

## 蘇合香元이 저산소증 유발 배양 대뇌신경세포에 미치는 영향

이지훈, 윤경선, 정승현, 신길조, 이원철, 문일수\*  
동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 해부학교실\*

### The Effect of Sohaphyang-won's for Delayed Neuronal Death in Hypoxia

Ji-Hun Lee, Kyoung-Sun Yun, Sung-Hyun Jeong, Gil-Cho Shin, Won-Chu Lee, Il-Su Moon\*

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University,  
Department of Anatomy, College of Medicine, Dongguk University\*

**Objectives :** The purpose of this study is to evaluate the effects of Sohaphyang-won and is to study the mechanism for neuronal death protection in hypoxia with Embryonic day 20(E20) cortical cells of a guinea pig(Sprague Dawley).

**Methods :** E20 cortical cells, used in this investigation were dissociated in Neurobasal media and grown for 14 days in vitro (DIV). On 14 DIV, Sohaphyang-won was added to the culture media for 72 hours. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock and further incubated in normoxia for another three days. On 20 DIV, Sohaphyang-won's effects for neuronal death protection were evaluated by LDH assay and the mechanism was studied by Bcl-2, Bak, Bax, caspase family.

**Results :** This study indicates that Sohaphyang-won's effects for neuronal death protection in hypoxia is confirmed by LDH assay by the method of Embryonic day 20(E20) cortical neuroblast.

**Conclusions :** Sohaphyang-won's mechanism for neuronal death protection in hypoxia restrains inflow of cytochrome C into cellularity caused by Bcl-2 increase and reduces the caspase cascade initiator caspase-10 and the effector caspase-3.

**Key Words:** Sohaphyang-won, hypoxia, Bcl-2, caspase

### 1. 緒 論

신경계질환의 증상 발현은 중추신경세포의 사멸로 유발되는데, 뇌졸중의 주요 증상인 운동·감각·인지 기능의 소실 등도 이에 기인된다. 중추신경세포들은 한 번 사멸이 되면 다시 재생이 불가능하기 때문

에 신경세포사 기전에 대한 연구 및 세포사의 예방이 중요한 의학적 과제로 현재 부각되고 있다.

오래 전부터 중추신경세포들은 대사성 손상을 비롯한 여러 종류의 물리·화학적 손상에 아주 민감한 것으로 알려져 왔다. 단지 수분간의 허혈(ischemia)만으로도 중추신경세포는 손상을 입게 되는데<sup>1</sup>, glutamate의 과다한 방출 또는 glutamate receptor의 과다한 흥분에 의하여 비교적 짧은 시간으로도 신경세포의 비가역적 손상이 초래된다<sup>2</sup>.

흥분독성의 기전으로는 이온 통로를 통한 칼슘의

· 접수 : 2003년 1월 2일 · 채택 : 2003년 2월 11일  
· 교신저자 : 이지훈, 경상북도 경주시 용강동 357번지 동국대학교 경주한방병원 의국  
(Tel: 054-770-1341 Fax:054-770-1500 E-mail: wideduck@hanmail.net)

세포 내 유입이 중요한 것으로 알려져 왔는데<sup>4</sup>, 최근에는 apoptosis가 신경계 질환의 신경세포사와 관련이 있다는 증거들이 축적되고 있다<sup>1,5,6</sup>.

蘇合香元은 중풍 급성기에 사용되는 처방으로, <太平惠民和劑局方><sup>8</sup>에 처음 수록되었다. 開竅, 溫裏祛寒, 理氣止痛하는 效能이 있어 傳屍骨蒸, 殲殮肺痿, 疰忤邪氣, 卒心痛, 霍亂吐利, 時氣鬼魅瘴癘, 赤白暴利, 瘀血月閉, 疰癰醒腫, 驚癇鬼忤, 中人小兒吐利, 大人狐狸 등의 치료에 사용되는데, 一切의 氣痰과 中氣, 上氣, 氣逆, 氣鬱, 氣痛 등의 證狀을 다스린다<sup>9</sup>.

蘇合香元에 대한 실험적 연구로는 安<sup>10</sup>의 鎮痛 · 抗痙攣 · 抗瀉下 효과, 南<sup>11</sup>의 저산소성 뇌장해에 대한 보호작용 및 심근 수축력 억제효과, 李<sup>12</sup>의 심근 허혈 상태 회복 효과 및 崔<sup>13</sup>의 rat에 유발된 뇌경색 면적 감소 효과 등이 있으나, 신경세포사 방지 효능의 작용기전에 대한 연구는 없었다.

