

ER Stress에 의해 유발된 C6 Glial Cells의 손상에 대한 龍腦의 보호효과

전인철 · 방창호 · 문병순 · 이 인*

원광대학교 한의과대학 한방내과학교실

Protective Effect of Borneolum on ER Stress-induced Damage in C6 Glial Cells

In Cheol Jeon, Chang Ho Bang, Byung Soon Moon, In Lee*

Department of Oriental Internal Medicine, School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Unfolded protein response (UPR) is an important genomic response to endoplasmic reticulum (ER) stress. The ER response is characterized by changes in specific proteins, induction of ER chaperones and degradation of misfolded proteins. Also, the pathogenesis of several diseases like Alzheimer's disease, neuronal degenerative diseases, and diabetes reveal the role of ER stress as one of the causative mechanisms. Borneolum has been used for neuronal disease in oriental medicine. In the present study, the protective effect of borneolum on thapsigargin-induced apoptosis in rat C6 glial cells. Treatment with C6 glial cells with 5 μ M thapsigargin caused the loss of cell viability, and morphological change, which was associated with the elevation of intracellular Ca^{++} level, the increase in Grp78 and CHOP and cleavage of pro-caspase 12. Furthermore, thapsigargin induced Grp98, XBP1, and ATF4 protein expression in C6 glial cells. Borneolum reduced thapsigargin-induced apoptosis through ER pathways. In the ER pathway, borneolum attenuated thapsigargin-induced elevations in Grp78, CHOP, ATF4, and XBP1 as well as reductions in pro-caspase 12 levels. Also, our data showed that borneolum protected thapsigargin-induced cytotoxicity in astrocytes from rat (P3) brain. Taken together, our data suggest that borneolum is neuroprotective against thapsigargin-induced ER stress in C6 glial cells and astrocytes. Accordingly, borneolum may be therapeutically useful for the treatment of thapsigargin-induced apoptosis in central nervous system.

Key words : borneolum, ER stress, thapsigargin

서 론

소포체(endoplasmic reticulum; ER)는 단백질의 합성, 조합, 그리고 분비와 막단백질의 적절한 역할 등을 조절하는데 중요한 역할을 한다. 또한 세포내 Ca^{++} 저장을 위한 장소이며 세포내 Ca 항상성을 유지하는데 중요한 역할 수행한다고 알려져 있다^{1,2}. 이러한 소포체의 기능 손상을 유도하는 요인으로는 oxidative stress, glucose starvation, chemical toxicity, 세포내 Ca^{++} 농도의 변화, 그리고 glycosylation억제제가 알려져 있으며, 이러한 요인들을 ER stress라 표현하고 있다³. ER stress는 소포체 내에 잘못

조합된 단백질(unfolded proteins)의 축적을 보이며 지속적인 ER stress는 세포사멸을 야기하게 된다^{4,5}. 최근에는 Alzheimer's disease를 비롯한 신경계 퇴행성질환들, 당뇨병 등에서의 ER stress의 역할과 질병유발 기전에 대해 많이 보고되고 있다^{5,6}. 특히 잘못 조합된 단백질과 ER stress에 대한 연구는 신경계 퇴행성질환의 공통적인 양상으로 보여지고 있어, 신경세포손상으로 인한 많은 질병 연구가 진행되고 있다^{6,7}.

龍腦는 龍腦香科에 속한 常綠喬木인 龍腦香 수지를 가공한 것으로⁹⁻¹¹ 藥性이 辛散苦泄한 약제로서 방향성이 있으며 특히 經絡을 疏通시키고 鬱火를 풀며 驚癇을 진정시키고 消腫 止痛하는 효능이 있어 中風口噤, 熱病痰迷, 氣閉耳聾 및 癰腫 등에 사용하고 있는 약제다^{8,10}.

龍腦에 대한 실험적 연구로는 니코틴성 아세틸콜린 수용체

* 교신저자 : 이인, 익산시 신용동 원광대학교 익산한방병원 한방5내과

· E-mail : leein21@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-859-2805

· 접수 : 2009/11/21 · 수정 : 2009/12/01 · 채택 : 2009/12/11

의 활성억제¹¹⁾, malassezia furfur에 대한 항균활성¹²⁾, 고지혈증에 미치는 영향¹³⁾, 항경련효과^{14,15)} 등이 보고되고 있다.

이에 본 실험에서는 龍腦가 중추신경계 세포 손상으로 인한 질병에 보호약재로의 유용성을 확인하고자 C6 glial cells에 대한 보호효과를 알아보기 위하여, C6 glial cells에 thapsigargin에 의한 ER stress를 유도하여 세포사멸을 유발시킨 후 LDH 방출 변화, 세포내 Ca⁺⁺농도의 변화, ROS 생성, 그리고 ER stress에 관련된 Grp78, Grp94, CHOP, caspase 12, XBPI, ATF4의 발현 변화를 관찰하고, 龍腦의 전처리가 ER stress에 의한 C6 glial cells 손상에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 백서로부터 분리한 astrocytes에서의 ER stress에 의한 세포 사멸과 龍腦의 보호효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약제

본 실험에 사용한 약제는 대한약전 외 한약규격주해에 근거하여 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of borneolum

韓藥名	生藥名	學名
龍腦	Borneolum	Dryobalanops aromatica Gaertner

2) 세포주

본 실험에 사용한 백서로부터 유래한 C6 glial cells 세포주는 한국 세포주 은행(KCLB, 서울대학교)에서 분양 받았으며, 5% CO₂, 95% 대기공기 및 37°C 환경의 세포 배양기에서 계대배양 하면서 실험을 실시하였다.

3) 시약 및 기기

본 실험의 세포배양에 필요한 Dubelco's minimum essential medium (DMEM), 항생제, glucose free DMEM, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS)은 GIBCO BRL사 (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입 하였다. 세포 배양 배양 용기(24, 48-well plate, 6 cm dish, 10 cm dish)는 Falcon사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입한 후 사용하였다. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), thapsigargin은 Sigma (St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하였다.

Genomic DNA는 Genomic DNA purification kit (Promega 사)를 이용하여 추출하였다. LDH 측정은 Roch (R & D, Germany)로 구입한 kit를 사용하여 측정하였다. 세포내 Ca⁺⁺ 측적을 인지하는 형광 염색시약인 Flura-3AM, 활성산소를 측정하는 형광 염색은 DCF-DA (6-carboxy-2',7' dichlorodihydro-fluorescein diacetate)는 Molecular probe (USA)로부터 구입하여 사용하였다. Western blotting에 사용된 Grp78, Grp94, CHOP, caspase 12, XBPI, ATF4의 항체들은 Santa Cruz사 (San

Diego, CA, USA)제품, enhanced chemiluminescence kit (ECL kit, Amersham, England)를 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

시료는 eppendorf tube에 100 mg/ml가 되도록 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹여 4°C에 보관하고 실험 시에는 세포 배양액인 DMEM에 희석하여 사용하였다.

2) 세포주 배양

C6 glial cells 세포주는 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% FBS가 포함된 DMEM (Gibco BRL, England) 배양액으로 배양하였으며, 2-3일 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포를 이용하였다. 각 실험 조건에 따라 thapsigargin나 한약제 등을 처리한 후 ER stress로 인한 세포사멸과 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 실험을 수행하였다

3) 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 MTT (Sigma Co, St. Louis, MO, USA) assay 방법을 이용하였다. 세포 배양판(48-well plate)에 세포 (1×10⁵ 세포 수/ml)를 분주하여 12시간 이상 세포 배양기 안에서 안정화시켰으며, 각 조건에 따라 처리한 후 배양기 안에서 일정 시간 배양하였다. 배양 완료 4시간 전에 MTT 용액(5 mg/ml in PBS)을 배양액 부피에 1/10이 되도록 50 μ l씩 첨가한 다음, 4시간 후 상층액을 제거하여 바닥에 부착된 불용성의 보라색 formazan을 완전히 건조시켰다. 불용성 formazan을 용해시키기 위해 1 ml의 DMSO 용액으로 충분히 용해시킨 다음, 분광광도계 (ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 545 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정상 대조군의 값과 비교하여 백분율 (%)로 표시 하였다.

4) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit를 이용하여 추출하였다. 먼저 조건에 따라 처리된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질을 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 spectrophotometer (Beckman사) 하에서 optical density (OD)값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 μ g을 2.0% agarose gel에서 전기영동(50V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

5) Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

Thapsigargin에 의한 세포독성을 실험하기 위하여 처리 시간과 처리군에 따른 LDH 양을 측정하였다. 각 실험군으로부터 상층액을 모아 1,000 rpm으로 7분간 원심분리 시킨 후, tube의 부유액을 LDH 분석에 이용하였다. LDH 측정은 Roch로부터 구입한 kit를 이용 하였다.

각 실험군으로부터 포획한 상층액 100 ul에 LDH 측정을 위한 반응 혼합액 100 ul을 혼합하여, 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응은 빛을 차단한 상태로 진행하였으며, 반응 후 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 아래와 같은 식에 의해

$$\text{세포독성(\%)} = \frac{\text{실험군의 흡광도} - \text{정상 실험군의 흡광도}}{\text{정상 실험군에 가지는 총 LDH를 나타내는 흡광도}} \times 100$$

활성도를 산출하였다. LDH 양은 전체 LDH 활성도에 대한 실험군에서의 LDH 활성도를 백분율(%)로 표시하였다.

6) 세포내 Ca²⁺ 축적 변화 측정

세포내 Ca²⁺ 축적을 측정하기 위하여 형광시약을 사용하여 분석하였다. 각 조건에 따라 배양된 세포에 Flura-3AM (5 uM)을 처리하였다. Flura-3AM을 1시간 처리한 후 PBS로 세척한 후 1% trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 포집한 후, 즉각적으로 Flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences)를 이용하여 형광을 측정하였다. Flura-3AM은 녹색의 형광을 생성하며, 세포내 축적된 Ca²⁺에 따라 Flura-3AM에 의하여 형광의 증가 혹은 감소의 변화를 인지한다. 세포 내 Ca²⁺의 축적에 비례하여 발생하는 형광의 세기가 증가 하게 된다.

7) 활성산소(ROS)생성의 측정

C6 glial cells에서 thapsigargin에 의해 생성되는 세포내 활성산소는 형광 probe인 50 μM의 DCF-DA를 이용하여 측정하였다. 각 실험군의 세포를 포획하기 전 DCF-DA (50 uM/ml)을 넣어 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척한 후, 1% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 세포를 포집하였다. ROS 생성은 Flow cytometry (FACS Calibur, BD Bioscience)를 이용하여 세포내 활성산소 생성과 비례하여 나타나는 형광의 세기를 측정하였다. FL1-parameter는 DCF-DA에 의한 녹색형광의 생성 정도를 나타낸 것이다.

8) Western blotting

C6 glial cells를 각 실험 조건에 따라 龍腦 혹은 thapsigargin을 처리하여 배양한 후 세포를 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 total cell lysate를 얻기 위하여 RIPA 용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSH, 1 μg/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포 부유액에 2 X sample buffer와 섞어 98°C에서 5분간 끓인 후 12.5% sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30 V에서 16시간 동안 transfer한 후 blocking (5% skim milk)하여 상온에서 1시간 동안 반응하여 비 특이적 항체결합을 예방하였다. Grp78, Grp94, Gadd153 (CHOP), caspase 12, XBPI, ATF-4 및 β-actin 등에 대한 항체를 tris-buffered saline (TBS)에 1:1,000으로 희석하여

nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 이어서 2차 항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase (TBS로 1:1,000으로 희석, Amersham사)와 상온에서 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3회 세척 후 ECL kit를 사용하여 필름에 노출시켰다.

9) Astrocyte 분리 및 배양

백서 뇌조직으로부터 astrocyte 분리는 Nunokawa등¹⁶⁾의 방법에 의하여 분리하였으며, 필요에 따라 다른 방법과 혼용하여 사용하였다. 생후 3일 이내의 백서 대뇌를 무균적으로 분리하여 Ca²⁺, Mg²⁺이 없는 HBSS로 세척한 후 파스퇴르 파이펫으로 부드럽게 조직을 분쇄한다. 분쇄된 대뇌조직은 멸균된 거즈를 통과시킨 후, 200 x g로 원심분리하여 침전 세포만을 포획한다. 원심분리로 얻어진 세포는 20% FBS/DMEM에 현탁하여 poly-L-Lysine으로 coating된 flasks에 부착시키기 위하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 배양하였다. 배양 3일 후에 비 부착세포는 제거하고, 부착된 세포만을 10% FBS/DMEM으로 배양하였다. 부착된 세포는 매 3일마다 새로운 배양액으로 교환하면서 10일 정도 세포배양을 유지하였다. 이때 소교세포(microglia)의 부착을 배제하기 위하여 flask를 교반기에 250 rpm으로 2시간동안 흔들어서 비 부착 세포를 제거하였다. 이러한 과정으로부터 얻어진 세포를 이용하여 필요에 따른 실험을 수행하였다. 준비된 astrocyte 군에 각 조건에 따라 실험을 수행 후 광학현미경을 이용하여 실험 조건에 따른 세포군의 형태적 변화를 확인하였다.

10) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 실험결과 의 통계처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였으며, p-value가 최대치 0.05 (p<0.05), 0.01 (p<0.01)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 龍腦가 C6 glial cells의 세포생존율에 미치는 영향

실험에 사용된 龍腦가 C6 glial cells에 세포 독성을 보이는지 확인하고자 다양한 농도의 龍腦를 C6 glial cells에 24시간 처리하여 MTT 방법을 이용하여 龍腦에 의한 세포 독성 여부를 확인하였다. 龍腦의 처리는 비교적 낮은 농도에서 농도 의존적으로 세포생존율을 증가 시켰으며 특히 50 μg/ml에서는 대조군에 비하여 높은 생존율(107%)을 보였다. 하지만 높은 농도에서는 세포 독성을 보임을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

2. Thapsigargin처리가 C6 glial cells의 세포사멸에 미치는 영향

ER stress를 유도하여 세포고사를 유도하는 thapsigargin을 이용하여, thapsigargin이 ER stress에 의한 C6 glial cells의 생존에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보하고자, C6 glial cells에 thapsigargin 0.5, 5, 20 uM를 처리한 후 시간에 따른 세포 독성을 확인하였다. Fig. 2에 나타난 바처럼 thapsigargin 처리 시간에 따른 세포독성을 확인 할 수 있었으며, 5 uM thapsigargin 24 시간 처리 시 세포생존율이 58% 정도임을 확인하였다.

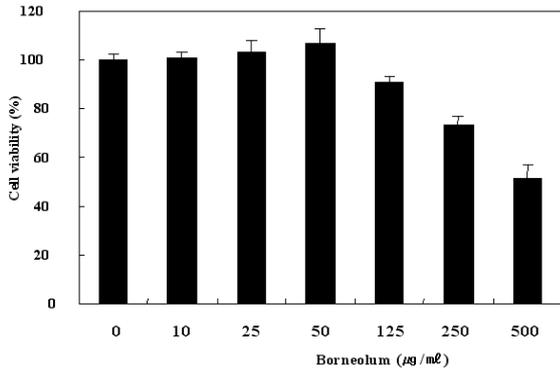


Fig. 1. Borneolum increased the viability of C6 glial cells. Cells were treated with a various concentration of borneolum for 24 h. The viability of cells was measured by MTT assay. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments.

