37℃에서 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 腦海馬의 CA1 및 DG구역의 면적을 측정하고 그 면적 내에서 핵이 갈색으로 염색된 TUNEL 양성반응의 신경세포 수를 측정하는 다음 각각 단위면적 (1,000μm²) 당으로 계산하였다.

6. 細胞培養液內 Lactate Dehydrogenase 측정²⁶⁾

腦海馬組織에 OGD에 의한 虛血損傷을 유발한 48시간 후에 腦海馬組織의 배양액내로 분비된 LDH 농도는 전문측정용 kit를 사용하여 측정하였다. 배양액 100μl를 96 well dish에 넣고, diaphorase/NAD+ 혼합용액과 iodotetrazolium chloride-sodium lactate 용액을 100μl 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 50μl를 첨가하여 반응을 중지시키고, ELISA 측정기를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

7. BV-2 미교세포의 배양 및 Oxidative Damage 유발²⁷⁾

미교세포 세포주의 일종인 BV-2 세포를 24-well plate에 well (500μl) 당 1x10⁶ cells가 되도록 조정하고 37℃, CO₂ 세포배양기에서 일반적인 세포배양방법에 따라 배양하였다. 세포가 원하는 만큼 자라면 PBS로 세척한 후 혈청이 포함되지 않은 조직 배양액으로 배양액을 교환해주었다. BV-2세포에 일반적인 oxidative damage를 유발하기 위해서는 H₂O₂를 100μM 단위로 처리하였으며, nitric oxide에 의한 oxidative damage 유발을 위해서는 유해 nitric oxide를 생성하는 sodium nitroprusside (SNP)를 1,500μM 단위로 처리하여 배양하였다.

8. 葛根의 처리 및 세포생존율 측정²⁸⁾

BV-2 미교세포에 각각 H₂O₂와 SNP를 처리하기 1시간 전에 갑근추출물을 0.5, 5 및 50μg/ml의 농도로 처리하고 24시간동안 37℃, CO₂ 세포배양기에서 배양하였으며, 24시간 후 MTT (0.5mg/ml) 용액을 처리하고 2시간동안 재배양하였다. 그 다음 배양액을 제거하고 DMSO를 200μl씩 넣고 잘 혼합한 다음 100μl의 배양액을 채취하여 ELISA 측정기로 540nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

성 적

1. 虛血損傷 腦海馬組織 CA1구역에서 신경세포사멸 면적의 변화
腦海馬 조직의 정상적인 배양상태인 정상군은 조직 전체면

적 19362.4±320.7μm² 중에서 PI에 의하여 염색된 신경세포사멸 면적은 6, 18, 24 및 48 시간 경과에 따라 각각 10.1±8.4, 23.8±9.2, 43.4±11.3 및 57.7±16.7μm² 을 나타내었으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서는 전체면적 19786.5±220.2μm² 중에서 시간 경과에 따라 각각 8186.8±543.3, 9274.0±528.5, 12203.3±874.7 및 12976.2±1400.1μm² 로 현저한 신경세포사멸 면적의 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 葛根 0.5μg/ml을 처리한 군에서는 전체면적 19721.8±320.6 μm² 중에서 시간 경과에 따라 각각 5600.3±628.7, 7632.3±575.9, 9277.4±994.9 및 10161.3±678.2μm²으로 약물처리 전 기간동안 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었다. 葛根 5μg/ml을 처리한 군에서는 전체면적 19820.8±239.8μm² 중에서 시간 경과에 따라 각각 5280.2±666.2, 6809.6±751.4, 8185.3±1140.0 및 9678.0±854.2 μm²으로 역시 약물처리 전 기간동안 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었다. 葛根 50μg/ml을 처리한 군에서는 전체면적 19014.3±438.1 μm² 중에서 시간 경과에 따라 각각 7384.0±1050.3, 7407.2±1195.4, 10586.2±1029.7 및 11272.8±1375.8μm²으로 약물처리 전 기간동안 대조군에 비하여 감소는 하였으나 유의성은 없었다. 그러므로 고농도의 葛根 투여에 의해서는 신경세포사멸 면적 감소의 효과가 관찰되지 않았다 (Fig. 2, 6).

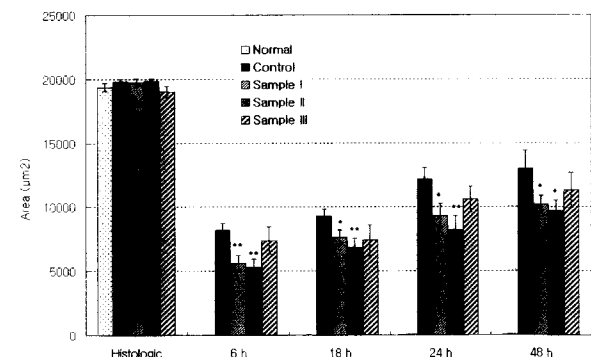


Fig. 2. Effect of Puerariae Radix on PI stained neuronal cell death area in CA1 of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation. Data presented mean ± standard error (n=12). Normal : group of normal control without oxygen-glucose deprivation. Control : group treated with oxygen-glucose deprivation for 60 minutes. Sample I : group treated with 0.5 μg/ml of Puerariae Radix extract after oxygen-glucose deprivation. Sample II : group treated with 5 μg/ml of Puerariae Radix extract after oxygen-glucose deprivation. Sample III : group treated with 50 μg/ml of Puerariae Radix extract after oxygen-glucose deprivation. * : statistical significance compared with control group (*, P<0.05; **, P<0.01).

