

# 鮮地黃이 PC12 세포 및 뇌해마 신경세포 손상에 미치는 영향

조재현 · 신정원<sup>3</sup> · 심은섭 · 김범희<sup>1</sup> · 손영주<sup>2</sup> · 정혁상<sup>1</sup> · 손낙원\*

경희대학교 동서의학대학원 신경과학 및 뇌질환전공, 1: 경희대학교 한의과대학 해부학교실 및 한의학연구소,  
2: 상지대학교 한의과대학 부인과학교실, 3: 워싱턴대학교 의과대학 해부학 및 신경생물학교실

## Neuroprotective Effects of Rehmanniae Radix on PC12 Cells and Hippocampal Neural Cells

Jae Heun Jo, Jung Won Shin<sup>3</sup>, Eun Shep Shim, Bum Hoi Kim<sup>1</sup>, Young Joo Sohn<sup>2</sup>, Hyuk Sang Jung<sup>1</sup>, Nak Won Sohn\*

*Department of Neuroscience and Brain Disease, Graduate School of East-West Medicine, Kyung Hee University,  
1: Department of Anatomy & Institute of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University,  
2: Department of Gynecology, College of Oriental Medicine, Sangji University,  
3: Department of Anatomy & Neurobiology, School of Medicine, Washington University in St. Louis, USA*

The present study investigated neuroprotective effects Rehmanniae Radix on PC12 cells and hippocampal neural cells. PC12 cells were damage by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide and organotypic hippocampal slice cultures were damaged by oxygen-glucose deprivation. Then methanol extract of Rehmanniae Radix was treated with 0.5, 5, and 50 µg/ml in culture media. Effects of Rehmanniae Radix were evaluated with cell viability assay, PI-staining, and TUNEL-labeling. Treatment of Rehmanniae Radix (with 5 and 50 µg/ml) produced significant increase of cell viability of PC12 cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and by SNP-induced nitric oxide. Treatment of Rehmanniae Radix produced significant decrease of PI-uptake % in CA1 (with 5 and 50 µg/ml) and DG (with 50 µg/ml) regions of organotypic hippocampal slice cultures damaged by oxygen-glucose deprivation. Moreover, treatment of Rehmanniae Radix produced significant decrease of TUNEL- positive cells in CA1 (with 5 and 50 µg/ml) and DG (with 50 µg/ml) regions of organotypic hippocampal slice cultures damaged by oxygen-glucose deprivation. These results suggest that methanol extract of Rehmanniae Radix has neuroprotective effects on PC12 cells damaged by oxidative stress and on organotypic hippocampal slice cultures damaged by oxygen-glucose deprivation.

Key words : neuroprotection, Rehmanniae Radix, PC12 cells, hippocampus, organotypic culture

### 서 론

최근 중풍, 허혈성 뇌질환, 치매 등 중추신경계 질환에 대한 각종 한약물의 효능에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 신경손상 보호효능의 효과적인 치료약물 개발에 있어 어려운 점 중의 하나는 약물효능을 정확히 예측할 수 있는 실험모델의 부족이라 할 수 있다. 세포실험은 신경세포내에 국한된 기전연구라는 점이, 동물실험은 실험동물의 혈압이나 체온 등 신체적인 상황이 뇌손상의 정도에 큰 영향을 미치며, 또한 한약물의 뇌혈관

문 통과가 어려운 점 등 약물의 투과성 문제 및 유효량의 문제 등이 존재한다.

鮮地黃은 玄蓼科 (Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 草本인 지황 *Rehmanniae glutinosa* Liboschite var. *purpurea* Makino의 신선한 뿌리로 수침방법에 따라 鮮地黃, 乾地黃 또는 熟地黃으로 사용된다. 鮮地黃은 味가 甘苦하고 性이 寒하며 淸熱 涼血 養陰生津하므로 溫熱病과 血熱妄行으로 인한 吐血과 衄血, 消渴, 熱痺腫痛, 產後血崩 등에 응용된다<sup>1-4)</sup>. 地黃의 생약학적 성분은 catalpol, rehmanniosides, rehmannin, β-sitosterol 등이 알려져 있으며, 중추신경계의 진정, 소염 및 면역증강, 지혈 등의 작용이 보고되어 있다<sup>1,2)</sup>. 실험적 연구로는 地黃이 주로 滋陰之劑로 사용된다는 점과 관련하여 면역증강 효능에 대한 연구가 보고 되어 있으며<sup>5,6)</sup>, 淸熱作用과 관련하여 항균 및 항염증작용에

\* 교신저자 : 손낙원, 경기 용인 기흥구 서천동 1 경희대학교 동서의학대학원

· E-mail : sohnw@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2747

· 접수 : 2007/09/19 · 채택 : 2007/11/21

대한 보고가 있다<sup>7)</sup>. 또한 고혈압의 신장기능에 대한 효능과 renin 분비 감소 효능 등<sup>8-10)</sup>과 말초혈류를 개선하는 효능<sup>11-13)</sup>도 보고된 바 있다. 최근 地黃의 성분인 catalpol이 PC12 세포의 산화적 손상 또는 gerbil의 뇌허혈 손상에 대하여 보호효능이 있음<sup>14-16)</sup>이 보고되었다.