이에 본 연구에서는 蘇合香元의 세포사 방지 기전을 구명하고자 저산소증으로 apoptosis를 유발한 흰쥐의 대뇌신경세포에서 세포 생존율과 Bcl-2, Bax, Bak 및 caspase family 단백질의 표현에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 동물

본 연구는 대한동물실험센터에서 구입한 체중 250~300g의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대상으로 실험을 실시하였다.

#### 2) 약재

실험에 사용된 蘇合香元은 方藥合編14에 준하여 동국대학교 한의과대학 부속 경주한방병원에서 조제된 것으로 處方 구성과 함량은 Table 1에 나타내었다.

#### 3) 蘇合香元 물추출액 제조

蘇合香元 3.54g을 50ml 증류수에 넣어 균질화하고 상온에서 4시간, 4°C에서 18시간 혼든 후, 이를 15,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45µm)한 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의 양은 1ml 추출액 3튜브를 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

#### 4) 항체

본 연구에 사용한 항체를 Table 2에 나타내었다.

### 2. 방법

#### 1) 신경세포 배양

임신 20일(embryonic day 20 : E20)된 Sprague-

**Table 1.** The Amount and Composition of Sohaphyang-won

Species	Part used	Latin name	Weight(mg/pill)
<i>Aucklandia lappa</i> Decne	Root	<i>Helinii Radix</i> (唐木香)	7.5
<i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ	Root	<i>Rhizoma Atractylis</i> (白朮)	7.5
<i>Aquilaria sinensis</i> GILG	Resin	<i>Aquillariae Lignum</i> (沈香)	7.5
<i>Styrax benzoin</i> DRYAND.	Resin	<i>Benzoinum</i> (安息香)	7.5
<i>Eugenia caryophyllata</i> THUNB.	Fruit	<i>Caryophylli Flos</i> (丁香)	7.5
<i>Bubalus bubalis</i> L.	Cornu	<i>Bubalus Fructus</i> (水牛角)	7.5
<i>Terminalia chebula</i> RETZ.	Fruit	<i>Terminaliae Fructus</i> (訶子皮)	7.5
<i>Cyperus rotundus</i> L.	Root	<i>Cyperi Rhizoma</i> (香附子)	7.5
<i>Piper longum</i> L.	Fruit	<i>Piperis longi Fructus</i> (畢撥)	7.5
<i>Moschus moschiferus</i> L.	Resin	<i>Moschus</i> (麝香)	7.5
<i>Boswellia carterii</i> BIRDW.	Resin	<i>Olibanum</i> (乳香)	3.75
<i>Liquidambar orientalis</i> MILL.	Resin	<i>Styrax Liquidus</i> (蘇合油)	3.75
<i>Dryobalanops aromatica</i> GAERTN. f.	Resin	<i>Borneolum</i> (龍腦)	3.75
<i>Apis mellifera</i> L.		<i>Mel</i> (蜂蜜)	86.25
Total amount			173.50

**Table 2.** Antibodies used in this Work

Antibody	Host	Usage	Source
Bak	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Bax	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Bcl-2	mouse	IB	monoclonal Upstate Biotechnology Inc.
Caspase-1	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Caspase-3	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Caspase-6	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Caspase-8	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.
Caspase-10	rabbit	IB	polyclonal Upstate Biotechnology Inc.

IB : immunoblot

Dawley계 흰쥐의 대뇌 피질신경세포를 Brewer 등의 방법 15에 따라 배양하였으며, 蘇合香元은 배양 14일 (day 14 in vitro : DIV)에 처리하였다. 임신 20일된 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아의 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37°C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1mM sodium pyruvate와 10mM HEPES(pH 7.4)가 첨가된 HBSS용액(Gibco, BRL) 5ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1ml Hank's 용액으로 옮기고 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 이 후 분산된 세포를 모으고 그 수를 측정 한 후 약 1,500cells/mm<sup>2</sup> 되도록 B27을 첨가한 plating Neurobasal media(Gibco, BRL)(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I, 0.1ml 25mM glutamate, 0.1ml 25mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 5% CO<sub>2</sub> 배양조에서 배양한 다음 2~3일 간격으로 배양액을 feeding Neurobasal media(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I)로 1:1씩 교환하였다.