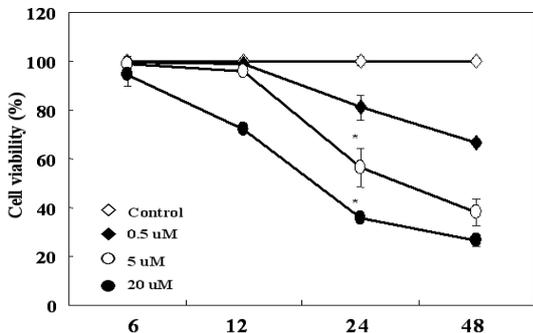


Fig. 2. Thapsigargin decreased the viability of C6 glial cells in a time-dependent manner. Cells were treated with a various concentration of thapsigargin for indicated period. The viability of cells was measured by MTT assay. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments. * p < 0.05 compared to control cells.

3. C6 glial cells 사멸에 대한 龍腦의 보호효과

龍腦의 처리가 thapsigargin에 의한 신경세포 사멸을 보호할 수 있는지 확인하고자 실험하였다. 앞선 결과를 토대로 thapsigargin에 의한 C6 glial cells의 사멸을 龍腦가 보호할 수 있는지 알아보고자, 5 μ M의 thapsigargin 처리에 다양한 농도의 龍腦를 전 처리 하였다. 龍腦의 전처리는 50 μ g/ml 처리 시 thapsigargin에 의한 세포사멸을 보호하여 생존율이 대조군과 유사하게 나타남을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 하지만 고농도(125 μ g/ml, 250 μ g/ml) 龍腦의 전처리는 thapsigargin에 의한 세포 손상을 회복하진 못하였다. 이는 앞서 龍腦 단독처리 시 고농도에서 세포독성을 보이는 결과에서도 확인한 할 수 있었다.

이와 같은 결과로부터 thapsigargin 5 μ M 처리에 의한 C6 glial cells의 세포사멸은 龍腦(50 μ g/ml)의 전처리에 의하여 보호됨을 알 수 있었다.

4. 龍腦가 세포고사에 미치는 영향

Thapsigargin에 의한 C6 glial cells의 사멸이 세포고사에 의해 유도된 죽음의 형태인지 확인하고자 DNA ladder를 확인하였다. 세포고사를 인지하는 일반적인 특징은 chromatin concentration, DNA fragmentation, 세포 형태의 위축 등으로 알

려져 있다. 본 연구에서는 먼저 DNA ladder를 확인하였다. Thapsigargin에 의한 DNA fragmentation은 뚜렷한 ladder를 나타내지는 않지만 agarose gel 상에 전체적으로 smear한 상태로 확인되었으며, 이러한 DNA fragmentation은 龍腦의 전처리에 의하여 어느 정도 회복됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

세포고사를 확인하는 또 다른 방법 중 세포내로부터 방출하는 LDH양을 측정함으로써 세포고사를 인지하게 된다. 먼저 5 μ M thapsigargin의 처리 후 시간에 따라 방출되는 LDH 양을 측정하였다(Fig. 5A). LDH의 방출은 9시간 경과 시까지는 거의 방출이 미미하였으나, 처리 12시간부터 LDH 방출이 증가하여 18시간 시 최고치를 나타내었다(95%). 또한 24시간 처리 시의 LDH 방출은 18시간 시 방출된 양과 유사함을 확인할 수 있었다. 이러한 LDH 방출의 증가는 龍腦의 전처리로 36%로 감소되어진다. 또한 龍腦 단독 처리(5.3%)는 대조군(5%)과 유사한 LDH 양을 나타내었다(Fig. 5B).

이러한 결과로부터 thapsigargin에 의한 세포사멸은 세포고사에 의하여 일어나며, 龍腦의 전처리는 C6 glial cells의 세포고사를 억제하는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

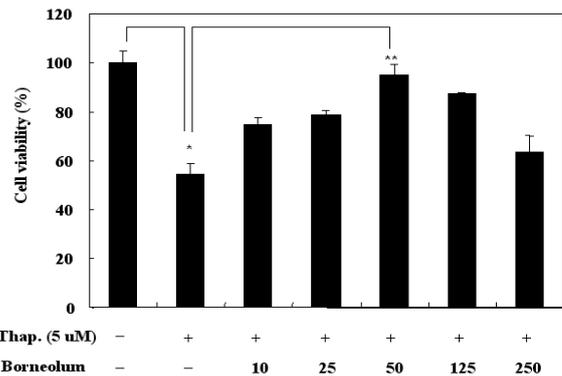


Fig. 3. Borneolum inhibited the thapsigargin-induced cell death in C6 glial cells. Cells were pre-treated with the various concentrations of borneolum for 3 h and the cells were exposed to thapsigargin for 24 h. The viability of cells was measured by MTT assay. Results were represented as the means \pm S.D. of three experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared to control cells.

Marker Control Borneolum Thap. Borneolum+Thap.

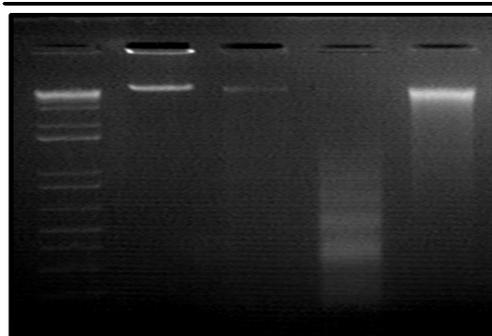


Fig. 4. Borneolum inhibited thapsigargin-induced DNA fragmentation in the C6 glial cells. The cells were pre-treated with 50 μ g/ml borneolum for 3 h then incubated in the absence or in the presence of 5 μ M thapsigargin for 24 h. Genomic DNA was extracted, separated on 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light.

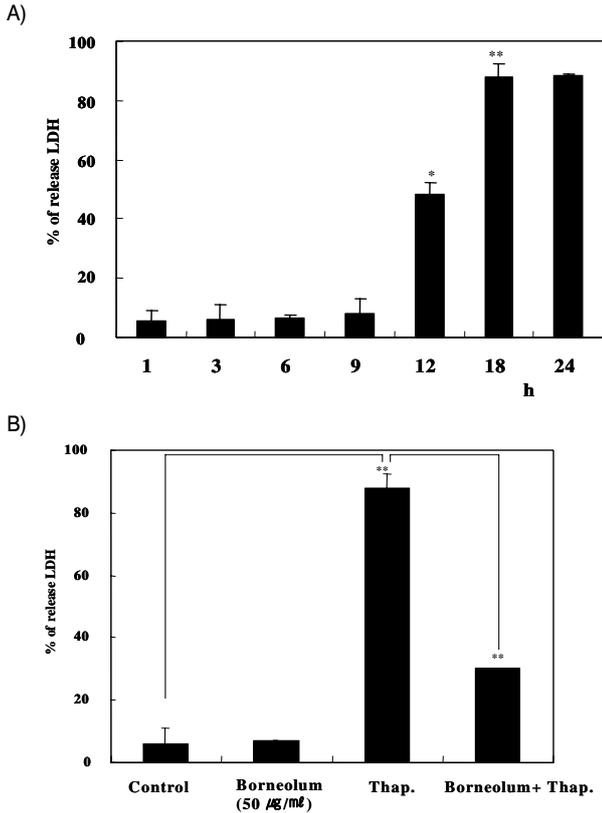


Fig. 5. Borneolum decreased the LDH release by the thapsigargin-induced cell death in C6 glial cells. Thapsigargin-induced cell death in time dependent manner, evaluated by LDH release. Cells were treated with 5 µM thapsigargin for different periods(A). Borneolum decreased the LDH release by the thapsigargin. Cells were treated with various conditions for 24 h(B). Culture medium samples were collected and assayed for LDH assay. Results were represented as the means ± S.D. of three experiment. *p < 0.05, **p < 0.01 compared to control cells.

