

원 저

배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 牛黃清心元이 유전자 표현에 미치는 영향

박동완, 김완식, 배철환, 정승현, 신길조, 이원철
동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Woohwangcheongsim-won* on Gene Expression in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells

Dong-Wan Park, Wan-Sik Kim, Cheol-hwan Bae, Sung-Hyun Jeong, Gil-Cho Shin, Won-Chul Lee

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

Objectives : The purpose of this investigation is to evaluate the effects of *Woohwangcheongsim-won* (WC) on the in vitro neuronal development and alteration in gene expression in a hypoxia model using cultured rat cortical cells.

Methods : E18 rat cortical cells were grown in a neurobasal medium containing B27 supplement and various concentration of WC. Initial development of growth cone was investigated by phase-contrast microscopy, while dendritic spine formation and synaptogenesis were investigated by immunocytochemistry with SynGAP α (a postsynaptic marker) and synaptophysin (presynaptic marker) antibodies. Alteration in gene expression was analysed by microarray using rat 5K-TwinChips.

Results : WC suppressed the development of growth cones and WC increased the number of dendritic spines at 20 and 50 μ g/mL concentration but there was no statistical significance. Instead, it significantly decreased the number at 100 μ g/mL. The expression of anti-apoptosis gene Bcl2-like 1 (Bcl2l1) increased (Global M=0.46), while Akt1 decreased. Proapoptosis genes Bad and PDCD2 increased. The expression of hemoglobin alpha 1 (probably neuroglobin) increased (Global M=0.93). The expression of antioxidants such as catalase, heme oxygenase (HO), and PRKAG2 gene increased. The expression PKC gene increased. The expression of retinoic acid receptor alpha (RAR α) increased significantly (Global M=1.0).

Conclusions : These data suggest that WC trends to suppress cellular activity slightly in normoxia and increases the expression of apoptosis-, antioxidation-, oxygen capture-related genes in hypoxia, but increases Bcl111 that anti-apoptosis gene, on the other hand increases Bad, PDCD2 that pro-apoptosis genes, too..

Key Words: *Woohwangcheongsim-won* (WC), gene expression, microarray, dendritic spine, delayed neuronal death, hypoxia

서 론

· 접수 : 2004년 7월 23일 · 논문심사 : 2004년 8월 11일
· 채택 : 2004년 8월 22일
· 교신저자 : 윤경선. 경북 경주시 용강동 357 동국대학교 부속
경주한방병원 3내과
(Tel: 054-770-1341, Fax: 054-770-1500, E-mail:
janusun@empal.com)

뇌신경세포의 손상·사망 기전으로는 중심부(core)의 괴사성 신경세포사(necrotic neuronal death)와 주변부(penumbra)의 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)가 있다^{1,2}. 지연성 신경세포사는 허혈성 손상을

받은 주변(penumbra region)이나 특정 부위의 신경세포들이 손상되어 3일에서 1주일 후 사망에 이르게 되는 것으로, apoptosis에 의한 것으로 알려져 있다³⁾.

Apoptosis는 세포의 분해를 위해 세포내의 효소들이 활발하게 관여하는 능동적인 죽음의 기전으로 세포의 비중감소, 염색사의 응축, DNA의 분절 등의 형태학적인 변화를 특징으로 하는데, 이러한 기전의 조절 및 치료에 대한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다⁴⁾.

최근 들어 유전학적 연구 기법들이 개발되면서 질병의 발병과정 중에 일어나는 다양한 요소들의 변화를 동시에 파악하며 이들 변화간의 상관관계에 대한 전체적인 흐름을 파악할 수 있는 실험 기법들이 제시 되었는데, microarray기법은 이러한 방법 중 최근에 부각되고 있는 방법이다^{6,7)}.

牛黃清心元은 中風 中臟腑의 陽閉證에 사용되는

處方으로써⁸⁾ 清熱解毒, 安神開竅의 효능이 있어 고혈압, 허혈성 심장질환, 뇌혈관질환 특히 中風 급성기의 의식장애에 常用되고 있다^{10,11,12,13)}.

뇌허혈과 관련된 牛黃清心元의 실험적 연구로는 홍 등¹⁴⁾의 뇌허혈 발생시 혼수시간의 단축과 무산소 부하시 생존시간의 연장효과, 조 등¹⁵⁾의 뇌허혈로 인한 조직손상의 예방효과와 신경학적 증상의 개선효과, 문¹⁶⁾의 전사활성 촉진작용(transcriptional activating effect)에 의한 eNOS 유전자 발현촉진과 VCAM-1 유전자의 발현억제 효과, 한¹⁷⁾의 흰쥐를 이용한 eNOS, p53 유전자의 발현 증가와 VCAM-1, TNF- α 유전자의 발현 감소를 통한 혈관의 항상성 유지효과, 조 등^{18,19)}의 흰쥐를 이용한 허혈 모델과 배양한 대뇌 신경세포 및 소뇌 신경세포를 이용한 저산소증 모델에서 지연성 신경세포사의 억제효과, 원 등²⁰⁾의 배양한 대

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

Species	Part used	Latin name	Weight (mg/pill)
<i>Dioscorea japonica</i> DECNE	Root	<i>Rhizoma Discoraeae</i> (山藥)	280.0
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH(<i>baked</i>)	Root	<i>Radix Glycyrrhizae</i> (甘草)	200.0
<i>Panax ginseng</i> C.A. MEY.	Root	<i>Radix Ginseng</i> (人蔘)	100.0
<i>Typhae latifolia</i> L(<i>baked</i>)	Pollen	<i>Typhae Pollen</i> (蒲黃)	100.0
<i>Trictium sativum</i> L(<i>baked</i>)	Seed	<i>Massa Medicata Fermentata</i> (神麩)	100.0
<i>Rhinoceros unicornis</i> L.	Cornu	<i>Rhinoceri Cornu</i> (犀角)	80.0
<i>Glycine max</i> MERR(<i>baked</i>)	Seed	<i>Glycine Semen Germinatum</i> (大豆黃卷)	70.0
<i>Cinnamomum cassia</i> PRESL	Cortex	<i>Cortex Cinnamomi</i> (肉桂)	70.0
<i>Equus asinus</i> L(<i>baked</i>)	Gelatin	<i>Asini Gelantium</i> (阿膠)	70.0
<i>Paeonia lactiflora</i> PALL	Root	<i>Radix Paeoniae</i> (白芍藥)	60.0
<i>Liriope platyphylla</i> WANG	Root	<i>Radix Liriopis</i> (麥門冬)	60.0
<i>Scutellaria baicalensis</i> GEORGI	Root	<i>Radix Scutellariae</i> (黃芩)	60.0
<i>Angelica gigas</i> NAKAI	Root	<i>Radix Angelicae</i> (當歸)	60.0
<i>Ledebouriella divaricata</i> HIROE	Root	<i>Radix Ledebouriellae</i> (防風)	60.0
<i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ	Root	<i>Rhizoma Atractylis</i> (白朮)	60.0
<i>Bupleurum falcatum</i> L	Root	<i>Radix Bupleuri</i> (柴胡)	50.0
<i>Platycodon grandiflorum</i> A. DC.	Root	<i>Radix Platycodi</i> (桔梗)	50.0
<i>Prunus armeniaca</i> L	semen	<i>Semen Armeniacae Amarum</i> (杏仁)	50.0
<i>Poria cocos</i> WOLF	Mycelium	<i>Poria</i> (白茯苓)	50.0
<i>Cnidium officinale</i> MAKINO	Root	<i>Rhizoma Cnidii</i> (川芎)	50.0
<i>Bos taurus domestica</i> GMELIN	Gallstone	<i>Calculus Bovis</i> (牛黃)	48.0
<i>Saiga tatarica</i> L	Cornu	<i>Cornu Tataricae</i> (羚羊角)	40.0
<i>Moschus moschiferus</i> L	Resin	<i>Moschus</i> (麝香)	40.0
<i>Dryobalanops aromatica</i> GAERTN. f	Resin	<i>Borneolum</i> (龍腦)	40.0
<i>Ampelopsis japonica</i> MAKINO	Root	<i>Radix Ampelopsis</i> (白蘞)	30.0
<i>Zingiberis officinale</i> ROSC(<i>baked</i>)	Root	<i>Rhizoma Zingiberis</i> (乾薑)	30.0
<i>Zizyphus jujuba</i> MILL	Fruit	<i>Jujubae Fructus</i> (大棗)	230.0
<i>Apis mellifera</i> L.	Mel	(蜂蜜)	1,600.0
Gold	Gold	(金箔)	q.s.
Total			3,750.0