뇌해마조직의 장기양 조직배양 방법(organotypic hippocampal slice culture, OHSC)은 비교적 준비 및 처리가 쉽고, 뇌조직의 일반적인 구성을 유지하고 있으며, 특히 신경세포 간의 연결이 유지되고 있는 것이 큰 장점이라 할 수 있다. 또한 약물의 처리가 용이하고, 신경세포의 손상 및 회복 정도를 조직과 조직배양액을 이용하여 보다 더 쉽게 정량화 할 수 있다. 이에 저자는 鮮地黃의 허혈손상에 대한 뇌신경세포손상 보호효과를 뇌신경세포의 산화적 손상 및 뇌해마 조직 허혈손상에 대한 효과로 나누어, 일차적으로 rat pheochromocytoma (PC12) 세포주에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 nitric oxide로 산화적 손상을 유발한 다음 세포 생존율에 미치는 효능을 관찰하고, 나아가 뇌해마의 장기양조직 절편배양에서 산소와 glucose 박탈에 따른 허혈손상에 대하여 propidium iodide (PI) 염색에 의한 신경세포사멸 정도의 변화 및 세포자연사와 관련된 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 양성반응 세포 수의 변화를 관찰하여 유의한 신경세포손상 보호효능을 관찰하였기에 이에 보고하는 바이다.

## 실험방법

### 1. 약물

실험에 사용한 한약물은 鮮地黃 (Rehmanniae Radix)으로, 매우 잘게 썰은 약재 200 g을 70% 에탄올 (ethanol) 3,000 ml에 넣어 5일간 실온에서 추출한 다음 여과지로 여과하고, rotary evaporator로 감압 농축한 후 완전히 동결건조시켜 에탄올추출액기스 10.1 g을 얻어 실험에 사용하였다.

### 2. PC12 세포의 산화적 손상에 대한 실험

#### 1) 세포배양 및 산화적 손상의 유발

PC12세포를 각각 24-well plate에 well (500  $\mu$ l) 당  $1 \times 10^6$  cells가 되도록 조정하고 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 세포가 원하는 만큼 자라면 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후 serum free media로 배양액을 교환해주었다. 산화적 손상을 유발하기 위하여 각각 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 100  $\mu$ M 단위로, sodium nitroprusside (SNP)는 1,500  $\mu$ M 단위로 처리하여 배양하였다<sup>17)</sup>.

#### 2) 세포생존율에 미치는 효능의 측정

PC12세포에 각각 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 SNP를 처리하기 1시간 전에 鮮地黃의 에탄올추출액기스를 0.5, 5 및 50  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하고 24시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, 이어서 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 0.5 mg/ml) 용액을 처리하고 2시간동안 재배양하였다. 그 다음 배양액을 제거하고 dimethyl sulfoxide를 200  $\mu$ l씩 넣고 잘 혼합한 다음 100 ml의 배양액을 채취하여 ELISA reader로 540

nm 파장에서 흡광도를 측정하였다<sup>18)</sup>.

### 3. 뇌해마 조직배양의 허혈손상에 대한 실험

#### 1) 뇌해마 조직배양

실험에 사용한 뇌조직은 7일령 Sprague-Dawley계 흰쥐의 뇌해마 (hippocampus)로 그 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 흰쥐의 머리를 단두한 후 안과용 가위로 재빨리 두피와 두개골을 제거하고 대뇌를 적출하였다. 적출한 대뇌를 petri dish에 담겨있는 해부용 media (MEM 500 ml + 25 mM HEPE + 4 mM L-glutamine, pH 7.4)에 옮기고 수술용 현미경을 이용하여 양쪽 대뇌반구에서 각각의 뇌해마를 적출하였다. 적출된 뇌해마를 조심스럽게 조직절편기 (tissue chopper)의 상판에 올려놓은 후 350  $\mu$ m 두께로 조직절편을 만들었다. 각각 분리된 뇌해마 조직을 culture insert에 옮기고, 1 ml의 culture media가 담겨있는 6-well culture dish에 insert를 삽입하였다. 이후 5% CO<sub>2</sub>, 36°C 상태의 humidified incubator에서 10일 동안 조직배양 하였다. 조직배양액은 50% MEM (500 ml 당 1 g glucose 함유), 25% Hank's balanced salt solution (HBSS), 25% horse serum에 20 nM HEPES, 6 g/L glucose, 1 mM L-glutamine을 첨가하고 bottle top filter로 filtering한 다음 pH를 7.25~7.30으로 조정하였으며, 50 mg/ml의 streptomycin-penicillin을 첨가하였다. 조직배양액은 조직을 배양하는 동안 3일에 한번씩 교환해주었다<sup>19)</sup>.

