

흰쥐 해마 CA1 영역에서 H₂O₂에 의한 장기강화 억제에 대한 발효황금 추출물의 효과

허준호 · Zhang Xiao Rong¹ · 김민선^{1*}

원광대학교 의과대학 응급의학교실, 1: 원광대학교 의과대학 생리학교실 & 원광대학교 뇌과학연구소

Effects of Fermented *Scutellaria Baicalensis* Extract on H₂O₂ - Induced Impairment of Long-term Potentiation in Hippocampal CA1 Area of Rats

Jun Ho Heo, Zhang Xiao Rong¹, Min Sun Kim^{1*}

Department of Emergency Medicine, Wonkwang University School of Medicine,

1: Department of Physiology, Wonkwang University School of Medicine & Brain Science Institute at Wonkwang University

Scutellaria baicalensis (SB) has widely used in the treatment for various brain diseases in the field of Oriental medicine. Biofermentation of SB can make major chemical constituents of SB to pass blood-brain barrier easily and to have more potent anti-oxidant ability. There is a little information about the contribution of fermented SB (FSB) to the formation or maintenance of the neural plasticity in the hippocampus. The purpose of this study was to evaluate effects of FSB extract on hydrogen peroxide (H₂O₂) - induced impairments of the induction and maintenance of long-term potentiation (LTP), an electrophysiological marker for the neural plasticity in the hippocampus. From hippocampal slices of rats, the field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were evoked by the electrical stimulation to the Schaffer collaterals - commissural fibers in the CA1 areas and LTP by theta-burst stimulation by using 64 - channels in vitro multi-extracellular recording system. In order to induce oxidative stress to hippocampal slices two different concentrations (200, 400 μM) of H₂O₂ were given to the perfused aCSF before and after the LTP induction, respectively. The ethanol extract of FSB with concentration of 25 μg/ml, 50 μg/ml was diluted in perfused aCSF that had 200 μM H₂O₂, respectively. Oxidative stress by the treatment of H₂O₂ resulted in decrease of the induction rate of LTP in the CA1 area with a dose - dependent manner. However, the ethanol extract of FSB prevented the reduction of the induction rate of LTP caused by H₂O₂ - induced oxidative stress with a dose - dependent manner. These results may support a potential application of FSB to ameliorate impairments of hippocampal dependent neural plasticity or memory caused by oxidative stress.

keywords : *Scutellaria baicalensis*, Fermentation, Oxidative stress, Hippocampus, Long - term potentiation

서 론

세포 내 미토콘드리아에서 에너지 대사과정 뿐 만 아니라 세포 막의 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate 산화효소에 의해서 과산화수소수 (H₂O₂), 수산화라디칼 (OH⁻) 및 과산화물 (O₂⁻) 등과 같은 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. ROS은 강력한 산화작용으로 화학적인 반응도가 매우 높아 세포들은 ROS를 억제하는 항산화 능력을 가지고 있다. 만일 세포에서 항산화 능력을 초과하는 ROS가 생성되면, ROS에 의한 산화적 스트레스 (oxidative stress)가 유발된다. 즉, 과량의 ROS가 세포를 구성하고 있는 유전자, 단백질, 지질 등과 반응하여 제 기능을 못하게 하여 세포 손상이 초래된다. 따라서 ROS에 의한 산

화적 스트레스가 다양한 질환들의 주된 병태생리학적 기전이다¹⁾.

신경세포는 평소 에너지 대사가 많기 때문에 ROS 발생이 잘 되고 항산화능력이 다른 세포보다 낮아 ROS에 의한 산화적 스트레스가 쉽게 나타날 수 있다²⁾. 특히, 혈류가 저하된 허혈 상태 자체와 이후 재관류 과정에서 ROS가 현저하게 발생되어 뇌졸중과 같은 급성 허혈성 뇌 질환에서 신경세포의 손상을 초래하는 중요한 원인이다. 더불어, 노화에 따른 만성 뇌 혈류장애로 인한 치매 및 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌 질환이 호발하는 데, ROS에 의한 산화적 스트레스가 주요 병태 생리로 알려져 있다^{1,3)}.

황금(黃芩, *Scutellaria baicalensis*)은 속쑥은풀과 식물로 황금의 주피를 벗긴 뿌리로서 소항염증, 항당뇨, 항균, 항알레르기, 항바이러스, 항고혈압 등과 같은 다양한 약리적 효능이 있다⁴⁾. 황

Min Sun Kim. Department of Physiology School of Medicine & Brain Science Institute at Wonkwang University, Jeonbuk, Iksan, South Korea

E-mail : mskim@wku.ac.kr · Tel : +82-63-850-6779

Received : 2019/10/21 · Revised : 2019/12/09 · Accepted : 2019/12/17

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.12.33.6.356>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

금의 성분은 baicalein, baicalin, oroxylin, wogonin 등의 주요 약리활성 물질들을 함유하고 있으며⁵⁾, ROS에 의한 산화적 스트레스를 억제하는 강력한 항산화 능력을 가지고 있어 소염작용 및 허혈성 세포손상을 억제할 수 있다. 따라서 황금은 신경세포에서 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 효과를 보였을 뿐 만 아니라 허혈성 뇌 손상 모델에서 뇌 손상을 감소하는 효과가 있다⁶⁾. 황금의 약리적 효능을 높이기 위하여 다양한 발효법이 응용되고 있는데, 발효된 황금(fermented *Scutellaria baicalensis*, FSB)은 발효과정에서 황금의 주요성분인 baicalein 및 wogonin 농도가 증가된다⁷⁾. 특히 baicalein은 baicalin보다 뇌혈관장벽을 쉽게 통과하며 뇌에서 항산화 효과를 보인다⁸⁾. 이와 함께 baicalein과 oroxylin은 신경가소성에 관여하는 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)의 생성과 관련되어 있다^{9,10)}.