뇌 신경세포의 저당/저산소증 모델에서의 牛黃清心元에 의한 신경세포사 방지 효과 등이 보고된 바 있다. 그러나 지금까지 牛黃清心元이 저산소증에서 신경세포의 전반적인 유전자표현의 변화에 미치는 영향에 대하여는 연구된 바가 없었다.

이에 본 연구에서는 배양한 대뇌 신경세포를 이용하여 牛黃清心元이 초기 성장원뿔(growth cone)의 발달, 가지돌기가지의 생성 및 연결생성에 미치는 영향을 조사하고, 저산소증으로 apoptosis를 유발한 흰쥐의 대뇌신경세포에서 牛黃清心元이 유전자표현에 미치는 영향을 microarray 방법으로 조사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 牛黃清心元은 東醫寶鑑¹⁰⁾에 준하여 동국대학교 한의과대학 부속 경주한방병원에서 조제된 것으로 處方 구성과 함량은 Table I과 같다.

2. 방법

1) 牛黃清心元의 물추출액 제조

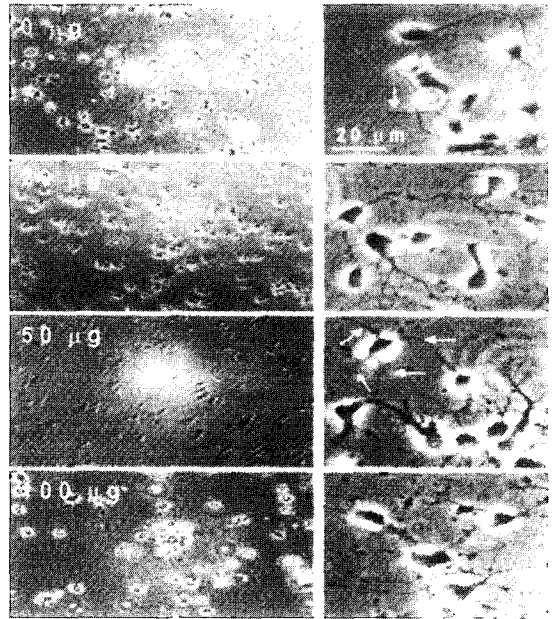
牛黃清心元 1丸(3.75g)을 125mL의 증류수에 넣어 균질화하고 상온에서 4시간, 4°C에서 18시간 혼돈 후, 이를 15,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45µm)한 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의 양은 1mL 추출액 3 튜브를 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

2) 신경세포배양

뇌피질 세포는 임신 18일(embryonic day 18 : E18)의 Sprague-Dawley계 흰쥐에서 분리하여 Brewer 등²¹⁾의 방법에 따라 배양하였다. E18의 흰쥐의 자궁을 가른 후 흰쥐 태아의 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37°C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1mM sodium pyruvate와 10mM HEPES(pH7.4)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. 이후 분산된 세포를 모으고 세포수를 측정 한 다음 약 1,500cells/mm²이 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% CO₂ 배양조에서 배양한 다음 2~3일 간격으로 배양액을 feeding neurobasal media(100mL neurobasal,

A



B

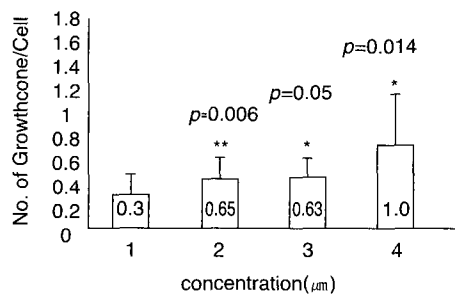
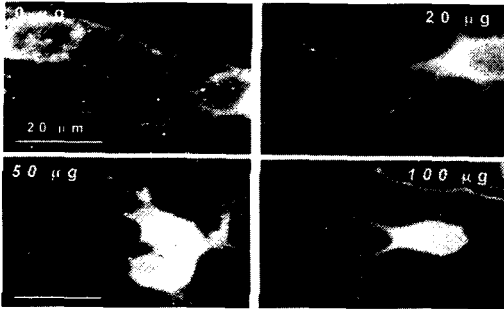


Fig. 1. Effects of WC on the Neurogenesis.

A



B

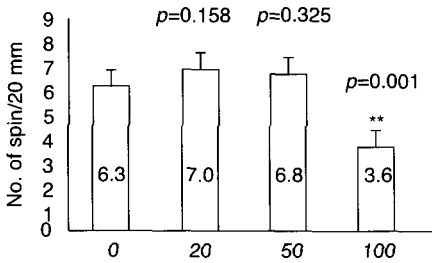


Fig. 2. Effects of WC on Dendritic Spine Formation.

2mL B27 supplement, 0.25mL glutamax I)로 농씩 교환하였다.

3) 牛黃清心元의 처리

배양 12일(12 day *in vitro* : DIV)에 牛黃清心元을 20 μg/mL 농도로 첨가하고 2일 더 배양한 후 각각의 실험을 실시하였다.