2) 蘇合香元의 처리와 저산소증 유발

배양 14일에 蘇合香元을 농도별로 첨가하고 72시간 처리하였다. 배양 17일에 CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator(Forma Scientific)를 이용하여 2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37°C 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유발하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

3) 면역염색(immunoblot)

12-well culture dish에 배양한 E20 대뇌 신경세포를 수확하여 1 × SDS-gel loading buffer를 넣고 100°C에서 5분간 처리하였다. 각각 20µg의 단백질을 8% 혹은 15% SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)하고, nitrocellulose(NC) membrane에 옮겨 (100V, 1시간) Ponceau S 용액 [0.1%(w/v) Ponceau S, 0.1% acetic acid]으로 5분간 염색한 후 증류수로 탈염색하여 표준분자량의 위치를 확인하였다. NC를 TTBS용액(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.2% Tween-20, 0.02% NaN<sub>3</sub>)으로 10분간 세척하고 4°C에서 16~18시간 처리한 후 1차 항체(1:2,000~5,000)를 넣고 2시간 반응시켰다. NC를 TTBS용액으로 10분씩 4회 세척하고, alkaline phosphatase-conjugated 2차 항체(1:2,000)를 넣어 2시간 반응시킨 후 TTBS용액으로 10분씩 2회, TBS(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>)용액으로 2회, alkaline phosphatase 완충용액(100mM Tris, pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>)으로 한번씩 각각 세척하였다. BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate P-toluedine salt) 및 NBT(p-nitro blue tetrazolium chloride)를 넣고 상온에서 발색시킨 후 증류수로 세척하여 발색을 중지하였다. 정량적 분석은 blot을 scan하여 NIH Scion Image Beta 3b software로 signal density를 측정하였다.

4) LDH assay

배양액 20µl를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate(NADH 1mg/ml)를 20µl씩 가한 다음, 상온

에서 2분간 혼든 후 37°C에서 30분간 더 흔들었다. 발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20μl씩 가지고 상온에서 20분간 혼든 후 0.4N NaOH를 100μl씩 가지고 상온에서 15분간 더 혼든 다음 ELISA reader로 흡광도(OD450)를 측정하였다.

5) 신호강도측정(Desitometry)

면역염색이 끝나면 NC가 마르지 않은 상태에서 scanner(300 dpi)를 이용하여 이미지를 얻고, NIH Scion Image Software를 이용하여 band intensity를 측정하였다. 이때 2D Rolling Ball Mode로 배경을 제거하였다.

6) 통계처리

모든 실험은 최소한 8배수로 시행하였고, 세포의 생존율은 대조군에 대한 백분율(% of control)로 표시하였다. 통계학적 유의성은 Mann-Whitney U test로 검증하였다.

III. 結果

1. 신경세포 배양

배양한 17 DIV E20 대뇌 신경세포의 위상차(phase-contrast) 현미경 사진을 Fig.3A에 나타내었다. 대뇌 신경세포는 배양 시작 후 2시간 정도부터 neurite를 생성하기 시작하였으며, 24시간 후에는 신경가지들이 20~30μm까지 자랐다. 또한 대뇌피질 신경세포는 특징적으로 여러 개의 가지 돌기를 내었다(Fig.3A). 이 연구에서는 serum이 첨가되지 않은 배지(serum-free media)를 사용하여, 신경교세포는 약 10% 정도로 거의 증식이 일어나지 않아 대부분이 신경세포로 구성되었다.

2. 蘇合香元이 정상산소 환경에서 신경세포에 미치는 영향

농도에 따른 蘇合香元 자체의 세포독성을 조사하고자, 14 DIV에 蘇合香元의 물추출액(water extract) 0~20μg/ml을 첨가하고 3일간 더 배양한 후, 18 DIV(18 DIV를 1 day로 표시함)에서부터 1, 3, 5, 7일에 각각 신경세포의 생존율을 LDH assay로 조사하

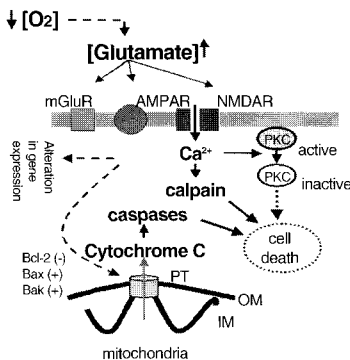


Fig. 1. A hypothesis for the delayed neuronal death by hypoxia.

