

大黃의 항산화와 신경세포손상 보호효능에 대한 연구

명성하 · 김연섭*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Anti-Oxidative and Neuroprotective Effects of Rhei Rhizoma on BV-2 Microglia Cells and Hippocampal Neurons

Sung-Ha Myung, Youn-Sub Kim*

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

This study demonstrated anti-oxidative and neuroprotective effects of Rhei Rhizoma. Anti-oxidative effects were studied on BV-2 microglia cells damaged by H₂O₂ and nitric oxide. Neuroprotective effects were studied by using oxygen/glucose deprivation of the organotypic hippocampal slice cultures. The results obtained are as follows; The groups treated with 0.5 and 5 mg/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 group treated with 50 mg/ml of Puerariae Radix demonstrated decreases of neuronal cell death area and cell death area percentages in CA1 region, but these were not significant statistically. The groups treated with 0.5 and 5 mg/ml of Puerariae Radix revealed significant decreases of neuronal cell death area and cell death area percentages in dentate gyrus of ischemic damaged hippocampus cultures during whole 48 hours of the experiment. The group treated with 50 mg/ml of Puerariae Radix demonstrated decreases of neuronal cell death area and cell death area percentages in dentate gyrus, but these were not significant statistically. The groups treated with 0.5 and 5 mg/ml of Puerariae Radix revealed significant decreases of TUNEL-positive cells in both CA1 region and dentate gyrus of ischemic damaged hippocampus cultures. The group treated with 50 mg/ml of Puerariae Radix demonstrated significant decrease of TUNEL-positive cells in CA1 region, but not in dentate gyrus of ischemic damaged hippocampus. The groups treated with 0.5 and 5 mg/ml of Puerariae Radix revealed significant decreases of LDH concentrations in culture media of ischemic damaged hippocampus cultures. The group treated with 50 mg/ml of Puerariae Radix demonstrated decrease of LDH concentrations in culture media, but it was not significant statistically. The groups treated with 0.5 and 5 mg/ml of Puerariae Radix revealed significant increases of cell viabilities of BV-2 microglia cells damaged by H₂O₂. The group treated with 50 mg/ml of Puerariae Radix demonstrated increase of cell viability of BV-2 microglia cells, but it was not significant statistically. The group treated with 0.5 mg/ml of Puerariae Radix revealed significant increase of cell viability of BV-2 microglia cells damaged by nitric oxide. The groups treated with 5 and 50 mg/ml of Puerariae Radix demonstrated increases of cell viabilities of BV-2 microglia cells, but these were not significant statistically. These results suggested that Puerariae Radix revealed neuroprotective effects through the control effect of apoptosis and oxidative damages.

Key words : Anti-Oxidation, Neuroprotection, Rhei Rhizoma, BV-2, Hippocampus

서론

大黃은 마디풀과 (Polygonaceae)에 속한 다년생 草本인 장엽

대황, 당고득대황, 약용대황의 뿌리줄기로 性味가 苦, 寒하고 淸熱攻下, 瀉火解毒, 淸熱涼血, 活血祛瘀, 淸熱燥濕 등의 효능을 가지고 있다.¹⁻⁴⁾ 沈降하여 攻下通便하는 효능으로 大便秘結, 腹脹腹痛을 치료하고, 通便하고 淸熱瀉火하여 熱病高熱, 神昏譫語 등에 便秘가 있는 경우에 활용되며, 活血祛瘀하므로 각종 瘀血阻滯 病症을 치료한다고 하였다. 그러므로 大黃은 임상에서 中風의 大便秘結, 腑氣不通하는 경우 淸熱瀉火 및 瀉下法을 이용하여 치료하

* 교신저자 : 김연섭, 성남시 수정구 북정동 산65 경원대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2005/03/25 · 수정 : 2005/04/21 · 채택 : 2005/05/16

는데 활용되고 있다.³⁻⁶⁾

大黃에 대한 최근의 연구들에 의하면, 大黃이 각종 병리적인 상태의 원인이 되는 활성산소를 제거하는 superoxide dismutase (SOD) 활성을 증가시킨다고 하였으며,⁷⁾ 혈청 lipid peroxidase 활성을 감소시키고 유해한 nitric oxide의 제거효능이 강력하므로 항감염, 항염증 작용 및 항산화 효능을 갖는다고 하였다.⁸⁾ 또한 大黃은 매우 우수한 항응혈 활성을 가지고 있다고 보고된 바 있고,⁹⁾ endotoxin으로 유발된 어혈병태모형에도 유의한 효과를 나타낸다고 하였으며,¹⁰⁾ 총경동맥과 추골동맥의 폐쇄에 의한 전 뇌허혈의 동물실험에서 大黃이 신경세포 손상에 대한 방어효과가 있다고 보고 된바 있다.¹¹⁾

이에 저자는 腦虛血에 대한 大黃의 뇌신경세포손상 보호와 항산화 효능을 관찰하기 위하여, 중추신경계의 조직손상이나 염증반응시 일차적인 면역반응을 담당하는 세포가 미교세포 (microglia cell) 이므로,¹²⁾ 미교세포 세포주인 BV-2 세포를 사용하여 H₂O₂ 및 nitric oxide 손상에 대한 항산화 효능을 관찰하였다.¹³⁾ 나아가 腦虛血에 대한 약물의 효능을 검증하는 실험방법에 있어서 동물실험과 세포배양 실험방법 각각의 단점을 보완할 수 있는 방법으로 사용되고 있는 腦海馬의 장기양조직배양 (organotypic hippocampal slice culture, OHSC) 방법¹⁴⁾을 이용하여 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷¹⁵⁾에 대하여 大黃의 신경세포손상 보호 효능을 관찰한바 유의한 효능이 관찰되었기에 보고하는 바이다.

실험방법

1. 약물

실험에 사용한 한약물은 大黃 (Rhei Rhizoma)으로 200g을 증류수 3,000ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 완전히 동결건조시켜 大黃 추출액 63g을 얻어 실험에 사용하였다.