4) 저산소증 모델

12 DIV에 약재를 20 μg/mL 농도로 첨가하고, 14 DIV에 CO₂ Water Jacketed Incubator(Forma Scientific Inc.)를 이용하여 2% O₂/5% CO₂ 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

5) RNA 추출

RNA 추출을 위한 배양은 60mm dish를 사용하였다. 저산소증 처리가 끝난 후 24시간 후에 배양액을 제거하고 5~10mL의 ice-cold PBS로 수세하였다. PBS

를 제거하고 용액D[4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate-2H₂O, 0.5%(w/v) sodium lauryl sarcosinate, 0.1M β-mercaptoethanol] 1mL을 각 culture dish에 넣어 세포를 용해하였다. 용해된 lysate를 microfuge tube에 옮기고 tissue homogenizer로 15~30초간 균질화하였다. 여기에 용액D 1mL 당 0.1mL의 2M sodium acetate(pH 4.0), 1mL의 phenol(4℃), 0.2mL의 chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 잘 섞어주었다. Tube를 얼음에 15분간 넣어둔 후 원심분리(10,000 × g, 20분, 4℃)하여 상등액을 취하고 동일부피의 isopropanol을 넣고 잘 섞어주었다. 이를 -20℃에서 2시간 처리한 후 원심분리(10,000 × g, 30분, 4℃)하여 RNA를 침전시키고 용액D에 녹였다. 이를 isopropanol로 한 번 더 침전시킨 다음 75% alcohol로 2회 수세한 후 diethyl pyrocarbonate를 처리한 물에 녹이고 -70℃에 보관하였다.

6) Microarray

Microarray는 Digital Genomics(서울)에 의뢰하여 분석하였다. 약재를 처리하거나(실험군) 처리하지 않고(대조군) 저산소증을 유발한 세포에서 분리한 각각 20~50 μg의 total RNA로부터 oligo(dT) primer와 역전사효소를 이용하여 first cDNA strand를 만들고, 대조군은 Cy3 dye(green)로, 실험군은 Cy5(red)로 표지하였다. 두 probe를 1:1 혼합하여 TwinChip™ Rat-5K(Digital Genomics)을 hybridization(3X SSC, 42℃, 16시간)하고 0.1X SSC로 상온에서 1분씩 4회 수세하였다.

7) 면역세포화학염색

배양용기(24-well plate)를 얼음 위에 올려놓고 배양액을 500 μL의 ice-cold D-PBS(0.1g/L CaCl₂, 0.2g/L KCl, 0.2g/L KH₂PO₄, 0.1g/L MgCl₂-6H₂O, 8.0g/L NaCl, 2.16g/L Na₂HPO₄-7H₂O)로 교환해 주었다. D-PBS를 4℃ methanol(500 μL)로 교환하고 5분 후 -20℃ methanol(500 μL)로 다시 교환한 다음 -20℃에서 20분간 두었다. Methanol을 ice-cold D-PBS(500 μL)로 교환하고 15분 후 preblock solution[0.05% triton, 5% normal goat serum in h-PBS(20mM NaPO₄, pH7.4, 450mM NaCl)]을 넣어 4℃에서 1시간 처리하였다. 1

차 항체(anti-Synaptophysin, 1:2,000, mouse monoclonal; anti-Bcl-xL, 1:2,000, mouse monoclonal; anti-SynGAP α , 1:2,000 rabbit polyclonal) 넣고 4°C에서 1시간 반응시킨 후 실온에서 preblock solution으로 20분씩 3회 세척하였다. 형광물질이 표지된 2차 항체(anti-mouse IgG, Alexa 488-labeled, 1:2,000; anti-rabbit IgG, Alexa 568-labeled, 1:2,000)를 넣고 1시간 더 반응시킨 후, D-PBS로 15분씩 3회 세척하였다. CCD camera(Photo metrics Inc., Germany)가 장착된 형광현미경(Leica Research Microscope DM IRE, Germany)으로 영상을 관찰하고, QFluoro version V1.0b software(Leica Micro systems AG, Wetzlar, Germany)를 이용하여 digital image를 얻었다.

8) 면역염색(immunoblot)

12-well culture dish에 배양한 E₂₀ 대뇌 신경세포를 수확하여 1×SDS-gel loading buffer를 넣고 100°C에서 5분간 처리하였다. 각각 20 μ g의 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 TTBS 용액(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.2% Tween-20, 0.02% Na₂S₂O₃)으로 10분간 세척하고 4°C에서 16~18시간 처리한 후 1차 항체(1:2,000~5,000)를 넣고 2시간 반응시켰다. NC를 TTBS 용액으로 10분씩 4회 세척하고, alkaline phosphatase-conjugated 2차 항체(1:2,000)를 넣어 2시간 반응시킨 후 TTBS 용액으로 10분씩 2회, TBS(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.02% Na₂S₂O₃) 용액으로 2회, alkaline phosphatase 완충용액(100mM Tris, pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂)으로 한번씩 각각 세척하였다. BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate P-toluidine salt) 및 NBT (p-nitro blue tetrazolium chloride)를 넣고 상온에서 발색시킨 후 증류수로 세척하여 발색을 중지시켰다. 정량적 분석은 blot을 scan하여 NIH Scion Image Beta 3b software로 signal density를 측정하였다.

9) 형광유전자의 형질전환

형질전환을 위한 배양은 17,000~20,000 cells/mm²의 밀도로 배양하였다. 11 DIV에 약재(20 μ g/mL)를 배양액에 넣어주고, 13 DIV에 형질전환 직전에 배양액을 약재가 첨가되지 않은 배지 400 μ L로 교체하였다. eGFP를 갖는 pC1 vector(Stratagene Inc.)에 BglII와 HindIII 제한효소 부위에 eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1(eIF4E-BP) full-length를 삽입한 재조합 plasmid(pC1-eGFP:eIF4E-BP1) 0.5~1.0 μ g을 50 μ L의 OptiMEM-I(Invitrogen Life Technology)에 혼합하고, 이를 LIPOFECTAMINE 2000™(Invitrogen Life Technology) 2 μ L를 OptiMEM-I 50 μ L에 혼합한 용액과 섞어주었다. 상온에서 15~20분간 방치한 후 혼합액을 배양액에 넣어주고 16시간 동안 더 배양한 후 저산소증을 유도하고(14 DIV) 정상산소 환경 하에서 계속 배양하였다.

10) 통계처리

통계학적 유의성은 세포 당 성장원뿔의 평균과 세포 20 μ L당 spine 수의 평균을 Mann-Whitney U test로 검증하였다.

결 과

1. 牛黃淸心元이 신경세포의 발달에 미치는 영향

1) 초기 가지돌기(dendrite) 및 성장원뿔(growth cone)의 발달에 미치는 영향

대뇌 신경세포는 배양 시작 후 2시간 정도부터 가지를 내기 시작하며, 24시간 후에는 일반적으로 가지돌기와 축삭(axon)으로 분화된다. 본 연구에서는 牛黃淸心元을 0~100 μ g/mL 농도로 배지에 첨가하여 배양하였다. 배양 24시간 후에 위상차 현미경으로 관찰한 결과 20 및 50 μ g/mL 농도에서는 가지돌기의 수와 모양에는 큰 차이를 보이지 않았지만, 100 μ g/mL 농도에서는 세포의 성장이 위축되고 가지돌기의 수가 줄어들며 사망한 세포도 많이 발견되었다. 특이한 것은 약재의 농도에 비례하여 성장원뿔의 수가 더 많았다. 대조군에서는 대부분의 성장원뿔이 축삭으로 발달하여 평균 0.3개/세포의 성장원뿔이 남아 있었으나, 약재를 처리한 배양에서는 20, 50, 100 μ g/mL의 농도에

Table 2. Apoptosis-related Genes Whose Transcription are Altered by WC in Hypoxia.

