

## 柴胡의 뇌해마 신경세포 보호효능에 대한 연구

신광식, 이원철

동국대학교 한의과대학 내과학교실

### A Study of Neuroprotective Effect of *Bupleuri Radix* on Hippocampal Neurons

Kwang-Sik Shin, Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

**Objective:** This study was performed to investigate neuroprotective effects of *Bupleuri Radix* against oxidative and ischemic damages.

**Method:** To observe the neuroprotective effects against ischemic damage, ischemic insult was induced by oxygen/glucose deprivation (OGD) on organotypic hippocampal slice cultures (OHSC) from 1 week-old Sprague-Dawley rats. Propidium iodide (PI) fluorescence-stained neuronal dead-cell areas, area percentages and TUNEL-positive apoptotic cells in CA1 and dentate gyrus, and LDH levels in culture media of the OHSC were measured following *Bupleuri Radix* extract treatment.

**Result:** The following results were obtained:

- (1) The 5 $\mu\text{g/ml}$  of *Bupleuri Radix* treatment demonstrated a significant decrease in PI fluorescence-stained neuronal dead-cell areas and area percentage in CA1 region of the OHSC from 18 hrs to 48 hrs following the OGD. The 50 $\mu\text{g/ml}$  of *Bupleuri Radix* treatment was also significant from 6 hrs to 48 hrs following the OGD and was more effective.
- (2) The 5 and 50 $\mu\text{g/ml}$  of *Bupleuri Radix* treatment demonstrated a significant decrease in PI fluorescence-stained neuronal dead-cell areas and area percentage in DG region of the OHSC from 6 hrs to 48 hrs following the OGD. The 50 $\mu\text{g/ml}$  treatment was more effective than the 5  $\mu\text{g/ml}$  treatment.
- (3) *Bupleuri Radix* treatment demonstrated a significant decrease in TUNEL-positive apoptotic cells in CA1 region (with 5 and 50 $\mu\text{g/ml}$ ) and in DG region (with 50 $\mu\text{g/ml}$ ) of the OHSC damaged by the OGD.
- (4) *Bupleuri Radix* treatment demonstrated a significant decrease in LDH concentrations in culture media of the OHSC damaged by the OGD.

**Conclusion:** These results suggest that *Bupleuri Radix* has neuroprotective and control effects on inflammatory and immune responses where there has been ischemic damage to the central nervous system.

**Key Words:** *Bupleuri Radix*, neuroprotective effect, inflammatory, immune responses, ischemic damage

### 1. 緒 論

1980년대 초반 Kirino의 연구<sup>1</sup>로, 뇌신경세포의 손상시 허혈로 인한 중심부(core)의 직접적인 괴사

성 세포사(necrotic neuronal death)과정 이외에 손상을 받은 주변부위(penumbra)의 지연성 신경세포사(delayed neuronal death, DND)가 밝혀졌는데, 이는 apoptosis에 의한 세포사멸 과정으로 알려지면서 현재 신경계 질환의 기전에 대한 심층적인 연구가 진행되고 있다.

최근 연구에 따르면 apoptic type의 지연성 세포사의 발생기전으로 free radicals, glutamate, calcium overload, nitric oxide 및 여러 cytokines 등 많은 요

· 접수 : 2004. 10. 12 · 채택 : 2004. 11. 1  
· 교신저자 : 신광식, 서울시 강남구 논현동 37-21  
동국대학교 부속 강남한방병원 3내과  
(Tel. 02-3416-9796 Fax. 02-3416-9790  
E-mail : hyunbihong@empal.com)  
· 본 연구는 동국대학교의 2003학년도 동국대학교 연구년 지원에 의하여 이루어졌음.

인들이 관여하는 것으로 알려져 있으며<sup>2,3</sup>, 이와 관련되어 신경세포 손상을 최소화시킬 수 있는 적절한 신경보호제 등 여러 방어적 약물제제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>4</sup>.

한의학에서도 실험동물에 蘇合香元<sup>5</sup>, 牛黃清心元<sup>6</sup>, 大造丸<sup>7</sup>, 星香正氣散<sup>8</sup>, 黃連解毒湯<sup>9</sup>, 防風當歸飲<sup>10</sup>, 清肺瀉肝湯<sup>11</sup> 등을 투여하여 뇌경색의 부피, 뇌부종의 크기 및 신경세포의 조직학적, 면역학적 손상이 감소되었다는 보고와, 六一順氣湯<sup>12</sup>, 祛風至寶丹<sup>13</sup>, 星香正氣散<sup>14</sup>, 牛黃清心元<sup>6</sup> 등을 투여하여 전뇌허혈 시 뇌순환 개선 효과, 지연성 신경세포사와 관련된 세포보호효과 및 신경전달물질에 미치는 영향 등이 보고되었으며, 최근에는 저당-저산소증 모델에서 牛黃清心元<sup>15</sup>, 蘇合香元<sup>16</sup> 등을 투여하여 신경세포사 방지에 효과가 있음이 보고되었다. 단일 약물은 厚朴<sup>17</sup>, 石菖蒲<sup>18</sup>, 黃芩<sup>19</sup>, 釣鈎藤<sup>20</sup>, 鱉鱉<sup>21</sup>, 遠志<sup>22</sup>, 牛膽南星<sup>23</sup> 등을 투여하여 체온저하, 항산화효과, caspase-3 유발억제, amyloid- $\beta$ 에 의한 신경세포 손상 보호효과, glutamate 독성에 의한 보호효과 등이 있음이 보고되었다.

柴胡가 중추신경계에 미치는 영향에 대해서는柴胡로부터 추출된 linoleic acid가 항경련 효능이 있다는 보고<sup>24</sup>와 dopamine, serotonin 및 GABA receptor에 작용한다는 보고<sup>25,26</sup>가 있고, 신경세포보호효과가 있음을 보고<sup>27</sup>한 바 있으나,柴胡의 뇌허혈 손상에 있어서 산소와 glucose 공급을 완전히 차단하는 방법(oxygen-glucose deprivation, OGD)을 이용한 연구는 아직 보고된 바 없었다.

이에 저자는 뇌해마 조직배양<sup>28</sup>을 이용하여 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈 손상에 있어서 propidium iodide 염색에 의한 신경세포사멸 면적의 변화, TUNEL 양성반응 세포 수의 변화 등을 통하여 뇌허혈 손상에 대한 신경세포 보호효능을 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 약물

柴胡(*Bupleuri Radix*) 200g을 증류수 3,000ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음, 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 완전히 동결건조시켜 물추출액 33g을 얻어 실험에 사용하였다.

### 2. 뇌해마 조직배양에 대한 실험

#### 1) 뇌해마 조직배양

실험에 사용한 뇌조직은 7일령 Sprague-Dawley 계 흰쥐의 뇌해마(hippocampus)로, 흰쥐의 머리를 단두한 후 안과용 가위로 재빨리 두피와 두개골을 제거하고 대뇌를 적출하였다. 적출한 대뇌를 petri-dish에 담겨있는 해부용 배양액(MEM 500ml + 25mM HEPE + 4mM 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, 1ml의 배양액이 담겨있는 6-well 배양접시에 culture insert를 삽입하였다. 이후 5% CO<sub>2</sub>, 36°C 상태의 습도가 조절된 배양기에서 10일 동안 조직배양하였다<sup>30,31</sup>.