2. 虛血損傷 腦海馬組織 CA1구역에서 신경세포사멸 면적비율의 변화

腦海馬 組織의 정상적인 배양상태인 정상군에서 CA1구역 전체면적에 대한 신경세포사멸 면적비율은 6, 18, 24 및 48 시간 경과에 따라 각각 0.0±0.0, 0.1±0.0, 0.2±0.1 및 0.3±0.1%를 나타내었으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서는 시간 경과에 따라 각각 41.5±2.9, 46.9±2.8, 61.9±4.8 및 64.8±6.7%로 현저한 신경세포사멸 면적비율의 증가를 나타내었으며, 시간경과에 따라 증가하였다. 산소와 glucose를 박탈한 虛

血損傷 상태에서 葛根 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 시간 경과에 따라 각각 28.5 \pm 3.2, 38.9 \pm 3.0, 47.0 \pm 5.0 및 51.0 \pm 3.3%로 대조군에 비하여 약물처리 전 기간동안 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었다. 葛根 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 시간 경과에 따라 각각 26.7 \pm 3.3, 34.8 \pm 4.3, 41.8 \pm 6.3 및 49.7 \pm 4.9%로 역시 대조군에 비하여 약물처리 전 기간동안 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었다. 葛根 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 시간 경과에 따라 각각 38.4 \pm 5.1, 39.2 \pm 6.7, 55.6 \pm 5.0 및 60.5 \pm 7.8%로 약물처리 전 기간동안 대조군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. (Fig. 3, 6)

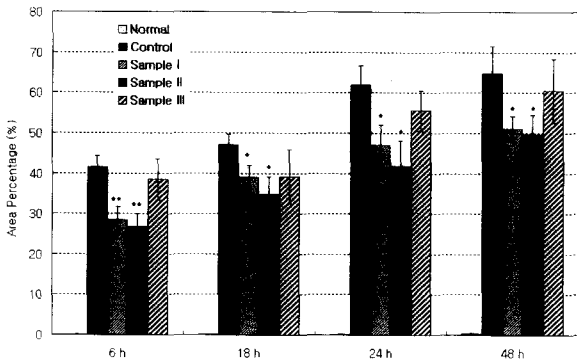


Fig. 3. Effect of Puerariae Radix on area percentage of neuronal cell death in CA1 of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation.

3. 虛血損傷 腦海馬組織 DG구역에서 신경세포사멸 면적의 변화

腦海馬 組織의 정상적인 배양상태인 정상군은 DG구역 전체 면적 4892.3 \pm 159.0 μm^2 중에서 PI에 의하여 염색된 신경세포사멸 면적은 6, 18, 24 및 48 시간 경과에 따라 각각 11.3 \pm 3.4, 28.3 \pm 8.8, 32.0 \pm 6.2 및 45.3 \pm 7.8 μm^2 을 나타내었으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서는 전체면적 5055.2 \pm 243.0 μm^2 중에서 시간 경과에 따라 각각 1214.0 \pm 123.6, 1380.9 \pm 101.3, 1937.2 \pm 294.8 및 2058.6 \pm 300.1 μm^2 로 현저한 신경세포사멸 면적의 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 葛根 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 전체면적 4624.0 \pm 283.3 μm^2 중에서 시간 경과에 따라 각각 790.0 \pm 179.4, 887.5 \pm 116.9, 1151.8 \pm 181.9 및 1277.8 \pm 145.6 μm^2 으로 대조군에 비하여 약물처리 전 기간동안 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었다. 葛根 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 전체면적 4721.5 \pm 194.3 μm^2 중에서 시간 경과에 따라 각각 746.2 \pm 141.6, 803.3 \pm 98.2, 1059.3 \pm 125.8 및 1189.0 \pm 168.4 μm^2 으로 역시 약물처리 전 기간동안 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었으며, 특히 약물처리 18시간 후 부터 더욱 유의한 효능을 나타내었다. 葛根 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 전체면적 4550.5 \pm 174.1 μm^2 중에서 시간 경과에 따라 각각 974.3 \pm 177.4, 1061.9 \pm 210.2, 1351.3 \pm 213.0 및 1557.8 \pm 274.8 μm^2 으로 약물처리 전 기간동안 대조군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 4, 6).

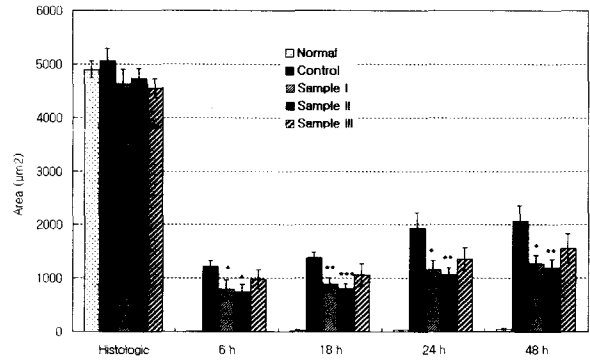


Fig. 4. Effect of Puerariae Radix on PI stained neuronal cell death area in DG of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation.