#### 2) 허혈손상 유발

뇌해마조직에 허혈손상은 산소와 glucose 공급을 완전히 차단하는 방법 (oxygen-glucose deprivation, OGD)을 사용하였으며, 그 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. Anaerobic chamber (85% nitrogen, 10% carbon dioxide, 5% hydrogen) 안에 PI가 첨가되고 glucose가 없는 ischemia balanced salt solution (IBSS, 143.4 mM NaCl, 5 mM HEPES, 5.4 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)를 배양시작 12시간 전에 넣어둠으로써 IBSS 안에 녹아있는 여분의 O<sub>2</sub>를 완전히 제거시켰다. 10일 동안 조직배양 후 광학현미경을 이용하여 조직의 구조가 온전하지 않은 조직을 선별하여 제거하고, 이후 anaerobic chamber 안에서 IBSS가 담긴 culture dish로 뇌해마조직의 insert를 옮기고 45분 동안 산소와 glucose 공급이 차단된 OGD에 의한 ischemic condition을 유발시켰다. 정확한 시간동안 ischemic condition을 유발시킨 후 미리 준비된 PI가 들어있는 신선한 serum free media로 뇌해마조직의 insert를 옮긴 후 normoxia condition (95% air-5% CO, 36.5°C)에서 48시간 동안 조직을 재배양 하였다<sup>20)</sup>.

#### 3) 한약물의 처리

鮮地黃의 에탄올추출액기스를 0.5, 5 및 50  $\mu$ g/ml의 농도로 ischemic condition 유발 45분전부터 이후 24시간 동안 각 단계의 culture media에 첨가시켰다.

#### 4) Propidium iodide 염색 및 신경세포사멸 정도의 측정

뇌해마조직을 PI가 5 mg/ml로 첨가된 culture media의 새로운 6 well dish에 옮기고 2시간 동안 preconditioning한 다음 연속하여 위의 조직배양방법에서 설명한 각 단계별 culture

media에 PI를 첨가하여 조직을 배양하였다. 한약물 처리와 OGD의 ischemic condition을 주기 전에 형광현미경 (Axiovert S100, Zeiss)을 이용하여 정상적인 상태의 뇌해마조직 PI-염색 사진을 얻었으며, 45분간의 OGD 후 24시간 후에 형광현미경을 사용하여 PI-염색 사진 (사진A)을 얻고, 곧바로 고농도의 glutamate를 처리하여 조직을 완전히 손상시킨 다음 다시 PI-염색 사진 (사진B)을 얻었다. 형광현미경의 UV filter는 rhodamine filter를 사용하였다. 각각의 PI-염색 사진들을 컴퓨터영상분석기로 옮긴 다음 NIH ImageJ software (Ver. 1.32)를 사용하여 뇌해마조직의 CA1 및 DG 구역에서 적색으로 염색된 PI 흡광도 (optical density, OD)를 측정하고, 사진B의 PI 흡광도에 대한 사진A의 PI 흡광도 비율을 계산하여 신경세포사멸의 정도를 수치화하였다(21).

5) TUNEL 염색 및 양성반응 신경세포 수의 측정

뇌해마조직에 OGD에 의한 ischemic condition을 유발한 후에 뇌해마조직을 1% paraformaldehyde를 포함한 PBS (pH 7.4)로 10분간 고정하고 5분간 2회 세척한 다음 ethanol-acetic acid solution으로 -20℃에서 20분간 재고정하였다. TUNEL 염색의 과정은 간단히 설명하면 다음과 같다. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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 counting staining 하고 100% n-Butanol로 세척한 다음 봉합하였다<sup>22)</sup>. 광학현미경이 연결된 컴퓨터영상분석기의 NIH ImageJ software를 이용하여 뇌해마의 CA1 및 DG 구역의 면적을 측정하고, 그 면적 내에서 관찰되는 TUNEL 염색에 양성반응을 보인 신경세포 수를 측정 한 다음 각각 단위면적 (10,000 μm<sup>2</sup>) 당으로 계산하였다.