조직배양액은 50% modified Eagle's medium (MEM; 500ml 당 1g glucose 함유), 25% Hank's balanced salt solution(HBSS), 25% horse serum에 20 nM HEPES, 6g/L glucose, 1 mM L-glutamine을 첨가하고 bottle top filter로 여과한 다음 pH를 7.25~7.30으로 조정하였으며, 50 $\mu$ g/ml의 streptomycin-penicillin을 첨가하였다. 조직배양액은 조직을 배양하는 동안 3일에 한번씩 교환해주었다.

#### 2) 뇌허혈 손상의 유발

뇌해마조직에 뇌허혈 손상은 산소와 glucose 공급을 완전히 차단하는 방법(oxygen-glucose deprivation, OGD)을 사용하였다<sup>29,32</sup>. 무산소실(anacrobic chamber; 85% nitrogen, 10% carbon dioxide, 5%

hydrogen) 안에 propidium iodide(PI)가 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>)을 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 제거한 후, 무산소실안에서 IBSS가 담긴 배양접시로 뇌해마조직의 culture insert를 옮기고 45분 동안 산소와 glucose 공급이 차단된 OGD에 의한 허혈상태를 유발시켰다. 정확한 시간동안 허혈상태를 유발시킨 후 미리 준비된 PI가 들어있는 신선한 serum free media로 뇌해마조직의 culture insert를 옮긴 후 정상 산소 상태(normoxia condition; 95% air-5% CO<sub>2</sub>, 36.5°C)에서 48시간 동안 조직을 재배양 하였다.

### 3) 한약물의 처리

柴胡의 물추출액을 0.5, 5 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 허혈상태 유발 45분전부터 이후 48시간 동안 각 단계의 조직배양액에 첨가시켰다.

### 4) Propidium iodide 염색 및 신경세포사멸 면적의 측정<sup>33</sup>

뇌해마조직을 PI가 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가된 배양액의 새로운 6 well dish에 옮기고 2시간 동안 사전배양한 다음 연속하여 위의 조직배양방법에서 설명한 각 단계별 배양액에 PI를 첨가하여 조직을 배양하였다. 한약물 처리와 OGD의 허혈상태를 유발하기전에 형광현미경(Axiovert S100, Zeiss)을 이용하여 정상적인 상태의 뇌해마조직 PI-형광염색영상을 얻었으며, 45분간의 OGD 후 6, 18, 24 및 48시간 후에 각각 형광현미경을 사용하여 PI-형광염색영상을 얻었다. 형광현미경의 UV filter는 rhodamine filter를 사용하였다. 저장된 PI-형광염색영상을 컴퓨터영상분석기로 옮긴 다음 NIH image software(Ver. 1.62)를 사용하여 뇌해마조직 전체와 CA1 및 DG 구역에서 PI에 의하여 적색으로 염색된 신경세포사멸 면적을 측정하였다.

### 5) TUNEL 염색 및 양성반응 신경세포 수의 측정<sup>34</sup>

뇌해마조직에 OGD에 의한 허혈상태를 유발한 48시간 후에 뇌해마조직을 1% paraformaldehyde (PFA)를 포함한 PBS(pH 7.4)로 10분간 고정하고 5분간 2회 세척한 다음 ethanol-acetic acid solution 으로 -20°C에서 20분간 재고정하였다. TUNEL 염색 과정은 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS에서 5분간, working strength TdT enzyme(70% reaction buffer + 30% TdT enzyme)으로 37°C에서 2시간, stop/wash buffer에서 15분간, anti-digoxigenin peroxidase conjugate에서 1시간 및 peroxidase substrate(DAB dilution buffer + DAB substrate)에서 10분간 반응시켰다. 이후 0.5% methyl green으로 5분간 배경염색하고 100% n-Butanol로 세척한 다음 봉합하였다. 광학현미경이 연결된 컴퓨터영상분석기의 NIH Image software (Ver. 1.62)를 이용하여 뇌해마의 CA1 및 DG구역의 면적을 측정하고 그 면적 내에서 관찰되는 TUNEL 염색에 양성반응을 보인 신경세포 수를 측정한다 다음 각각 단위면적(1,000 $\mu\text{m}^2$ ) 당으로 계산하였다.

### 6) 세포배양액내 Lactate Dehydrogenase 측정<sup>35</sup>

뇌해마조직에 OGD에 의한 허혈상태를 유발한 48시간 후에 뇌해마조직의 배양액내로 분비된 lactate dehydrogenase(LDH)농도는 전문측정용 kit를 사용하여 측정하였다. 배양액 100 $\mu\text{l}$ 를 96 well dish 에 넣고, diaphorase/NAD<sup>+</sup>혼합용액과 iodotetrazolium chloride-sodium lactate 용액을 100 $\mu\text{l}$  첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 50 $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응을 중지시키고, ELISA를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

### 3. 통계처리

실험결과의 분석은柴胡 물추출액을 농도별로 투여한 실험군(sample)을 허혈 유발 대조군(control)과 각각 비교하는 Student's t-test를 사용하였다.

### III. 實驗 成績

1. 뇌해마조직 CA1구역 신경세포사멸 면적의 변화  
 뇌해마 조직의 정상적인 배양상태인 정상군은 조직 전체면적  $19,945.8 \pm 468.5 \mu\text{m}^2$  중에서 PI에 의하여 염색된 신경세포사멸 면적은 6, 18, 24 및 48 시간 경과에 따라 각각  $10.9 \pm 6.2$ ,  $21.3 \pm 7.5$ ,  $43.4 \pm 11.3$  및  $108.0 \pm 19.1 \mu\text{m}^2$ 를 나타내었으며, 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태의 대조군에서는 조직 전체면적  $20,988.8 \pm 318.1 \mu\text{m}^2$  중에서 시간 경과에 따라 각각  $7,266.0 \pm 809.2$ ,  $11,187.5 \pm 1,041.6$ ,  $12,015.0 \pm 1,060.6$  및  $14,388.7 \pm 1,591.5 \mu\text{m}^2$ 로 현저한 신경세포사멸 면적의 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한

뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 I에서는 조직 전체면적  $19,888.5 \pm 416.9 \mu\text{m}^2$  중에서 시간 경과에 따라 각각  $5,600.3 \pm 938.7$ ,  $9,049.0 \pm 1,001.1$ ,  $9,360.8 \pm 864.1$  및  $11,661.3 \pm 776.2 \mu\text{m}^2$ 로 약물처리 24시간 후의 대조군에 비하여  $P < 0.05$ 의 유의한 신경세포사멸 면적 감소가 관찰되었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 II에서는 조직 전체면적  $20,237.5 \pm 488.1 \mu\text{m}^2$  중에서 시간 경과에 따라 각각  $4,696.8 \pm 1,444.2$ ,  $7,559.6 \pm 923.2$ ,  $8,483.3 \pm 850.6$  및  $10,046.8 \pm 1,593.4 \mu\text{m}^2$ 로 약물처리 18시간 후부터 48시간까지 대조군에 비하여  $P < 0.05$  이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었다. 산소와

Table 1. Changes of Neuronal Cell Death Area in CA1 of Organotypic Hippocampal Slice Culture

( $\mu\text{m}^2$ )

Group	Histologic Area	PI Area in CA1			
		6 h	18 h	24 h	48 h
Normal	19,945.8±468.5	10.9±6.2	21.3±7.5	43.4±11.3	108.0±19.1
Control	20,988.8±318.1	7,266.0±809.2	11,187.5±1,041.6	12,015.0±1,060.6	14,388.7±1,591.5
Sample I	19,888.5±416.9	5,600.3±938.7	9,049.0±1,001.1	9,360.8±864.1*	11,661.3±776.2
Sample II	20,237.5±488.1	4,696.8±1,444.2	7,559.6±923.2**	8,483.3±850.6**	10,046.8±1,593.4*
Sample III	20,947.7±451.7	4,561.3±689.2**	7,407.2±1,314.4*	8,086.2±670.7**	10,439.5±644.0*

Data presented mean ± standard error (n=12).