Hypoxic insult causes accumulation of glutamate in the synaptic area and results in the overstimulation of NMDA-, AMPA-, and metabotropic glutamate receptors. The Ca<sup>2+</sup> influx via NMDAR is known to activate calpain. Through, so far, unknown routes glutamate overstimulation results in the formation of mitochondrial permeability transition (PT) pores. The PT pores are formed by pro-apoptotic proteins such as Bax or Bak. Instead, formation of PT pores are inhibited by Bcl-2. Once PT pores are formed cytochrome C is released from mitochondria into cytosol and caspase cascade is initiated. The calpain and caspases degrade specific subsets of proteins that are essential for cellular life and eventually cause cell death. In hypoxic insult, PKC is rapidly inactivated. Therefore, activation of caspases and calpain, together with inactivation of PKC may be the main signaling pathway underlying delayed neuronal death by hypoxia. IM, mitochondrial inner membrane. OM, mitochondrial outer membrane.

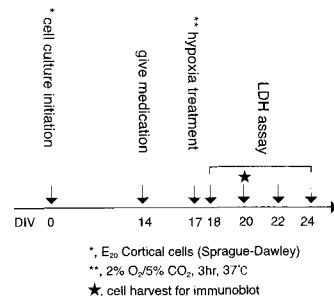
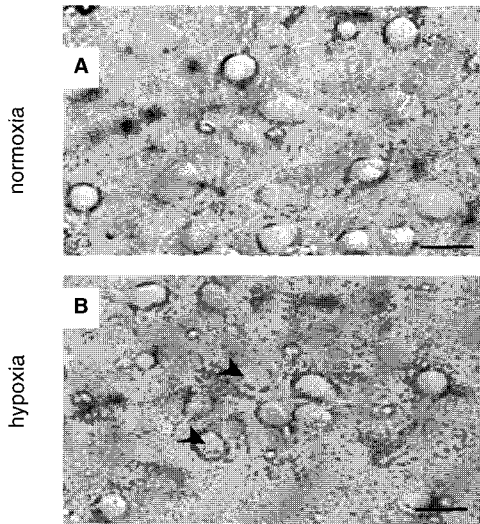


Fig. 2. Experimental schemes. LDH, lactate dehydrogenase.

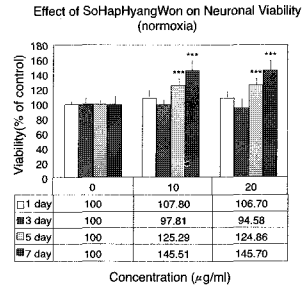


**Fig. 3.** Cortical cells in culture.  
 A. 17 DIV cortical cells in normoxia. Phase-contrast microscopy.  
 B. Sister cells as in panel A on 3 days after hypoxia. Note vacuoles formed in soma (arrowheads). Phase-contrast microscopy. Bar, 20 $\mu$ m.

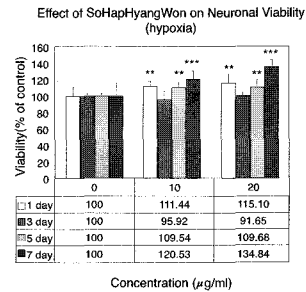
였다. 蘇合香元은 E20 대뇌신경세포에 대하여 20  $\mu$ g/ml까지 세포독성이 없었으며, 5일에는 25%, 7일에는 약 45%의 세포사망 보호효과를 나타내었다(Fig.4).

### 3. 蘇合香元이 저산소증에서 신경세포의 사망 억제 효과

저산소증 모델에서 신경세포사에 대한 蘇合香元의 억제 효과를 조사하였다. 14 DIV에 蘇合香元 물추출물 0~20  $\mu$ g/ml을 첨가하고 3일간 더 배양한 후, 17 DIV에 저산소 처리하고(2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 3 hrs) 1, 3, 5, 7일 후에 각각 신경세포의 생존율을 LDH assay로 조사하였다. 蘇合香元을 첨가한 경우 저산소 처리 후 3일에는 생존세포수가 대조군에 비하여 약간 감소되었으나, 1, 5, 7일에는 약 10~35% 정도로 증가되었다(Fig.5).