4. 통계처리

실험결과는 통계 프로그램 SPSS® for windows (version 10.0, SPSS, Inc., Chicago, U.S.A.)를 사용하여 약물의 농도에 따른 지표의 발현수치를 비교할 경우 oneway ANOVA를 실시하였으며, 유의수준 P value<0.05인 경우 유의성이 있다고 평가하였고 post hoc test로서 Scheffe's test를 시행하였다.

실험성적

1. 鮮地黃이 PC12 세포의 산화적 손상에 미치는 영향

정상적인 배양상태인 normal군의 세포생존율을 100% 하였을 때, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 손상을 유발한 control군은 53.4±2.5%로 세포생존율이 현저하게 감소하였으며, 鮮地黃 0.5 μg/ml을 함께 처리한 SJH-0.5군은 61.3±4.4%로 증가하였으나 control군에 비하여 유의성은 없었다. 鮮地黃 5 μg/ml을 함께 처리한 SJH-5군에서는 68.6±3.7%, 50 μg/ml을 함께 처리한 SJH-50군에서는 67.5±4.8%로 각각 control군에 비하여 P<0.01 및 P<0.05의 유의성 있는 세포생존율의 증가가 관찰되었다. SNP로 산화적 손상을 유발한 control군은 48.7±2.6%로 세포생존율이 현저하게 감소하였

고, SJH-0.5군은 50.6±4.3%로 control군과 차이가 없었다. SJH-5군은 63.3±5.5%, SJH-50군은 60.1±4.1%로 모두 control군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 세포생존율의 증가가 관찰되었다(Fig. 1).

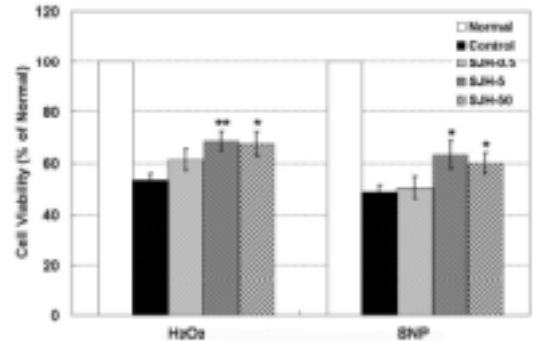


Fig. 1. Effect of Rehmanniae Radix on cell viability of PC12 cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SNP. Methanol extract of Rehmanniae Radix demonstrated significant anti-oxidative effect against PC12 cells damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SNP at 5 and 50 μg/ml concentration (\*, P<0.05; \*\*, P<0.01).

2. 鮮地黃이 허혈손상 뇌해마조직의 신경세포사멸에 미치는 영향

뇌해마조직 CA1구역에서 PI-흡광도에 의하여 측정된 신경세포사멸 정도는 정상적인 배양상태인 normal군에서는 3.8±0.9%로 매우 미약하였으며, 산소와 glucose의 박탈에 의하여 허혈손상이 유발된 control군은 63.4±5.0%로 신경세포사멸 정도가 현저하게 증가하였다. 鮮地黃 0.5 μg/ml을 처리한 SJH-0.5군은 58.0±5.0%로 감소하였으나 control군에 비하여 유의성은 없었다. 鮮地黃 5 μg/ml을 처리한 SJH-5군에서는 50.6±4.3%, 50 μg/ml을 처리한 SJH-50군에서는 42.0±5.6%로 각각 control군에 비하여 P<0.05 및 P<0.01의 유의성 있는 신경세포사멸의 억제효과가 관찰되었다. 뇌해마조직 DG구역에서 normal군은 2.2±0.7%이었으며, control군은 50.1±4.7%로 신경세포사멸 정도가 현저하게 증가하였다. SJH-0.5군은 46.5±3.4%, SJH-5군은 44.5±4.9%로 control군에 비하여 감소하였으나 유의성이 없었으며, SJH-50군은 38.0±4.1%로 control군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 신경세포사멸의 억제효과를 나타내었다(Fig. 2, 3).

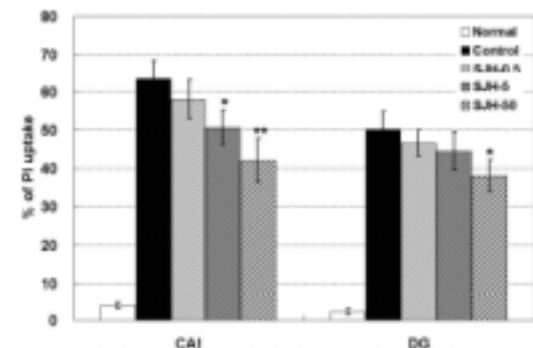


Fig. 2. Effect of Rehmanniae Radix on neuronal cell death in organotypic hippocampal slice cultures damaged by oxygen-glucose deprivation. Methanol extract of Rehmanniae Radix demonstrated significant anti-ischemia effect on CA1 (with 5 and 50 μg/ml) and DG (with 50 μg/ml) regions of the hippocampus damaged by oxygen-glucose deprivation (\*, P<0.05; \*\*, P<0.01).