4. 虛血損傷 腦海馬組織 DG구역에서 신경세포사멸 면적비율의 변화

腦海馬 조직의 정상적인 배양상태인 정상군에서 DG구역 전체 면적에 대한 신경세포사멸 면적비율은 6, 18, 24 및 48 시간 경과에 따라 각각 0.2 \pm 0.1, 0.6 \pm 0.2, 0.7 \pm 0.1 및 0.9 \pm 0.2%를 나타내었으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서는 시간 경과에 따라 각각 24.9 \pm 2.9, 27.7 \pm 2.1, 37.2 \pm 4.8 및 42.0 \pm 7.3%로 현저한 신경세포사멸 면적비율의 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 葛根 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 시간 경과에 따라 각각 16.8 \pm 3.4, 20.1 \pm 2.9, 24.8 \pm 3.6 및 27.8 \pm 2.2%로 대조군에 비하여 약물처리 전 기간동안 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었으며, 특히 약물처리 18시간 및 24시간 후에 더욱 유의한 효과를 나타내었다. 葛根 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 시간 경과에 따라 각각 15.7 \pm 2.8, 17.4 \pm 2.4, 22.7 \pm 2.8 및 26.0 \pm 4.2%로 역시 약물처리 전 기간동안 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었으며, 특히 약물처리 18시간 및 24시간 후에 더욱 유의한 효과를 나타내었다. 葛根 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 시간 경과에 따라 각각 21.4 \pm 4.1, 22.8 \pm 4.2, 29.5 \pm 4.5 및 34.2 \pm 6.3%로 약물처리 전 기간동안 대조군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 그러므로 CA1구역에서와 같이 고농도의 葛根 처리는 유의한 신경세포사멸 면적비율의 감소를 나타내지 못하였다 (Fig. 5, 6).

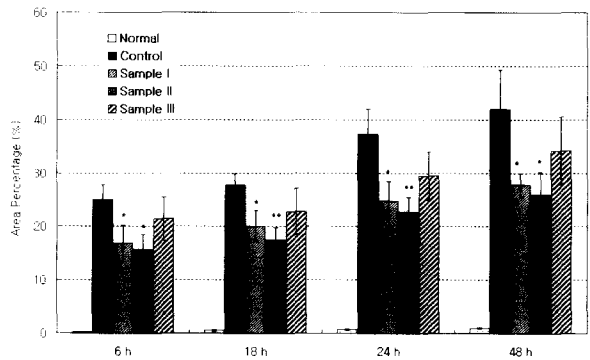


Fig. 5. Effect of Puerariae Radix on area percentage of neuronal cell death in DG of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation.

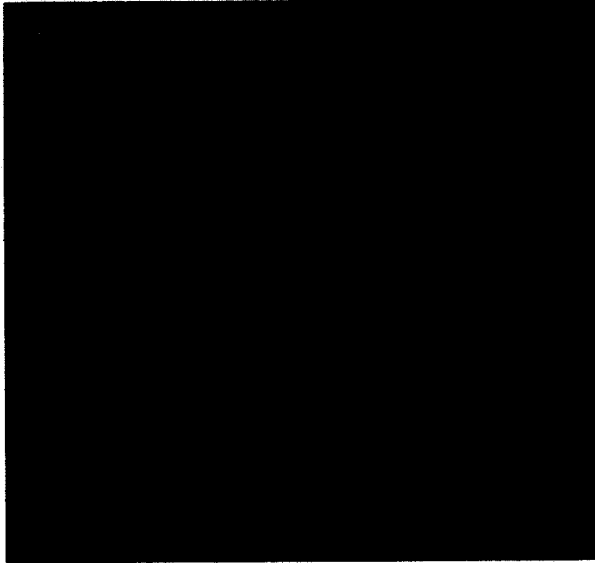


Fig. 6. PI stained sections of organotypic hippocampal slice culture at 24 hours after oxygen-glucose deprivation (section 1, at precondition stage; section 2, normal group; section 3, control group; section 4, sample I group; section 5, sample II group; section 6, sample III group). Groups treated with 0.5 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Puerariae Radix extract show significant decrease of neuronal cell death area (red color PI-stained area) with respect to control group.

5. 虛血損傷의 腦海馬組織 TUNEL 양성반응 신경세포의 변화

정상적인 배양상태인 정상군에서는 TUNEL 양성반응을 보인 신경세포의 수는 단위면적 당 CA1구역에서 1.3 ± 0.2 개, DG구역에서 1.8 ± 0.5 개가 관찰되었으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서는 CA1구역에서 71.3 ± 10.5 개, DG구역에서 63.5 ± 11.4 개로 虛血損傷에 의하여 TUNEL 양성반응 신경세포 수의 현저한 증가가 관찰되었다. 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 葛根 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 CA1구역에서 30.6 ± 4.4 개, DG구역에서 25.6 ± 3.8 개로 모두 대조군에 비하여 $P < 0.01$ 의 유의한 감소를 나타내었다. 葛根 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 CA1구역에서 32.7 ± 5.1 개, DG구역에서는 28.7 ± 5.3 개로 역시 대조군에 비하여 모두 $P < 0.01$ 의 유의성 있는 TUNEL 양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다. 葛根 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 CA1구역에서 46.6 ± 8.2 개로 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 감소를 나타내었으나, DG구역에서는 49.8 ± 9.6 개로 대조군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 7, 8).

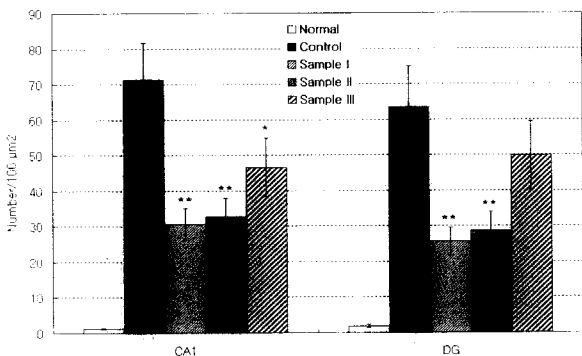


Fig. 7. Effect of Puerariae Radix on TUNEL-positive cells in CA1 and DG of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation.