Normal ; group without oxygen-glucose deprivation.

Control ; group treated with oxygen-glucose deprivation for 45 minutes.

Sample I ; group treated with  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

Sample II ; group treated with  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

Sample III ; group treated with  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

\* ; statistical significance compared with control group.

(\* ,  $P < 0.05$ ; \*\* ,  $P < 0.01$ )

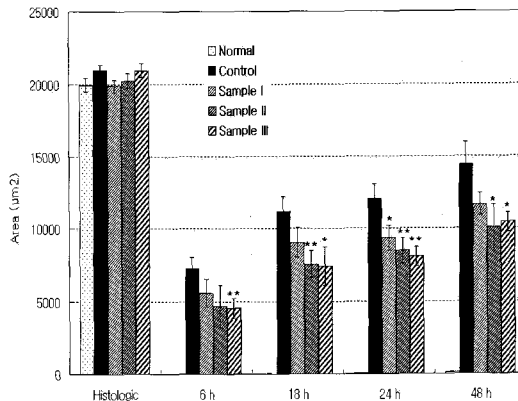


Fig. 1. Effect of Bupleuri Radix on neuronal cell death area in CA1 of organotypic hippocampal slice culture.

glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 실험군 III에서는 조직 전체면적 20,947.7 $\pm$ 451.7 $\mu\text{m}^2$  중에서 시간 경과에 따라 각각 4,561.3 $\pm$ 689.2, 7,407.2 $\pm$ 1,314.4, 8,086.2 $\pm$ 670.7 및 10,439.5 $\pm$ 644.0 $\mu\text{m}^2$ 로 약물처리 6시간 후부터 48시간 까지 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었다(Table 1, Fig. 1, 5).

2. 뇌해마조직 CA1구역 신경세포사멸 면적비율의 변화

뇌해마 조직의 정상적인 배양상태인 정상군에서 조직 전체면적에 대한 신경세포사멸 면적비율은 6, 18, 24 및 48 시간 경과에 따라 각각 0.1 $\pm$ 0.0,

0.1 $\pm$ 0.0, 0.2 $\pm$ 0.1 및 0.5 $\pm$ 0.1%를 나타내었으며, 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태의 대조군에서는 시간 경과에 따라 각각 34.7 $\pm$ 3.8, 52.9 $\pm$ 4.5, 56.9 $\pm$ 4.6 및 67.5 $\pm$ 6.5%로 현저한 신경세포사멸 면적비율의 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 실험군 I에서는 시간 경과에 따라 각각 29.1 $\pm$ 5.6, 45.1 $\pm$ 4.5, 47.2 $\pm$ 4.6 및 56.2 $\pm$ 3.8%로 대조군에 비하여 신경세포사멸 면적비율이 감소하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 실험군 II에서는 시간 경과에 따라 각각 24.3 $\pm$ 8.1, 37.8 $\pm$ 5.0, 42.4 $\pm$ 4.6 및 51.5 $\pm$ 8.5%로 대조군에 비하여 약물처리

Table 2. Changes of Area Percentage of Neuronal Cell Death in CA1 of Organotypic Hippocampal Slice Culture

(%)

Group	Area % of PI in CA1			
	6 h	18 h	24 h	48 h
Normal	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1
Control	34.7 $\pm$ 3.8	52.9 $\pm$ 4.5	56.9 $\pm$ 4.6	67.5 $\pm$ 6.5
Sample I	29.1 $\pm$ 5.6	45.1 $\pm$ 4.5	47.2 $\pm$ 4.6	56.2 $\pm$ 3.8
Sample II	24.3 $\pm$ 8.1	37.8 $\pm$ 5.0*	42.4 $\pm$ 4.6*	51.5 $\pm$ 8.5
Sample III	21.9 $\pm$ 3.4*	35.0 $\pm$ 6.0*	38.7 $\pm$ 3.3**	50.1 $\pm$ 4.1*

Data presented mean  $\pm$  standard error (n=12).

Normal ; group without oxygen-glucose deprivation.

Control ; group treated with oxygen-glucose deprivation for 45 minutes.

Sample I ; group treated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

Sample II ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

Sample III ; group treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

\* ; statistical significance compared with control group.

(\* , P<0.05; \*\* , P<0.01)

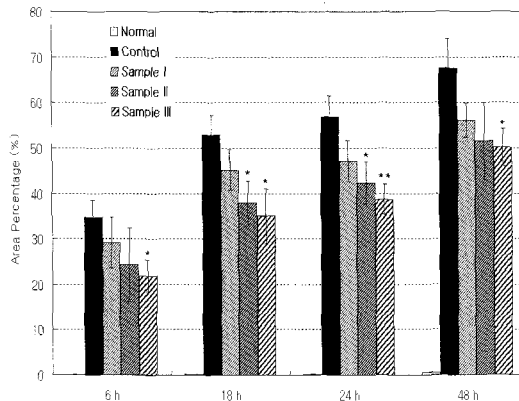


Fig. 2. Effect of Bupleuri Radix on area percentage of neuronal cell death in CA1 of organotypic hippocampal slice culture.

후 18시간과 24시간 후에만 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 III에서는 시간 경과에 따라 각각 21.9 $\pm$  3.4, 35.0 $\pm$ 6.0, 38.7 $\pm$ 3.3 및 50.1 $\pm$ 4.1%로 약물처리 6시간 후부터 48시간까지 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었다(Table 2, Fig. 2, 5).