2. BV-2 미교세포의 배양 및 Oxidative Damage 유발¹⁶⁾

미교세포 세포주의 일종인 BV-2 세포를 24-well plate에 well (500µl) 당 1x10⁶ cells가 되도록 조정하고 37°C, CO₂ 세포배양기에서 일반적인 세포배양방법에 따라 배양하였다. 세포가 원하는 만큼 자라면 PBS로 세척한 후 혈청이 포함되지 않은 조직배양액으로 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.

3. 大黃처리 및 세포생존율 측정¹⁷⁾

BV-2 미교세포에 각각 H₂O₂와 SNP를 처리하기 1시간 전에 大黃을 0.5, 5와 50µg/ml의 농도로 처리하고 24시간동안 37°C, CO₂ 세포배양기에서 배양하였으며, 24시간 후 MTT (0.5mg/ml) 용액을 처리하고 2시간동안 재배양하였다. 그 다음 배양액을 제

거하고 DMSO를 200µl씩 넣고 잘 혼합한 다음 100µl의 배양액을 채취하여 ELISA 측정기로 540nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

4. 腦海馬 조직 채취 및 배양^{18,19)}

실험에 사용한 뇌조직은 7일령 Sprague-Dawley계 흰쥐의 뇌해마 (hippocampus)로 조직의 전처리 및 배양 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 흰쥐의 머리를 단두한 후 곧바로 안과용 가위로 두피와 두개골을 제거하고 대뇌를 적출하였다. 적출한 대뇌를 해부용 조직배양액 (MEM 500ml + 25mM HEPE + 4mM L-glutamine, pH 7.4)이 담긴 실험쟁반에 옮기고 수술용 현미경을 이용하여 양쪽 대뇌반구에서 각각의 뇌해마를 적출하였다. 적출된 뇌해마를 조심스럽게 조직절편기의 상판에 올려놓은 후 350µm 두께로 조직절편을 만들었다. 각각 분리된 뇌해마 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, 1 mM L-glutamine을 첨가하고 여과한 다음 pH를 7.25~7.30으로 조정하였으며, 50mg/ml의 streptomycin-penicillin을 첨가하였다. 조직배양액은 조직을 배양하는 동안 3일에 한번씩 교환해주었다.

5. 虛血損傷 유발 및 大黃처리²⁰⁾

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.

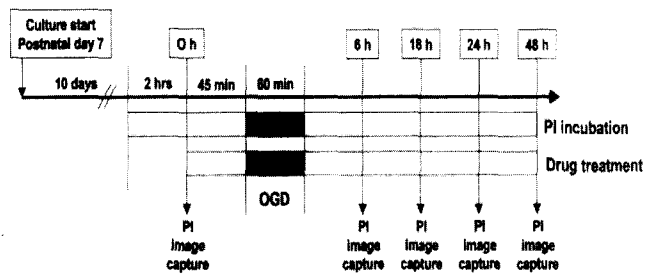


Fig. 1. Time schedule of drug treatment and PI stained image capture during organotypic hippocampal slice culture.

10일 동안 일반적인 조직배양 후 광학현미경을 이용하여 조직의 구조가 온전하지 않은 조직을 선별하여 제거하고, 이후 무산소 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 뇌해마 조직의 insert를 옮기고 60분 동안 산소와 glucose 공급이 차단된 OGD에 의한 虛血損傷을 유발시켰다. IBSS는 무산소 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 뇌해마조직의 조직배양망을 옮긴 후 정상산소상태 (normoxia condition, 95% air-5% CO₂, 36.5°C)에서 48시간 동안 조직을 재배양하였다. 한약물의 처리는 大黃을 0.5, 5와 50µg/ml의 농도로 虛血損傷 유발 45분전부터 이후 48시간 동안 각 단계의 조직배양액에 첨가시켰다.

6. Propidium iodide (PI) 염색 및 신경세포사멸 면적의 측정²¹⁾

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

7. TUNEL 염색 와 양성반응 신경세포 수의 측정²²⁾

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

8. 세포배양액내 Lactate Dehydrogenase (LDH) 측정²³⁾

뇌해마조직에 OGD에 의한 虛血損傷을 유발한 48시간 후에 뇌해마조직의 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°C에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 50µl를 첨가하여 반응을 중지시키고, ELISA 측정기를 이용

하여 490nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

9. 통계처리

성적은 Graphpad Prism(USA)으로 Student's t-test를 이용해 검정한 P값이 0.05미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

성 적

1. H₂O₂ 손상에 대한 BV-2 미교세포 생존율의 변화

정상적인 배양상태인 정상군에서의 세포 생존율을 100%로 하였을 때 H₂O₂를 처리한 대조군은 35.3±4.6%로 세포 생존율이 현저하게 감소하였으며, H₂O₂와 大黃 0.5µg/ml을 처리한 군에서는 39.8±2.1%로 대조군에 비하여 12.7% 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. H₂O₂와 大黃 5µg/ml을 처리한 군은 46.4±3.3%로 대조군에 비하여 31.4% 증가하였으며, H₂O₂와 大黃 50µg/ml을 처리한 군은 49.1±3.9%로 대조군에 비하여 39.1% 증가하여, 두 군 모두 대조군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 세포 생존율의 증가가 관찰되었다. (Fig. 2)

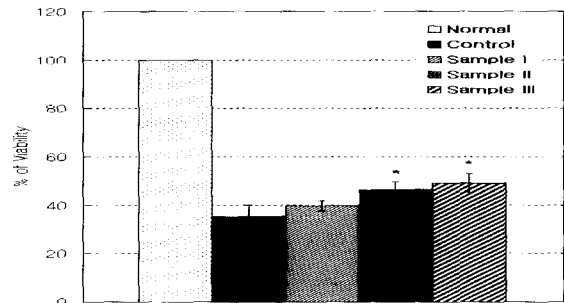


Fig. 2. Effect of Rhei Rhizoma on Cell Viability of BV-2 microglia cells damaged by H₂O₂. Data presented mean ± standard error (n=6). Normal : Group of normal control without oxygen-glucose deprivation, Control : Group treated with oxygen-glucose deprivation for 60 minutes, Sample I : Group treated with 0.5µg/ml of Rhei Rhizoma extract after oxygen-glucose deprivation, Sample II : Group treated with 5µg/ml of Rhei Rhizoma extract after oxygen-glucose deprivation, Sample III : Group treated with 50µg/ml of Rhei Rhizoma extract after oxygen-glucose deprivation. * : Statistical significance compared with control group (*, P<0.05).