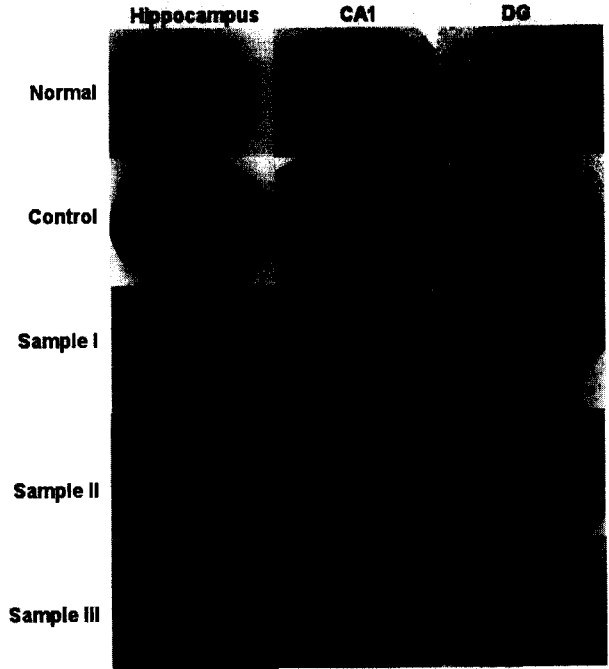


Fig. 8. TUNEL-positive cells in CA1 and DG of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation. Groups treated with 0.5 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Puerariae Radix extract show significant decrease of TUNEL-positive cells (dark brown color) with respect to control group.

6. 虛血損傷 腦海馬 組織培養液內 LDH 농도의 변화

정상적인 배양상태인 정상군에서는 배양액내 LDH의 농도가 $374.8 \pm 61.3 \text{ U/L}$ 로 관찰되었으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서는 $1076.5 \pm 83.1 \text{ U/L}$ 로 약 300% 이상 현저한 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 葛根 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 $766.8 \pm 109.5 \text{ U/L}$ 로 대조군에 비하여 28.8% 감소하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 감소를 나타내었다. 葛根 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 $704.8 \pm 134.3 \text{ U/L}$ 로 대조군에 비하여 34.5% 감소하여 역시 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 감소를 나타내었으나, 葛根 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 $912.0 \pm 115.1 \text{ U/L}$ 로 대조군에 비하여 15.3%만 감소하여 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 9).

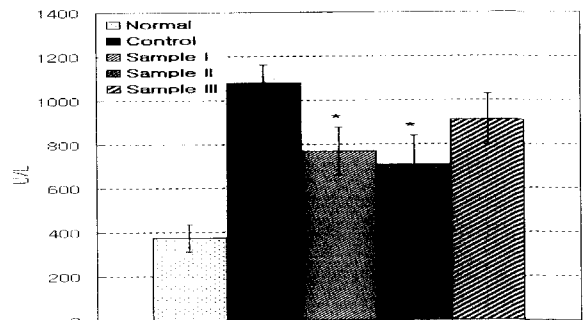


Fig. 9. Effect of Puerariae Radix on LDH levels in culture media of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation.

7. H_2O_2 손상에 대한 BV-2 미교세포 생존율의 변화

정상적인 배양상태인 정상군에서의 세포생존율을 100%로

하였을 때 H₂O₂를 처리한 대조군은 31.2±1.6%로 세포 생존율이 현저하게 감소하였으며, H₂O₂와 함께 葛根 0.5μg/ml을 처리한 군에서는 40.2±1.4%로 대조군에 비하여 28.8% 증가하여 P<0.001의 매우 유의성 있는 세포생존율의 증가가 관찰되었다. 葛根 5μg/ml을 처리한 군에서는 41.8±4.0%로 대조군에 비하여 34.0% 증가하여 P<0.05의 유의성 있는 세포생존율의 증가가 관찰되었으나, 葛根 50μg/ml을 처리한 군에서는 37.1±2.9%로 대조군에 비하여 18.9%만 증가하여 통계학적인 유의성은 없었다 (Fig. 10).

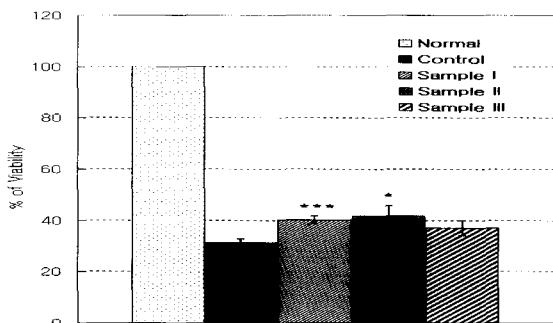


Fig. 10. Effect of Puerariae Radix on Cell Viability of BV-2 microglia cells damaged by H₂O₂.

8. Nitric Oxide 손상에 대한 BV-2 미교세포 생존율의 변화

정상적인 배양상태인 정상군에서의 세포생존율을 100%로 하였을 때 nitric oxide 유도를 위하여 SNP를 처리한 대조군은 41.2±8.7%로 세포생존율이 현저하게 감소하였으며, SNP와 함께 葛根 0.5μg/ml을 처리한 군에서는 60.5±8.3%로 대조군에 비하여 46.9% 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 葛根 5μg/ml을 처리한 군에서는 60.9±3.2%로 대조군에 비하여 47.7% 증가하여 P<0.05의 유의성 있는 증가를 나타내었으며, 葛根 50μg/ml을 처리한 군에서는 55.2±5.4%로 대조군에 비하여 33.9% 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 11).

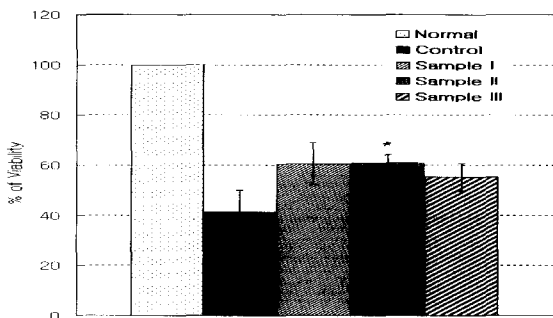


Fig. 11. Effect of Puerariae Radix on Cell Viability of BV-2 microglia cells damaged by nitric oxide.