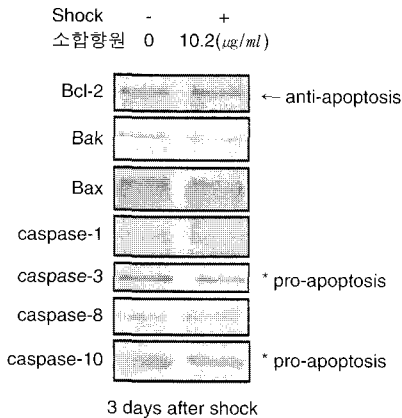
**Fig. 4.** Neuroprotective effect of SoHapHyang-won in normoxia. (\* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001) E20 cortical cells were grown in 24-well plates. On 14 DIV, SoHapHyang-won was added to the culture media at 0 ~ 20 $\mu$ g/ $\mu$ l and incubated for 72 hrs. On 18, 20, 22, 24 DIV (1, 3, 5, 7 day, respectively), cell viability was measured by LDH assay and expressed as % of control.



**Fig. 5.** Neuroprotective effect of SoHapHyang-won in hypoxia. (\* P<0.05 \*\* P<0.01 \*\*\* P<0.001) E20 cortical cells were grown in 24-well plates. On 14 DIV, SoHapHyang-won was added to the culture media at 0 ~ 20 $\mu$ g/ $\mu$ l and incubated for 72 hrs. On 17 DIV, cells were given a hypoxic shock (2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C, 3 hrs) and further incubated in normoxia. Cell viabilities were measured on 1, 3, 5, 7 days after shock by LDH assay and expressed as % of control.

### 4. 蘇合香元이 저산소증에서 apoptosis와 관련된 단백질의 표현에 미치는 영향

원위 태아 E20 대뇌 신경세포 배양(12-well plate) 14일에 蘇合香元으로 72시간 전처리하고 17 DIV에 저산소증(2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C)을 유발한 다음 3일 후에 세포를 수확하여 SDS-gel loading 완충용액으로 세포를 용해시켜 전기영동하고(8 혹은 15% SDS-gel, 40 $\mu$ g/lane), 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮겨 각 단백질들의 표현을 면역염색하

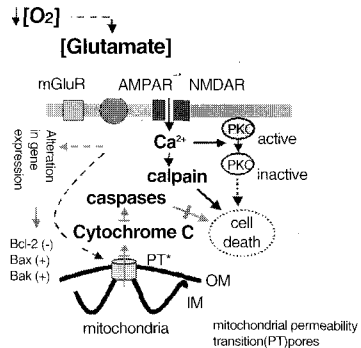


**Fig. 6.** Effects of Sohaphyang-won on the expression of apoptosis-related proteins in the hypoxia model. An hypoxic shock was given for 3 hrs in the presence or absence of 10 μg/μl of Sohaphyang-won. On the third day after shock, cells were harvested, proteins were electrophoresed in SDS-gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membrane and blotted with various antibodies. Note that anti-apoptosis protein Bcl-2 was increased (arrowhead) while pro-apoptosis protein caspase-10 and -3 (initiator and effector of the caspase cascade, respectively) was decreased (asterisk).

여 조사하였다. anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2는 대조군에 비하여 7% 정도 약간 증가되었으며, pro-apoptosis 단백질인 Bak, Bax는 차이가 없었다(Fig.6). 한편 caspase cascade의 initiator인 caspase-1과 caspase-8은 큰 차이를 보이지 않았으나 caspase-10은 약 14%의 감소를 보였으며, effector 인 caspase-3는 약 25%의 큰 감소를 나타내었다(Fig.6, double asterisks).