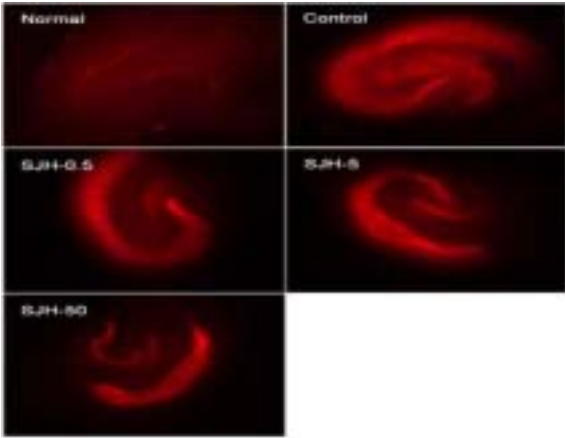


Fig. 3. Propidium iodide (PI) stained sections of organotypic hippocampal slice cultures damaged by oxygen-glucose deprivation (x40). Red colored regions are PI incorporated area by neuronal cell death. SJH means Rehmanniae Radix and 0.5, 5, and 50 indicate concentration of methanol extract of Rehmanniae Radix. SJH-5 and SJH-50 sections show significant decrease of PI uptake compared to the control section.

3. 鮮地黃이 허혈손상 뇌해마조직의 TUNEL-양성반응 신경세포에 미치는 영향

뇌해마조직 CA1구역에서 일정면적 (10,000  $\mu\text{m}^2$ ) 당 자연사한 TUNEL-양성반응 신경세포의 수를 측정할 때 normal군은  $1.7 \pm 0.6$  개로 매우 희소하였으며, 산소와 glucose의 박탈에 의하여 허혈손상이 유발된 control군은  $46.7 \pm 5.6$  개로 자연사한 신경세포 수가 현저하게 증가하였다. 鮮地黃 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 SJH-0.5군은  $39.7 \pm 5.4$  개로 감소하였으나 control군에 비하여 유의성은 없었다. 鮮地黃 5  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 SJH-5군에서는  $29.0 \pm 3.7$  개, 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 SJH-50군에서는  $22.0 \pm 4.8$  개로 각각 control군에 비하여  $P < 0.05$  및  $P < 0.01$ 의 유의성 있는 신경세포 자연사 감소효과가 관찰되었다. 뇌해마조직 DG구역에서 normal군은  $1.3 \pm 0.8$  개이었으며, control군은  $38.4 \pm 4.5$  개로 신경세포 자연사가 현저하게 증가하였다. SJH-0.5군은  $33.2 \pm 5.1$  개, SJH-5군은  $31.1 \pm 3.7$  개로 control군에 비하여 감소하였으나 유의성이 없었으며, SJH-50군은  $26.3 \pm 3.8$  개로 control군에 비하여  $P < 0.05$ 의 유의성 있는 신경세포 자연사의 감소효과를 나타내었다(Fig. 4, 5).

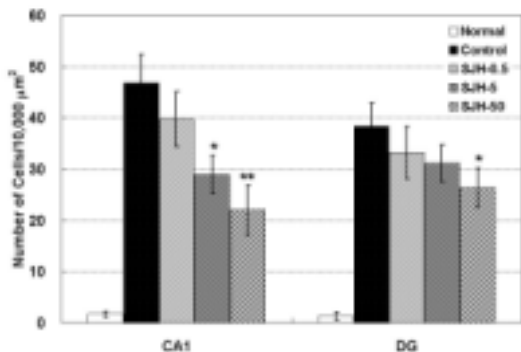


Fig. 4. Effect of Rehmanniae Radix on TUNEL-positive cells in organotypic hippocampal slice cultures damaged by oxygen-glucose deprivation. Methanol extract of Rehmanniae Radix demonstrated significant anti-apoptotic cell death on CA1 (with 5 and 50  $\mu\text{g/ml}$ ) and DG (with 50  $\mu\text{g/ml}$ ) regions of the hippocampus damaged by oxygen-glucose deprivation (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).