Bcl2l1	0.46257	7.68	Bcl2-like 1
Bad	0.43807	9.82	bcl-2 associated death agonist
Pdcd2	0.42273	9.63	programmed cell death 2
Hmox1	0.33043	11.6	Heme oxygenase
Bid3	0.09203	10.3	BH3 interacting domain 3
Tp53	0.06347	11.5	tumor protein p53
P2rx1	0.0284	9.19	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel,
Cycs	0.01377	13.7	cytochrome c, somatic
Ngfr	-0.0356	10.9	nerve growth factor receptor
Akt1	-0.2758	13.1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1

Table 3. Growth and Maintenance-related Genes Which are Up-regulated by WC in Hypoxia. Only Those Genes with Global M Values Above 0.3 and Below -0.3 are Shown.

Hba1	0.9320595	7.60716	hemoglobin, alpha 1
Atp2b2	0.89058	10.09914	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2
Tsc2	0.6898009	8.41381	Tuberous sclerosis 2, (renal carcinoma)
Myh6	0.6857952	11.08529	myosin heavy chain, polypeptide 6
Slc2a4	0.6387075	11.36426	solute carrier family 2, member 4
Rps29	0.5613824	10.07753	Ribosomal protein S29
Vhl	0.4263326	11.50033	von Hippel-Lindau syndrome homolog
Fxyd2	0.4097893	10.04974	FXDY domain-containing ion transport regulator 2
Fxyd1	0.3995305	11.01308	FXDY domain-containing ion transport regulator 1
Rpl29	0.3862235	10.00948	ribosomal protein L29
Nras	0.3540118	11.20524	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
Agm	0.3511968	11.40995	Agtrin
Myh11	0.3357499	11.7563	myosin heavy chain 11
Thy1	0.3291187	10.42389	Thymus cell surface antigen
Plau	0.305283	11.33338	Urinary plasminogen activator, urokinase
Rps8	0.3012152	12.53475	ribosomal protein S8
Mtap6	-0.306623	12.20877	microtubule-associated protein 6
Slc12a1	-0.3128048	11.36637	solute carrier family 12, member 1
Slc4a1	-0.3229718	9.511183	solute carrier family 4, member 1
Cacnb3	-0.3338132	12.73291	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit calcium
Atp2a2	-0.3540521	10.73864	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2
Atp1a1	-0.3593555	12.1429	ATPase, Na+K+ transporting, alpha 1 sodium
Slc1a3	-0.3684065	9.343504	solute carrier family 1, member 3
Polb	-0.3738937	8.902717	DNA polymerase beta
Slc9a1	-0.3822797	10.9797	solute carrier family 9, member 1
Gfra1	-0.3998874	9.347492	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1
Arl4	-0.4130571	11.78839	ADP-ribosylation-like 4
Fth1	-0.4171995	14.37634	ferritin, heavy polypeptide 1
Slc16a1	-0.4367374	10.83212	solute carrier family 16, member 1
Gosr2	-0.4403829	10.18398	golgi SNAP receptor complex member 2
Tmod1	-0.4497602	12.30729	tropomodulin 1
Slc2a1	-0.4563777	9.532973	solute carrier family 2, member 1
Pmp	-0.4608567	12.27503	prion protein
Slc15a2	-0.4746913	11.86463	solute carrier family 15, member 2

서 각각 0.7($p=0.006$), 0.6($p=0.05$), 1.0($p=0.014$)개로서 매우 유의하게 감소하였다. 이 결과는 牛黃淸心元이 신경세포 축삭의 발달을 억제함을 나타낸다.

2) 牛黃淸心元이 신경세포 가지돌기가시(dendritic

spine)의 발달에 미치는 영향

牛黃淸心元이 신경세포의 가지돌기가시의 발달에 미치는 영향을 7 DIV 세포를 가지 돌기가시의 표지 단백질인 SynGAP α 에 대한 항체로 면역세포화학염

Table 4. Response to Stress-related Genes Which are Altered by WC in Hypoxia.

Cat	0.55307	9.9	Catalase
Prkag1	0.43243	12	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit
Hmox1	0.33043	12	Heme oxygenase
Il1b	0.3064	13	Interleukin 1 beta
Cat	0.22262	10	Catalase
Nfkb1	0.12672	13	nuclear factor kappa B p105 subunit
Pap	-0.03893	12	pancreatitis-associated protein
C3	-0.05495	14	Complement component 3
Crp	-0.08539	11	C-reactive protein
Fn1	-0.12354	14	Fibronectin 1
Adm	-0.23348	10	adrenomedullin
Epo	-0.26735	9.9	Erythropoietin
B2m	-0.34466	12	Beta-2-microglobulin
Pla2g1b	-0.57059	8.4	phospholipase A2, group 1B
F2	-0.60976	11	coagulation factor 2

Table 5. Signal Transduction-related Genes Which are Up-regulated by WC in Hypoxia. Only Those Genes with Global M Values Above 0.3 and Below -0.3 are Shown.

Dgkb	1.609434	8.5182	diacylglycerol kinase, beta
Glp1r	0.8593112	8.352	glucagon-like peptide 1 receptor
Tsc2	0.6898009	8.4138	Tuberous sclerosis 2, (renal carcinoma)
Stmn1	0.6084545	9.6167	stathmin 1
Plcg1	0.5751458	10.922	Phospholipase C, gamma 1
Prkcb1	0.4469874	12.056	protein kinase C, beta 1
Limk1	0.4041103	9.9808	LIM motif-containing protein kinase 1
Map2k1	0.4032389	12.549	mitogen activated protein kinase kinase 1
Madh7	0.3896486	8.9859	MAD homolog 7 (Drosophila)
Syk	0.388467	11.886	Spleen tyrosine kinase
Il6r	0.3840055	7.7331	interleukin 6 receptor
Nras	0.3540118	11.205	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
Mbp	0.3340803	12.54	Myelin basic protein
Hmox1	0.3304266	11.578	Heme oxygenase
Prkcz	0.3253824	10.944	protein kinase C, zeta
Plau	0.305283	11.333	Urinary plasminogen activator, urokinase
Gprk2l	-0.331017	11.383	G protein-coupled receptor kinase 2, groucho gene related (Drosophila)
Gfra1	-0.399887	9.3475	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1 TGFbeta
Tac1	-0.42197	9.4644	Tachykinin (substance P, neurokinin A, neuropeptide K, neuropeptide gamma)
Mapk14	-0.428183	10.594	mitogen activated protein kinase 14
Gng7	-0.492515	13.046	guanine nucleotide binding protein, gamma 7
Nrgn	-0.497361	10.935	neurogranin protein kinase cascade1(EAIGO:0007243)RGDlna
Cxcl10	-0.509969	14.366	chemokine (C-X-C motif) ligand 10

색법으로 조사하였다. 7 DIV는 신경세포의 연결생성 (synaptogenesis)이 활발히 일어나는 중간시점인데, 대조군에서는 평균 가지돌기 20µm 당 6.3개의 SynGAP α puncta, 즉 가지돌기가지가 생성되었다. 약제를 20 혹은 50µg/mL를 처리한 경우 평균 7.0(p=0.158) 및 6.8개(p=0.325)로 숫자가 늘어났으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나 100µg/mL의 농도로 약제를 처리한

경우 3.0개(p=0.001)로서 매우 유의한 감소를 보였다. 이 결과는 牛黃清心元이 신경세포의 가지돌기가지의 생성을 억제하는 것을 의미한다.