5. 龍腦가 C6 glial cells내에서의 Ca⁺⁺축적에 미치는 영향

Thapsigargin의 처리는 세포 내 소포체의 손상(ER stress)을 야기하여 세포고사를 유도한다고 알려져 있다. ER stress로 인한 unfolded protein response (UPS)는 다양한 세포고사 유도과 관련된 신호전달 기전에 관여하는데 그 중 세포내 Ca⁺⁺의 축적을 야기한다고 알려져 있다¹⁷⁾. 본 연구에서는 thapsigargin의 처리가 C6 glial cells내에 Ca⁺⁺의 축적을 야기하는지 확인하였다. Thapsigargin (5 µM) 처리 후 시간에 따른 세포내 Ca⁺⁺농도의 증가를 인지하기 위하여 형광염색시약인 Flura-3AM을 이용하였다. Flura-3AM은 세포내 Ca⁺⁺농도에 따라 녹색의 형광을 발하게 됨으로 세포내 축적된 Ca⁺⁺농도에 비례하여 형광의 강도가 증가되며, 증가되는 형광 세기를 FACS를 이용하여 분석하였다. Fig. 6A에서 나타난 바처럼 thapsigargin의 처리는 시간에 따라 C6 glial cells 내 Ca⁺⁺의 축적을 야기 하였으며, 증가 양상은 Fig. 6B에서 뚜렷하게 확인할 수 있었다. 또한 thapsigargin에 의한 Ca⁺⁺의 세포내 축적이 龍腦의 전 처리에 의하여 변화하는지 확인하였다. 龍腦(50 µg/ml)의 전처리는 thapsigargin에 의한 Ca⁺⁺의 세포내 축적을 뚜렷하게 감소함을 Flura-3AM을 이용한 분석으로 확인하였다. Fig. 7A, B에 나타난 바처럼 thapsigargin처리에 의한 Ca⁺⁺의 세포내 축적은 대조군에 비하여 2배(105%) 이상 증

가하였으며 이러한 증가양상은 龍腦의 전처리에 의하여 현저하게 억제됨을 확인하였다(70% 정도 감소).

본 결과로부터 thapsigargin 처리는 C6 glial cells에 ER stress를 유발하여 세포내 Ca⁺⁺의 축적을 야기하고 龍腦는 이를 억제함을 확인할 수 있었다.

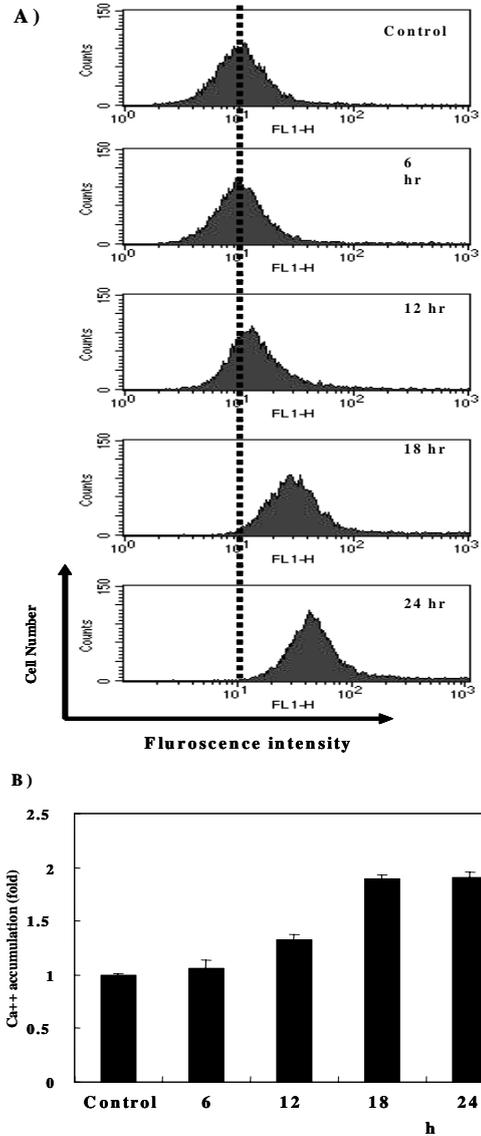


Fig. 6. Thapsigargin increased intracellular Ca⁺⁺ accumulation in C6 glial cells. Cells were treated with 5 µM thapsigargin for indicated periods. The cells were stained with Flura-3AM for 30 min, and then cells were harvested after treatment. After washing unbound dye out, the cells were subjected on flow cytometric analysis to estimate intracellular Ca⁺⁺ levels.

6. 龍腦가 C6 glial cells 내에서의 ROS 생성에 미치는 영향

Thapsigargin 처리에 의한 ER stress로 세포는 다양한 변화가 유도되어진다. ER stress로 인한 세포내 Ca⁺⁺의 축적과 더불어 활성산소의 생성이 보고되고 있다¹⁸⁾. 따라서 본 연구에서는 thapsigargin처리에 의해 활성산소 생성이 증가되는지, 그리고 이러한 활성산소 생성 증가에 龍腦가 미치는 영향을 분석하였다. 활성산소 생성의 증가를 측정하기 위하여 각 조건에 따라 18시

간 처리 후 hydroxyl radical을 인지하는 DCF-DA로 염색하여 형광의 발생 정도를 FACS로 분석하였다. FACS를 이용한 활성산소 생성의 정도는 DCF-DA 염색에 의해 발생하는 형광의 정도가 활성산소 생성과 비례한다. 5 μ M thapsigargin 처리는 대조군에 비하여 2배 이상의 활성산소 생성의 증가를 가져왔다. 또한 thapsigargin에 의한 활성산소 증가가 龍腦의 전처리로 억제되는지 확인한 바, 龍腦의 전처리는 thapsigargin 단독 처리(2배)의 활성산소의 증가가 66.25% 정도로 억제됨을 확인할 수 있었다. 하지만 龍腦 단독 처리 시에도 활성산소의 양은 대조군과 거의 유사한 양상을 나타냈다.

이러한 결과로부터 thapsigargin에 의하여 활성산소 생성이 증가되며, 龍腦의 전처리는 활성산소 생성 억제에 효율적으로 작용함을 알 수 있었다(Fig. 8).

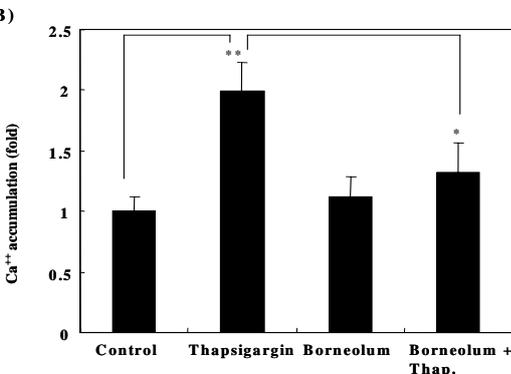
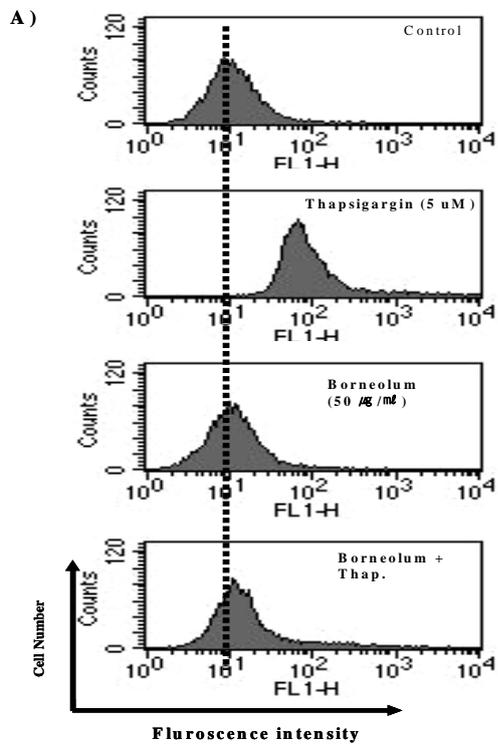


Fig. 7. Borneolum inhibited thapsigargin-induced intracellular Ca⁺⁺ accumulation in C6 glial cells. Cells were treated with various conditions for 18 h. The cells were stained with Flura-3AM for 30 min, and then cells were harvested after treatment. After washing unbound dye out, the cells were subjected to flow cytometric analysis to estimate intracellular Ca⁺⁺ levels.