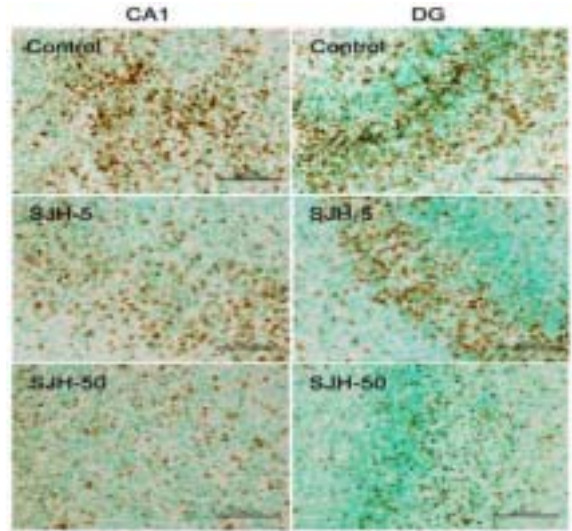


Fig. 5. TUNEL immuno-reacted sections of organotypic hippocampal slice cultures damaged by oxygen-glucose deprivation. Dark brown colored cells are TUNEL-positive cells in stage of apoptotic cell death. SJH means Rehmanniae Radix and 0.5, 5, and 50 indicate concentration of methanol extract of Rehmanniae Radix. SJH-50 sections show significant decrease of TUNEL-positive cells compared to the control sections in both CA1 and DG. Scale bars are 100  $\mu\text{m}$  (x200).

고찰

鮮地黃은 淸熱涼血 養陰生津하는 효능으로 면역기능을 증강시키는 효능이 있다는 연구들이 보고되어 있다<sup>5,6)</sup>. 최근에는 地黃의 성분인 catalpol이  $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의한 산화적 손상의 PC12 세포에 대하여 caspase 기전을 억제하고 cytochrome c 분비를 억제한다고 하였으며<sup>14)</sup>, gerbil의 일시적인 전뇌허혈에 대하여 신경세포 손상 보호효능이 보고된 바 있다<sup>15,16)</sup>. 본 실험에서는 鮮地黃의 뇌허혈에 대한 신경세포 보호효능을 관찰하기 위해서, 일차적으로 신경세포의 항산화 효능 검색 및 기전연구에 많이 사용되고 있는 neural crest에서 분화된 신경전구세포인 PC12 세포<sup>23)</sup>에 대한 항산화 효능을 탐색하였다. PC12 세포에  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 산화적 손상을 유발하고 鮮地黃 에탄올추출물을 처리한 결과 5 및 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서 control군에 비하여  $P < 0.01$  및  $P < 0.05$ 의 유의성 있는 세포생존율의 증가가 관찰되었다 (Fig. 1). 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군은 효과가 없었으며, 5  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군이 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에 비하여 더 우수한 항산화 효능을 나타내었으므로, 농도에 비례적이지는 않지만, 이러한 결과는 鮮地黃이 신경세포의 산화적 손상을 억제하는 효능을 가지고 있다는 것을 보여주었다.

Nitric oxide는 정상적인 신경세포에서는 신경세포의 신호전달자로서 역할을 하는 gas성 분자이지만 뇌허혈과 각종 신경퇴행성 질환에서는 병리적 변화를 일으키는 한 요인이 된다는 사실은 잘 알려져 있으며, 신경세포에 nitric oxide를 고농도로 처리하였을 때 신경독성에 의하여 세포자연사 기전을 포함한 신경세포 사멸을 일으킨다<sup>24-26)</sup>. in vitro 실험에서 nitric oxide에 의한 산화적 손상을 유발하기 위해서는 화학적인 nitric oxide 제공자(donor)인 sodium nitroprusside (SNP)를 많이 사용하고 있다<sup>27)</sup>. 본 실험에서 PC12 세포에 SNP를 처리하여 nitric oxide에 의한 산화적 손상을 유발한 다음 鮮地黃 에탄올추출물을 처리한 결과

5 및 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군 모두에서 control군에 비하여  $P < 0.05$ 의 유의성 있는 세포생존율의 증가가 관찰되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 鮮地黃이 nitric oxide에 의한 신경세포의 산화적 손상에 대해서도 억제효능이 있음을 나타낸다.

위에서와 같이 鮮地黃이 신경세포의 산화적 손상에 대해서 유의한 억제효능이 있다는 것을 확인하였으므로, 나아가 뇌해마의 허혈손상에 대한 효능을 관찰하였다. 뇌해마가 허혈손상에 가장 민감한 부위라는 것은 많은 연구를 통하여 잘 알려져 있으며, 뇌해마의 조직배양 방법은 in vivo에서 볼 수 있는 신경세포간의 신경연접을 온전히 갖고 있다는 점에서 in vitro 실험의 단점이 보완될 수 있는 많은 장점을 가지고 있다<sup>19,28)</sup>. 그러므로 뇌해마의 장기양조직 절편배양 (organotypic hippocampal slice culture, OHSC)에 산소와 glucose를 일시적으로 차단하는 허혈손상 모델 (oxygen-glucose deprivation, OGD)은 신경계 약물의 손상보호 효능검색, 중추신경계 퇴행과정 및 신경연접의 excitotoxicity 등을 연구하는데 많이 이용되고 있다<sup>20,29)</sup>. 신경세포사멸의 정도를 측정하기 위해서는 배양조직을 PI로 형광염색 하였다. PI는 세포가 사멸기전을 일으키면 세포막이 손상되므로 세포내로 침투하여 세포핵의 DNA에 부착하여 형광을 발색하게 되므로 세포사멸을 증명하는데 많이 사용된다<sup>21,30)</sup>.