3) 牛黃清心元이 연결생성에 미치는 영향

牛黃清心元이 연결생성에 미치는 영향을 14 DIV 세포를 SynGAPα 및 synaptophysin(축삭말단에 있는 연결소포막 단백질)에 대한 항체로 이중 염색하여

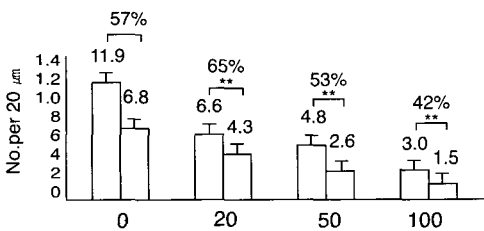
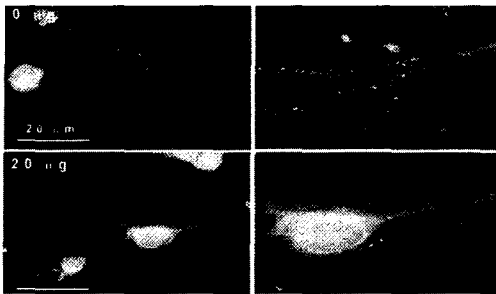


Fig. 3. Effects of WC on Synaptogenesis.

조사하였다. 7 DIV에서와 마찬가지로 100 μ g/mL의 약재 농도에서는 SynGAP α puncta 수가 감소하였지만 50 μ g/mL까지는 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 synaptophysin puncta는 현저히 감소하였는데, 대조군에서는 평균 가지돌기 20 μ m 당 11.9개의 synaptophysin puncta가 생성되었지만, 약재를 20, 50, 100 μ g/mL을 처

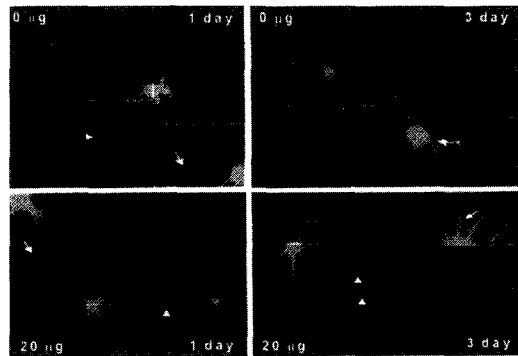


Fig. 4. Direct visualization of the protection of cortical neurons by WC in hypoxia.

리한 경우 각각 평균 6.6, 4.8, 3.0개로 통계적으로 매우 유의하게 감소하였다(Fig. 3B). 또한 가지돌기가서와 연결을 이룬 축삭말단도 약재를 처리하지 않은 대조군은 6.8개였으나, 약재를 20, 50, 100 μ g/mL을 처리한 경우 각각 평균 4.3, 2.6, 1.5개로 통계적으로 매우 유의하게 감소하였다(Fig. 3B). 그리고 synaptophysin puncta 가운데 연결을 이룬 puncta는 20 μ g/mL 농도에서는 약간 증가하였고, 50 μ g/mL 농도에서는 약간 감소하였으며, 100 μ g/mL에서는 현저히 감소하였다. 이 결과는 牛黃清心元이 성장원뿔의 발달을 억제하는 결과와 부합하여 축삭말단의 형성도 현저히 억제함을 나타낸다.

Table 6. Transcription-related Genes Which are Up-regulated by WC in Hypoxia. Only Those Genes with Global M Values Above 0.1 and Below -0.3 are Shown.

Rara	1.02028	8.541	Retinoic acid receptor, alpha
Copeb	0.642835	9.667	core promoter element binding proteina
Nfyb	0.474151	10.01	nuclear transcription factor - Y beta
Vhl	0.426333	11.5	von Hippel-Lindau syndrome homolog
Pdcd2	0.422726	9.626	programmed cell death 2 regulation
Madh7	0.389649	8.986	MAD homolog 7 (Drosophila)
Alrp	0.34849	9.938	ankyrin-like repeat protein
Cebpd	-0.34097	12.67	CCAAT/enhancerbinding, protein (C/EBP) delta
Egr4	-0.46145	10.99	early growth response 4
Nfyc	-0.49273	10.28	nuclear transcription factor-Y gamma
Fosl1	-0.53155	10.68	Fos-like antigen 1
Otx1	-0.55048	10.01	Orthodenticle (Drosophila) homolog 1
Myf6	-0.56312	11.21	myogenic factor 6
Dbp	-0.94817	9.109	D site albumin promoter binding protein
Nr1h2	-1.16486	8.615	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2

2. 저산소증에서 牛黃清心元이 신경세포의 보호효과에 미치는 영향

본 연구에서는 형광단백질(green fluorescence protein, GFP) 유전자에 진핵세포 단백질합성인자 4E(eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E)의 결합단백질인 eIF4E-BP1 유전자를 융합시킨 재조합 plasmid로 13 DIV 대뇌 신경세포를 형질전환(transfection)시켜 세포의 전체구조를 조사할 수 있었다. 신경세포의 형질전환은 그 효율이 낮기 때문에(보통 1~5%), 牛黃清心元(20 μ g/mL)의 존재가 효율에 미치는 영향을 최소한으로 하기 위하여 11 DIV 세포에 2일간만 처리하였다. 13 DIV에 eIF4E-BP1 유전자를 형질전환시켜 16시간 동안 배양하여 유전자표현이 되게 한 후, 저산소증(2% O₂/5% CO₂, 37°C)을 유도하였다. 다시 정상산소환경에서 계속 배양하여 형광현미경으로 관찰하였다(Fig. 4). 저산소증 유발 1일 후에 형광신경세포는 대조군과 실험군의 차이가 없었다. 즉, GFP:eIF4E-BP1 융합단백질이 세포체, 가지돌기 및 축삭에 고루 퍼졌으며, eIF4E-BP1가 가지돌기가지에 많이 존재하는 단백질이기 때문에 그 융합형광단백질도 가지에 많이 위치하였다(Fig. 4, 1 day; arrows). 저산소증 유발 3일 후에는 대조군의 경우에는 많은 형광세포의 가지돌기가 위축되었고 수포가 생성되어 손상을 입은 세포들이 많이 발견되었다(Fig. 4, 0 μ g, 3 day; *표시한 arrow). 그러나 실험군에서는 가지돌기가지와 축삭이 손상을 받지 않은 건강한 세포가 대부분이었다(Fig. 4, 20 μ g, 3 day). 이 결과는 저산소증에서 牛黃清心元이 신경세포의 축삭, 가지돌기 및 가지 돌기가지를 보호하였음을 형태학적으로 직접 보여준다.