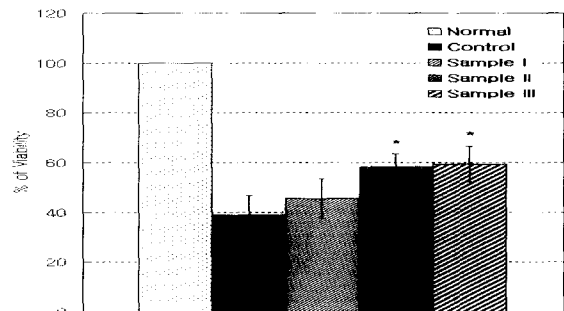


Fig. 3. Effect of Rhei Rhizoma on Cell Viability of BV-2 microglia cells damaged by nitric oxide.

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

정상적인 배양상태인 정상군에서의 세포 생존율을 100%로 하였을 때 nitric oxide를 생성하는 SNP를 처리한 대조군은

38.9±7.7%로 세포 생존율이 현저하게 감소하였으며, SNP와 大黃 0.5µg/ml을 처리한 군에서는 45.6±7.9%로 대조군에 비하여 17.2% 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. SNP와 大黃 5 µg/ml을 처리한 군은 58.2±5.3%로 대조군에 비하여 49.6% 증가하였으며, SNP와 大黃 50µg/ml을 처리한 군은 59.3±7.2%로 대조군에 비하여 52.4% 증가하여, 두 군 모두 대조군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 세포 생존율의 증가가 관찰되었다. (Fig. 3)

3. 虛血損傷 뇌해마조직 CA1구역에서 신경세포사멸 면적의 변화

뇌해마 장기양조직의 정상적인 배양상태인 정상군은 CA1구역 전체면적 19362.4±320.7µm² 중에서 PI에 의하여 염색된 신경세포사멸 면적은 6, 18, 24 와 48 시간 경과에 따라 각각 10.1±8.4, 23.8±9.2, 43.4±11.3 와 57.7±16.7µm²을 나타내었으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군은 전체면적 19786.5±220.2µm² 중에서 시간 경과에 따라 각각 8186.8±543.3, 9274.0±528.5, 12203.3±874.7 와 12976.2±1400.1µm²로 현저하게 신경세포사멸 면적이 증가하였다. 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 大黃 0.5µg/ml을 처리한 군에서는 전체면적 19138.5±349.2µm² 중에서 시간 경과에 따라 각각 6433.7±903.1, 8465.7±710.3, 10110.8±1220.7 와 11828.0±1510.0µm²로 대조군에 비하여 신경세포사멸 면적이 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다. 大黃 5µg/ml을 처리한 군은 조직 전체면적 20070.8±210.2µm² 중에서 시간 경과에 따라 각각 6113.5±875.9, 7309.6±789.6, 9018.7±1245.1 와 10344.7±554.9µm²로 약물처리 전 기간 동안 대조군에 비하여 P<0.05의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었다. 大黃 50µg/ml을 처리한 군에서는 조직 전체면적 19347.7±440.1µm² 중에서 시간 경과에 따라 각각 5800.7±720.1, 6907.2±860.0, 8419.5±614.8 와 9606.2±570.3µm²로 약물처리 전 기간 동안 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었으며, 특히 약물처리 24시간 후에 가장 높은 유의성을 나타내었다. (Fig. 4, 8)

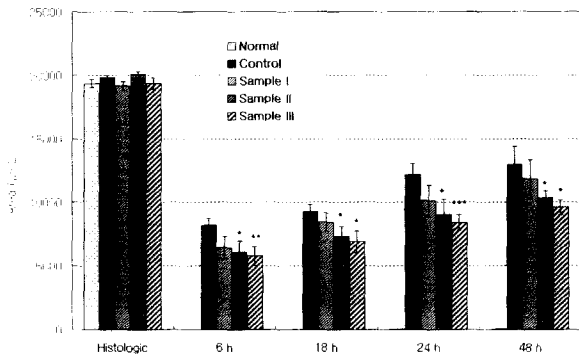


Fig. 4. Effect of Rhei Rhizoma on PI stained neuronal cell death area in CA1 of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation.

4. 虛血損傷 뇌해마조직 CA1구역에서 신경세포사멸 면적비율의 변화

뇌해마 장기양조직의 정상적인 배양상태인 정상군에서 CA1

구역 전체면적에 대한 신경세포사멸 면적비율은 6, 18, 24 와 48 시간 경과에 따라 각각 0.0±0.0, 0.1±0.0, 0.2±0.1 와 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 와 64.8±6.7%로 현저한 신경세포사멸 면적비율의 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 大黃 0.5µg/ml을 처리한 군은 시간 경과에 따라 각각 33.6±4.5, 44.2±3.5, 52.3±5.7 와 60.5±6.7%로 대조군에 비하여 신경세포사멸 면적비율이 감소는 하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 大黃 5µg/ml을 처리한 군은 시간 경과에 따라 각각 30.4±4.2, 36.5±3.9, 44.8±6.1 와 51.7±3.4%로 약물처리 전 기간 동안 대조군에 비하여 P<0.05의 유의한 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었다. 大黃 50µg/ml을 처리한 군에서는 시간 경과에 따라 각각 29.9±3.4, 35.7±4.5, 43.7±3.2 와 50.3±2.4 %로 약물처리 전 기간 동안 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의성 있는 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었다.(Fig. 5, 8)

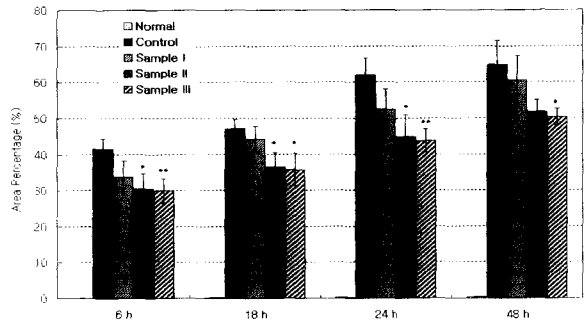


Fig. 5. Effect of Rhei Rhizoma on area percentage of neuronal cell death in CA1 of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation.