3. 뇌해마조직 DG구역 신경세포사멸 면적의 변화

뇌해마 조직의 정상적인 배양상태인 정상군은 조직 전체면적 5,225.6 $\pm$ 173.1 $\mu\text{m}^2$  중에서 PI에 의하여 염색된 신경세포사멸 면적은 6, 18, 24 및 48 시간 경

과에 따라 각각 27.9 $\pm$ 7.8, 69.9 $\pm$ 32.3, 73.7 $\pm$ 23.3 및 82.0 $\pm$ 38.2 $\mu\text{m}^2$ 를 나타내었으며, 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태의 대조군에서는 조직 전체면적 5,196.0 $\pm$ 325.8 $\mu\text{m}^2$  중에서 시간 경과에 따라 각각 1,009.7 $\pm$ 167.3, 1,151.0 $\pm$ 186.3, 1,352.0 $\pm$ 177.5 및 1,458.4 $\pm$ 138.2 $\mu\text{m}^2$ 로 현저한 신경세포사멸 면적의 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 I에서는 조직 전체면적 5,290.7 $\pm$ 382.3 $\mu\text{m}^2$  중에서 시간 경과에 따라 각각 873.3 $\pm$ 155.3, 913.8 $\pm$ 179.2, 923.2 $\pm$ 110.5 및 1,245.3 $\pm$ 220.1 $\mu\text{m}^2$ 로 대조군에 비하여 신경세포사멸 면적이 감소하였으나 유의성은 없었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴

Table 3. Changes of Neuronal Cell Death Area in DG of Organotypic Hippocampal Slice Culture

Group	Histologic Area	PI Area in DG ( $\mu\text{m}^2$ )			
		6 h	18 h	24 h	48 h
Normal	5,225.6 $\pm$ 173.1	27.9 $\pm$ 7.8	69.9 $\pm$ 32.3	73.7 $\pm$ 23.3	82.0 $\pm$ 38.2
Control	5,196.0 $\pm$ 325.8	1,009.7 $\pm$ 167.3	1,151.0 $\pm$ 186.3	1,352.0 $\pm$ 177.5	1,458.4 $\pm$ 138.2
Sample I	5,290.7 $\pm$ 382.3	873.3 $\pm$ 155.3	913.8 $\pm$ 179.2	923.2 $\pm$ 110.5	1,245.3 $\pm$ 220.1
Sample II	5,138.2 $\pm$ 142.5	585.8 $\pm$ 156.0*	620.0 $\pm$ 149.7*	748.3 $\pm$ 152.1**	985.0 $\pm$ 215.4*
Sample III	5,133.8 $\pm$ 227.2	521.6 $\pm$ 112.7*	639.4 $\pm$ 84.4*	692.1 $\pm$ 74.9**	1,041.9 $\pm$ 147.6*

Data presented mean  $\pm$  standard error (n=12).

Normal ; group without oxygen-glucose deprivation.

Control ; group treated with oxygen-glucose deprivation for 45 minutes.

Sample I ; group treated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

Sample II ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

Sample III ; group treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

\* ; statistical significance compared with control group.

(\* , P<0.05; \*\* , P<0.01)

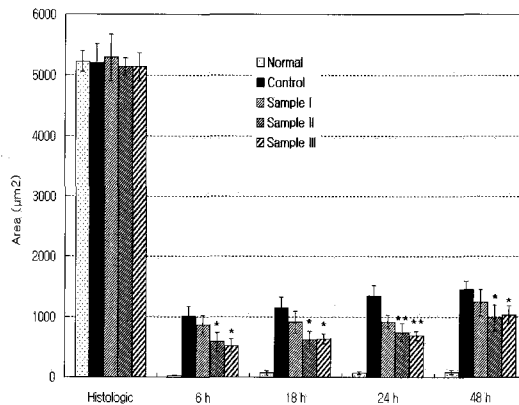


Fig. 3. Effect of Bupleuri Radix on neuronal cell death area in DG of organotypic hippocampal slice culture.

胡 물추출액 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 II에서는 조직 전체면적 5,138.2 $\pm$ 142.5 $\mu\text{m}^2$  중에서 시간 경과에 따라 각각 585.8 $\pm$ 156.0, 620.0 $\pm$ 149.7, 748.3 $\pm$ 152.1 및 985.0 $\pm$ 215.4 $\mu\text{m}^2$ 로 약물처리 6시간 후부터 48시간까지 대조군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포 사멸 면적의 감소가 관찰되었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 III에서는 조직 전체면적 5,133.8 $\pm$ 227.2 $\mu\text{m}^2$  중에서 시간 경과에 따라 각각 521.6 $\pm$ 112.7, 639.4 $\pm$ 84.4, 692.1 $\pm$ 74.9 및 1,041.9 $\pm$ 147.6 $\mu\text{m}^2$ 로 약물처리 6시간 후부터 48시간까지 control군에 비하여 P<0.05 이상의 유의한 신경세포사멸 면적의 감소가 관찰되었다(Table 3, Fig. 3, 5).

4. 뇌해마조직 DG구역 신경세포사멸 면적비율의 변화

뇌해마 조직의 정상적인 배양상태인 정상군에서 조직 전체면적에 대한 신경세포사멸 면적비율은 6, 18, 24 및 48 시간 경과에 따라 각각 0.6 $\pm$ 0.2, 1.4 $\pm$ 0.7, 1.5 $\pm$ 0.5 및 1.7 $\pm$ 0.8%를 나타내었으며, 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태의 대조군에서는 시간 경과에 따라 각각 18.9 $\pm$ 2.5, 21.7 $\pm$ 3.2, 25.9 $\pm$ 3.2 및 30.6 $\pm$ 2.8%로 현저한 신경세포사멸 면적비율의 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 I에서는 시간 경과에 따라 각각 18.1 $\pm$ 4.0, 18.9 $\pm$ 3.6, 18.6 $\pm$ 2.7 및 24.0 $\pm$ 3.7%로 대조군에 비하여

**Table 4.** Changes of Area Percentage of Neuronal Cell Death in DG of Organotypic Hippocampal Slice Culture (%)

Group	Area % of PI in DG			
	6 h	18 h	24 h	48 h
Normal	0.6 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 0.8
Control	18.9 $\pm$ 2.5	21.7 $\pm$ 3.2	25.9 $\pm$ 3.2	30.6 $\pm$ 2.8
Sample I	18.1 $\pm$ 4.0	18.9 $\pm$ 3.6	18.6 $\pm$ 2.7	24.0 $\pm$ 3.7
Sample II	11.4 $\pm$ 2.9*	12.2 $\pm$ 3.1*	14.7 $\pm$ 3.1**	19.6 $\pm$ 4.6*
Sample III	10.3 $\pm$ 2.0**	12.5 $\pm$ 1.6**	13.9 $\pm$ 1.7**	19.7 $\pm$ 2.7**

Data presented mean  $\pm$  standard error (n=12).

Normal ; group without oxygen-glucose deprivation.

Control ; group treated with oxygen-glucose deprivation for 45 minutes.

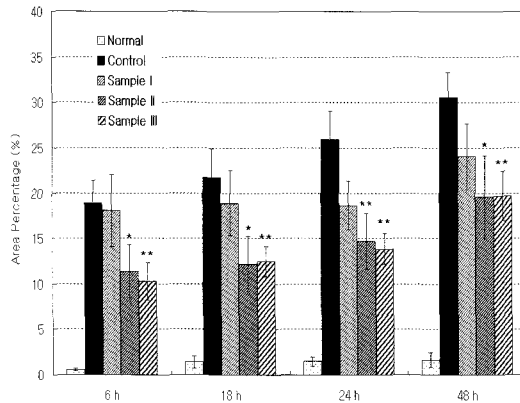
Sample I ; group treated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

Sample II ; group treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

Sample III ; group treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

\* ; statistical significance compared with control group.

(\* , P<0.05; \*\* , P<0.01)



**Fig. 4.** Effect of Bupleuri Radix on area percentage of neuronal cell death in DG of organotypic hippocampal slice culture.