해마(hippocampus)는 대뇌 및 편도체 등과 신경망을 이루고 기억의 형성 및 저장에 중추적인 역할을 담당한다. 해마는 *Cornu ammonis* (CA)와 치상핵으로 구성되고 이들 사이에 매우 많은 시냅스가 형성되어 있어, 이들 시냅스에 흥분성 자극을 가하면 흥분성 후시냅스전위(field evoked excitatory postsynaptic potentials, fEPSPs)가 쉽게 발생한다. 또한 시냅스에 강한 전기자극을 반복하면 fEPSPs의 크기가 커지고 100분 이상 지속되는 현상이 되는데, 이를 장기강화(long-term potentiation, LTP)라 한다. 한편 해마 CA1 영역에서 LTP 현상은 기억형성 및 유지에 중요한 신경생리학적 기전으로 알려져 있어 신경가소성을 관찰하는 중요한 전기생리학적 지표로 사용되고 있다¹¹⁾.

만성 저혈성 흰쥐모델 및 급성 허혈 손상 동물실험에서 황금 추출물 및 황금의 주요성분인 baicalein과 oroxylin이 행동학적 검사에서 기억력 감퇴를 예방하는 효과를 보였다^{10,12)}. 본 연구진의 사전 연구¹³⁾에서 발효황금 및 조구등 혼합 추출물이 해마절편에서 fEPSPs의 진폭 및 LTP를 증가시켰다. 또한 해마 절편에 H₂O₂에 의한 산화성 스트레스를 초래하였을 때 LTP 유발의 감소를 발효황금 및 조구등 혼합 추출물이 예방하는 효과를 보였다. 따라서 기억력에 영향을 미치는 황금의 선행 연구결과를 고려해 볼 때, 발효황금 추출물이 해마에서 LTP 현상에 영향을 미칠 수 있을 것으로 가정할 수 있다.

Baicalein 성분이 해마의 CA1 영역에서 LTP 현상에 미치는 영향에 대한 연구는 보고 되었 으나¹⁴⁾ 황금 추출물 및 발효황금 추출물에 대한 연구가 거의 진행되지 않은 실정이다. 따라서 본 연구는 H₂O₂로 산화성 스트레스를 유발한 상태의 해마 CA1 영역에서 LTP 현상에 대한 발효황금 추출물의 영향을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 100~150 g의 Sprague - Dawley계 수컷 흰쥐 (Saemtaco Biokorea Co, Korea)로서 일상생활에 적합한 환경에서 사육하고(온도: 22 ± 2°C, 습도: 45~55%) 동물 고형사료 (Saemtaco Biokorea Co, Korea)와 물은 마음대로 먹을 수 있게 하였다. 모든 실험과정은 원광대학교 실험동물 윤리위원회의 규정

을 준수하였다.

실험군은 정상 뇌척수액만 투여한 정상 대조군(n=5), 산화성 스트레스를 유발하기 위하여 H₂O₂를 투여한 H₂O₂ 투여군(n=5), 그리고 H₂O₂와 발효황금 추출물(n=5)을 같이 투여한 H₂O₂+발효황금 추출물 투여군으로 구분하였다.

2. 발효황금 추출물의 제조 및 투여

발효황금의 제작 및 추출은 Kim 등¹³⁾의 선행연구를 근거로 하였으며 발효과정은 발효전용공장에서 시행하였다. 즉, 효모균 (*Saccharomyces cerevisiae*) 및 매실효소 혼합액을 분쇄한 황금에 침지하고 발효용기에 넣고 3차 발효하였다. 이때 40~60°C에서 3 습식과 건식을 반복적으로 가하면서 숙성단계를 진행하였다. 이후 추출 과정은 세척이 끝난 발효황금을 추출기에 넣고 에탄올 추출방식으로 3회 반복하여 추출하고 냉동건조로 고형 발효황금 추출물을 획득하였다. 발효황금 추출물을 뇌척수액에 희석하였으며 선행연구 결과¹³⁾에 근거하여 25, 50 µg/ml 농도로 실험에 사용하였다.

3. 해마절편의 제작

뇌 절편의 제작 및 뇌 척수액의 제조는 사전연구에 근거하였다¹⁵⁾. 간단하게 서술하면 뇌 절편 제작을 위하여 절단용 sucrose 뇌척수액을 사용하였으며, LTP를 기록하기 위해서는 정상 인공 뇌척수 용액을 사용하였다. 실험동물을 과량의 urethane으로 마취 후 대뇌를 적출하여 냉장 sucrose 용액 (1~2°C)에서 대뇌 반구를 20~30°로 기울여 고정된 다음 조직절편기 (vibroslicer: Campden, UK)를 이용하여 뇌 절편을 제작한 후 해마영역만 분리하였다. 해마 절편은 32°C 인공 뇌척수액에 1시간 동안 방치 후 26°C 인공 뇌척수액으로 옮겨 회복하였다.