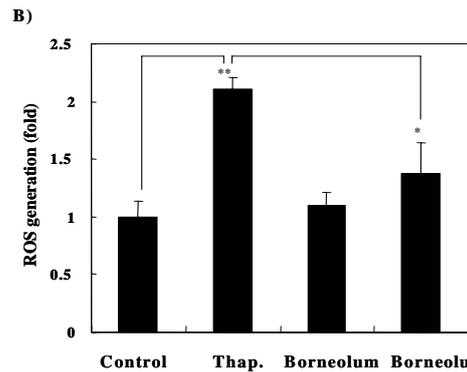
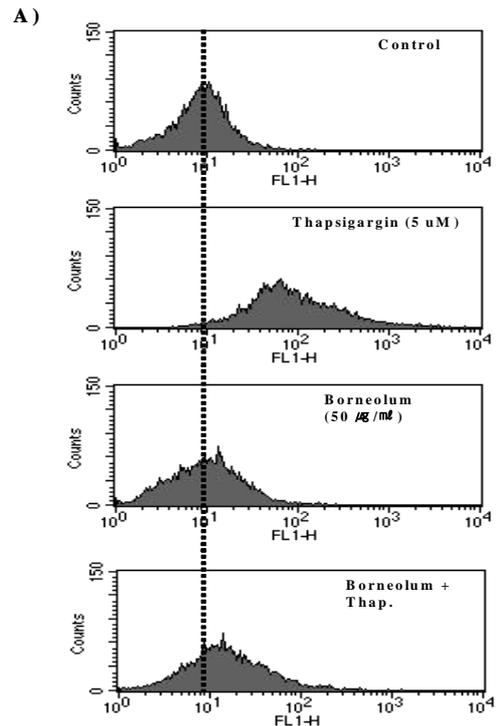


Fig. 8. Borneolum inhibited thapsigargin-induced ROS generation in C6 glial cells. Cells were treated with various conditions for 18 h. The cells were stained with DCF-DA for 30 min, and then cells were harvested after treatment. After washing unbound dye out, the cells were subjected to flow cytometric analysis to estimate intracellular ROS levels.

7. 龍腦가 ER stress유도에 관련된 단백질 발현 변화에 미치는 영향

Thapsigargin에 의한 ER stress로 야기되는 세포사멸 기전에 관련된 단백질 발현 변화를 확인하고자 Western blot을 실시하였다. 소포체(ER) 내 단백질의 적절한 조합과 결합은 ER stress 내에서 발현되는 적절한 molecular chaperone protein의 도움이 필요하다고 알려져 있다¹⁹⁾. 특히 glucose regulated proteins (Grps)의 발현 변화가 중요한 요인이다. Grps는 Grp78, Grp94가 존재하며, 그 외 ER stress에 관여하는 다른 chaperone proteins은 Gadd153 (CHOP)단백질이 알려져 있다.

본 연구에서는 ER stress로 야기되는 Grp78, CHOP 단백질의 발현 변화에 龍腦의 처리가 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. Thapsigargin의 처리는 Grp78 단백질과 CHOP 단백질의 발현이 대조군에 비하여 증가하였으며, 이러한 발현 증가는 龍腦

의 처리에 의해 감소하여 대조군 수준으로 발현됨을 확인하였다 (Fig. 9). 또한 caspase 12의 활성을 확인한바, thapsigargin에 의하여 caspase 12 활성이 뚜렷하게 나타났으며, 龍腦의 처리에 의하여 caspase 12 활성이 대조군 수준으로 감소함을 확인하였다 (Fig. 9A).

Grp78 이외에 ER chaperon family에 속하는 Grp94의 발현 양상과 Grp78발현 변화에 의해 영향을 받는 XBP1, ATF4의 발현 양상을 확인하였다. Thapsigargin처리에 의해 Grp94, XBP1, 그리고 ATF4의 발현이 증가되었다. 하지만 龍腦의 전처리는 이러한 단백질의 발현의 감소를 야기하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 9B).

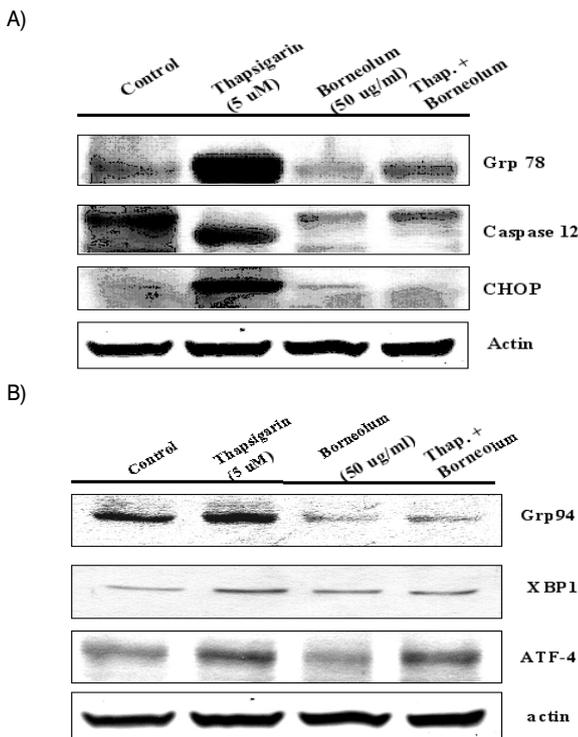


Fig. 9. Effect of borneolum on ER stress-related protein expression in C6 glial cells. The cells were treated with various conditions for 24 h. The cell lysates from cells was separated on 10% and 12% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-Grp78, CHOP, and pro-caspase 12 antibody(A), anti-Grp94, XBP1, and ATF4-antibody(B). The immunoreactive signals were visualized by ECL kit.

8. 龍腦가 백서로부터 분리한 astrocyte의 손상에 미치는 영향

C6 glial cells를 이용하여 thapsigargin에 의한 ER stress로 인한 세포고사기전을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 백서로부터 astrocyte를 분리하여 primary culture상태에서도 thapsigargin에 의한 ER stress가 유도되는지 확인하고, 이러한 astrocyte손상을 龍腦가 보호할 수 있는지 알아보기 위하여 세포 형태 변화를 현미경 시하에서 확인하였다.

Thapsigargin처리는 백서의 뇌조직으로부터 분리하여 배양한 astrocyte의 손상을 야기하여 세포모양이 대조군과 같이 신장된 방추형의 모습을 잃어 버려 작아지는 모습을 볼 수 있으며, 배양판에 부착되는 강도 또한 약하여 쉽게 배양판으로부터 떨어

지는 모습 등 뚜렷하게 손상된 양상을 보였다. 하지만 龍腦 전처리는 대조군이나 龍腦 단독에서 볼 수 있었던 세포 모양을 유지하고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 10).

이와 같은 결과들로부터 C6 glial cells에 thapsigargin의 처리는 ER stress를 야기하여 신경세포 사멸을 유도하였으며, thapsigargin에 의한 C6 glial cells 사멸은 龍腦의 전처리에 의하여 효과적으로 보호됨을 확인하였다. 또한 생후 3일째인 백서의 뇌조직으로부터 astrocyte를 분리 배양하여 thapsigargin처리에 의한 astrocyte 세포 손상을 확인하였으며, 이러한 손상은 龍腦의 전처리에 의하여 보호됨을 다시 확인하였다. 따라서 龍腦는 ER stress로 인한 신경세포 사멸을 효과적으로 보호할 수 있음을 알 수 있었다.