5. 虛血損傷 뇌해마조직 DG구역에서 신경세포사멸 면적의 변화

뇌해마 장기양조직의 정상적인 배양상태인 정상군은 DG구역 전체면적 4892.3±159.0µm² 중에서 PI에 의하여 염색된 신경세포사멸 면적은 6, 18, 24 와 48 시간 경과에 따라 각각 11.3±3.4, 28.3±8.8, 32.0±6.2 와 45.3±7.8µm²을 나타내었으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군은 전체면적 5055.2±243.0µm² 중에서 시간 경과에 따라 각각 1214.0±123.6, 1380.9±101.3, 1937.2±294.8 와 2058.6±300.1µm²로 현저하게 신경세포사멸 면적이 증가하였다. 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 大黃 0.5µg/ml을 처리한 군에서는 전체면적 4457.3±253.2µm² 중에서 시간 경과에 따라 각각 890.0±144.0, 1037.5±129.5, 1277.2±165.6 와 1361.2±125.7µm²로 약물처리 18시간 후부터 대조군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었다. 大黃 5µg/ml을 처리한 군은 조직 전체면적 4554.8±179.3µm² 중에서 시간 경과에 따라 각각 787.4±132.4, 886.7±106.8, 1142.7±112.4 와 1355.7±208.7µm²로 약물처리 전 기간 동안 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었으며, 특히 18시간에서는 매우 높은 유의성을 나타내었다. 大黃 50µg/ml을 처리한 군에서는 조

직 전체면적 $4383.8 \pm 128.7 \mu\text{m}^2$ 중에서 시간 경과에 따라 각각 807.6 ± 92.0 , 845.3 ± 148.8 , 1076.3 ± 141.8 와 $1271.0 \pm 136.8 \mu\text{m}^2$ 로 약물 처리 전기간 동안 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었다.(Fig. 6, 8)

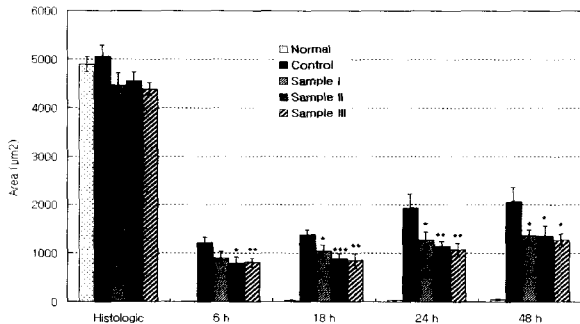


Fig. 6. Effect of Rhei Rhizoma on PI stained neuronal cell death area in DG of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation.

6. 虛血損傷 뇌해마조직 DG구역에서 신경세포사멸 면적비율의 변화

뇌해마 장기양조직의 정상적인 배양상태인 정상군에서 DG 구역 전체면적에 대한 신경세포사멸 면적비율은 6, 18, 24 와 48 시간 경과에 따라 각각 0.2 ± 0.1 , 0.6 ± 0.2 , 0.7 ± 0.1 와 $0.9 \pm 0.2\%$ 를 나타내었으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서는 시간 경과에 따라 각각 24.9 ± 2.9 , 27.7 ± 2.1 , 37.2 ± 4.8 와 $42.0 \pm 7.3\%$ 로 현저한 신경세포사멸 면적비율의 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 大黃 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군은 시간 경과에 따라 각각 20.5 ± 3.5 , 23.6 ± 2.9 , 28.6 ± 3.7 와 $32.3 \pm 3.4\%$ 로 대조군에 비하여 신경세포사멸 면적비율이 감소는 하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 大黃 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군은 시간 경과에 따라 각각 18.1 ± 3.5 , 19.9 ± 2.5 , 25.3 ± 2.6 와 $29.6 \pm 4.9\%$ 로 약물처리 후 18시간과 24시간에서 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의한 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었다. 大黃 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 시간 경과에 따라 각각 18.3 ± 2.2 , 19.3 ± 3.3 , 24.7 ± 3.3 와 $27.7 \pm 3.2\%$ 로 약물처리 전기간 동안 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었다. (Fig. 7, 8)

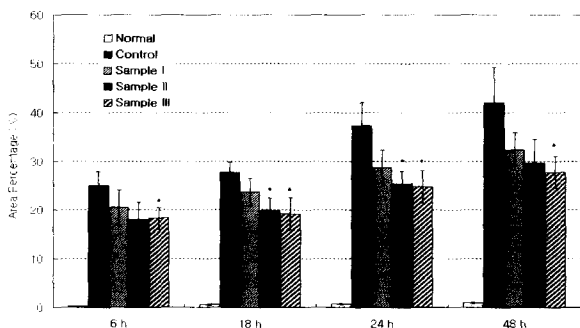


Fig. 7. Effect of Rhei Rhizoma on area percentage of neuronal cell death in DG of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation.

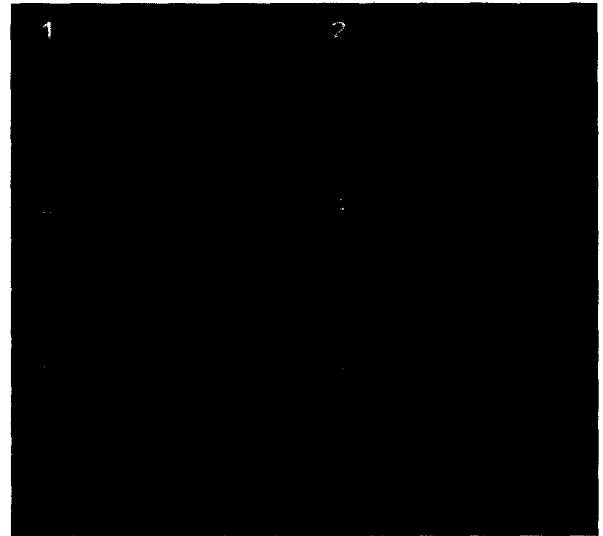


Fig. 8. PI stained sections of organotypic hippocampal slice culture at 24 hours after oxygen-glucose deprivation (section 1, at preconditioning stage; section 2, normal group; section 3, control group; section 4, sample I group; section 5, sample II group; section 6, sample III group). Groups treated with 5 and $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ of Rhei Rhizoma extract show significant decrease of neuronal cell death area (red color PI-stained area) with respect to control group.