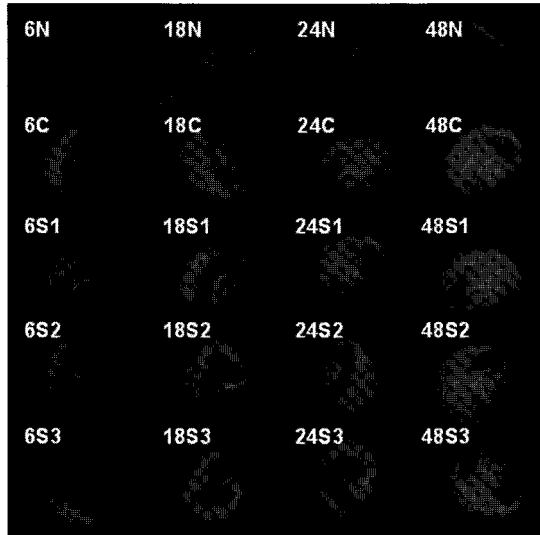


Fig. 5. Propidium iodide images of organotypic hippocampal slice culture after oxygen-glucose deprivation. (N: normal group without oxygen-glucose deprivation, C: control group treated with oxygen-glucose deprivation for 45 minutes, S1: sample I group treated with  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation, S2: sample II group treated with  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation, S3: sample III group treated with  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation). Groups treated with 5 and  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  of Bupleuri Radix extract show significant decrease of neuronal cell death area (red color PI-stained area) compared to control group.

신경세포사멸 면적비율이 감소하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 II에서는 시간 경과에 따라 각각  $11.4\pm 2.9$ ,  $12.2\pm 3.1$ ,  $14.7\pm 3.1$  및  $19.6\pm 4.6\%$ 로 약물처리 6시간 후부터 48시간까지 대조군에 비하여  $P<0.05$  이상의 유의한 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 III에서는 시간 경과에 따라 각각  $10.3\pm 2.0$ ,  $12.5\pm 1.6$ ,  $13.9\pm 1.7$  및  $19.7\pm 2.7\%$ 로 약물처리 6시간 후부터 48시간까지 대조군에 비하여  $P<0.05$  이상의 유의한 신경세포사멸 면적비율의 감소가 관찰되었다(Table 4, Fig. 4, 5).

#### 5. 뇌해마조직 TUNEL 양성 신경세포의 변화

정상적인 배양상태인 정상군에서는 TUNEL 양성 반응을 보인 신경세포의 수는 단위면적 당 CA1구역에서  $2.4\pm 0.5$ 개, DG구역에서  $4.4\pm 0.6$ 개가 관찰되었으며, 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태의

대조군에서는 CA1구역에서  $39.2\pm 8.4$ 개, DG구역에서  $30.9\pm 7.4$ 개로 약 600% 이상 현저한 신경세포 apoptosis가 관찰되었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 I에서는 CA1구역에서  $26.8\pm 3.8$ 개, DG구역에서  $23.3\pm 3.3$ 개로 대조군에 비하여 감소되었으나 통계학적 유의성은 없었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 II에서는 CA1구역에서  $18.0\pm 4.6$ 개로 대조군에 비하여  $P<0.05$ 의 유의성 있는 신경세포 apoptosis의 감소가 관찰되었으며, DG구역에서는  $19.3\pm 4.4$ 개로 대조군에 비하여 감소되었으나 통계학적 유의성은 없었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 실험군 III에서는 CA1구역에서  $17.5\pm 3.2$ 개, DG구역에서는  $14.9\pm 3.4$ 개로 모두 대조군에 비하여  $P<0.05$ 의 유의성 있는 신경세포 apoptosis의 감소가 관찰되었다(Table 5, Fig. 6, 7).



**Table 5.** Changes of TUNEL-Positive Cells in CA1 and DG of Organotypic Hippocampal Slice Culture

Group	CA1	DG
Normal	2.4±0.5	4.4±0.6
Control	39.2±8.4	30.9±7.4
Sample I	26.8±3.8	23.3±3.3
Sample II	18.0±4.6*	19.3±4.4
Sample III	17.5±3.2*	14.9±3.4*

Data presented mean ± standard error (n=6).

Normal ; group without oxygen-glucose deprivation.

Control ; group treated with oxygen-glucose deprivation for 45 minutes.

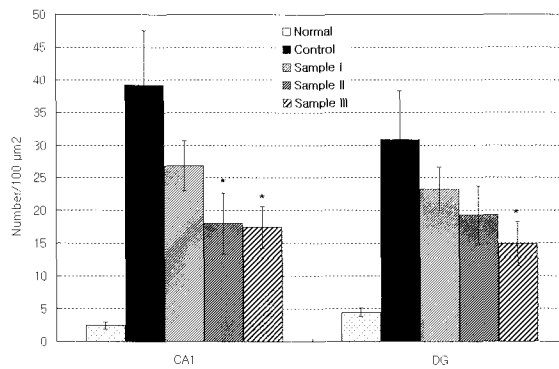
Sample I ; group treated with 0.5µg/ml of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

Sample II ; group treated with 5µg/ml of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

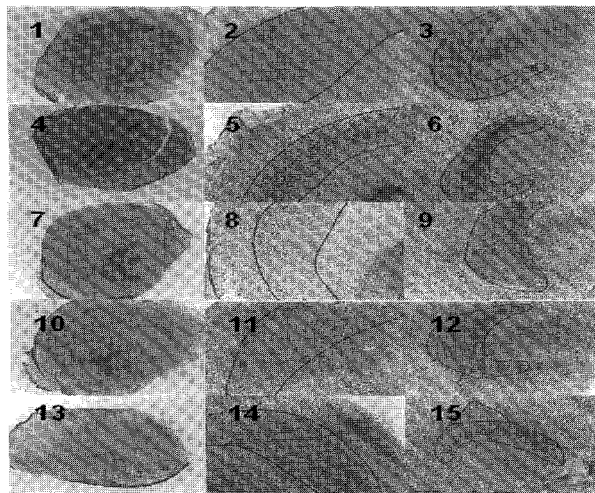
Sample III ; group treated with 50µg/ml of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

\* ; statistical significance compared with control group.

(\* , P<0.05)



**Fig. 6.** Effect of Bupleuri Radix on TUNEL-positive cells in CA1 and DG of organotypic hippocampal slice culture.



**Fig. 7.** TUNEL-positive cells in CA1 and DG of organotypic hippocampal slice culture after oxygen-glucose deprivation (section 1, 2 and 3: Normal, section 4, 5 and 6: Control, section 7, 8 and 9: Sample I, section 10, 11 and 12: Sample II, section 13, 14 and 15: Sample III, section 2, 5, 8, 11 and 14: CA1, section 3, 6, 9, 12 and 15: DG). Groups treated with 5 and 50µg/ml of Bupleuri Radix extract show significant decrease of TUNEL-positive cells (dark brown color) compared to control group.