고찰

葛根은 콩과(Leguminosae)에 속한 다년생 藤本인 칩 (Pueraria Thunbergiana Radix)의 뿌리를 건조한 것으로 神農本草經에 처음으로 기재된 이래 현재 韓方 臨床에서 널리 활용되

고 있는 약재이다. 性味が 甘辛, 平하다. 辛味が 發散透表하여 解肌除熱하는 작용이 있으므로 風寒, 風熱에 사용하며, 生津止渴의 효능이 있어 胃熱口渴, 消渴 등에 사용한다 하였으며, 또한 散鬱火, 解酒毒하며, 傷寒中風과 陽明頭痛, 腸風瘡疹 등에 활용된다고 하였다¹⁻⁵. 약리작용으로도 解熱과 血壓降下 작용이 있으며, 腦血流 循環異常을 회복시키는 효능이 있고, 高血壓과 動脈硬化症에서도 腦血流가 개선된다고 하였다. 또한 冠狀動脈 擴張 작용과 心臟機能 개선 및 抗不整脈 작용이 있으며, 기억력 증강 작용이 있다고 보고된 바 있다³⁻⁵. 또한 갈근의 解酒毒 효능과 관련하여 강 등²⁹과 김 등³⁰은 알코올 의존환자 및 정상 성인에 葛根을 투여한 결과 기초 음주욕구를 감소시키고 혈중 알콜 농도를 저하시키는 효과가 있다고 하였으며, 이 외에도 그 alcohol 대사^{6,7} 및 alcohol로 인한 肝損傷에 대한 연구⁸⁻¹¹들이 많이 수행되었다.

최근 연구에 의하면 葛根이 alcohol로 손상을 준 흰쥐의 腦海馬에서 c-Fos 발현을 유의하게 감소시키고¹², 신경세포의 분화를 증가시켰다고 하였다¹³. 이러한 연구 결과들은 葛根이 腦虛血에 대하여 유의한 효능을 나타낼 수 있음을 추측케 하는 결과들이다. 직접적인 腦虛血 또는 신경세포 손상의 보호작용에 대하여는 中大腦動脈 閉鎖에 의한 腦浮腫을 유의하게 감소시켜 腦虛血의 神經病理學的 손상에 유의한 효능이 있다는 보고¹⁵와 大腦皮質 신경세포의 glutamate에 의한 손상에 대하여 손상보호 효능이 있다는 보고¹⁶ 등이 있었다.

본 실험에서는 葛根의 腦虛血에 대한 신경세포 보호효능을 관찰하기 위하여 in vivo 동물실험과 in vitro 세포실험의 중간적인 형태인 腦海馬의 臟器樣 組織培養方法을 사용하였다. 腦海馬의 臟器樣 組織培養方法은 약물의 효능을 검색하는데 많은 장점을 가지고 있다²⁹. 신경세포 배양방법에서는 약물의 수송이나 신경세포의 미세한 주변환경을 정확히 조절할 수 있고, 약물의 전달이 용이하다는 장점을 가지고 있으며, 세포사멸을 염색을 통하여 정확히 정량화할 수 있는 장점이 있으나 동일함을 증명할 수 있는 세포주의 확보가 어려운 점과 정상적인 神經連接을 가지고 있지 않다는 것이 단점이다. 또한 급성으로 신경조직을 절편으로 만들어 배양하는 방법은 신경세포의 배양방법에 비하여 많은 장점을 가지고 있다. 특히 급격한 대사억제 즉, 虛血을 연구하는 데는 큰 장점이 있다. 그러나 12-24시간이 지나면 상태가 나빠져서 손상된 세포와 건강한 세포가 공존하게 되고 이러한 점이 자연성신경세포사멸을 연구하는 데는 단점이다^{31,32}. 臟器樣 切片培養 (organotypic slice culture) 방법은 in vivo에서 볼 수 있는 신경세포간의 神經連接을 온전히 갖고 있다는 점에서 많은 장점이 있다. 특히 腦海馬組織의 臟器樣 切片培養方法은 산소와 glucose 박탈에 의한 腦虛血 모델에 대한 신경계 보호효능 검색, 中樞神經系 退行過程 및 神經連接의 excitotoxicity 등을 연구하는 데 많이 이용되고 있다^{33,34}.

腦海馬의 臟器樣 組織培養에서 산소와 glucose 박탈에 의한 虛血損傷을 유발하고 葛根을 처리한 다음 신경세포사멸의 면적을 측정하기 위해서 조직을 propidium iodide (PI)로 형광염색 하였다. PI는 형광염색 염료로 조직배양시 생염색을 위하여 많이 사용되며, 세포 활성을 real time imaging으로 보여줄 수 있는 장