7. 虛血損傷의 뇌해마조직 TUNEL 양성반응 신경세포의 변화

정상적인 배양상태인 정상군에서는 TUNEL 양성반응을 보인 신경세포 수는 단위면적 당 CA1구역에서 2.8 ± 0.9 개, DG구역에서 1.8 ± 0.3 개가 관찰되었으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서는 CA1구역에서 56.3 ± 9.5 개, DG구역에서 45.2 ± 10.3 개로 현저한 TUNEL 양성반응 신경세포 수의 증가가 관찰되었다. 虛血損傷 상태에서 大黃 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 CA1구역에서 35.4 ± 4.5 개, DG구역에서 27.2 ± 2.9 개로 대조군에 비하여 CA1구역에서는 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 TUNEL 양성반응 신경세포 수의 감소가 관찰되었고, DG구역에서는 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 大黃 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 CA1구역에서 30.2 ± 4.4 개, DG구역에서는 25.7 ± 3.8 개로 역시 대조군에 비하여 CA1구역에서는 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 TUNEL 양성반응 신경세포 수의 감소가 관찰되었고, DG구역에서는 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 大黃 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서는 CA1구역에서 29.6 ± 5.4 개, DG구역에서는 24.5 ± 3.4 개로 모두 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 TUNEL 양성반응 신경세포 수의 감소가 관찰되었다. (Fig. 9, 10)

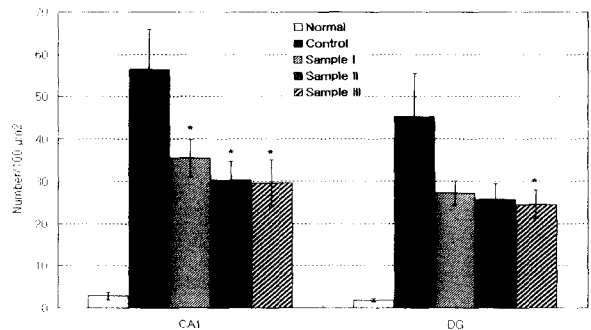


Fig. 9. Effect of Rhei Rhizoma on TUNEL-positive cells in CA1 and DG of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation.

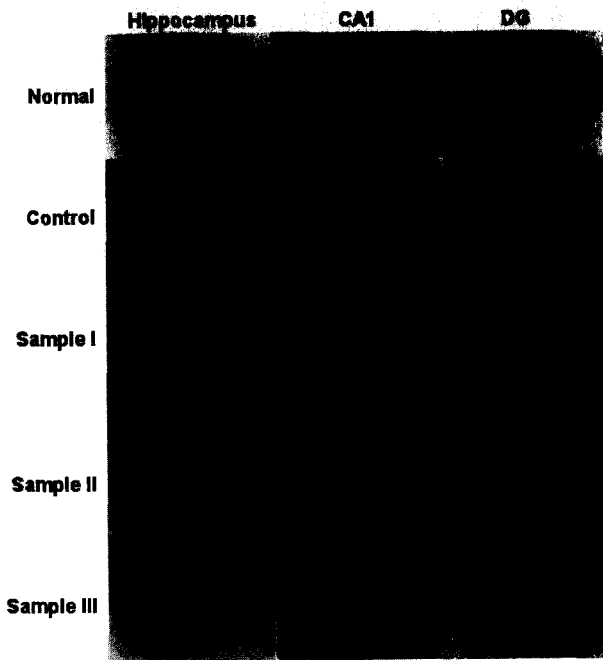


Fig. 10. TUNEL-positive cells in CA1 and DG of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation. Groups treated with Rhei Rhizoma extract show significant decrease of TUNEL-positive cells (dark brown color) with respect to control group in CA1 (0.5, 5 and 50 μ g/ml treatment) and in DG (50 μ g/ml treatment only).

8. 虛血損傷 뇌해마 조직배양액내 LDH 농도의 변화

정상적인 배양상태인 정상군에서는 배양액내 LDH의 농도가 541.2±61.3U/L로 관찰되었으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태의 대조군에서는 1121.2±121.3U/L로 현저한 증가를 나타내었다. 虛血損傷 상태에서 大黃 0.5 μ g/ml을 처리한 군에서는 896.8±75.2U/L로 대조군에 비하여 20.0% 감소하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 大黃 5 μ g/ml을 처리한 군에서는 741.3±95.8U/L로 대조군에 비하여 33.9% 감소하여 P<0.05의 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 大黃 50 μ g/ml을 처리한 군에서는 723.5±123.9 U/L로 대조군에 비하여 35.5% 감소하여 역시 P<0.05의 유의성 있는 감소를 나타내었다. (Fig. 11)

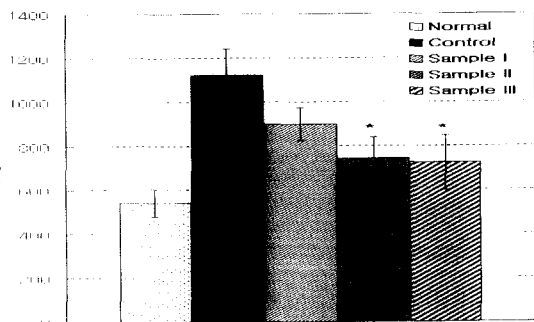


Fig. 11. Effect of Rhei Rhizoma on LDH levels in culture media of organotypic hippocampal slice culture under oxygen-glucose deprivation.