6. 뇌해마 조직배양액내 LDH 농도의 변화

정상적인 배양상태인 정상군에서는 배양액내 LDH의 농도가 324.8±75.2 U/L로 관찰되었으며, 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태의 대조군에서는 1,056.5±71.4U/L로 약 300% 이상 현저한 증가를 나타내었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액 0.5µg/ml를 처리한 실험군 I에서는 960.7±90.4U/L, 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액 5µg/ml를 처리한 실험군 II에서는 848.3±94.6U/L로 대조군에 비하여 감소되었으나 통계학적 유의성은 없었다. 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈양 상태에서 柴胡 물추출액 50µg/ml를 처리한 실험군 III에서는 842.4 ±59.9U/L

로 대조군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 감소를 나타내어 현저한 신경세포사멸의 감소가 관찰되었다(Table 6, Fig. 8).

IV. 考 察

柴胡는 산형과에 속한 다년생 초본인 柴胡의 뿌리를 건조한 약재로 <神農本草經>에서 “味苦, 平. 主心腹腸胃中結氣, 飲食積聚, 寒熱邪氣, 推陳致新, 久服輕身, 明目益精”의 효능이 있음이 최초로 수록되었으며, 和解退熱, 疏肝解鬱, 升舉陽氣하는 효능이 있어 半表半裏의 邪氣를 치료하며 傷寒의 寒熱往來, 胸脇苦滿, 肝氣鬱結, 口苦耳聾, 頭痛目眩 등에

Table 6. Changes of LDH Levels in Culture Media of Organotypic Hippocampal Slice Culture

Group	LDH (U/L)
Normal	324.8±75.2
Control	1,056.5±71.4
Sample I	960.7±90.4
Sample II	848.3±94.6
Sample III	842.4±59.9*

Data presented mean ± standard error (n=6).

Normal ; group oxygen-glucose deprivation.

Control ; group treated with oxygen-glucose deprivation for 45 minutes.

Sample I ; group treated with 0.5µg/ml of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

Sample II ; group treated with 5µg/ml of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

Sample III ; group treated with 50µg/ml of Bupleuri Radix extract after oxygen-glucose deprivation.

\* ; statistical significance compared with control group.

(\* , P<0.05)

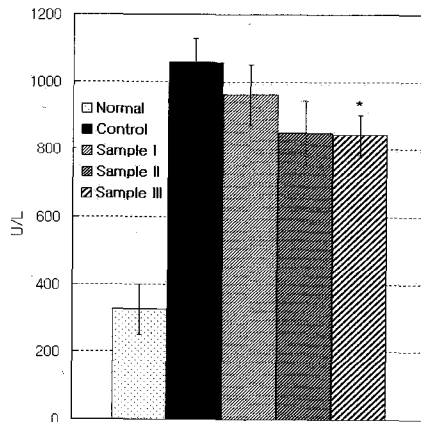


Fig. 8. Effect of Bupleuri Radix on LDH levels in culture media of organotypic hippocampal slice culture.

활용되어 왔다<sup>36-38</sup>. 약리작용으로는 해열, 진통, 소염 작용이 있으며, 항궤양 및 간기능 보호, 이담작용 등이 보고되었다<sup>39-41</sup>. 한약 처방에서 柴胡가 주약으로 구성되어 있는 柴胡湯類 역시 肝의 疏泄作用이 원활하지 못한 肝氣鬱結과 肝膽濕熱 등을 치료하는데 사용되고 있다<sup>42</sup>.

柴胡에 대한 실험적 연구로는 송<sup>37</sup>, 박<sup>43</sup> 등의 柴胡類의 成分과 效能에 관한 비교연구 외에, 김과 박<sup>40</sup>의 CCl<sub>4</sub> 로 유발된 백서의 간손상에 대한 연구, 김등<sup>39</sup>의 간 MAO활성에 대한 연구 등 간기능과 관련된 연구보고가 다수이며, 또한 柴胡의 약리학적 유효성분은 buleorumol, saikosaponin a, c 및 d, oleanane-family saponin 등으로<sup>43,44</sup>, 이 중에서 특히 saikosaponin은 prostaglandin E<sub>2</sub>의 분비를 촉진하며<sup>45</sup>, 임파구와 관련된 면역증강 작용이 있어 B-cell의 증식과 유해 nitric oxide 발생을 현저히 감소시키고<sup>46</sup>, 종양부위에 tumor infiltrating lymphocyte를 증가시키며, NK세포를 활성화시키고<sup>47</sup>, anti-cell adhesive activity를 증가시키며<sup>48</sup>, apoptosis와 telomerase 활성을 억제함으로써 암세포증식을 억제한다<sup>49</sup>는 보고가 있다.

최근 뇌졸중에 대한 국내외 연구에 의하면 신경세포사멸을 유도하는 경로로 exitotoxicity, oxidative stress 및 apoptosis가 알려져 있다<sup>4</sup>. 그 중 oxidative stress는 apoptosis를 통해 cell death를 유발하는데<sup>50</sup>, 최근 apoptosis가 신경계 질환의 주 사멸 기전으로 생각되고 있다. Apoptosis라고 명명되는 세포사멸 과정 중에는 세포막과 핵 내에 특이한 형태학적인 변화가 동반되는데, 세포막 융기의 돌출(membrane blebbing), apoptosis 소포체(apoptotic body)의 형성, 핵 내에서의 염색사 응축, 핵분절, DNA 분절 등과 같은 변화가 동반된다<sup>51</sup>.

이에 저자는 뇌허혈 손상에 대한 신경세포 보호 효능을 관찰하고자 뇌해마의 조직배양방법을 사용하였다.

Propidium iodide(PI)는 형광발색염료로 세포 활성을 real time imaging으로 보여줄 수 있는 장점을 이용하여 조직배양시 생염색을 위하여 많이 사용된

다. PI의 생염색 과정은, 건강한 세포에는 침투하지 못하나, 여러 가지 요인에 의한 세포 사망시에는 세포막의 손상에 의해 세포내로 침투하여 세포핵에 들어가 DNA에 부착, 형광을 발색하게 되므로 세포사멸을 관찰하거나 정량하는데 많이 사용된다<sup>52,53</sup>.

뇌해마의 장기양조직배양에서 산소와 glucose 박탈에 의한 뇌허혈양 손상을 유발하고 柴胡 물추출액을 처리하여 그 효과를 측정할 때 뇌해마 CA1구역에서 PI에 의하여 염색된 신경세포사멸 면적 및 면적비율에 대하여 柴胡 물추출액 5 $\mu$ g/ml를 처리한 군에서는 약물처리 18시간 후부터 48시간까지, 50  $\mu$ g/ml를 처리한 군에서는 약물처리 6시간 후부터 48시간까지 유의한 신경세포사멸의 감소가 관찰되었으며, 50 $\mu$ g/ml의 고농도에서 효과가 더 우수하였다. 또한 뇌해마 DG구역에서 PI에 의하여 염색된 신경세포사멸 면적 및 면적비율에 대하여 柴胡 물추출액 5 $\mu$ g/ml 및 50 $\mu$ g/ml를 처리한 군에서는 약물처리 6시간 후부터 48시간까지 유의한 신경세포사멸의 감소가 관찰되었으며, 50 $\mu$ g/ml의 고농도에서 효과가 더 우수하였다.