3. 牛黃清心元이 저산소증에서 유전자표현에 미치는 영향

牛黃清心元이 어떠한 기전으로 저산소증에서 신경세포를 보호하는지를 알아보기 위하여 microarray 방법을 적용하여 유전자표현에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구에 적용한 모델에서 신경세포는 저산소증 유발 후 1일에는 거의 사망하지 않으나, 3일 후부

터 급격히 사망하기 시작한다. 따라서 저산소증 유발 후 1일경에 많은 유전자가 표현이 달라질 것으로 예상하여 12 DIV에 牛黃清心元 20 μ g/mL을 처리하고 2일 후 14 DIV에 저산소증을 유발하고 15 DIV에 세포로부터 total RNA를 분리하였다. 이때 소량의 RNA를 분석하여 A₂₆₀/A₂₈₀의 값이 1.5이상이고, 28S rRNA/18S rRNA의 값이 2.0이상인 최소로 분해된 RNA만을 사용하였으며, Microarray 전문회사인 Digital Genomics(서울)에 의뢰하여 TwinChip™ Rat-5K microarray chip을 분석하였다. 이때 대조군의 RNA는 Cy3 형광물질(green)로, 실험군은 Cy5 형광물질(red)로 표지하였다. TwinChip의 upper array와 lower array의 형광이미지가 서로 매우 유사한 것을 보아 재현성이 높음을 알 수 있었다. MA plot에서 보면[M=log₂(R/G), A={log₂(R×G)}/2] 대부분의 M 값이 -0.5에서 +0.5 사이로서 40% 정도의 증감을 나타내었다. 이 가운데 Global M 값이 +0.1 이상 즉 7% 이상 표현이 증가한 유전자가 1819종, -0.1 이하 즉 7% 이상 표현이 감소한 유전자가 1836종이었다.

1) apoptosis 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 牛黃清心元에 의하여 표현이 변화되는 유전자는 10가지였다. 이 가운데 8가지는 표현이 증가하였으며, 2가지는 감소하였다(Table II). 이 가운데 Bcl2-like 1(Bcl2l1) 유전자가 가장 많이 증가하였다(Global M=0.46). Bcl2l1은 antiapoptosis 유전자로서²⁰ 그 표현의 증가는 apoptosis의 방지를 의미한다. 그러나 proapoptosis 유전자인 Bad와 programmed cell death-2(PDCD2) 유전자²⁰도 비슷한 정도로 증가하였다. 또한 serine-threonine kinase인 protein kinase B(Akt1) 유전자²⁰의 표현은 감소하였다.

2) 세포의 성장과 유지에 관련된 유전자 표현의 변화

저산소증에서 牛黃清心元에 의하여 37가지의 성장과 유지에 관련된 유전자는 표현이 증가하였으며, 63가지는 감소하였다(Table III). 따라서 전반적으로 저산소증에서 牛黃清心元은 성장과 유지에 관련된 유전자를 더 억제하는 것으로 보인다. 이 가운데 특이한 것은 hemoglobin alpha 1의 증가이며 세포의 성장과 유지에 관련된 유전자 가운데 hemoglobin alpha 1

은 약 2배의 증가(Global M=0.93)를 보였다. 그러나 신경계에서는 neuroglobin(Ngb)이 표현되기 때문에 실험에서 나타난 hemoglobin 유전자는 사실 Ngb으로 해석하는 것이 합당할 것 같다. 따라서 본 연구의 결과에서는 hemoglobin 유전자의 표현이 증가되는 것으로 나타났지만, 아마도 실제 신경세포에서는 Ngb이 증가되었을 것으로 추정된다.

3) 세포주기 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 牛黃清心元에 의하여 5가지의 세포주기 관련 유전자는 표현이 증가하였으며 10가지는 감소하였다. 그러나 Global M 값이 0.28에서 -0.57로서 그 표현변화의 정도가 미약하였다. 이는 신경세포가 세포분열을 하지 않는 세포이기 때문일 것으로 이해된다.

4) 스트레스 반응 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 牛黃清心元에 의하여 6가지의 스트레스 반응 관련 유전자는 표현이 증가하였으며 10가지는 감소하였다(Table IV). 이 가운데 가장 많이 증가하는 것은 catalase 유전자로 나타났다. Catalase는 과산화수소(H₂O₂)를 중화하여 물과 산소로 전환시키는 항산화효소로서 저산소증에서 catalase mRNA가 증가됨이 보고되었다^{25,26}. 또한 heme oxygenase(HO)도 증가되었는데, HO-1은 heme을 biliverdin, iron 그리고 CO로 분해한다²⁷. 한편 Biliverdin은 biliverdin reductase에 의하여 bilirubin이 되는데, biliverdin과 bilirubin은 강한 항산화 활성(antioxidant activity)을 갖기 때문에 저산소증으로 유발된 산화적 손상을 방어할 것으로 보인다^{28,29}. 저산소증에서 牛黃清心元에 의하여 표현이 증가되는 PRKAG2는 5'-AMP-activated protein kinase(AMPK) gamma2 subunit로서, AMPK는 ATP 수위를 조절하는 주요 조절자이며 ATP가 고갈되는 상황에서 세포를 보호한다³⁰. 따라서 저산소증에 기인하는 산화적 손상과 에너지 고갈 상태에서 이를 극복하고자 하는 catalase, HO 및 PRKAG2 유전자들의 표현 증가는 매우 합리적인 것으로 이해된다.

5) 신호전달 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 牛黃清心元에 의하여 24가지의 신호전달 관련 유전자는 표현이 증가하였으며, 25가지는

감소하였다(Table V). 생체 내 일시적 global ischemia 나 in vitro 저산소증에서 glutamate 수용체의 과도한 활성화는 PKC를 비활성화시켜 세포사를 초래한다^{31,32}.

6) 전사(transcription) 관련 유전자 표현의 변화

저산소증에서 牛黃清心元에 의하여 17가지의 전사 관련 유전자는 표현이 증가하였으며, 18가지는 감소하였다(Table VI). 이 가운데 hypoxia, cobalt chloride, 그리고 desferrioxamine에 의하여 그 전사활성이 증가되어 간세포(hepatic cell)의 저산소 스트레스에서 유전자표현을 조절하는 것으로 추정되는³³ retinoic acid receptor alpha(RAR α)가 가장 많이 증가하였다(Global M=1.0)

고 찰

뇌신경세포의 손상·사망 기전은 허혈로 인한 중심에서의 직접적인 괴사성 신경세포사(necrotic neuronal death)와 후기 신경세포사 또는 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)로 불리는 세포사망 기전이 밝혀졌다¹². 지연성 신경세포사는 허혈성 손상의 주변부위(penumbra region)에서 glutamate의 흥분독성, 단백질 합성장애, 열충격 단백질(heat shock protein) 유전자 발현장애, 산소 유리기 생성 등에 의하여 apoptosis 과정으로 일어난다^{3,34}. 이 과정에는 흥분성 아미노산인 glutamate의 과다한 분비가 가장 중요한 역할을 하며³⁵, 이에 의한 ionotropic glutamate 수용체인 AMPA 수용체와 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체의 과다한 활성화가 세포사의 주된 원인이 된다^{3,36,37}.