고찰

최근의 연구들에 의하면 인체내에서 산화로 인하여 생성된

활성산소 와 여러 종류의 과산화물들이 다양한 질병의 원인이 되며 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다.^{24,25)} 이와 관련하여 大黃이 혈청 lipid peroxidase 활성을 감소시키며, 활성산소를 제거하는 superoxide dismutase (SOD) 활성을 증가시킴으로서 항노화작용이 있고, 지적능력 개선효과가 있다는 보고가 있다.⁷⁾ 또한 31종의 한약재로부터 유해활성 nitric oxide (NO)의 제거효능을 검증한 결과 大黃이 가장 강력한 NO 제거효능이 있어 과도한 NO 와 산화산물인 peroxynitrite에 의한 병리적인 상태를 개선하는 약물로의 개발 가능성이 보고되어 있으며,⁸⁾ 이러한 항산화작용에 관련된 활성물질로 piceatannol이라는 활성성분이 분리 연구되고 있다.²⁶⁾

본 실험에서는 위와 같이 보고된 大黃의 항산화 효능이 뇌 신경세포에서도 관찰되는가를 확인하기 위하여 일차적으로 미교세포 세포주인 BV-2 세포에 대하여 H₂O₂ 와 nitric oxide에 의한 손상시 세포 생존율에 대한 효능을 검색하였다.

미교세포는 정상세포와 함께 중추신경계의 신경세포를 구조적 및 대사적으로 보조하고 있는 신경아교세포의 일종으로 중추신경계 내에 약 12%를 차지하고 있는 것으로 보고되어 있으나 그 수가 매우 가변적이다.²⁷⁾ 각종 중추신경계의 병리적인 상태에서는 증식과 이동의 능력이 있고, 구조적·기능적 변화를 나타내어 다발성 경화증, 뇌허혈, parkinson 질환, 뇌종양 등의 병소에 축적되게 된다.^{28,29)} 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 염증반응과 면역반응을 증강 또는 조절하는 역할을 한다고 하였다.³⁰⁻³²⁾

이러한 미교세포의 세포주 중 하나인 BV-2 미교세포에 대하여 일반적으로 사용되는 H₂O₂ 처리에 의한 oxidative 손상을 유발한 다음 大黃를 처리한 결과 0.5 μ g/ml을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 12.7% 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. H₂O₂와 大黃 5 μ g/ml을 처리한 군은 대조군에 비하여 31.4% 증가하였으며, 50 μ g/ml을 처리한 군은 49.1±3.9%로 대조군에 비하여 39.1% 증가하여, 두 군 모두 대조군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 세포 생존율의 증가가 관찰되었다. 또한 BV-2 미교세포에 세포자연사와 밀접히 관련된 유해 nitric oxide에 의한 손상을 유발하기 위하여, 세포외적으로 유해 nitric oxide를 발생시키는 sodium nitroprusside (SNP)16를 처리한 실험에서도 大黃를 처리한 결과 0.5 μ g/ml을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 17.2% 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 5 μ g/ml을 처리한 군은 대조군에 비하여 49.6% 증가하였으며, 50 μ g/ml을 처리한 군은 대조군에 비하여 52.4% 증가하여, 두 군 모두 대조군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 세포 생존율의 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 大黃의 항산화 효능이 뇌신경세포에서도 유의하게 나타난다는 것을 관찰한 것으로 미교세포의 중추신경계내 작용과 함께 생각할 때 大黃이 뇌질환의 각종 병리적인 상태에서 신경아교세포들의 손상을 보호하고, 활성화시킴으로써 뇌조직 손상에 대한 보호효능을 나타낼 것이라는 것을 추측하게 한다.

大黃이 中風의 大便秘結, 腑氣不通하는 경우 清熱瀉火와 瀉下法에 활용되는 기전인 사하작용은 화학적 유효성분으로는 rhein과 sennoside에 의한 것으로 보고되어 있으며,^{33,34)} 그 외에 항혈전, 혈중지질과 관련 효소활성과 고지혈증에 대한 연구,³⁵⁻³⁷⁾ 비만에 미치는 영향^{38,39)} 등에 대하여 많은 연구보고가 있다. 또한 大黃이 혈압강화 효능이 있으며, ACE에 유의한 영향을 준다는 보고가 있고,^{40,41)} 총경동맥과 추골동맥의 폐쇄에 의한 전뇌허혈의 동물실험에서 大黃이 신경세포 손상에 대한 방어효과가 있다고 보고 된바 있다.¹¹⁾

본 실험에서는 腦虛血손상에 대한 大黃의 신경세포손상 보호효능을 관찰하기 위하여 腦海馬의 臟器樣組織배양방법을 사용하였다. 腦海馬의 臟器樣組織배양방법은 약물의 효능을 검색하는데 많은 장점을 가지고 있다.²⁰⁾ 신경세포배양 방법에서는 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 신경연접을 가지고 있지 않다는 것이 단점이다. 또한 급성으로 신경조직을 절편으로 만들어 배양하는 방법은 신경세포의 배양 방법에 비하여 많은 장점을 가지고 있다. 특히 급격한 대사억제 즉, 허혈을 연구하는 데는 큰 장점이 있다. 그러나 12-24시간이 지나면 상태가 나빠져서 손상된 세포와 건강한 세포가 공존하게 되고 이러한 점이 지연성신경세포사멸을 연구하는 데는 단점이다.^{42,43)} 장기양 절편배양 (organotypic slice culture) 방법은 in vivo에서 볼 수 있는 신경세포간의 신경연접을 온전히 갖고 있다는 점에서 많은 장점이 있다. 특히 腦海馬組織의 장기양 절편 배양방법은 산소와 glucose 박탈에 의한 腦虛血 모델에 대한 신경계 보호효능 검색, 중추신경계 퇴행과정과 신경연접의 excitotoxicity 등을 연구하는데 많이 이용되고 있다.^{44,45)}

Propidium iodide (PI)는 형광발색염료로 조직배양시 생염색을 위하여 많이 사용되며, 세포 활성을 real time imaging으로 보여줄 수 있는 장점이 있다. PI는 건강한 세포에는 침투하지 못하나 여러 가지 요인에 의한 세포사망시 세포막의 손상에 의하여 세포내로 침투하여 핵에 들어가 DNA에 부착하여 형광을 발색하게 되므로 세포사멸을 증명하는데 많이 사용된다.^{46,47)}

腦海馬의 臟器樣組織배양에서 산소와 glucose 박탈에 의한 虛血損傷을 가하고 大黃를 처리하여 그 효과를 측정한다. 腦海馬 CA1구역에서 PI에 의하여 염색된 신경세포사멸 면적과 면적비율은 모든 군에서 시간경과에 따라 증가하고 있으며, 산소와 glucose를 박탈한 虛血損傷 상태에서 大黃 0.5 μ g/ml을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 신경세포사멸 면적이 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다. 大黃 5 μ g/ml을 처리한 군은 약물처리 전기간 동안 대조군에 비하여 P<0.05의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었으며, 大黃 50 μ g/ml을 처리한 군에서도 약물처리 전기간 동안 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되어 大黃의 농도에 비례하여 효능이 증가하는 것으로 관찰되었다.