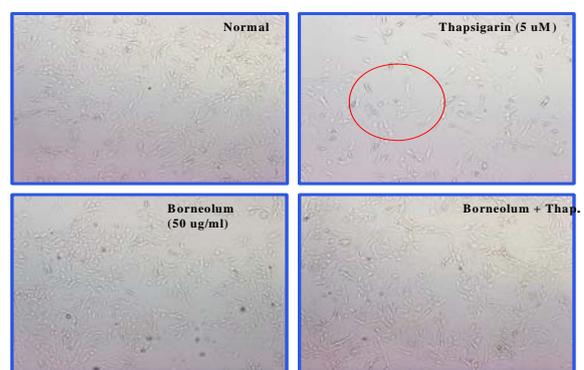


Fig. 10. Borneolum inhibited the morphological changes of rat primary astrocytes by thapsigargin-induced cytotoxicity. Astrocytes were cultured on slide chamber. The cells were treated with various conditions for 24 h. Cells were washed after treatment and then morphological features of the cells were observed by converted phase-contrast microscopy(x 100).

고찰

나이가 증가함에 따라 뇌의 중추신경세포는 대사성 손상을 비롯한 여러 종류의 화학적, 물리적 손상에 아주 민감하여 허혈에 따른 흥분독성이나 자유유리기에 의한 산화적 손상으로 사멸되어 알츠하이머병, 파킨슨병 및 허혈성 뇌질환 등의 발생 확률이 높아질 수 있다는 것이 밝혀지고 있다^{18,20-22}.

한의학에서 腦는 《靈樞·海論編》²³에서는 “腦爲髓之海”라 하였고 《難經·失寸失強者死編》²⁴에서는 “五臟六腑之精氣, 皆上升于頭以成七竅之用 故爲精明之府”라 하여 精神, 意識, 思惟, 聰明 등의 정신활동을 주관하는 중추로 인식하고 있다²⁵.

腦의 노화에 대해선 《靈樞·海論編》²³에 “髓海之餘, 則輕勁多力, 自過其度; 髓海不足, 則腦轉耳鳴, 脛痠眩冒, 目無所見, 解情安臥”라고 하여 腦髓의 充足與否가 정신 및 신체 활동의 노쇠와 관련되어 있음을 기술하고 있으며 《靈樞·天年篇》²³에 “血氣虛, 脈不通, 眞邪相攻, 亂而相引, 故中壽而盡也”라 하였고 《靈樞·營衛生會篇》²³에서는 “壯者之氣血盛, 其肌肉骨, 氣道通, 營衛之行, 不失其常 …… 老者之氣血衰, 其肌肉枯, 氣道澁, 五臟之氣相搏, 其營氣衰少”라 하여 연령의 증가에 따라 氣血이 부족하게 되어 신체의 각 부분에 이상 변화가 생기고 五臟기능의 협조가 순조롭지 못하게 됨을 설명하고 있다.

중추신경세포의 손상기전은 일반적으로 세포가 외부자극에 의해 심각한 손상을 입었을 경우에는 세포막의 파괴, 세포의 팽창, 용해를 동반하는 괴사를 일으키지만 허혈성 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병 등과 같은 신경계질환에 있어서는 생체내의 다양한 생화학적 기전들이 작용하여 신경세포와 C6 glial cells의 고사를 초래하게 되는 것으로 알려져 있다²⁶⁻²⁸.

세포고사(apoptosis)는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 세포의 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로 壞死(necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적인 특징을 동반하는 유전자 활성에 의하여 조절받는 생리과정이다^{22,29,30}.

최근 C6 glial 세포고사에 대한 한약재의 보호효과를 실험적으로 연구한 논문으로는 정³¹의 疎風湯이 glutamate에 의한 C6 glial cell의 apoptosis에 미치는 영향, 이³²의 疎風湯이 glutamate에 의한 C6 glial 세포 손상에 있어 항산화 효소 발현에 미치는 영향 등이 보고되고 있으나 龍腦가 thapsigargin에 의한 ER stress로 유발된 C6 glial cells의 산화적 손상에 대한 보호효과에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

龍腦는 龍腦香科 식물 龍腦香 수지의 가공품 또는 樟腦, 松節油등을 화학적인 방법으로 합성한 제품으로 맛은 맵고 쓰며 성질은 凉하다. 그 歸經은 心, 肺經이고 모든 竅를 통하게 하고 鬱火를 제거하며 翳를 제거하고 눈을 밝게 하며 浮腫을 내리고 止痛하는 효능이 있다. 中風口噤, 熱病神昏, 驚癇痰迷, 氣閉耳聾, 喉痺, 口瘡, 中耳炎, 癰腫, 痔疾, 目赤翳膜, 蟻蟲病을 치료한다⁸⁻¹⁰. 주 성분은 거의 순수한 α -borneol이며 용뇌향의 수지와 정유에는 여러 가지 terpene류가 들어 있다. borneol 외에 humulene, β -elemene, caryophyllene 등의 sesquiterpens와 oleanolic acid, aliphatic acid, asiatic acid, dipterocarpol hydroxydammarone, dryobalanone, erythrorodio 등 triterpenoid가 들어 있다. 점막, 피하 조직에 모두 잘 흡수되어 체내에서 glucuronic acid와 결합된 후 체외에 배출된다. 간 기능의 측정에 사용된 예에서는 1g의 龍腦를 내복하면 정상인 사람은 24시간 내에 결합체를 60-100% 배출한다³³.

이에 저자는 龍腦가 중추신경세포손상에 미치는 방어효과를 실험적으로 알아보기 위하여 C6 glial cells에 龍腦를 전처리하고 thapsigargin에 의한 ER stress를 유도하여 세포사멸을 유발시킨 후 LDH 방출 변화, 세포내 Ca^{++} 농도의 변화, ROS 생성, 그리고 ER stress에 관련된 Grp78, Grp94, CHOP, caspase 12, XBPL, ATF4의 발현 변화를 관찰하여 龍腦가 ER stress에 의한 C6 glial cells 손상에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 백서로부터 분리한 astrocytes에서의 ER stress에 의한 세포 사멸과 龍腦의 보호효과를 관찰하였다.

일반적으로 세포고사 기전은 mitochondria pathway와 death receptor pathway 신호전달계를 경유하여 유도된다고 알려져 왔으나, 최근에는 또 다른 신호전달계인 endoplasmic reticulum (ER) stress에 의한 경로를 통해서도 유도된다는 보고가 증가하고 있다^{24,17}. ER은 분비나 막단백질을 합성하는 기관이다. ER의 기능은 내재되어 있는 조합효소(folding enzymes)나

chaperones molecular의 도움으로 초기 단백질을 조합(folding)하고, 정확하게 조합된 단백질만이 golgi apparatus로 이송된다. 하지만 ER 기능 손상을 초래하는 다양한 자극에 의하여 분비단백질의 초기 조합이 잘못(unfolding)되면 ER 내에 축적되게 된다고 한다. 이렇게 축적된 잘못 조합된 단백질(unfolding proteins)은 세포고사를 유도하며 특히 신경퇴화성 질병들(neurodegenerative disorders)을 야기하게 된다고 알려져 있다^{3,5,34}. 최근 Alzheimer's disease의 경우 amyloid β -peptide의 축적과 관련됨을 제시하고 있다^{5,7}.