牛黃清心元은 淸熱瀉火, 解毒, 開竅化痰, 養血生津, 補脾胃, 安神 등의 효능이 있어³⁸, 주로 卒中風으로 인한 不省人事, 痰涎壅塞, 精神昏潰, 言語蹇澀, 口眼喎斜, 半身不遂 등을 치료하는데 활용되고 있다⁹. 牛黃清心元이 저산소증을 유도한 대뇌 신경세포 보호효과가 있음은 이미 보고된 바 있으나²⁰, 저산소증에서 牛黃清心元에 의한 신경세포의 보호를 세포 미세구조적으로 확인한 연구는 없었으므로, 본 연구에서는 microarray 기법을 적용하여 저산소증으로 apoptosis를

유발한 흰쥐의 대뇌신경세포에서 유전자의 표현을 조사하여본 결과 Global M 값이 +0.1이상 즉 7%이상 표현이 증가한 유전자가 1819종, -0.1이하 즉 7%이상 표현이 감소한 유전자가 1836종이었다. 본 연구의 결과는 저산소증에서 牛黃清心元에 의하여 수많은 유전자들의 표현이 변화됨을 보여준다. 그러나 대부분의 경우 Global M 값이 -0.5에서 +0.5 사이로서 약 40% 내외의 증감을 보였다. 이러한 사실은 牛黃清心元에 의하여 많은 유전자들의 표현이 변화하나 그 변화 범위가 크지 않음을 시사한다. 그리고 전반적으로 apoptosis에 관련된 유전자는 표현이 증가하는 것이 많았지만 다른 그룹의 유전자들은 대부분 감소하는 경향을 보였다. 이는 신경세포발달의 초기 성장원뿔의 발달, 가지 돌기가지의 생성, 연접생성에 미치는 牛黃清心元의 영향을 고려할 때 중요한 의미를 갖는 것으로 보인다. 본 세포학적 연구에서 牛黃清心元은 성장원뿔의 발달을 억제하고 연접의 생성도 억제하는 것으로 나타났다. Microarray 결과도 apoptosis와 관련된 유전자들을 제외하고는 대부분 표현을 감소시키는 경향을 보였는데, 전반적으로 세포의 활성을 억제하는 것은 산소와 에너지가 부족한 저산소증에서 세포보호효과가 있을 것으로 추정된다. 저산소증에서 세포보호에 중요한 유전자의 표현 증감을 설명하면 다음과 같다.

Apoptosis 관련 유전자 가운데 Bcl2-like 1(Bcl2l1) 유전자가 가장 많이 증가하였는데(Global M=0.46) 이것은 antiapoptosis 유전자로서²²⁾ 그 표현의 증가는 apoptosis를 방지할 것이다. 그러나 왜 apoptosis를 방지하는 牛黃清心元이 apoptosis 촉진 유전자인 Bad 및 PDCD2 유전자²³⁾의 표현을 증가시키고 apoptosis 억제 유전자인 Akt1 유전자²⁴⁾의 표현을 더 줄이는지는 현재로서는 설명하기 어렵다.

Hemoglobin alpha 1은 약 2배의 증가(Global M=0.93)를 보였는데 globin은 산소운반능력을 갖는 단백질로서 산소를 이용하는 모든 생명체에 중요하다. 현재까지 척추동물에서는 혈액에서 발견되는 hemoglobin, 근육세포에 발견되는 myoglobin, 그리고 신경계에 발견되는 neuroglobin(Ngb) 등 3가지가 보고

되었다. Ngb는 151개의 아미노산으로 구성된 단일 펩티드 단백질로서 hemoglobin 및 myoglobin과 단지 21% 및 25%의 sequence identity를 갖지만 중요한 아미노산은 서로 보존되어 있다²⁵⁾. 최근 Ngb은 주로 대뇌 신경세포에 분포하고 있음이 보고되었다²⁶⁾. 흥미로운 점은 neuronal Ngb의 표현이 저산소증, 대뇌허혈, 그리고 CoCl₂ 및 deferoxamine 등의 처리에 의하여 그 표현이 증가된다는 것이다²⁶⁾. 그리고 신경세포에서 neurotrophic effects를 갖는 heme에 의하여도 그 표현이 증가된다²⁷⁾. 산소운반기능을 갖는 Ngb의 증가는 저산소증에서 신경세포를 보호할 것으로 추정된다.

스트레스 반응 관련 유전자 가운데 catalase는 저산소증에서 생성된 과산화수소를 중화한다. heme oxygenase(HO)는 heme을 biliverdin으로 분해하고 Biliverdin은 biliverdin reductase에 의하여 강한 항산화 활성을 갖는 bilirubin이 된다. 그리고 PRKAG2는 5'-AMP-activated protein kinase(AMPK) gamma2 subunit로서, AMPK는 ATP 수위를 조절하여 ATP가 고갈되는 상황에서 세포를 보호한다³⁰⁾. 따라서 저산소증에 기인하는 산화적 손상과 에너지 고갈 상태에서 이를 극복하고자 하는 catalase, HO 및 PRKAG2 유전자들의 표현증가는 매우 합리적인 것으로 이해된다.

신호전달 관련 유전자 가운데 특이한 것은 PKC 표현의 증가이다. global ischemia나 저산소증에서 glutamate 수용체의 과도한 활성은 PKC를 비활성화시켜 세포사를 초래하는 것으로 알려져 있다^{31,32)}. 따라서 PKC 유전자표현의 증가는 세포를 보호하는 효과가 있을 것으로 추정된다.

전사(transcription) 관련 유전자 가운데는 retinoic acid receptor alpha(RAR α)가 가장 많이 증가하였다. RAR α 는 저산소증에서 표현이 증가되어 저산소 스트레스에서 유전자표현을 조절하는 것으로 추정되는 유전자이다³³⁾. 아직 이 유전자의 기능은 알려져 있지 않지만 저산소증에서 牛黃清心元에 의하여 2배(Global M=1.0) 이상 증가하는 것은 중요한 의미를 가질 것으로 추정된다.

이상의 결과를 요약하면 牛黃清心元은 정상산소 환경에서는 세포의 활성을 약간 억제하는 경향을 보

이고, 저산소증에서는 항산화 및 산소운반에 관여하는 유전자들의 표현을 증가시키고, anti-apoptosis 유전자인 Bcl111은 증가시킨 반면 pro-apoptosis 유전자인 Bad와 PDCD2도 증가시켰다. pro-apoptosis 유전자를 증가시킨 현상은 현재로서는 설명할 수 없지만, 전반적으로 세포의 활성을 억제하고 항산화 및 산소운반 능력을 증가시킴으로써 저산소 환경에서 신경세포가 산화적 손상과 에너지 고갈 상태를 극복하는데 도움을 준 것으로 이해된다.