腦海馬 DG구역에서 PI에 의하여 염색된 신경세포사멸 면적

과 면적비율은 大黃 0.5 μ g/ml을 처리한 군에서는 약물처리 18시간 후부터 대조군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었으나 면적비율을 관찰한바 통계학적 유의성은 없었다. 이러한 결과는 각 군마다 DG구역의 전체면적이 다른데 따른 결과의 차이이다. 大黃 5 μ g/ml을 처리한 군은 약물처리 전기간 동안 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었으며, 특히 18시간에서는 매우 높은 유의성을 나타내었다. 大黃 50 μ g/ml을 처리한 군에서는 약물처리 전기간 동안 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되어 CA1구역에서와 마찬가지로 大黃의 농도 증가에 따라 보호효능이 증가하는 것으로 관찰되었다.

세포자연사 apoptosis가 존재한다는 것은 잘 알려져 있으며 주로 in vitro 모델에서 분리된 세포에서 잘 연구되어 있다. in vitro 모델에서 apoptosis를 확인한 것은 DNA가 internucleosomal 180-200 base의 조각으로 갈라지는 현상 (DNA laddering)과 DNA fragmentation (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)를 관찰하는 방법이다.⁴⁸⁻⁵⁰⁾ 腦海馬의 臟器樣組織배양에서 산소와 glucose 박탈에 의한 虛血損傷을 가하여 신경세포의 자연사를 유발시키고 大黃을 처리하여 그 효능을 관찰한 바 腦海馬 組織의 TUNEL 양성반응 세포 수는 CA1구역에서는 大黃 0.5, 5와 50 μ g/ml을 처리한 모든 군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으며, DG구역에서는 大黃 50 μ g/ml을 처리한 모든 군에서만 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. 이는 大黃이 腦虛血손상에 가장 민감한 구역이 CA1구역에서 腦虛血 손상에 의하여 증가하는 뇌신경세포의 자연사를 유의하게 억제하는 효능이 있음을 보여주는 결과이다.

腦海馬의 臟器樣組織배양 방법에서 산소와 glucose 박탈은 electrophysiological field potentials의 저하를 나타내고, OGD의 12-24시간 후에는 생화학적으로 세포사멸을 나타내는 lactate dehydrogenase (LDH)의 방출이 관찰된다. 조직학적으로 신경세포 사멸의 지표는 PI에 의한 세포핵의 형광염색이 가장 흔히 사용되지만 여러 가지 유해인자들을 부여한 실험에서 24-48시간에서는 세포방출 LDH농도와도 일치하는 것이 보고되어 있다.^{23,51)} 또한 신경세포 자연사의 후기에는 세포막이 손상되고 세포의 공간으로 세포질 단백질들의 방출이 관찰된다. 이것은 이차적인 자연사의 유인이 되기도 한다. 이 과정을 방법적으로 정량하는 것이 세포질 효소인 LDH의 세포배양액내 방출량을 정량하여 세포 자연사를 정량하는 것이다.⁵²⁾ 그러므로 腦海馬의 臟器樣組織배양에서 산소와 glucose 박탈에 의한 뇌허혈 손상을 가하여 신경세포의 자연사를 유발시키고 배양액 내로 분비된 LDH 농도에 대한 大黃의 효능을 관찰한 바 大黃 5와 50 μ g/ml을 처리한 군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이는 大黃이 조직내 신경세포의 자연사를 억제하였다는 것을 간접적으로 보여주는 결과이다.

이러한 결과들을 종합해보면 大黃은 유해 nitric oxide에 대한 신경세포 보호작용과 腦虛血 손상으로 유발되는 손상부위의 신경세포사멸과 자연사를 억제하는 신경세포 보호효능을 가지고 있는 것으로 생각된다.

결 론

大黃의 뇌신경세포 항산화 효능을 관찰하기 위하여 비교세포 세포주인 BV-2 세포를 사용하여 H₂O₂ 와 nitric oxide 손상에 대한 세포 생존율을 관찰하였다. 또한 腦海馬의 臟器樣組織배양 방법을 이용하여 산소와 glucose를 박탈한 腦虛血손상에 의한 신경세포 보호효능을 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

H₂O₂ 손상에 대한 BV-2 비교세포의 세포 생존율은 大黃 5와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 세포 생존율의 증가가 관찰되었다. Nitric Oxide 손상에 대한 BV-2 비교세포의 세포 생존율은 大黃 5와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 세포 생존율의 증가가 관찰되었다. 腦虛血損傷 腦海馬組織 CA1구역에서 신경세포사멸 면적과 면적비율의 변화는 大黃 5와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군은 약물처리 전기간 동안 대조군에 비하여 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었다. 腦虛血損傷 腦海馬組織 DG구역에서 신경세포사멸의 변화에서 大黃 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군은 대조군에 비하여 약물처리 18시간 후부터 유의성 있는 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었다. 大黃 5와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군은 약물처리 전기간 동안 대조군에 비하여 유의한 신경세포사멸 면적 과 면적비율의 감소가 관찰되었다. 腦虛血損傷의 腦海馬組織에서 TUNEL 양성반응 신경세포 수는 CA1구역에서는 大黃을 처리한 군에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으며, DG구역에서는 大黃 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 군에서만 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. 腦虛血損傷 腦海馬 組織배양액내 LDH 농도의 변화는 大黃 5와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 大黃은 腦虛血 손상시 신경세포사멸을 유의하게 억제하며, 신경세포손상을 보호하는 효능이 있었다.