Apoptosis의 과정 중 특징적인 사항은 조직학적으로 세포 내에 응축된 chromatin 덩어리들이 나타나는 것과 생화학적으로 2중 구조의 DNA가 파괴되어 180-200 base의 nucleosome 조각으로 갈라지는 현상(DNA laddering)이 나타나는 것이다. 이러한 신경세포의 apoptosis는 DNA fragmentation을 이용하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling(TUNEL)이라는 방법으로 관찰할 수 있다<sup>34,54</sup>.

뇌해마의 장기양조직배양에서 산소와 glucose 박탈에 의한 뇌허혈양 손상을 가하여 신경세포의 apoptosis를 유발시키고 柴胡 물추출액을 처리하여 그 효능을 관찰할 때 뇌해마 조직의 TUNEL 양성반응 세포 수는 CA1구역에서는 柴胡 물추출액 5 $\mu$ g/ml 및 50 $\mu$ g/ml를 처리한 군에서, DG구역에서는 50 $\mu$ g/ml를 처리한 군에서 유의한 신경세포 apoptosis의 감소가 관찰되었다.

산소와 glucose 박탈에 의한 허혈상태에서 세포

들은 생화학적으로 세포사멸을 나타내는 lactate dehydrogenase(LDH)의 방출이 관찰된다. 또한 신경세포의 apoptosis 후기에는 세포막이 손상되고 세포외 공간으로 세포질 단백질들이 방출되는데, 이것은 이차적인 apoptosis의 유인이 되기도 한다<sup>55</sup>. 조직학적으로 신경세포 사멸의 지표는 PI에 의한 세포핵의 형광염색이나 TUNEL 염색에 의한 관찰방법이 가장 흔히 사용된다. PI의 흡착량은 Fluoro-Jade 등이 신경세포를 조직학적으로 관찰한 결과와 매우 정확한 연관성을 가지고 있으며, 또한 여러 가지 유해인자들을 부여한 실험보고에서 24-48시간 사이의 세포에서 방출되는 LDH 농도와 일치된다는 보고가 있다<sup>34,56</sup>. 이 과정을 이용하여 세포질 효소인 LDH의 세포배양액내 방출량을 정량하여 세포의 apoptosis를 정량적으로 관찰할 수 있는데, 본 실험에서 뇌해마의 장기양조직배양에서 산소와 glucose 박탈에 의한 뇌허혈 손상을 가하여 신경세포의 apoptosis를 유발시키고 배양액 내로 분비된 LDH 농도에 대한 柴胡 물추출액의 효능을 관찰한 바 柴胡 물추출액 50 $\mu$ g/ml를 처리한 군에서만 신경세포사멸의 감소가 인정되었다.

이러한 결과들을 종합해보면 柴胡는 유해 nitric oxide에 대한 신경세포 보호작용과 뇌허혈 손상으로 유발되는 손상부위의 신경세포사멸 및 apoptosis를 억제하며, 아울러 이차적으로 발생하는 손상부위의 염증반응 및 면역반응을 조절하는 작용으로 신경세포 보호효능을 나타내는 것으로 생각된다.

## V. 結 論

柴胡가 뇌해마 조직배양을 이용하여 산소와 glucose를 박탈한 뇌허혈 손상에 대하여 propidium iodide 염색에 의한 신경세포사멸 면적의 변화, TUNEL 양성반응 세포 수의 변화 등을 통하여 뇌허혈 손상에 대한 신경세포 보호효능을 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 뇌해마 CA1구역에서 Propidium iodide에 의하여

염색된 신경세포사멸 면적 및 면적비율에 대하여 柴胡 물추출액 5 $\mu$ g/ml를 처리한 군에서는 약물처리 18시간 후부터 48시간까지, 50 $\mu$ g/ml를 처리한 군에서는 약물처리 6시간 후부터 48시간까지 유의한 신경세포사멸의 감소가 관찰되었으며, 50 $\mu$ g/ml의 고농도에서 효과가 더 우수하였다.

2. 뇌해마 DG구역에서 Propidium iodide에 의하여 염색된 신경세포사멸 면적 및 면적비율에 대하여 柴胡 물추출액 5 $\mu$ g/ml 및 50 $\mu$ g/ml를 처리한 군에서는 약물처리 6시간 후부터 48시간까지 유의한 신경세포사멸의 감소가 관찰되었으며, 50 $\mu$ g/ml의 고농도에서 효과가 더 우수하였다.

3. 뇌해마 조직의 TUNEL 양성반응 세포 수는 CA1 구역에서는 柴胡 물추출액 5 $\mu$ g/ml 및 50 $\mu$ g/ml를 처리한 군에서, DG구역에서는 50 $\mu$ g/ml를 처리한 군에서 유의한 신경세포 apoptosis의 감소가 관찰되었다.

4. 뇌해마 조직배양액내 LDH 농도에 대하여는 柴胡 물추출액 50 $\mu$ g/ml를 처리한 군에서만 신경세포사멸의 감소가 인정되었다.

## 參考文獻

1. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res. 1982;239(1):57-69.
2. Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. Am J. Physiol. 1992;263: 1356-62.
3. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanism of brain injury following ischemia and reperfusion. J. Appl Physiol. 1991; 71:1185-95.
4. 광병주. 신경세포 사멸의 기전: exitotoxicity,