본 실험에서 OHSC에 45분간의 OGD에 의하여 허혈손상을 유발하고 24시간동안 鮮地黃 에탄올추출물을 처리한 결과, 뇌해마조직 CA1 구역에서는 5 및 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서 control군에 비하여  $P < 0.05$  및  $P < 0.01$ 의 유의성 있는 신경세포사멸의 억제효과가 관찰되었고, 뇌해마조직 DG구역에서는 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서만 control군에 비하여  $P < 0.05$ 의 유의성 있는 신경세포사멸의 억제효과를 나타내었다 (Fig. 2, 3). 이러한 결과는 鮮地黃 에탄올추출물이 허혈손상에 의한 신경세포사멸에 대해서 보호효능이 있음을 보여주는 것이다. 이외에 유의한 효능을 나타낸 鮮地黃 에탄올추출물의 농도가 PC12 세포의 in vitro 실험에서는 5  $\mu\text{g/ml}$  이었으나 OHSC 실험에서는 50  $\mu\text{g/ml}$  이었다. 이러한 차이점은 배양 및 약물처리의 대상이 단일세포주일 때와 조직절편일 때의 차이에 의한 것으로 생각된다.

세포자연사를 조직학적으로 관찰하는 방법 중 많이 이용되는 것이 세포자연사 과정에서 세포핵의 DNA가 갈라지는 기전을 이용하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)을 하는 방법이다<sup>22,31)</sup>. 본 실험에서 OHSC에 45분간의 OGD에 의하여 허혈손상을 유발하고 24시간동안 鮮地黃 에탄올추출물을 처리한 결과, 뇌해마조직 CA1구역에서는 5 및 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서 control군에 비하여  $P < 0.05$  및  $P < 0.01$ 의 유의성 있는 TUNEL-양성반응 신경세포 수의 감소효과가 관찰되었고, 뇌해마조직 DG구역에서는 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서만 control군에 비하여  $P < 0.05$ 의 유의성 있는 TUNEL-양성반응 신경세포 수의 감소효과가 관찰되어 PI-흡광도에 의한 신경세포사멸의 억제효과에서와 동일한 결과를 나타내었다 (Fig. 4, 5). 이러한 결과는 鮮地黃 에탄올추출물이 허혈손상에 의한 신경세포의 자연사에 대해서 보호효능이 있음을 보여주는 것이다.

본 실험의 결과들을 총괄하면, 鮮地黃의 에탄올추출물은

nitric oxide 등의 산화적 손상과 허혈손상에 대하여 유의한 보호 효능을 나타내었으며, 이러한 결과는 鮮地黃이 in vivo 상태의 뇌허혈 손상에 대해서도 일정한 보호효능을 나타낼 수 있다는 기초적 근거자료를 제시하는 것으로 생각된다.

## 결론

鮮地黃이 뇌신경세포 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, PC12 세포의  $\text{H}_2\text{O}_2$  및 nitric oxide에 의한 산화적 손상에 대한 효능과 뇌해마의 장기양조직 절편배양에서 산소와 glucose 박탈에 의한 허혈손상에 대한 효능을 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다. 鮮地黃의 에탄올추출물은 PC12 세포의  $\text{H}_2\text{O}_2$  손상에 대하여 5 및 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서 유의성 있는 세포생존율의 증가가 관찰되었으며, SNP 처리에 의한 nitric oxide 손상에 대하여도 5 및 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서 유의성 있는 세포생존율의 증가가 관찰되었다. 鮮地黃 에탄올추출물은 뇌해마 장기양조직 절편배양의 허혈손상에 대하여 CA1구역에서는 5 및 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군, DG구역에서는 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서 유의성 있는 신경세포사멸의 억제가 관찰되었다. 또한 鮮地黃 에탄올추출물은 뇌해마 장기양조직 절편배양의 허혈손상에 대하여 CA1구역에서는 5 및 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군, DG구역에서는 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서 유의성 있는 TUNEL-양성반응 신경세포 수의 감소가 관찰되었다. 이상의 결과로 보아 鮮地黃의 에탄올추출물은 nitric oxide 등의 산화적 손상과 뇌해마의 허혈손상에 대하여 유의한 보호효능을 나타내는 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 BK 21 사업에 의해 지원되었음.