참고문헌

- 이상인, 안덕균, 신민교, 이영종, 외2. 한약임상응용. 서울: 성보사. pp 68-72, 1990
- 이시진. 본초강목. 북경: 인민위생출판사. pp 1115, 1982.
- 전국 한의과대학 본초학교수공저. 본초학. 서울: 영림사. pp 241-244, 1991.
- 김호철. 한약약리학. 서울: 집문당. pp 174-177, 2001.
- 전국 한의과대학 심계내과교실 공저. 동의심계내과학. 서울: 서원당. pp 448-462, 1995.
- 박종양, 변일. 중풍치료에 있어서 침열사화법에 대한 문헌적 고찰. 대한한방내과학회지 12(1):155-165, 1991.
- Tian, J., Du, H., Yang, H., Liu, X., Li, Z. A clinical study on compound da huang (radix et rhizoma rhei) preparations for improvement of senile persons' memory ability. J Tradit Chin Med. 17(3):168-173, 1997.
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Tanaka, T. Direct scavenging of nitric oxide by traditional crude drugs. Phytomedicine. 6(6):453-463, 2000.
- 육참수. 어혈에 사용되는 생약 (大黃, 三稜)의 항응혈 활성. 경희약대논문집. 20, 59-62, 1992.
- 김도완, 박창국. 전탕시간에 따른 생대황(生大黃) 및 주대황(酒大黃)이 어혈병태모형에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 19(1):114-133, 1998.
- 안덕균, 원도희, 김종호. 4-vessel occlusion으로 유발한 흰쥐 전뇌허혈의 신경세포 손상에 대한 대황의 방어효과. 대한본초학회지 14(1):111-120, 1999.
- Barres, B. A., Barde, Y. Neuronal and glial cell biology. Curr Opin Neurobiol. 10, 642-648, 2000.
- Brune, B., von Knethen, A., Sandau, K. B. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. Cell Death Differ. 6, 969-975, 1999.
- Zimmer, J., Gahwiler, B. H. Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. J Comp Neurol. 228, 432-446, 1984.
- 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.
- Sugaya, K., Chouinard, M., McKinney, M. Immunostimulation protects microglial cells from nitric oxide-mediated apoptosis. Neuroreport. 8, 2241-2245, 1997.
- 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.
- 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.
- Noraberg, J., Kristensen, B. W., Zimmer, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. Brain Res Protoc. 3, 278-290, 1999.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lobner, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis. J Neurosci Methods. 96, 147-152, 2000.
- McCord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative

- stress. *Am J Med.* 108, 652-659, 2000.
25. Bondy, S. C. Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage. *Neurotoxicol.* 13, 87-100, 1992.
 26. 오성준, 백남인, 김해영. 대황 (*Rheum undulatum* L.) 뿌리의 항산화 활성물질. *Piceatannol. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol.* 44(3):208-210, 2001.
 27. Gremo, F., Sogos, V., Ennas, M. G., Meloni, A., Persichini, T., Colasanti, M., Lauro, G. M. Features and functions of human microglia cells. *Adv Exp Med Biol.* 429, 79-87, 1997.
 28. Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G. W.. Microglia: Intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Rev.* 20, 269-287, 1995.
 29. Moore, S., Thanos, S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Neurobiol.* 48, 441-460, 1996.
 30. 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.
 31. 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.
 32. Stoll, G., Jander, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology on the CNS. *Prog Neurobiol.* 58, 233-247, 1999.
 33. 김호철, 안덕균. 대황과의 배합전탕이 대황 중 sennoside b의 추출량에 미치는 영향. *대한본초학회지* 11(1):75-78, 1996.
 34. 안덕균, 이상인, 김호철. 대황의 전탕시간 및 수침방법이 대황 중 sennoside b의 추출량에 미치는 영향. *경희한의대논문집.* 9(2):153-156, 1996.
 35. Park, E. K., Choo, M. K., Yoon, H. K., Kim, D. H. Antithrombotic and antiallergic activities of rhaponticin from *Rhei Rhizoma* are activated by human intestinal bacteria. *Arch Pharm Res.* 25(4):528-533, 2002.
 36. 손영종, 김윤상, 이영종. 대황이 고지혈증 흰쥐의 혈중지질 및 효소활성에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 14(1):61-68, 1999.
 37. 이영종. 대황 전탕액 분획이 고지사료 투여 흰쥐의 혈중 지질 함량에 미치는 영향. *대한본초학회지* 15(2):87-93, 2000.
 38. 배정환, 이종수, 김성수, 신현대. 대황이 비만유도 백서의 체중과 부고환지방조직 변화에 미치는 영향에 대한 연구. *한방재활의학회지* 8(2):62-76, 1998.
 39. 오명길, 송용선. 대황 추출액이 백서의 비만모형에 미치는 영향. *한방재활의학회지* 7(2):46-64, 1997.
 40. Sanae, F., Komatsu, Y., Chisaki, K., Kido, T., Ishige, A., Hayashi, H. Effects of San'o-shashin-to and the constituent herbal medicines on theophylline-induced increase in arterial blood pressure of rats. *Biol Pharm Bull.* 24(10): 1137-1141, 2001.
 41. Uchida, S., Ikari, N., Ohta, H., Niwa, M., Nonaka, G., Nishioka, I., Ozaki, M. Inhibitory effects of condensed tannins on angiotensin converting enzyme. *Jpn J Pharmacol.* 43(2):242-246, 1987.
 42. 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.
 43. 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.
 44. 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.
 45. Kristensen, B. W., Norberg, J., Zimmer, J. Comparison of excitotoxic profiles of ATPA, AMPA, KA and NMDA in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res.* 917, 21-24, 2001.
 46. 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.
 47. 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.
 48. 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.
 49. 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.
 50. Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 284, 555-556, 1980.
 51. Ahlemeyer, B., Klumpp, S., Kriegstein, J. Release of cytochrome c into the extracellular space contributes to neuronal apoptosis induced by staurosporine. *Brain Res.* 934, 107-116, 2002.
 52. Ankarcrone, 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.