#### IV. 考 察

중추신경세포의 죽음은 형태학적으로 necrosis와 apoptosis로 구분된다. Necrosis는 세포 외액의 이온들(Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)이 급격히 세포 내로 유입되어 세포질 및 미토콘드리아의 팽창, 세포막 파열 등의 특징을 나타내며, apoptosis는 세포질 및 핵염색질이 응축되고 분절되어 apoptotic body를 형성한다<sup>16</sup>. 이외에도



**Fig. 7.** A model for the mechanism for neuronal protection by Sohaphyang-won in hypoxia. Data from this work indicate that Sohaphyang-won increases the anti-apoptosis protein Bcl-2, while it reduces the caspase cascade initiator caspase-10 and the effector caspase-3 significantly. Therefore, it may be reasonable to propose that Sohaphyang-won protects delayed neuronal death in hypoxia by both increasing Bcl-2 and reducing caspase-10 and -3.

necrosis와는 달리 apoptotic cell death에는 많은 유전자 발현의 변동이 관여함이 알려져 있다. Bcl-2는 세포내 미토콘드리아 막이나 핵막에 존재하는 단백질로 세포 내에서 이종이중체(dimer)를 형성하여 작용하는데, Bcl-2/Bcl-2인 동종이중체(homodimer)를 형성하여 작용하거나, 또 다른 Bcl-2 family 단백질인 Bax와 Bcl-2/Bax의 이종이중체(heterodimer)를 형성하여 작용하는 것으로 알려져 있다. Bcl-2/Bcl-2 동종이중체는 세포의 apoptosis를 억제하는 기능을 가지며, Bax의 양에 따라 이 동종이중체의 양이 결정되어 사망에 대한 세포의 감수성이 결정되는 것으로 추정된다<sup>17</sup>. 즉 Bax의 양이 상대적으로 많아지면 세포가 쉽게 죽고, Bcl-2의 양이 상대적으로 많아지면 세포가 잘 죽지 않는다.

선충류인 *C. elegans*(예쁜꼬마선충)에서 Bcl-2의 homologue인 Ced-9이 cysteine protease인 Ced-3의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있는데<sup>18</sup>, Ced-3는 포유동물의 apoptosis 과정 중에 활성화되는 caspase와 유사한 것으로 알려져 있다<sup>19</sup>. Ced-3 활성화에 필수적인 Ced-4는 포유류의 Apaf-1 유전자와 유사한데, 역시 caspase 활성화에 필수적인 것으로 밝혀졌다<sup>20</sup>.

Caspase는 비활성 전구체(inactive precursors)로 존재하다가 adaptor protein에 의하여 apoptosis가 시작되면 활성화된다. 지금까지 14개의 mammalian caspases가 발견되었는데, 일부는 apoptosis 조절에 관여하고 나머지는 pro-inflammatory cytokines의 processing에 관여한다<sup>21</sup>. Apoptosis에 관여하는 caspase들은 initiator(upstream)와 effector(downstream) caspases로 구분된다<sup>22</sup>. Initiator caspases(주로 caspases-1, -8, -10)는 apoptosis를 촉진하는 자극(proapoptotic stimulus)에 반응하여 effector caspases를 활성화시키며, effector caspases(주로 caspases-3, -6)는 apoptosis 과정 중 대부분의 단백질 분해에 관여한다. 따라서 여러 경우에 있어 caspase 활성화와 caspase 활성을 조절하는 단백질들이 세포의 삶과 죽음을 결정하는데 중요한 역할을 한다.

Apoptosis가 일어나는 세포에서는 미토콘드리아로부터 cytochrome C가 세포질로 방출되고<sup>5</sup>, 방출된 cytochrome C와 Apaf-1이 caspase에 작용하여 이를 활성화시키는 것으로 알려져 있는데<sup>6</sup>, apoptosis를 방지하는 단백질인 Bcl-2는 미토콘드리아로부터 cytochrome C의 방출을 억제하여 caspase 활성을 저하시킨다고 알려져 있다<sup>5,23</sup>. 최근의 연구에 의하면, Bcl-2는 이러한 작용 이외에 cytochrome C의 하위단계에서 직접적으로 caspase 활성을 억제한다고 알려져 있다. 즉, *C. elegans*에서 Bcl-2의 homologue인 Ced-9이 Ced-4와 결합하고 그 활성을 조절함으로써 세포사를 억제시킨다고 하여, 포유동물에 있어서도 Bcl-2가 Ced-4의 homologues인 Apaf-1과 상호작용하여 apoptosis를 조절할 수 있다고 하였다<sup>24-27</sup>.