점이 있다. PI는 건강한 세포에는 침투하지를 못하나 여러 가지 요인에 의한 세포사멸 시 세포막의 손상에 의하여 세포내로 침투하여 핵에 들어가 DNA에 부착하여 형광을 발색하게 되므로 세포사멸을 증명하는데 많이 사용된다^{35,36)}. 본 실험의 결과, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서는 시간 경과에 따라 현저한 신경세포사멸 면적 및 면적비율의 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 葛根 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 군에서는 약물처리 전 기간동안 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 이상의 유의한 신경세포사멸 면적 및 면적비율의 감소가 관찰되었다. 葛根 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 군에서는 대조군에 비하여 감소는 하였으나 유의성은 없었다. 이러한 결과는 葛根이 腦虛血에 민감한 腦海馬의 CA1구역에서 腦虛血에 의한 신경세포사멸을 유의하게 억제하는 효능이 있는 것을 나타내며, 0.5 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 우수한 효능을 나타내는데 비하여 고농도의 葛根 투여에 의해서는 신경세포사멸 면적 감소의 효과가 관찰되지 않았다. 腦海馬의 DG구역에서도 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서는 현저한 신경세포사멸 면적 및 면적비율의 증가가 관찰되었으며, 산소와 glucose를 박탈한 상태에서 葛根을 농도별로 처리한 군들에서의 결과는 CA1구역에서의 결과와 동일하게 0.5 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 우수한 효능을 나타내는데 비하여 고농도의 葛根 투여에 의해서는 신경세포사멸 면적 감소의 효과가 관찰되지 않았다. 이러한 PI로 염색된 신경세포사멸 면적 및 면적비율이 감소된 결과는 葛根이 腦虛血 손상에 의하여 과사 또는 자연사되는 신경세포를 유의하게 보호하는 작용이 있는 것을 나타낸다. 腦虛血 손상에 의하여 腦海馬에서 신경세포의 自然死 apoptosis가 유도된다는 것은 잘 알려져 있으며, 주로 in vitro 모델의 분리된 세포에서 잘 연구되어 있다. in vitro 모델에서 apoptosis를 확인하는 방법은 DNA가 internucleosomal 180-200 base의 조각으로 갈라지는 현상 (DNA laddering)과 DNA fragmentation (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)를 관찰하는 것이다³⁷⁻³⁹⁾. 腦海馬의 臟器樣 組織培養에서 산소와 glucose 박탈에 의한 虛血損傷을 가하여 신경세포의 自然死를 유발한 대조군에서는 CA1구역과 DG구역 모두에서 현저한 TUNEL 양성반응 신경세포 수의 증가가 관찰되었으며, 虛血損傷 상태에서 葛根 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 군에서는 CA1구역과 DG구역 모두에서 대조군에 비하여 $P < 0.01$ 의 유의한 감소를 나타내었다. 葛根 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 군에서는 CA1구역에서만 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 감소를 나타내었으나, DG구역에서는 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 이러한 결과를 PI염색 결과와 같이 살펴보면 葛根의 腦虛血 損傷에 의한 신경세포의 自然死를 억제한다는 것을 나타내는 결과이다. 조직학적으로 신경세포사멸의 지표는 PI에 의한 세포핵의 형광염색이 가장 흔히 사용되지만 여러 가지 유해인자들을 부여한 실험에서 24-48시간에서는 세포외로 방출되는 lactate dehydrogenase (LDH) 농도와도 일치하는 것이 보고되어 있다^{26,40)}. 腦海馬의 臟器樣 組織培養 方法에서 산소와 glucose 박탈은 electrophysiological field potentials의 저하를 나타내고, OGD의 12-24시간 후에는 생화학적으로 세포사멸을 나

타내는 LDH의 방출이 관찰된다. 또한 신경세포 自然死의 후기에는 細胞膜이 손상되고 세포의 공간으로 세포질 단백질들의 방출이 관찰된다. 이것은 이차적인 自然死의 유인이 되기도 한다. 이 과정을 방법적으로 정량하는 것이 세포질 효소인 LDH의 細胞培養液內 방출량을 정량하여 세포자연사를 정량하는 것이다⁴¹⁾. 본 실험의 결과 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서 처리군에 비하여 약 300% 이상 현저한 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 葛根 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 군과 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 군에서는 모두 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 葛根 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 군에서는 대조군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 이러한 결과도 이전의 PI염색에 의한 신경세포사멸 면적 및 면적비율을 관찰한 결과와 TUNEL 양성반응 신경세포 수의 변화를 관찰한 결과와 일치하는 것으로 葛根의 신경세포 손상보호 효능을 입증하는 것이다.

최근의 연구들에 의하면 인체내에서 酸化로 인하여 생성된 活性酸素 및 여러 종류의 過酸化物質들이 다양한 질병의 원인이 되며 老化를 촉진하는 것으로 알려져 있다^{42,43)}. 이와 관련하여 葛根의 유효성분인 puerarin은 d-galactose에 의한 기역력 감퇴에 대하여 superoxide dismutase (SOD) 활성을 증강시키고 lipofuscin을 감소시키는 抗氧化作用을 통하여 기역력 감퇴에 유의한 효능이 있다고 하였다¹⁴⁾. 본 실험에서는 이러한 葛根의 抗氧化 효능이 腦組織의 신경아교세포에서도 관찰되는 가를 확인하기 위하여 일차적으로 미교세포 세포주인 BV-2 세포에 대하여 H_2O_2 및 nitric oxide에 의한 손상시 세포생존율에 대한 효능을 검색하였다. 미교세포는 정상세포와 함께 中樞神經系의 신경세포를 構造的 및 代謝的으로 보조하고 있는 신경아교세포의 일종으로 中樞神經系 내에 약 12%를 차지하고 있는 것으로 보고되어 있으나 그 수가 매우 가변적이다⁴⁴⁾. 각종 中樞神經系의 병리적인 상태에서는 증식과 이동의 능력이 있고, 構造的-機能的 변화를 나타내어 多發性 硬化症, 腦虛血, Parkinson 질환, 腦腫瘍 등의 병소에 축적되게 된다^{45,46)}. 미교세포의 다양한 기능에 대하여는 아직 잘 알려지지 않은 면이 있으나 infiltrating cytotoxic lymphocyte를 자극하여 손상받은 조직의 회복에 일정한 역할을 하며, 면역조절 역할을 하는 macrophage나 monocyte와 매우 밀접한 관련이 있어 염증관련 cytokine들을 분비하여 炎症反應과 免疫反應을 증강 또는 조절하는 역할을 한다고 하였다⁴⁷⁻⁴⁹⁾. 이러한 미교세포의 세포주 중 하나인 BV-2 미교세포에 대하여 일반적으로 사용되는 H_2O_2 처리에 의한 oxidative 손상을 유발한 다음 실험한 결과 대조군은 세포생존율이 현저하게 감소하였으며, H_2O_2 와 함께 葛根 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 군에서는 대조군에 비하여 $P < 0.001$ 의 매우 유의성 있는 세포생존율의 증가가 관찰되었다. 葛根 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 군에서는 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 세포생존율의 증가가 관찰되었으나, 葛根 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 군에서는 대조군에 비하여 증가는 하였으나 통계학적인 유의성은 없었다.