## 참고문헌

1. 김호철. 한약약리학. 서울, 집문당. pp 467-469, 2001.
2. 이상인, 안덕균, 신민교. 한약임상응용. 서울, 성보사. pp 105-106, 1990.
3. 이상인. 본초학. 서울, 의약사. p 105, 1975.
4. 이시진. 본초강목. 서울, 고문사. p 1205, 1975.
5. 권영달, 송용선. 생지황(生地黃)의 투여가 마우스의 선천면역 및 적응면역 반응에 미치는 영향. 한방재활의과학회지 8(1):233-254, 1998.
6. 황영명, 고병희, 송일병. 생지황, 건지황, 숙지황이 세포성면역반응 및 체액성면역반응에 미치는 영향. 경희한의대논문집 10: 207-218, 1987.
7. Dai, Y., But, P.P., Chan, Y.P., Matsuda, H., Kubo, M. Antipruritic and antiinflammatory effects of aqueous extract from Si-Wu-Tang. Biol. Pharm. Bull. 25(9):1175-1178, 2002.
8. 박정배, 김경식. 지황 수침이 실험적 신성 고혈압 백서의 신장기능에 미치는 영향. 대한침구학회지 11(1):225-239, 1994.

9. 이호섭, 류도곤, 윤용갑, 유윤조. 지황 전탕액 투여가 백서의 혈장 Renin 활성도, 혈장 Aldosterone 및 Atrial Natriuretic Peptide 농도에 미치는 영향. 대한한의학회지 17(1):329-335, 1996.
10. Lee, H.S., Kim, S.T., Cho, D.K. Effects of rehmanniae radix water extract on renal function and renin secretion rate in unanesthetized rabbits. Am. J. Chin. Med. 21(2):179-186, 1993.
11. 권남원, 송병기, 구분홍. 생지황 및 대계가 생쥐의 혈장 Prothrombin Time에 미치는 영향. 경희한의대논문집 5: 259-268, 1982.
12. Kubo, M., Asano, T., Matsuda, H., Yutani, S., Honda, S. Studies on Rehmanniae radix. III. The relation between changes of constituents and improvable effects on hemorheology with the processing of roots of Rehmannia glutinosa. Yakugaku Zasshi, 116(2):158-168, 1996.
13. Kubo, M., Asano, T., Shiimoto, H., Matsuda, H. Studies on rehmanniae radix. I. Effect of 50% ethanolic extract from steamed and dried rehmanniae radix on hemorheology in arthritic and thrombotic rats. Biol. Pharm. Bull. 17(9):1282-1286, 1994.
14. Jiang, B., Liu, J.H., Bao, Y.M., An, L.J. Catalpol inhibits apoptosis in hydrogen peroxide-induced PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. Toxicon. 43(1):53-59, 2004.
15. Li, D.Q., Bao, Y.M., Zhao, J.J., Liu, C.P., Liu, Y., An, L.J. Neuroprotective properties of catalpol in transient global cerebral ischemia in gerbils: dose-response, therapeutic time-window and long-term efficacy. Brain Res. 1029(2):179-185, 2004.
16. Li, D.Q., Duan, Y.L., Bao, Y.M., Liu, C.P., Liu, Y., An, L.J. Neuroprotection of catalpol in transient global ischemia in gerbils. Neurosci. Res. 50(2):169-177, 2004.
17. Trembovler, V., Abu-Raya, S., Shohami, E. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhances cell damage in rat PC12 cells. Neurosci. Lett. 353(2):115-118, 2003.
18. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983.
19. 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.
20. 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. Lett. 327: 49-52, 2002.
21. 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.
22. 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.
23. Desolea, M.S., Sciolab, L., Sircanaa, S., Godania, C., Mighelia, R., Delogua, M.R., Pirasa, G., De Natalea, G., Mielea, E. Protective effect of deferoxamine on sodium nitroprusside induced apoptosis in PC12 cells. Neurosci. Lett. 247: 1-4, 1998.
24. Dawson, V.L., Dawson, T.M. Nitric oxide actions in neurochemistry. Neurochem. Int. 29: 97-110, 1996.
25. Garthwaite, J., Boulton, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. Annu. Rev. Physiol. 57: 683-686, 1995.
26. Youdim, M.B.H., Ben-Shachar, D., Eshel, G., Finterg, J.P.M., Risderer, P. The neurotoxicity of iron and nitric oxide. Relevance to the etiology of Parkinson's disease. Adv. Neurol. 60: 259-266, 1993.
27. Rief, D.W., Simmons, R.D. Nitric oxide mediates iron release from ferritin. Arch. Biochem. Biophys. 283: 537-541, 1990.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.