蘇合香元은 牛黃清心元, 小續命湯, 疎風湯, 至寶丹, 通竅散, 星香正氣散 등과 함께 中風 급성기에 다용되는 처방으로<sup>7</sup>, 氣病의 通治藥으로 芳香開竅, 行氣溫中하는 效能이 있어 突然昏倒, 牙關緊閉, 不省人事; 心腹卒痛, 甚則昏厥하는 寒閉證에 쓰며, 中風, 中氣 및 時行瘴癘之氣를 치료한다<sup>28</sup>.

蘇合香元에 대한 기존의 연구로는 南<sup>11</sup>의 저산소성 뇌장해에 대한 보호작용과 崔<sup>13</sup>의 rat에 유발된 뇌경색 면적 감소 효과 등의 허혈관질환 및 저산소성 뇌

장해에 대한 검증만 있었을 뿐 신경세포사 방지의 기전에 대한 보고는 없었다. 따라서 소합향원의 신경세포사 보호작용과 그 기전에 대한 연구는 의미있는 일이라고 사료된다.

이에 저자는 저산소증에 의해 세포가 apoptotic cell death로 진행된다면 apoptosis를 억제하는 Bcl-2 유전자는 상대적으로 감소할 것이며 apoptosis를 유도하는 Bax, Bak 및 caspase family는 상대적으로 증가할 것이라는 가설아래 蘇合香元의 세포사 방지 기전을 구명하고자 저산소증으로 apoptosis를 유발한 흰쥐의 대뇌신경세포에서 세포 생존율과 Bcl-2, Bax, Bak 및 caspase family 단백질의 표현에 미치는 영향을 조사하였다.

그 결과, 정상산소 환경에서 蘇合香元은 20  $\mu\text{g/ml}$ 까지 대뇌 신경세포 독성이 없었으며, 5일에는 25%, 7일에는 약 45%의 세포사망 보호효과를 나타내었다.

저산소증 모델에서 蘇合香元을 첨가한 경우 저산소 처리 후 3일에는 생존세포수가 대조군에 비하여 약간 감소되었으나, 1, 5, 7일에는 약 10~35% 정도 증가되어 신경세포 보호작용이 있음을 LDH assay를 통하여 확인하였다.

蘇合香元이 저산소증에서 apoptosis와 관련된 단백질의 표현에 미치는 영향을 조사한 결과, anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2는 대조군에 비하여 약간 증가되었으며, pro-apoptosis 단백질인 Bak, Bax는 큰 차이가 없었다. 한편 caspase cascade의 initiator 가운데 caspase-1과 -8은 큰 차이를 보이지 않았으나, caspase-10은 약 14%, effector 인 caspase-3는 약 25% 정도 감소되었다.

蘇合香元이 저산소증에서 신경세포사를 억제하는 기전은 apoptosis를 억제하는 Bcl-2의 표현 증가와, caspase cascade의 시발자인 caspase-10과 실행자인 caspase-3의 표현 감소로 나타났다. 따라서, Bcl-2의 표현 증가는 mitochondrial permeability transition(PT) pore의 생성을 저하시켜 cytochrome C의 세포질 내 유출 억제 기전과 Apaf-4와 결합하여 caspase의 활성을 억제하는 기전에 의하여 이루어지며, caspase cascade의 시발자인 caspase-10과 실행자인 caspase-3

의 표현을 감소시켜 단백질 분해를 줄임으로써 세포사를 감소시키는 것으로 추정되었다.

이상의 실험 결과로 蘇合香元은 정상산소상태 및 저산소증으로 인한 대뇌 신경세포의 생존율을 증가시켰으며, apoptosis 기전 중 Bcl-2의 표현 증가, caspase-3과 caspase-10의 표현 감소에 유효하게 작용하여 뇌졸중 발병 후 발생하는 대뇌 신경세포사 방지에 예방 효과가 있는 것으로 생각된다. 향후 蘇合香元의 저당 저산소증 모델에 대한 신경세포사 방지기전에 대한 연구도 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

본 연구에서는 蘇合香元의 세포사 방지기전을 알아보기 위하여 배양한 E20의 Sprague-Dawley계 흰쥐 대뇌 피질신경세포를 이용하여 배양 14일에 蘇合香元으로 3일간 약재 처리한 후 배양 17일에 저산소증을 유발하고 배양 20일에 신경세포의 변화를 관찰 및 조사하였다.

蘇合香元의 신경세포사 방지효과에 관해서는 LDH assay를 이용하여 관찰하였고, 蘇合香元의 신경세포사 방지기전에 관해서는 apoptosis와 관련된 단백질인 Bcl-2, Bak, Bax, caspase family의 표현을 통하여 조사하였다.