해마 절편의 CA1 영역에 산화성 스트레스를 가하기 위해 뇌척수액에 H₂O₂를 희석하여 해마절편에 주입하였다. 실험 당일 H₂O₂ 원액 (30%)을 뇌척수액에서 200 µM, 400 µM 농도가 되도록 희석하여 해마절편에 분당 2 ml 용량을 주입하였다.

또한 발효황금 추출물 원액을 40°C로 가열하여 유효성분들이 잘 용해될 수 있도록 한 다음 뇌척수액 1 ml 당 25 µg, 50 µg의 농도가 되도록 뇌척수액에 각각 희석하여 H₂O₂ 투여전 30분간 전 처치하였다. 이후 다시 200 µM H₂O₂와 발효황금 추출물을 병행 투여하였다.

4. 해마 절편의 CA1 영역에서 흥분성 후 시냅스 유발전위 및 장기강화 (long-term potentiation, LTP) 기록 및 분석

해마절편에서 흥분성 후 시냅스 유발전위 (fEPSPs, field excitatory postsynaptic potentials)의 유발 및 기록은 선행연구를 근거하였다¹⁵⁾. 해마 절편에서 fEPSP 및 LTP의 발생은 한국전자통신연구원(ETRI)에서 개발한 64채널 세포외기록시스템 (ETRI, Korea)을 사용하였다. CA1 영역의 방사층 중앙부가 64개 전극의 중앙에 위치하도록 64 채널 전극 프로브에 해마절편을 위치시킨 다음 실버앵커로 고정하였다. fEPSPs의 발생을 위하여 Trigger 프로그램을 이용하여 구형파 전류를 발생시켜 CA1 영역의 방사층 새퍼 겐가지 - 교련섬유 (Schaffer's collateral - commissural

fiber)를 단일 전기자극하였다. fEPSPs 신호는 64채널 신호증폭시스템에서 신호를 증폭하고 잡신호를 제거한 다음 Signal 프로그램으로 기록하면서 4채널을 On-line 상태로 fEPSPs의 기울기 및 진폭을 분석하여 저장하였다.

기저기록(baseline recording)으로 fEPSPs의 최대진폭의 40~50% 진폭이 발생할 수 있도록 전기자극 강도로 20초 간격으로 fEPSPs를 유발하여 30분 이상 기록하였다.

기저기록 후 LTP 현상을 유도하기 위한 자극은 세타파(20 Hz, 4 pulses, 10 bursts, interburst interval : 200 ms) 자극으로 20초 간격으로 4회 자극하여 LTP 현상을 유도하고 1시간 이상 fEPSPs를 기록하였다.

각 해마절편에서 당 4채널의 fEPSPs의 기울기 및 진폭 값을 Excel 프로그램을 이용하여 LTP 유발율을 다음과 같은 환산식으로 분석하였다. [LTP 유발율 (%) = [(세타파 자극 후 fEPSPs 기울기 - 기저기록 동안 fEPSPs의 기울기) / 기저기록 동안 fEPSPs의 기울기] X 100]. 한편 LTP 유발율의 통계분석을 위하여 세타파 자극 후 50~60 분 사이에 산출된 fEPSPs의 기울기 평균값을 산출하였다.

5. 통계분석

각 해마절편으로부터 세타파 자극 후 50~60 분 사이에 산출된 평균 LTP 유발율을 산출하였다. 각 실험조건에서 10개의 해마 절편으로부터 LTP 유발율의 평균값과 표준편차를 산출하였다. 각 실험조건 간의 통계분석은 SPSS 14.0 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석과 사후검정 Tukey's post - hoc test으로 통계적 유의성 분석하고, 통계적 유의 수준은 p<0.05으로 설정하였다.

결 과

1. 정상 해마절편의 CA1 영역에서 흥분성 후시냅스 유발전위 (fEPSPs) 및 LTP 현상 유발

해마절편 CA1 영역의 방사층을 전기자극하며 유발된 fEPSPs 파형은 상사층 (SR)에서 잘 발생하였고 전기자극 채널에 가까운 기록 채널에서 fEPSPs의 진폭이 크게 기록되었다.

fEPSPs의 전압 및 기울기는 안정된 상태를 유지하기 위하여 30 분간 기저기록을 실시하였다. 이후 세타파를 4회 자극하여 LTP 현상을 유발하였으며 fEPSPs의 진폭이 60분 이상 지속적으로 증가한 상태가 유지되었다. 세타파 자극 후 50~60분 사이에 분석하였을 때 fEPSPs의 기울기로부터 산출된 LTP 유발율은 174.5 ± 4.5% (n=10)였다(Fig. 1-3).