본 연구에서는 C6 glial cells 생존에 龍腦의 처리가 어떠한 영향을 주는지 확인하였다. 먼저 다양한 농도의 龍腦를 24시간 처리한 후 생존율을 확인하였다. Fig. 1에서 나타난바와 같이 C6 glial cells에 대한 龍腦의 처리는 일반적인 보호 약재의 사용 농도에 비하여 낮은 농도(50 ug/ml)에서 대조군에 비하여 높은 생존율(107%)을 나타내었다. 반면 고 농도 처리(250 ug/ml)에서는 대조군에 비하여 낮은 생존율을 나타내는 세포독성이 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 ER stress를 야기하는 시약으로 잘 알려진 thapsigargin에 의한 C6 glial cells의 사멸을 龍腦가 보호할 수 있는지 확인하였다. Thapsigargin은 세포질로 Ca^{++} pumping을 야기 시킴으로서 ER stress를 유도한다고 알려져 있다. 먼저 본 연구에 이용되는 C6 glial cells에서 thapsigargin처리에 의해 ER stress를 유도하기 위하여 다양한 농도의 thapsigargin을 24시간 처리하여 C6 glial cells의 생존율을 확인하였다. Fig. 2로부터 C6 glial cells의 ER stress 유도는 5 uM thapsigargin을 24시간 처리할 때 57%정도의 C6 glial cells 생존율을 나타냄으로써 확인 할 수 있었다.

Thapsigargin에 의한 ER stress 유도 조건은 연구에 이용되는 세포주에 따라 다양하게 나타남으로, 본 연구에서 확인하고자 하는 C6 glial cells에 대한 연구에는 thapsigargin 5 uM을 24시간 처리 조건으로 연구를 진행하였다. 龍腦의 전처리로 thapsigargin에 의한 세포사멸을 보호할 수 있는지 확인 한바, 50 ug/ml 龍腦의 전처리로 대조군에 유사한 수준으로 보호함을 확인하였다(Fig. 3). 하지만 Fig. 3에서와 같이 고농도의 龍腦(250 ug/ml)는 단독처리에서 보여준 세포독성에서처럼 thapsigargin에 의한 세포사멸을 회복시키지 못함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 thapsigargin에 의한 세포 사멸이 ER stress에 의한 세포고사기전을 통하여 유도되었는지 확인하고자 하였다.

일반적인 세포고사 현상을 나타내는 여러 특징적인 양상 중 DNA ladder를 확인하였다(Fig. 4). Thapsigargin처리에 의한 DNA ladder형성은 뚜렷한 ladder가 나타나지는 않았으나 분산된 모습의 DNA ladder를 확인하였으며, 이러한 DNA fragmentation은 龍腦의 전처리에 의하여 어느 정도 대조군 수준으로 회복함을 확인하였다. 또한 신경세포 세포독성을 확인하는 LDH 측정을 하였다. LDH 방출은 세포괴사와 세포고사 모두 나타나는 현상이다. 하지만 세포고사의 경우 비교적 늦은 시간에 방출되어지고, 세포괴사의 경우는 대개 3시간 이내부터 LDH가 방출되기 시작한다고 알려져 있다. 본 연구에서도 thapsigargin에 의한 세포사멸이 세포고사 유도에 의한 죽음인지 확인하고자

LDH를 측정하였다. Fig. 5A에서 나타난 바처럼 thapsigargin 처리에 의해 12시간 후부터 LDH가 방출되기 시작하고 18시간 경과 시 최대방출량을 보였다. 물론 24시간 시에도 최고치의 LDH 방출을 확인할 수 있었으나, 18시간 이후부터 세포고사에 대한 기전이 거의 진행되었음을 추측할 수 있게 하였다.

Yoshia⁶⁾의 보고에 따르면 thapsigargin은 Ca⁺⁺항상성을 저해하는 기전을 통해 ER stress를 야기한다고 한다. 본 연구에서도 C6 glial cells에 대한 thapsigargin의 처리가 세포내 Ca⁺⁺의 축적을 유도하는지 확인하였다. Flura-3AM에 의한 세포내 Ca⁺⁺의 축적은 시간 의존적으로 증가함을 확인하였으며(Fig. 6), LDH 방출이 높았던 18시간 경과 시 Ca⁺⁺의 축적은 최고치를 나타내었다. 또한 龍腦의 전처리가 thapsigargin에 의한 세포내 Ca⁺⁺축적을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있어(Fig. 7), 龍腦가 ER stress에 의한 세포사멸을 보호할 수 있으리라 사료되었다. Chen et al.,³⁵⁾은 ethanol에 의한 ER stress가 활성산소의 생성을 증가시킴을 보고하고 있으며, 본 연구에서도 thapsigargin에 의해 hydroxyl radical인 활성산소의 생성이 증가를 관찰할 수 있었다. Thapsigargin에 의해 증가된 활성산소 생성은 龍腦의 전처리에 의하여 대조군 수준에 가깝게 억제되는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 8). 하지만 또 다른 종류의 활성산소 생성(superoxide anion, NO)에 대한 생성여부는 본 연구에서는 수행하지 않았으나, ER stress와 활성산소 생성의 연구가 진행되어 진다면 좀 더 명확한 결론을 얻을 수 있으리라 사료된다.

Lee et al.,의 보고에 따르면 ER stress에 의한 반응은 잘못된 단백질반응(unfolding protein response)으로부터 시작되며, 이때 여러 가지 chaperones(Grp 78과 CHOP)의 기능이 세포생존이나 죽음에 중요한 역할을 한다고 한다. Grp78과 CHOP(GADD153)은 잘 알려진 chaperone으로 ER stress에 대한 반응으로 발현이 현저하게 증가하게 된다고 알려져 있다^{3,36)}. 따라서 이러한 단백질의 발현 변화가 ER stress에 대한 특이적 표식으로 인지되고 있다.

본 연구에서도 thapsigargin에 의한 세포사멸에 ER stress에 의해 야기됨을 그 특이적인 단백질 발현 변화를 확인함으로써 추론할 수 있어 Western blot을 실시하여 단백질 발현 변화를 확인하였다. Fig. 9에서 나타난 바처럼 C6 glial cells에 대한 thapsigargin의 처리는 Grp78, CHOP 단백질의 뚜렷한 발현을 유도하였으며, 이러한 단백질 발현의 증가는 龍腦의 전 처리에 의하여 현저하게 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 ER stress로 인한 세포사멸을 보호하는 많은 보고에서도 확인할 수 있는 결과이다^{36,37)}.

일반적으로 aspartate-specific cysteinyl proteases (caspases)에 속하는 효소는 세포고사에 중요한 역할을 갖는다고 알려져 있다^{34,38)}. 세포고사는 caspase 3의 활성화에 의하여 최종 세포고사에 이르며 앞 단계에 관여하는 caspase 종류는 세포고사 기전에 따라 다르다. ER stress에 의한 세포고사 기전에는 caspase 12의 활성화가 중요하게 작용한다고 알려져 있다³⁴⁾. 본 연구에서도 procaspase 12의 활성도를 Western blot으로 확인하였으며 thapsigargin에 의한 pro-caspase 12의 분절을 龍腦의 전 처리에

의하여 억제됨을 확인할 수 있었으며, ATF4, XBP1단백질의 발현이 龍腦의 전 처리로 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 9). ATF4는 PERK 기전에 관여하는 단백질이고, XBP1은 IRE1a 기전에 관여하는 단백질로 알려져 있다^{39,40)}. 따라서 본 연구 결과에서도 ER stress에 의한 세포반응 기전이 다양하게 관여함을 간접적으로 시사하였다.

이와 같은 결과들로부터 C6 glial cells에 대한 thapsigargin의 ER stress로 야기되는 신경세포 사멸을 龍腦의 전처리가 효과적으로 보호할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 본 연구에서는 in vitro실험에서의 보호 효과가 primary culture상에서의 astrocyte상에서도 동일한 보호효과를 나타내는지 확인하고자 생후 3일된 백서의 뇌로부터 분리한 astrocyte를 이용하여 실험하였다. 백서로부터 분리한 astrocyte에서도 龍腦의 전처리는 thapsigargin에 의한 세포사멸을 효과적으로 보호함을 확인하였다(Fig. 10).