1. 蘇合香元은 E20 대뇌 신경세포 배양을 이용한 저산소증 모델에서 신경세포 보호작용이 있음을 LDH assay를 통하여 확인하였다.
2. 蘇合香元의 저산소증 신경세포사 억제 기전은 apoptosis를 억제하는 Bcl-2의 표현을 증가시켜 mitochondrial permeability transition(PT) pore의 생성을 저하시킴으로써 cytochrome C의 세포질 내 유출을 억제하고, caspase cascade의 시발자인 caspase-10과 실행자인 caspase-3의 표현을 감소시켜 단백질 분해를 줄임으로써 세포사를 감소시키는 것으로 추정되었다.

## 參考文獻

1. 고재영, 김양희. 신경계질환에서의 아포토시스. 유전 제2권. 서울:윌드사이언스; 1998, p.147-65.
2. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Progress in Brain Res.* 1985;63:39-58.
3. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 1987a;7:357-68.
4. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 1987b;7:369-79.
5. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997;275:1132-6.
6. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Nucleotide, OMIM, Protein: Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome C-dependent activation of caspase-3. *Cell* 8. 1997;90(3):405-13.
7. 車相賢. 中風治療의 文獻的 考察과 鍼灸治療에 대한 소견. 大韓韓醫學會內科學會 中風 學術大會 論文集. 1995:59-69.
8. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北:旋風出版社;1976, p.214.
9. 許浚. 原本東醫寶鑑. 서울:南山堂;2001, p.93.
10. 안영기, 최용태. 四關穴 鍼刺와 麝香蘇合香元이 鎮痛, 抗痙攣, 抗瀉下, 血清成分變化 및 胃기능에 미치는 영향. 경희대논문집. 1981:1-12.
11. 남상경. 牛黃清心元과 蘇合香元의 효능에 관한 연구. 서울:경희대학교학원;1990.
12. 이영빈, 문상관, 고창남, 조기호, 김영석, 배형섭, 이경섭. 麝香蘇合元이 재관류장치의 흰쥐 심장에 미치는 영향. 대한성인병학회. 1997;3(1):164-81.
13. 최은정, 신길조, 이원철. 蘇合香元이 실험적 뇌경색 흰쥐의 국소뇌혈류량 및 경색 면적에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1997;18(1):456-69.
14. 黃度淵. 證脈·方藥合編. 서울:남산당;1992, p.20.
15. Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., and Price, P. J.. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free



- medium combination. *J. Neurosci. Res.* 1993;35:567-576l.
16. Shigeno T, Mima T, Takakura K, Graham DI, Kato G, Hashimoto Y, Furukawa S. Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J Neurosci.* 1991;11(9):2914-9.
  17. Volpe BT, Wessel TC, Mukherjee B, Federoff HJ. Temporal pattern of internucleosomal DNA fragmentation in the striatum and hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 17. 1995; 186(2-3):157-60.
  18. Sei Y, Von Lubitz KJ, Basile AS, Borner MM, Lin RC, Skolnick P, Fossom LH. Internucleosomal DNA fragmentation in gerbil hippocampus following forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 25. 1994;171(1-2):179-8.
  19. Nicholson WD, Ali A, Thornberry NA, Vailancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 1995;376:37-43.
  20. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome C-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 1997;90:405-13.
  21. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 22. 1990;348(6299):334-6.
  22. Earmshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1999;68:383-424.
  23. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked. *Science* 21. 1997;275(5303):1129-32.
  24. Spector MS, Desnoyers S, Hoepfner DJ, Hengartner MO. Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature* 13. 1997;385 (6617):653-6.
  25. Wu D, Wallen HD, Nunez G. Interaction and regulation of subcellular localization of CED-4 by CED-9. *Science* 21. 1997;275(5303):1126-9.
  26. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 21. 1997;275(5303):1122-6.
  27. Chen F, Hersh BM, Conradt B, Zhou Z, Riemer D, Gruenbaum Y, Horvitz HR. Translocation of *C. elegans* CED-4 to nuclear membranes during programmed cell death. *Science* 25. 2000;287(5457): 1485-9.
  28. 龔延賢. 萬病回春. 서울:행림서원;1972, p.62.