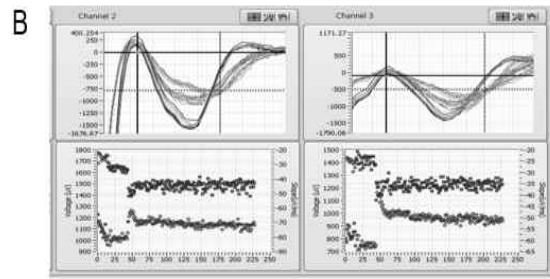
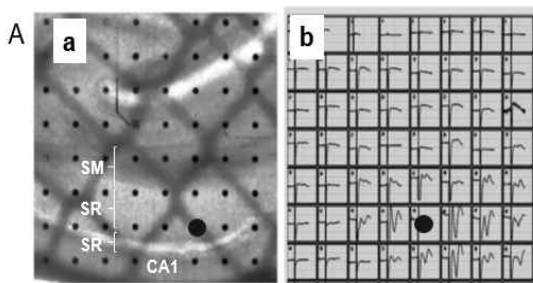


Fig. 1. Typical recordings of field excitatory post-synaptic potentials (fEPSPs) (A) and long-term potentiation (B) by using 64 channels in vitro multi-extracellular recording system. A-a, photograph showing location of hippocampal *Cornu ammonis* (CA1) area on the recording probe having 64 recording electrodes. A-b, Regional distributions of fEPSPs evoked by an application of single pulse electrical shock to Schaffer collaterals-commissural fibers (dark dot) in the CA1 area of the hippocampus. B, Typical changes of fEPSPs traces and temporal changes in slope and amplitude of fEPSPs in two recording channels of the recording probe following theta-burst stimulation consisting of 5 trains of 5 pulses at 100 Hz delivered at 200ms intervals. SM, stratum lacunosum moleculare; SR, stratum radiatum; SP, stratum pyramidale; SO, stratum oriens.

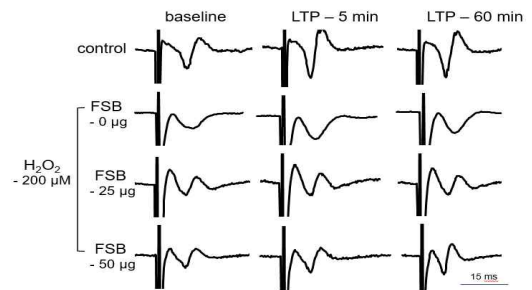


Fig. 2. Representative examples for potentiation of fEPSPs traces in CA1 area following the induction of LTP by theta burst stimulation to the Schaffer collateral axons under 4 experimental conditions. Control indicates changes of fEPSPs in normal animal. Other lower 3 traces indicate changes of fEPSPs traces by the treatments of 0 µg/ml, 25 µg/ml, and 50 µg/ml concentrations of fermented *Scutellaria baicalensis* (FSB) under 200 µM concentration of H₂O₂ in artificial cerebrospinal fluid (aCSF), respectively.

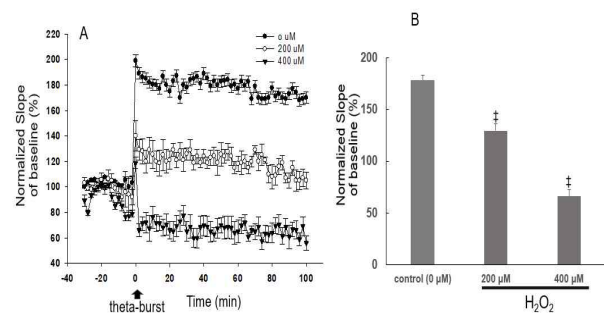


Fig. 3. Effect of H₂O₂ - induced oxidative stress on the induction and maintenance of LTP in the hippocampal CA1 area. A. Time-dependent changes in the slope of fEPSPs potentiation in the hippocampal CA1 area under 0 µM, 200 µM, and 400 µM concentrations of H₂O₂ in aCSF. B. Bar histograms showing comparison of the induction rate of LTP under three different concentrations of H₂O₂ in aCSF. Values were calculated by average of slope values of fEPSPs recorded at last 10 minutes after the theta burst stimulation. Values at data points are means ± SEM of normalized slope of fEPSPs from 10 hippocampal slices. #Denotes

statistically difference between control and 200 or 400 μM concentration of H_2O_2 , respectively ($\#p < 0.01$).

2. 해마절편에서 H_2O_2 에 의한 산화성 스트레스에 의한 LTP 유발을 감소 및 발효황금 추출물의 효과

기저기록 후 H_2O_2 을 200, 400 μM 농도로 뇌척수액에 각각 희석하였을 때, fEPSPs의 LTP 유발율이 H_2O_2 농도 의존적으로 통계적 유의한 감소를 보였다. 즉, LTP 유발율은 H_2O_2 를 처리하지 않은 정상 대조군의 경우 $174.5 \pm 4.5\%$ 였고, H_2O_2 200 μM 투여군 ($n=10$)은 $107.8 \pm 3.7\%$ ($\dagger p < 0.01$), H_2O_2 400 μM 투여군($n=10$)은 $70.5 \pm 11.2\%$ ($\#p < 0.01$)이 었다(Fig. 2, 3).