- oxidative stress and apoptosis. 대한 생화학 · 분자생물학회 소식지. 1998;5:47-52.
5. 최은정, 신길조, 이원철. 蘇合香元이 실험적 뇌경색 흰쥐의 국소뇌혈류량 및 경색 면적에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1997;18(1):462-5.
  6. 조규선, 정승현, 신길조, 이원철. 우황청심원이 중대뇌동맥 결찰로 유발된 뇌허혈에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(1):78-89.
  7. 조규선, 이원철, 윤상협. 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄후 大造丸 투여가 대뇌반구 및 시상위축에 미치는 영향. 한방성인병학회지. 1998;4(1):163-75.
  8. 유종삼. 星香正氣散이 흰쥐의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1992.
  9. 김선영, 윤상협, 이원철. 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄후 黃連解毒湯 투여가 대뇌반구 및 시상위축에 미치는 영향. 동국논총. 1998;37:229-46.
  10. 홍천표, 정승현, 박인식, 신길조, 이원철. 防風當歸飲이 중대뇌동맥 폐쇄후 재관류 모델에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000;21(2):319-27.
  11. 오연환, 정승현, 박인식, 신길조, 이원철. 淸肺瀉肝湯이 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(2):161-74.
  12. 정승현, 신길조, 이원철. 六一順氣湯 抽出物이 생쥐의 全腦虛血에 미치는 영향. 동국한의학연구소논문집. 1997;7(2):149-54.
  13. 정완우, 정승현, 박인식, 신길조, 이원철. 祛風至寶丹이 Mongolian Gerbil의 가역성 전뇌허혈에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(2):145-60.
  14. 예경옥, 박치상, 이은주, 송지혜, 김미려, 조정숙, 김영호, 박창국, 양재하. 星香正氣散이 뇌허혈을 유발시킨 백서의 신경전달물질에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000;21(1):116-25.
  15. 원철환, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. 배양 대뇌신경세포의 저당-저산소증 모델에서 牛黃淸心元에 의한 세포사 방지 연구. 대한한의학회지. 2002;23(4):125-49.
  16. 김재우. 배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소 및 저당/저산소증 모델에서 蘇合香元의 세포사 방지 효과에 대한 연구. 동국대학교 대학원. 2001.
  17. 천병태. 厚朴이 흰쥐의 전뇌허혈에 의한 신경세포손상에 미치는 효과. 경희대학교 대학원. 1999.
  18. 김영수. 石菖蒲가 4-vessel occlusion으로 유발된 흰쥐 뇌허혈의 신경세포 손상에 대한 방어효과. 대한본초학회지. 2000;15(2):79-85
  19. 김경훈, 정수현, 김재우, 임형섭, 정승현, 신길조, 이원철, 문일수. 黃芩이 저산소증으로 유발된 대뇌신경세포의 세포사에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2002;23(3):396-404.
  20. 이인환, 임강현, 이종석, 석경호, 안덕균, 박호근, 김호철. 釣鉤藤의 4-VO로 유발한 흰쥐뇌허혈에 대한 신경방어효과. 대한본초학회지. 1999;14(2):97-103
  21. 박태훈. 蟾蜍가 허혈/재관류에 의한 뇌손상에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1999;20(2):196-209.
  22. 박진서. 遠志 뿌리 추출물의 뇌허혈 보호효과와 성분분리에 관한 연구. 동국대학교 대학원. 2001.
  23. 임경남. 南星이 배양한 대뇌신경세포의 저산소증 모델에 미치는 영향. 서울대학교. 제10회 기초의학학술대회. 2002.
  24. Liu Y, Wu H, Ge F. Chemical constituents analysis on anticonvulsive effect of three extracts from radix bupleuri. Zhong Yao Cai. 2002;25(9):635-7.
  25. Sugiyama K, Muteki T, Kano T. The Japanese herbal medicine 'saiko-keishi-to' activates GABAA receptors of rat sensory neurons in culture. Neurosci Lett. 1996;216(3):147-50.
  26. Liao JF, Jan YM, Huang SY, Wang HH, Yu LL, Chen CF. Evaluation with receptor binding assay on the water extracts of ten CNS-active Chinese herbal drugs. Proc Natl Sci Council

- Repub China B. 1995;19(3):151-8.
27. 최삼열, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. PC12 손상 세포 및 전뇌허혈 유발 Gerbil에 대한 시호의 세포보호효과. 대한한의학회지. 2002;23(4): 113-24
  28. Zimmer J, Gahwiler BH. Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. J Comp Neurol. 1984;228:432-46.
  29. Bonde C, Noraberg J, Zimmer J. Nuclear shrinkage and other markers of neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slice cultures. Neurosci Letter, 2002;327:49-52.
  30. Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. Trends Neurosci. 1997;20:471-7.
  31. Noraberg J, Kristensen BW, Zimmer J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. Brain Res Protoc. 1999;3:278-90.
  32. Xu GP, Dave KR, Vivero R, Schmidt-Kastner R, Sick TJ, Porez-Pinzon MA. Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. Brain Res. 2002;952:153-8.
  33. Brana C, Benham C, Sundstrom L. A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. Brain Res Protoc. 2002; 10:109-14.
  34. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol. 1992;119:493-501.
  35. Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis. J Neurosci Methods. 2000;96:147-52.
  36. 한기광, 김성훈, 성락기. 시호에 대한 문헌 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1999;7(2): 1-13.
  37. 송호상, 김호철, 이상인. 시호(柴胡)류의 성분과 효능에 관한 비교연구. 대한본초학회지. 1993; 8(1):58-68.
  38. 채인식. 시호제(柴胡劑)의 임상치료에 대하여. 대한한의학회지. 1963; 1(5):10-3.
  39. 김승모, 왕오호, 박재현. 시호가 총담관결찰및 taurocholate 부가 쥐뇌 간의 MAO활성에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000;21(2): 275-81.
  40. 김연희, 박희수. 시호(柴胡)약침이 CCl<sub>4</sub> 로 유발된 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1998;15(1):343-56.
  41. 최용태. 가토(家兎)의 침자출혈과 시호의 병용에 따른 해열효과에 관한 실험적 연구. 대한한 의학회지. 1977;14(1):22-35.
  42. 손갑호, 정찬길, 김성훈. 상한시호탕류의 병리 변증 임상 및 실험에 대한 문헌적 고찰. 대한한 의학회지. 1994;15(2):445-510.
  43. 박주홍, 이상인. 시호의 추출방법에 따른 성분 비교와 제형변화에 관한 연구. 경희한의대논문집. 1997;20(1):116-26.
  44. Jung DW, Sung CK. Production of antibody against saikosaponin a, an active component of bupleuri radix. Arch Pharm Res. 1998;21(2): 135-9.
  45. Kyo R, Nakahata N, Kodama Y, Nakai Y, Kubo M, Ohizumi Y. Antagonism of saikosaponin-induced prostaglandin E<sub>2</sub> release by baicalein in C6 rat glioma cells. Biol Pharm Bull. 1999; 22(12):1385-7.
  46. Izumi S, Ohno N, Kawakita T, Nomoto K, Yadomae T. Wide range of molecular weight distribution of mitogenic substance(s) in the hot water extract of a Chinese herbal medicine,

- Bupleurum chinense. *Biol Pharm Bull.* 1997; 20(7):759-64.
47. Kok LD, Wong CK, Leung KN, Tsang SF, Fung KP, Choy YM. Activation of the anti-tumor effector cells by Radix bupleuri. *Immunopharmacology.* 1995;30(1):79-87.
  48. Ahn BZ, Yoon YD, Lee YH, Kim BH, Sok DE. Inhibitory effect of bupleuri radix saponins on adhesion of some solid tumor cells and relation to hemolytic action: screening of 232 herbal drugs for anti-cell adhesion. *Planta Med.* 1998; 64(3):220-4.
  49. Cheng YL, Chang WL, Lee SC, Liu YG, Lin HC, Chen CJ, Yen CY, Yu DS, Lin SZ, Harn HJ. Acetone extract of Bupleurum scorzoniferifolium inhibits proliferation of A549 human lung cancer cells via inducing apoptosis and suppressing telomerase activity. *Life Sci.* 2003;73(18):2383-94.
  50. Islekel H, Islekel S, Guner G, Ozdamar N. Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia reperfusion. *Brain Res.* 1999; 843:18-24.
  51. Hussain S, W slikker, Ali SF. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Devl Neurosci* 1995;13:811-7.
  52. Monette R, Small DL, Mealing G, Morley P. A fluorescence confocal assay to asses neuronal viability in brain slices. *Brain Res Protoc.* 1998; 2:99-108.
  53. Wilde GJC, Sundstrom LE, Iannotti F. Propidium iodide in vivo: an early marker of neuronal damage in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 1994;18:223-6.
  54. Love S, Hilton DA. Comparison of methods for the detection of cells in different stages of apoptosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1996;22: 161-2.
  55. Ahlemeyer B, Klumpp S, Krieglstein J. Release of cytochrome c into the extracellular space contributes to neuronal apoptosis induced by staurosporine. *Brain Res.* 2002;934:107-16.
  56. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotkovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* 1995;15: 961-73.