또한 BV-2 미교세포에 細胞自然死와 밀접히 관련된 유해 nitric oxide에 의한 손상을 유발하기 위하여, 세포외적으로 유해

nitric oxide를 발생시키는 sodium nitroprusside (SNP)²⁷⁾를 처리한 실험에서도 대조군은 세포생존율이 현저하게 감소하였으며, SNP와 함께 葛根 0.5와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 葛根 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 葛根이 각종 병리적인 상태에서 뇌조직의 면역 및 염증반응에 관여하는 미교세포에 대하여 우수한 抗酸化 효능이 있음을 나타낸다.

본 실험의 결과를 종합하면, 葛根은 일정한 농도에서 虛血損傷에 의한 腦海馬 CA1 및 DG구역 신경세포 사멸을 유의하게 억제하고, TUNEL 양성반응과 LDH 농도 변화로 확인되는 신경세포 自然死를 유의하게 억제하는 효능이 있으며, 또한 미교세포의 酸化의 손상과 유해 nitric oxide에 대한 抗酸化효능이 있어 신경세포 손상보호 효능을 나타내는 것으로 생각된다.

결 론

腦虛血에 대한 葛根의 효능을 관찰하기 위하여 in vivo 동물 실험과 in vitro 세포배양 실험방법 각각의 단점을 보완할 수 있는 방법으로 사용되고 있는 腦海馬의 臟器樣 組織培養方法을 이용하여 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷에 대하여 신경세포 손상보호 효능을 관찰하였으며, 신경아교세포에 대한 葛根의 抗酸化 효능을 관찰하기 위하여 미교세포 세포주인 BV-2 세포를 사용하여 H₂O₂ 및 nitric oxide 손상에 대한 抗酸化 효능을 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

虛血損傷 腦海馬組織 CA1구역에서 신경세포사멸 면적 및 면적비율의 변화는 葛根 0.5 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 약물 처리 전 기간동안 대조군에 비하여 유의한 신경세포사멸 면적 및 면적비율의 감소가 관찰되었다. 虛血損傷 腦海馬組織 DG구역에서 신경세포사멸 면적 및 면적비율의 변화는 葛根 0.5 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 약물처리 전 기간동안 대조군에 비하여 유의한 신경세포사멸 면적 및 면적비율의 감소가 관찰되었다. 虛血損傷의 腦海馬組織 TUNEL 양성반응 신경세포의 변화는 葛根 0.5 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 CA1구역과 DG구역 모두에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으며, 葛根 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 CA1구역에서만 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다. 虛血損傷 腦海馬 組織培養液內 LDH 농도의 변화는 葛根 0.5 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다. H₂O₂ 손상에 대한 BV-2 미교세포 생존율의 변화는 葛根 0.5 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 유의성 있는 세포생존율의 증가가 관찰되었다. Nitric Oxide 손상에 대한 BV-2 미교세포 생존율의 변화는 葛根 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서만 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 葛根은 腦虛血에 의한 신경세포사멸을 유의하게 억제하며, 신경세포의 酸化의 손상과 유해 nitric oxide에 대한 抗酸化 효능이 있어 신경세포 손상보호 효능을 나타내는 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. 黃奭輯. 神農本草經. 北京 : 中醫古籍出版社. pp.64-65, 1987.
2. 오의락. 本草從新. 서울 : 행림출판사. p.256, 1972.
3. 上海中醫學院. 中草藥學. 香港 : 商務印書館. pp.532-534, 1977.
4. 이상인, 안덕균, 신민교. 한약임상응용. 서울 : 성보사. p.62,63, 1990.
5. 김호철. 한약약리학. 서울 : 집문당. pp.92-94, 2001.
6. Lee, M.K., Cho, S.Y., Jang, J.Y., Cho, M.S., Jeon, S.M., Jang, M.K., Kim, M.J., Park, Y.B. Effects of Puerariae Flos and Puerariae Radix extracts on antioxidant enzymes in ethanol-treated rats. Am J Chin Med 29(2):343-354, 2001.
7. Keung, W.M. Anti-dipsotropic isoflavones. The potential therapeutic agents for alcohol dependence. Med Res Rev 23(6):669-696, 2003.
8. 우홍정, 이장훈, 김영철. 인진과 갈근이 d-galactosamine, 급성 alcohol중독 및 CCl₄ 중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지 18:411-429, 1997.
9. 송우섭, 장준혁, 김경호, 윤종화, 김갑성. 갈근수침이 Ethanol 투여로 유발된 흰쥐의 간손상에 미치는 영향. 대한침구학회지 15:279-288, 1998.
10. Guerra, M.C., Speroni, E., Broccoli, M., Cangini, M., Pasini, P., Minghetti, A., Crespi-Perellino, N., Mirasoli, M., Cantelli-Forti, G., Paolini, M. Comparison between chinese medical herb Pueraria lobata crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. Life Science 67(24):2997-3006, 2000.
11. Arao, 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 Medica 64(5):413-416, 1998.
12. Jang, M.H., Shin, M.C., Lee, T.H., Bahn, G.H., Shin, H.S., Lim, S., Kim, E.H., Kim, C.J. Effect of Puerariae radix on c-Fos expression in hippocampus of alcohol-intoxicated juvenile rats. Biol Pharm Bull 26(1):37-34, 2003.
13. Jang, M.H., Shin, M.C., Chung, J.H., Shin, H.D., Kim, Y., Kim, E.H., Kim, C.J. Effects of Puerariae radix on cell proliferation and nitric oxide synthase expression in dentate gyrus of alcohol-intoxicated Sprague-Dawley rats. Jpn J Pharmacol 88(3):355-358, 2002.
14. Xu, X.H., Zhao, T.Q. Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice. Acta Pharmacol Sin 23(7):587-590, 2002.
15. 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 22(12):752-754, 1997.
16. Dong, L.P., Wang, T.Y. Effects of puerarin against glutamate excitotoxicity on cultured mouse cerebral cortical neurons.