CA1 영역에서 200 μM H_2O_2 에 의한 LTP 유발을 억제 현상에 대한 발효황금 추출물의 작용을 확인하기 위하여 발효황금 추출물을 농도 별로 30분간 전처치한 다음 200 μM H_2O_2 와 발효황금 추출물을 병행 투여하여 LTP 유발율의 변화를 관찰하였다. 200 μM H_2O_2 만 투여한 실험군과 비교하여 발효황금 추출물의 투여가 LTP 유발율의 감소를 억제하는 경향을 보였다. 즉, 세타자극 후 50-60분 사이에 fEPSPs의 기울기를 근거로 LTP 유발율은 대조군 ($n=10$)은 $174.5 \pm 4.5\%$, 200 μM H_2O_2 투여군($n=10$)은 $107.8 \pm 3.7\%$, H_2O_2 +발효황금 추출물 25 $\mu\text{g/ml}$ 투여군($n=10$)은 $138.3 \pm 8.7\%$, H_2O_2 +발효황금 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여군($n=10$)은 $155.7 \pm 5.7\%$ 을 보였다. 대조군과 비교하여 발효황금 투여군에서 LTP 유발율이 유의하게 감소되었으나($\dagger p < 0.05$, $\#p < 0.01$), 발효황금을 투여하지 않은 실험군(0 $\mu\text{g/ml}$)과 비교하여 25 $\mu\text{g/ml}$ 투여군 ($*p < 0.05$)과 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여군 ($**p < 0.01$)에서 LTP 유발율이 유의하게 증가되었다(Fig. 2, 4). 따라서 발효황금 추출물의 투여는 H_2O_2 의 시냅스 가소성의 억제 현상을 방어할 수 있는 효과가 있음을 확인하였다.

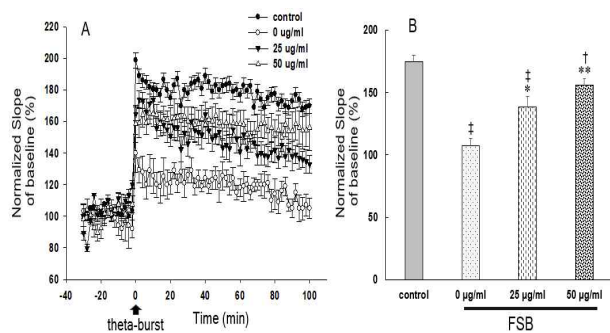


Fig. 4. Effect of FSB on H_2O_2 - induced the impairment of LTP in hippocampal CA1 area. A. Time-dependent changes in the slope of fEPSPs potentiation in hippocampal CA1 area by the treatments of 0 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, and 50 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of FSB under 200 μM concentration of H_2O_2 in aCSF following the induction of LTP, respectively. B. Bar histogram showing comparison of induction rate of LTP under 3 different concentrations of FSB + 200 H_2O_2 in aCSF. Values were calculated by average of slope values of fEPSPs recorded at last 10 minutes after the theta burst stimulation. Values at data points are means \pm SEM of normalized slope of fEPSPs from 10 hippocampal slices in each experimental conditions. *Denotes statistically difference between 0 $\mu\text{g/ml}$ and 25 $\mu\text{g/ml}$ or 50 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of FSB, respectively ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$). \dagger Denotes statistically difference between control and 0 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, or 50 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of FSB, respectively ($\dagger p < 0.05$, $\#p < 0.01$).

고찰

본 연구에서 해마절편 CA1 영역의 방사층을 전기자극하며 유발된 fEPSPs 파형은 방사층에서 잘 관찰되었으며, 세타파를 4회 자극하여 fEPSPs 파형이 커지고 이러한 현상이 60분 이상 지속되는 LTP 현상이 잘 관찰되었다. 그러나 기저기록 후 H_2O_2 를 200, 400 μM 농도로 뇌척수액에 각각 희석하였을 때 fEPSPs의 LTP 유발율이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3).

LTP는 흥분 의존성 신경가소성의 유형으로 해마 및 뇌 여러 영역에서 학습 및 기억의 생성에 중요한 관련이 있다. 해마 CA1 영역에서 LTP 발생은 구심성 신경섬유를 반복적으로 강하게 자극하여 흥분성 시냅스인 N-methyl-d-aspartate (NMDA) 수용체의 강한 흥분으로 세포내 칼슘이온의 증가와 세포내 신호전달계의 활성화가 나타난다¹¹). 이때 세포 내 2차 신호전달계로 extracellular signalregulated kinases (ERKs), cAMP response element binding protein (CREB), phosphoinositide 3-kinase 등이 활성화되어 여러 유전자들의 발현을 유도한다. 이에 따라 단백질 합성이 이루어지며 가지돌기 가지 (dendritic spine) 및 다양한 시냅스 단백질의 증가가 나타나 LTP가 유지되고 이러한 현상이 기억의 생성에 필수적이다¹⁶).

한편 BDNF 단백질은 해마 및 대뇌 피질에 많이 존재하며 기억 및 학습에 매우 중요한 물질로 알려져 있다. LTP 유도를 위한 강한 흥분에 의해 BDNF 단백질이 축삭말단에서 분비되고 시냅스를 경유하여 신경세포의 TrkB 수용체에 결합하여 LTP의 지속적인 유지에 매우 중요한 물질이다¹⁷). 이와 함께 최근 실험연구에서 BDNF 단백질은 신경세포에서 sestrin2 단백질의 기능을 강화시켜 항산화 효과를 증가시켜 세포사멸을 막는 것으로 알려져 BDNF 단백질의 중요성이 더욱 부각되고 있다¹⁸).