결론

본 연구에서는 배양한 대뇌 신경세포를 이용하여 牛黃淸心元이 초기 성장원뿔(growth cone)의 발달, 가지 돌기가지의 생성 및 연결생성에 미치는 영향을 조사하고, 저산소증에서 牛黃淸心元이 유전자표현에 미치는 영향을 microarray 방법으로 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 牛黃淸心元은 대뇌신경세포 성장원뿔의 발달을 억제하였다.
- 2) 牛黃淸心元은 20 및 50 μ g/mL의 농도에서는 가지 돌기가지의 생성을 약간 증가시켰으나 통계적 의미는 없었으며, 100 μ g/ml 농도에서는 현저히 억제하였다.
- 3) anti-apoptosis 유전자인 Bcl2-like 1(Bcl211)은 많이 증가하였고 (Global M = 0.46), Akt1은 감소하였으며, proapoptosis 유전자인 Bad, PDCD2도 증가하였다.
- 4) hemoglobin alpha 1은 약 2배의 증가(Global M = 0.93)를 보였다.
- 5) 항산화 관련 catalase, heme oxigenase(HO), PRKAG2는 증가하였다.
- 6) PKC의 표현은 증가되었다.
- 7) retinoic acid receptor alpha(RAR α)의 표현이 크게 (Global M = 1.0) 증가하였다.

참고문헌

1. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982;239(1):57-69.
2. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: Apoptosis pathways. *J. Allergy Clin Immunol.* 2001;108(4 Pt 2):99-103.
3. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol.* 2000;62(3):215-49.
4. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424.
5. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J. Cancer.* 1972;26(4):239-57.
6. Collins FS. Genetics: an explosion of knowledge is transforming clinical practice. *Geriatrics.* 1999;54:41-47.
7. Harrington CA, Rosenow C, Retief F. Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol.* 2000;3:285-91.
8. 김영석. 중풍(뇌졸중). 중풍학술대회논문집. 1995:1-56.
9. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北: 旋風出版社. 1975:3,25,26.
10. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 대성문화사. 1981:171-3.
11. 康命吉. 濟衆新編. 서울: 여강출판사. 1992:44.
12. 윤길영. 동의임상방제학. 서울: 명보출판사. 1985:71, 234.
13. 김동용, 오승환, 안일희, 이연정, 김형균, 이승무, 나성수. 의식장애를 동반한 졸중풍 급성기 환자에서 牛黃淸心元 투여에 관한 고찰, 대한한의학회지. 1994;15(1):203-10.
14. 홍남두, 김남재, 김규섭. 牛黃淸心元이 순환기계에 미치는 영향. 생약학회지. 1988;18(4):241-8.
15. 조태순, 이선미, 이은방, 조성익, 김용기, 신대회, 박대규. 牛黃淸心元의 뇌허혈 및 중추신경계에 대한 약효. 약학회지. 1998;41(6):817-28.
16. Sang-Kwan Moon, Young-Suk Kim, Chang-Nam Ko,

- Hyung-Sup Bae, Ki-Ho Cho, Kyung-Sup Lee. Effect of Uwhangchungsimwon on Expression of Nitric Oxide Synthase and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Human Endothelial Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2003;31(3): 389-402.
17. 한창호. 牛黃清心元이 eNOS, 세포유착분자, TNF- α 및 p53 유전자 발현에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2001.
 18. 조규선, 정승현, 신길조, 이원철. 牛黃清心元이 중대뇌 동맥 결찰로 유발된 뇌허혈에 미치는 영향, 대한한의학회지. 2001;22(1):78-89.
 19. 조규선, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. 牛黃清心元이 저산소증 유발 배양신경세포에 미치는 영향, 대한한방내과학회지. 2001;22(2):135-44.
 20. 원철환, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. 배양 대뇌신경세포의 저당-저산소증모델에서 牛黃清心元에 의한 세포사 방지 연구. 대한한방내과학회지. 2002;23(4): 125-39.
 21. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK and Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*. 1993;35:567-76.
 22. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74:609-19.
 23. Owens GP, Hahn WE, Cohen JJ. Identification of mRNAs associated with programmed cell death in immature thymocytes. *Mol Cell Biol*. 1991;11:4177-88.
 24. Kang JQ, Chong ZZ, Maiese K. Critical role for Akt1 in the modulation of apoptotic phosphatidylserine exposure and microglial activation. *Mol Pharmacol*. 2003 Sep;64(3):557-69.
 25. Martin R, Fitzl G, Mozet C, Martin H, Welt K, Wieland E. Effect of age and hypoxia/reoxygenation on mRNA expression of antioxidative enzymes in rat liver and kidneys. *Exp Gerontol*. 2002 Dec;37(12):1481-7.
 26. Lievre V, Becuwe P, Bianchi A, Bossenmeyer-Pourie C, Koziel V, Franck P, Nicolas MB, Dauca M, Vert P, Daval JL. Intracellular generation of free radicals and modifications of detoxifying enzymes in cultured neurons from the developing rat forebrain in response to transient hypoxia. *Neuroscience*. 2001;105(2):287-97.
 27. Liu Yi, Ortiz de Montellano PR. Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1. *J Biol Chem*. 2000;275:5297-307.
 28. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987;235:1043-6.
 29. Martinez-Cruz F, Pozo D, Osuna C, Espinar A, Marchante C, Guerrero JM. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. *J Neurosci Res*. 2002 Aug 15;69(4):550-8.
 30. Lang T, Yu L, Tu Q, Jiang J, Chen Z, Xin Y, Liu G, Zhao S. Molecular cloning, genomic organization, and mapping of PRKAG2, a heart abundant gamma2 subunit of 5'-AMP-activated protein kinase, to human chromosome 7q36. *Genomics*. 2000 Dec 1;70(2):258-63.
 31. Fujii T, Garcia-Bermejo ML, Bernabo JL, Caamano J, Ohba M, Kuroki T, Li L, Yuspa SH, Kazanietz MG. Involvement of protein kinase C delta (PKCdelta) in phorbol ester-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. Lack of proteolytic cleavage of PKCdelta. *J Biol Chem*. 2000 Mar 17;275(11):7574-82.
 32. Tremblay R, Chakravarthy B, Hewitt K, Tauskela J, Morley P, Atkinson T, Durkin JP. Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals. *J Neurosci*. 2000 Oct 1;20(19):7183-92.
 33. Chauvet C, Bois-Joyeux B, Danan JL. Retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) alpha4 is the predominant isoform of the nuclear receptor RORalpha in the liver and is up-regulated by hypoxia in HepG2 human hepatoma cells. *Biochem J*. 2002 Jun 1;364(Pt 2):449-56.
 34. Tremblay R, Chakravarthy B, Hewitt K, Tauskela J, Morley

- P, Atkinson T, Durkin JP. Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals. *J Neurosci.* 2000;20(19):7183-92.
35. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem.* 1984;43(5):369-74.
36. Felipo V, Minana MD, Grisolia S. Inhibitors of protein kinase C prevent the toxicity of glutamate in primary neuronal cultures. *Brain Res.* 1993;604(1-2):192-6.
37. Durkin JP, Tremblay R, Chakravarthy B, Mealing G, Morley P, Small D, Song D. Evidence that the early loss of membrane protein kinase C is a necessary step in the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J Neurochem.* 1997;68(4):1400-12.
38. 남상경, 이경섭. 牛黃清心元과 소합향원의 효능에 대한 연구. *경희의학.* 1990; 19:220-37.
39. Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature.* 2000;407:520-3.
40. Sun Y, Jin K, Mao XO, Zhu Y, Greenberg DA. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:15306-11.
41. Zhu Y, Sun Y, Jin K, Greenberg D.A. Hemin induces neuroglobin expression in neural cells. *Blood.* 2002 Oct 1;100(7): 2494-8.