- Zhongguo Yao Li Xue Bao 19(4):339-342, 1998.
17. Zimmer, J. and Gahwiler, B.H. Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. *J Comp Neurol* 228, 432-446, 1984.
 18. Bonde, C., Noraberg, J., Zimmer, J. Nuclear shrinkage and other markers of neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slice cultures. *Neurosci Letter*. 327, 49-52, 2002.
 19. Barres, B.A., Barde, Y. Neuronal and glial cell biology. *Curr Opin Neurobiol* 10, 642-648, 2000.
 20. Brune, B., von Knethen, A., Sandau, K.B. Nitric oxide (NO). an effector of apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 969-975, 1999.
 21. Gahwiler, B.H., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R.A., Thompson, S.M. Organotypic slice cultures. a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20, 471-477, 1997.
 22. Noraberg, J., Kristensen, B.W., Zimmer, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Protoc* 3, 278-290, 1999.
 23. Xu, G.P., Dave, K.R., Vivero, R., Schmidt-Kastner, R., Sick, T.J., Porez-Pinzon, M.A. Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res* 952, 153-158, 2002.
 24. Brana, C., Benham, C., Sundstrom, L. A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. *Brain Res Protoc*. 10, 109-114, 2002.
 25. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501, 1992.
 26. Lobner, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death. validity for neuronal apoptosis. *J Neurosci Methods* 96, 147-152, 2000.
 27. Sugaya, K., Chouinard, M., McKinney, M. Immunostimulation protects microglial cells from nitric oxide-mediated apoptosis. *Neuroreport* 8, 2241-2245, 1997.
 28. Kim, H., Kim, Y.S., Kim, S.Y., Suk, K. The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production. *Neurosci Letter* 309, 67-71, 2001.
 29. 강철중, 김명정, 김성근, 김인주. 알코올 의존환자에서 갈근이 알코올 갈망과 대뇌 국소혈류량의 변화에 미치는 영향. *신경정신의학* 36(5):861-869, 1997.
 30. 김지훈, 김명정, 김성근, 박제민, 정영인. 정상 성인에서 갈근 (*Radix puerariae*)의 장기투여가 혈중 알콜 농도에 미치는 영향. *신경정신의학* 35(6):1230-1235, 1996.
 31. Laake, J.H., Haug, F.M., Wieloch, T., Ottersen, O.P. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. *Brain Res Protoc* 4, 173-184, 1999.
 32. Vomov, J.J., Tasker, R.C., Coyle, J.T. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke* 25, 457-464, 1994.
 33. Hsu, S.S., Newell, D.W., Tucker, A., Malouf, A.T., Winn, H.R. Adenosinergic modulation of CA1 neuronal tolerance to glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neurosci Lett* 178, 189-192, 1994.
 34. Kristensen, B.W., Noraberg, J., Zimmer, J. Comparison of excitotoxic profiles of ATPA, AMPA, KA and NMDA in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res* 917, 21-24, 2001.
 35. Monette, R., Small, D.L., Mealing, G., Morley, P. A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Res Protoc* 2, 99-108, 1998.
 36. Wilde, G.J.C., Sundstrom, L.E., Iannotti, F. Propidium iodide in vivo. an early marker of neuronal damage in rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 18, 223-226, 1994.
 37. Hilton, D.A., 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* 45, 13-20, 1997.
 38. Love, S., Hilton, D.A. Comparison of methods for the detection of cells in different stages of apoptosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22, 161-162, 1996.
 39. Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284, 555-556, 1980.
 40. Ahlemeyer, B., Klumpp, S. and Kriegelstein, J. Release of cytochrome c into the extracellular space contributes to neuronal apoptosis induced by staurosporine. *Brain Res* 934, 107-116, 2002.
 41. Ankarcona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotkovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., Nicotera, P. Glutamate-induced neuronal death. a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15, 961-973, 1995.
 42. McCord, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108, 652-659, 2000.
 43. Bondy, S.C. Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage. *Neurotoxicol* 13, 87-100, 1992.
 44. Gremo, F., Sogos, V., Ennas, M.G., Meloni, A., Persichini, T., Colasanti, M, Lauro GM. Features and functions of human microglia cells. *Adv Exp Med Biol* 429, 79-87, 1997.
 45. Gehrman, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W. Microglia. Intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Rev* 20, 269-287, 1995.

46. Moore, S., Thanos, S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Neurobiol* 48, 441-460, 1996.
47. Albina, J.E., Cui, S., Mateo, R.B., Reichner, J.S. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 150, 5080-5085, 1993.
48. Minghetti, L., Levi, G. Microglia as effector cells in brain damage and repair. focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol* 54, 99-1025, 1998.
49. Stoll, G., Jander, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology on the CNS. *Prog Neurobiol* 58, 233-247, 1999.