본 연구에서 H_2O_2 을 200, 400 μM 농도로 뇌척수액에 각각 희석하였을 때 fEPSPs의 LTP 유발율이 H_2O_2 농도 의존적으로 통계적 감소를 보였다(Fig. 2, 3). 이러한 연구결과는 선행연구의 결과와 유사한 경향을 보였다^{19,20}). 슈퍼옥사이드 라디칼을 O_2 와 H_2O_2 로 전환하는 superoxide dismutase을 전처치하는 경우에도 LTP 유발율이 감소되었으며 이때 슈퍼옥사이드 억제제를 투여하면 LTP 유발율의 감소가 없어지는 결과를 보였다²¹). 그러나 H_2O_2 의 LTP 억제효과에 대한 기전은 정확히 밝혀져 있지 않으나 다만 serine/threonine phosphatase 2A 효소의 억제에 기인하는 것으로 알려져 있다²²). 따라서 본 연구와 선행연구결과를 고려해 볼 때 산화성 스트레스가 해마에서 LTP 생성 및 유지를 억제하고 이러한 현상에 의해 해마가 관장하는 여러 유형의 기억력에 부정적 영향을 미칠 수 있음을 의미한다. 이와함께 신경세포에서도 ROS의 산화성 스트레스가 신경세포를 쉽게 손상시킬 수 있어 산화성 스트레스가 만성 퇴행성 질환 및 급성 뇌 손상을 초래하는 뇌졸중, 외상성 손상에서 신경세포의 손상의 주된 병태기전으로 인식되고 있다^{1,23}).

해마 CA1 영역은 여러 형태의 학습 및 기억에 관여하는 데^{24,25}), 뇌 혈류의 구조적 특성 때문에 혈류장애가 쉽게 일어나서, 산화성 스트레스에 매우 취약한 것으로 알려져 있다. 따라서 해마는 여러 유형의 대뇌 관련 질환에서 가장 쉽게 손상되는 영역으로 인

식되고 있다²⁶⁾. 해마 CA1 영역에서 200 μM H_2O_2 에 의한 LTP 억제 현상에 대한 발효황금 추출물의 작용을 확인하기 위하여 발효황금 추출물을 농도별로 30분간 전처리한 다음 200 μM H_2O_2 와 발효황금 추출물을 병행 투여하여 LTP 유발율의 변화를 관찰하였다. 이때 200 μM H_2O_2 만 투여한 실험군과 비교하여 발효황금 추출물의 투여가 농도 의존적으로 LTP 유발율의 감소를 유의하게 억제하는 경향을 보였다 (Fig. 2, 4). 따라서 발효황금 추출물의 투여는 H_2O_2 의 활성산소가 유도하는 시냅스 가소성의 억제 현상을 방어할 수 있는 효과가 있음을 확인하였다.

본 연구결과와 유사하게 다양한 세포를 대상으로 한 *in vitro* 실험들에서 황금 추출물들이 H_2O_2 에 의한 산화성 스트레스로부터 항산화 효과를 보여 DNA 손상을 막고 미토콘드리아에 의해 매개되는 세포고사를 예방할 수 있는 실험적 증거들이 제시되었다^{4,5,27,28)}. 한편, 황금의 주요 성분은 baicalein, baicalin, oroxylin, wogonin이며, 특히 baicalein이 신경세포의 손상을 보호하는 것으로 잘 알려져 있다²⁹⁾. 황금의 약리적 효능을 높이기 위하여 다양한 발효법이 응용되고 있는데, 발효과정에서 황금의 주요성분들 중 baicalin이 baicalein으로, wogonoside가 wogonin으로, 7-O-glucoside oroxylin 이 oroxylin A 전환되어 baicalein, wogonin 및 oroxylin A 농도가 더욱 증가된다⁷⁾. 이때 발효방법에 따라 차이는 있지만 baicalin이 baicalein으로 전환되는 전환율이 90% 이상이다^{7,30)}. 즉, 발효과정에서 화학구조에서 존재하는 포도당이 제거됨으로써 구조적으로 작은 형태로 전환됨으로써, 발효 후 생성되는 유효성분들이 뇌혈관장벽을 쉽게 통과하며 뇌에 보다 쉽게 작용 할 수 있다. 특히 oroxylin A 가 뇌혈관장벽을 가장 잘 통과하여 뇌에서 이들 성분 중에 가장 많이 존재한다^{8,31)}.

이와 더불어 황금의 발효된 성분들이 항산화 능력이 더 높다. 일반적으로 baicalein이 강력한 항산화 효과를 가지고 있으며 ROS를 직접 제거하는 능력을 가지고 있는데 이는 화학적 구조에 기인한다³²⁾. 이에 반하여 baicalin은 baicalein 보다 항산화 효과가 낮다. SH-SY5Y 세포에서 H_2O_2 에 의한 세포손상을 예방하는 능력이 baicalein 보다 낮았다. 또한 baicalein은 항산화 효소들의 활성화 및 유전자의 발현을 촉진하여 항산화 효과를 더욱 증진한다^{9,29)}.