따라서 in vitro, ex vivo 실험을 통하여 ER stress에 의한 C6 glial cells의 사멸을 龍腦가 효과적으로 보호할 수 있으며, 이러한 결과는 龍腦의 임상적 적용에 유용한 근거가 될 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 龍腦가 중추신경계 세포 손상으로 인한 질병에 보호약제로의 유용성을 확인하고자 C6 glial cells에 thapsigargin에 의한 ER stress를 유도하여 세포사멸을 유발시키고, 백서로부터 분리한 astrocytes에도 ER stress를 유발시켜 龍腦의 보호효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

龍腦는 C6 glial cells에 대해 50 ug/ml에서 높은 생존율(107%)을 보였다. 龍腦(50 ug/ml)는 thapsigargin에 의한 C6 glial cells 사멸에 대해 대조군과 유사한 생존율로 보호효과를 보였다. 龍腦는 DNA ladder와 LDH 방출양과 양상을 통해서도 thapsigargin에 의한 C6 glial cells의 세포고사를 억제함을 확인하였다. 龍腦의 전처리는 thapsigargin에 의한 Ca⁺⁺의 세포내 축적을 억제하였다. 龍腦의 전처리는 thapsigargin에 의한 활성산소 생성을 억제하는 효과를 나타내었다. 龍腦의 전처리로 ER stress에 관여하는 Grp78, Grp94, XBP1, ATF4, CHOP, caspase 12 단백질의 발현을 감소하였다. 생후 3일된 백서로부터 분리한 astrocyte를 배양하여 thapsigargin에 의한 세포손상을 확인하였으며, 龍腦의 보호효과 또한 확인하였다.

이와 같은 결과들로부터 龍腦는 ER stress에 의해 유발된 C6 glial cells의 산화적 손상을 보호함을 확인 하였다.

감사의 글

이 논문은 2008학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행 됨.

참고문헌

1. Kaneko, M., Nomura, Y. ER signaling in unfolded protein

- response, *Life Sci.* 74(2-3):199-205, 2003.
2. Kadowaki, H., Nishitoh, H., Ichijo, H. Survival and apoptosis signals in ER stress, the role of protein kinases. *J. of Chemical Neuroanatomy* 28: 93-100, 2004.
 3. 이인규, 김두만, 김보완, 김용기, 김인주, 김태화, 박중열, 손석만, 유형준, 이문규, 이병완, 차봉연. 산화질소와 ER (endoplasmic reticulum) 스트레스. *BioWave*. 9(1):1-11, 2007.
 4. Schröder, M., Kaufman, R.J. ER stress and the unfolded protein response, *Mutat Res.* 569(1-2):29-63, 2005.
 5. Forman, M.S., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. 'Unfolding' pathways in neurodegenerative disease, *Trends Neurosci.* 26(8):407-410, 2003.
 6. Yoshida, H. ER stress and diseases, *FEBS J.* 274(3):630-658, 2007.
 7. Lindholm, D., Wootz, H., Korhonen, L. ER stress and neurodegenerative diseases, *Cell Death Differ.* 13(3):385-392, 2006.
 8. 全國韓醫科大學本草學教授共編. 本草學. 서울, 永林社, pp 522-523, 1991.
 9. 池亨浚, 李尙仁. 대한약전의 한약(생약) 규격집 주해서. 서울, 한국메디칼인텍스사, p 276, 1998.
 10. 陳存仁. 圖說漢方醫藥大辭典 제4권. 서울, 서울대학교출판부, pp 569-576, 1997.
 11. 오규석. A study on inhibition of nicotinic receptors by *Dryobalanops aromatica*. 서울, 동국대학교, 1999.
 12. 김영주, 황근배, 서영배. *Dryobalanops aromatica* 유래 용뇌의 *Malassezia furfur*에 대한 항균 활성. 서울, 한국미생물·생명공학회지 33(3):236-239, 2005.
 13. 崔貞善. CPs(丹蔘, 三七, 龍腦 複合劑)가 高脂血症에 미치는 影響. 익산, 圓光大學校, 2004.
 14. 崔殷圭. 龍腦香이 Mouse에서의 抗痙攣 效果. 서울, 東國大學校, 1999.
 15. 金京玉. 薄荷와 龍腦 複合香氣의 抗痙攣效果 機轉에 관한 實驗的 研究. 서울, 東國大學校, 2002.
 16. Nunokawa, Y., Ishida, N. and Tanaka, S. Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 191: 89-94, 1993.
 17. Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, *EMBO Rep.* 7(9):880-885, 2006.
 18. Gotz, M.E., A. Freyberger and P. Riederer. Oxidative stress, a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 29: 241-249, 1990.
 19. Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., Ron, D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12: 982-995, 1998.
 20. Behl, C., J.B., Killer, F.g., Schubert, D. Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res* 645: 253-264, 1995.
 21. 河北醫學院. 靈樞經校釋. 北京, 人民衛生出版社, 上冊 : p 355, 512 514, 下冊 : p 129, 1982.
 22. 張介賓. 類經(下). 서울, 大星文化社, p 411, 1990.
 23. 허미정, 안택원, 황치원, 설인찬. 內經의 腦學說에 대한 文獻的 考察, 惠和醫學, 6(1):175-200, 1997.
 24. Peter, L. Ischemic Cell Death in Brain Neurons, *Physiol. Review*, 79: 1431-1568, 1999.
 25. 서순규. 성인병·노인의학, 서울, 고려의학, pp 10-19, 28-30, 225-229, 1992.
 26. Kirino, T., Tamura, A., Sano, K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia reversible and irreversible types of ischemic cell damage, *Progress in Brain*, 63: 39-58, 1985.
 27. Cohen, J.J. Apoptosis, *Immunol*, 14: 126-130, 1993.
 28. Savitz, S., Rosenbaum, D. Apoptosis in neurological disease, *J. Neurosurgery*, 42: 555-574, 1998.
 29. 정승원. 소풍탕이 Glutamate에 의한 C6 Glial Cell의 Apoptosis에 미치는 영향. 익산, 원광대학교, 2006.
 30. 이민구. 소풍탕이 Glutamate에 의한 C6 glial 세포 손상에 있어 항산화 효소 발현에 미치는 영향. 익산, 원광대학교, 2007.
 31. 강소신의학원 편. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 역. 중약대사전. 중국, 상해과학출판사, 한국, 도서출판 정담, 31: 925-932, 1998.
 32. Nakagawa, T., Yuan, J. Cross-talk between two cysteine protease families, Activation of Caspase-12 by Calpain in Apoptosis., *J. of Cell biology.* 150: 887-894, 2000.
 33. Chen, G., Ma, C., Kimberly, A., Bower, K.A., Xianglin Shi, X., Zunji Ke, Z., Jia Luo, J. Ethanol promotes endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death, Involvement of oxidative stress. *J Neurosci Res.* 16, 2007.
 34. Benavides, A., Pastor, D., Santos, P., Tranque, P., Calvo, S. CHOP plays a pivotal role in the astrocyte death induced by oxygen and glucose deprivation, *Glia.* 52(4):261-275, 2005.
 35. Szegezdi, E., Duffy, A., O'Mahoney, M.E., Logue, S.E., Mylotte, L.A., O'brien, T., Samali, A. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun.* 349(4):1406-1411, 2006.
 36. Widmann, C., Gibson, S. Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 273(12):7141-7147, 1998.
 37. Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J. All roads lead to ATF4. *Dev Cell.* 4: 442-444, 2006.
 38. Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., Ron, D. IRE1 couples

- endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 415: 92-96, 2002.
39. 장경태, 이정숙. 노화와 건강, 서울, 대한미디어, p 175, 1999.
40. Derick Han, Chandan, K. Sen, Sashwati Roy. Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiols antioxidants, *Am J Physiol* 273: 1771-1778, 1997.