Baicalein은 해마 절편에서 NMDA 수용체의 흥분성 증가에 의한 LTP 유발율을 항진시키는 효과가 있는데, 이때 농도 의존적으로 종형(bell) 형태를 보였다. 또한 baicalein의 전처리에 의한 LTP 유발율의 증가가 phosphoinositide 3-kinase의 억제제에 의하여 감소되었다. Baicalein의 전처리가 LTP 유발 동안 ERK 및 CREB 단백질의 인산화를 통하여 세포내 신호전달계의 활성을 증가시키는 것으로 보고하였다. 이러한 근거에 baicalein의 경구투여가 흰쥐에서 해마 의존성 기억 능력을 향상시켰다¹⁴⁾. 따라서 baicalein이 해마에서 LTP 발생을 촉진할 수 있고 이로 인해 해마에 의한 기억 및 학습의 촉진을 유도할 수 있는 중요한 성분임을 암시한다¹²⁾.

Baicalein과 oroxylin은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 CREB 신호전달계를 활성화시켜 BDNF 및 신경성장인자의 발현을 강력하게 증가시키며 이에 따라 신경세포의 분화 및 발생, 축삭성장을 촉진할 수 있어 퇴행성 뇌질환에 효과를 보였다^{13,9,33)}. 또한 신경세포 내 ERK 신호전달계를 활성화시켜 기억력을 향상시킬 수 있다. 실

험동물연구에서 baicalein은 이러한 작용을 통하여 항우울 효과를 보였으며³⁴⁾, oroxylin A는 만성 허혈성 뇌질환 모델 및 scopolamine 투여 모델에서 해마의존성 기억력 감소를 효과적으로 예방하였다^{35,36)}. Oroxylin A의 경구투여가 해마에서 BDNF mRNA 유전자의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다³⁷⁾. 또한 피질 신경세포를 대상으로 patch clamp 연구에서 oroxylin A가 GABA에 의한 내향성 염소 전류를 감소시키는 효과를 보여 oroxylin A가 γ -Aminobutyric acid (GABA) 수용체를 억제하는 효과를 보였다³⁶⁾.

이러한 선행연구결과를 근거로 본 연구에서 해마 절편에 발효황금 추출물의 투여가 H_2O_2 에 의해 유도된 산화성 스트레스에 의한 LTP 현상의 감소를 막는 효과는 첫째, 발효과정에서 baicalein 및 oroxylin의 함량이 높아졌으며, baicalein의 항산화 능력, LTP 유지 능력 및 BDNF 합성 능력에 기인한 것으로 사료된다. 둘째, oroxylin의 BDNF 합성 능력도 발효황금의 효능 중 중요한 역할일 것으로 사료된다. 다만 본 연구의 한계점은 *in vitro* 연구에서 해마 절편을 대상으로 발효황금이 산화성 스트레스에 의한 LTP 장애에 미치는 영향을 관찰 것뿐이다. 따라서 추가적 연구를 통하여 허혈성 대뇌 질환 및 치매 모델에서 발효황금 추출물이 해마의 신경가소성 및 기억력을 향상시키는 지와 이와 관련된 분자생물학적 변화 규명이 요구된다.

결론

해마절편에서 H_2O_2 에 의해 유도된 산화성 스트레스를 유발하면 신경가소성의 전기생리학적 지표인 LTP 현상이 용량 의존적으로 감소되었다. 그러나 발효황금 추출물이 이러한 산화성 스트레스에 의한 LTP 감소를 용량 의존적으로 예방하였다. 이러한 결과는 발효황금 추출물이 해마의 신경가소성 장애를 예방할 수 있는 실험적 근거로 활용될 수 있으며 발효황금의 작용 기전 규명을 위한 추후 연구가 요구된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 교내연구비 (2018)에 의하여 수행하였습니다.

References

1. Salim S, Oxidative Stress and the Central Nervous System, The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2017;360:201-5.
2. Cogley JN, Fiorello ML, Bailey DM, 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress, Redox biology. 2018;15:490-503.
3. Carvalho AN, Firuzi O, Gama MJ, Horssen JV, Saso L, Oxidative Stress and Antioxidants in Neurological Diseases: Is There Still Hope?, Current drug targets.

- 2017;18:705-18.
4. Zhao T, Tang H, *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology, 2019;71:1353-69.
 5. Xie L, Zheng Y, Ma Z, Sun Q, Li X, Wang ZL, et al., A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*, *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2018;56:465-84.
 6. Gaire BP, Moon SK, Kim H, *Scutellaria baicalensis* in stroke management: nature's blessing in traditional Eastern medicine, *Chinese journal of integrative medicine*. 2014;20:712-20.
 7. Xu C, Ji GE, Bioconversion of flavones during fermentation in milk containing *Scutellaria baicalensis* extract by *Lactobacillus brevis*, *Journal of microbiology and biotechnology*. 2013;23:1422-7.
 8. Fong SY, Wong YC, Zuo Z, Development of a SPE-LC/MS/MS method for simultaneous quantification of baicalein, wogonin, oroxylin A and their glucuronides baicalin, wogonoside and oroxyloside in rats and its application to brain uptake and plasma pharmacokinetic studies, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014;97:9-23.
 9. Sowndhararajan K, Deepa P, Kim M, Park SJ, Kim S, Baicalein as a potent neuroprotective agent: A review, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;95:1021-32.
 10. Kim DH, Lee Y, Lee HE, Park SJ, Jeon SJ, Jeon SJ, et al., Oroxylin A enhances memory consolidation through the brain-derived neurotrophic factor in mice, *Brain research bulletin*. 2014;108:67-73.
 11. Gustafsson B, Wigstrom H, Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region: its induction and early temporal development, *Progress in brain research*. 1990;83:223-32.
 12. Gu XH, Xu LJ, Liu ZQ, Wei B, Yang YJ, Xu GG, et al., The flavonoid baicalein rescues synaptic plasticity and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, *Behavioural brain research*. 2016;311:309-21.
 13. Kim MS, Yang JH, Kong BM, Manufacture Method of combination of fermented *Scutellaria baicalensis* with *Gastrodia elata* for prevention and treatment of central nervous system disease. Korean Intellectual Property Office. 2015;10-2015-0062531.
 14. Wang W, Wang F, Yang YJ, Hu ZL, Long LH, Fu H, et al., The flavonoid baicalein promotes NMDA receptor-dependent long-term potentiation and enhances memory, *British journal of pharmacology*. 2011;162:1364-79.
 15. Lee GW, Kim JH, Kim MS, Reduction of long-term potentiation at Schaffer collateral-CA1 synapses in the rat hippocampus at the acute stage of vestibular compensation, *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2017;21:423-8.
 16. Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, Storm DR, Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus, *Neuron*. 1996;16:973-82.
 17. Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH, BDNF and memory formation and storage, *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2008;14:147-56.
 18. Chen SD, Wu CL, Hwang WC, Yang DI, More Insight into BDNF against Neurodegeneration: Anti-Apoptosis, Anti-Oxidation, and Suppression of Autophagy, *International journal of molecular sciences*. 2017;18.
 19. Kamsler A, Segal M, Hydrogen peroxide as a diffusible signal molecule in synaptic plasticity, *Molecular neurobiology*. 2004;29:167-78.
 20. Serrano F, Klann E, Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus, *Ageing research reviews*. 2004;3:431-43.
 21. Klann E, Thiels E, Modulation of protein kinases and protein phosphatases by reactive oxygen species: implications for hippocampal synaptic plasticity, *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 1999;23:359-76.
 22. Winder DG, Sweatt JD, Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity, *Nature reviews. Neuroscience*. 2001;2:461-74.
 23. Chen L, Liu B, Relationships between Stress Granules, Oxidative Stress, and Neurodegenerative Diseases, 2017;2017:1809592.
 24. Bliss TV, Collingridge GL, A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, *Nature*. 1993;361:31-9.
 25. Ocampo AC, Squire LR, Clark RE, Hippocampal area CA1 and remote memory in rats, *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*. 2017;24:563-8.
 26. Sen A, Hongpaisan J, Hippocampal microvasculature changes in association with oxidative stress in Alzheimer's disease, *Free radical biology & medicine*.

- 2018;120:192-203.
27. Shao ZH, Li CQ, Vanden Hoek TL, Becker LB, Schumacker PT, Wu JA, et al., Extract from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuates oxidant stress in cardiomyocytes, *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1999;31:1885-95.
 28. Yoon JJ, Jeong JW, Choi EO, Kim MJ, Hwang-Bo H, Kim HJ, et al., Protective effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis in HaCaT human skin keratinocytes, *EXCLI journal*. 2017;16:426-38.
 29. Li Y, Zhao J, Holscher C, Therapeutic Potential of Baicalein in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease, *CNS drugs*. 2017;31:639-52.
 30. Chon H, Kim G, Kim S, Comparison of aqueous plant extracts before and after fermentation with *Lactobacillus paracasei* LS-2 on cytokine induction and antioxidant activity, *Natural product communications*. 2010;5:1277-82.
 31. Fong SYK, Li C, Ho YC, Li R, Wang Q, Wong YC, Brain Uptake of Bioactive Flavones in *Scutellariae Radix* and Its Relationship to Anxiolytic Effect in Mice, 2017;14:2908-16.
 32. Hamada H, Hiramatsu M, Edamatsu R, Mori A, Free radical scavenging action of baicalein, *Archives of biochemistry and biophysics*. 1993;306:261-6.
 33. Jeon SJ, Rhee SY, Seo JE, Bak HR, Lee SH, Ryu JH, et al., Oroxylin A increases BDNF production by activation of MAPK-CREB pathway in rat primary cortical neuronal culture, *Neuroscience research*. 2011;69:214-22.
 34. Xiong Z, Jiang B, Wu PF, Tian J, Shi LL, Gu J, et al., Antidepressant effects of a plant-derived flavonoid baicalein involving extracellular signal-regulated kinases cascade, *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2011;34:253-9.
 35. Kim DH, Jeon SJ, Son KH, Jung JW, Lee S, Yoon BH, et al., Effect of the flavonoid, oroxylin A, on transient cerebral hypoperfusion-induced memory impairment in mice, *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2006;85:658-68.
 36. Kim DH, Jeon SJ, Son KH, Jung JW, Lee S, Yoon BH, et al., The ameliorating effect of oroxylin A on scopolamine-induced memory impairment in mice, *Neurobiology of learning and memory*. 2007;87:536-46.
 37. Jeon SJ, Bak H, Seo J, Han SM, Lee SH, Han SH, et al., Oroxylin A Induces BDNF Expression on Cortical Neurons through Adenosine A2A Receptor Stimulation: A Possible Role in Neuroprotection, *Biomolecules & therapeutics*. 2012;20:27-35.