

흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 황芩에 의한 신경세포사 저해 효과

김완식¹ · 정승현¹ · 신길조¹ · 문일수² · 이원철^{1*}

¹동국대학교 한의과대학 내과학교실, ²동국대학교 의과대학 해부학교실

Received December 7, 2006 / Accepted January 10, 2007

Inhibition effect of neuronal death by *Scutellaria baicalensis* GEORGI Water-Extract in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells. Wan-Sik Kim¹, Seung-Hyun Jung¹, Gil Jo Shin¹, Il Soo Moon² and Won Chol Lee^{1*}. ¹Dept. of Oriental Medicine, and ²Department of Anatomy, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea. — *Scutellaria baicalensis* GEORGI(SB) is used in oriental medicine for the treatment of incipient strokes. Although it has been reported that SB is neuroprotective in a hypoxia model, its mechanism is poorly understood. Here, we investigated the effect of SB on the modulation of retinoic acid receptor α (RAR α). Rat cerebrocortical cells were grown in neurobasal medium. On DIV12 cells were treated with SB (20 μ g/ml) and given a hypoxic shock (2% O₂/5% CO₂ 3 hr) on DIV14. *In situ* hybridization using cRNA probe revealed that RAR α mRNA punctae are distributed, in addition to nucleus, throughout neuronal dendrites, where SB upregulated its density by 69.8% ($p=0.001$) and 129.8% ($p=0.001$) in both normoxia and hypoxia, respectively. At the protein level, SB upregulated RAR α in the neuronal soma by 78.8% ($p=0.004$) and 23.6% ($p=0.001$) in both normoxia and hypoxia, respectively. These results indicate that SB upregulates RAR α in both normoxia and hypoxia, which might contribute to the neuroprotection.

Key words – rat cortical cell culture, hypoxia, IC, ISH, RAR α , *Scutellaria baicalensis* GEORGI

서 론

일반적으로 신경세포(neuron)는 무산소에 가장 민감한(anoxia-sensitive) 세포로서 뇌졸중(stroke)을 야기하는 허혈·저산소증에 의한 뇌신경세포 손상기전은 신경과학자 및 임상외에게 매우 중요한 관심사이다[2]. 뇌로 공급되는 산소가 심각한 수준으로 저하되면 뇌신경세포는 5분 이내에 ATP의 90% 저하로 인하여[9], 세포막의 흥분[12] 및 Ca²⁺의 세포내 유입, glutamate의 세포 외 유출[29], mitochondria의 막전위(mitochondrial membrane potential) 저하 및 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생성 과잉 등[20,25]을 야기해 세포괴사(necrosis)와 세포자연사(apoptosis)를 유발하게 된다. 그러나 신경세포는 저산소증에 대해 방어능력이 있다[13,26]. 세포내 산소압의 변화에 반응할 수 있는 유전자 프로그램을 갖고 있어, 몸에 공급되는 산소가 부족하면 산화적 스트레스에 대응하기 위해 항산화스트레스 유전자들의 발현을 증가, 적혈구 생성(erythropoiesis)과 혈관신생(angiogenesis)이 촉진된다[10,23]. 해당(glycolysis)과 포도당 수송(glucose transport)에 관여하는 유전자 발현을 증가시켜 포도당의 이용 속도를 증가시켜 ATP 수위를 회복시키는 것으로 알려져 있다[8,31-34]. 신경세포에는 다수의 산소감지자(O₂ sensor)가 있는데 이 가운데 산소에 민감한 Na⁺이온통로와 K⁺이온

통로, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH) 등은 직접 O₂와 접촉하여 신경세포의 흥분성을 조절하게 된다[27]. 결국 신경세포는 산소공급이 저하되면 신경세포막을 통해 이온들의 이동을 조절하고, 에너지 생산 저하에 따른 에너지 소모를 줄이며, hypoxia-inducible factor(HIF)-1과 nuclear factor kappa B(NF κ B) 등의 전사인자(transcription factor)를 활성화시켜 특정 유전자들의 발현을 유도한다[11,28,30].

생약재 황금(黃芩)은 꿀풀과(Labiatae)에 속한 다년생 초본인 황금(*Scutellaria baicalensis* GEORGI)의 뿌리를 박피하여 건조한 것으로 성한(性寒), 미고(味苦), 무독(無毒)한 약물로 양심거열(涼心去熱), 사폐화(瀉肺火), 소담이기(消痰利氣)하여 장열번갈(壯熱煩渴), 습열사리(濕熱瀉痢), 한열왕래(寒熱往來), 풍열두통(風熱頭痛)을 치료한다[39,40]. 대서호탕(大柴胡湯), 황련해독탕(黃連解毒湯), 우황청심원(牛黃清心元) 등은 이러한 황금의 효능을 잘 나타내는 처방이다. 황금의 뇌허혈과 관련된 실험적 연구로는 이 등[21]의 흰쥐 전뇌허혈 모델에서의 신경방어효과, 김 등[16]의 저산소증 모델에서 대뇌신경세포 자연사 방지 및 치료 효과, 김 등[17]의 저산소증 모델의 microarray 결과 catalase, heme oxygenase(HO) 등의 증가 효과,尹 등[38]의 저산소증 모델에서 ROS 생산 저하 및 mitochondria 막전위 유지 등이 보고되고 있다.

Retinoic acid(RA)은 세포의 생존, 분화 및 증식에 중요한 역할을 하며, RA는 유전자 전사인자인 all-trans retinoic acid(RA) receptors(RARs)에 의하여 신호전달이 이루어지고, 세 가지(RAR α , β 및 γ) 아형이 존재한다[5]. RARs는 reti-

*Corresponding author

Tel : +82-31-961-9040, Fax : +82-31-961-9009

E-mail : heart0915@hanmail.net

noid X(9-cis RA) receptors(RXR)와 결합하여 heterodimerization을 함으로서 유전자 전사인자로 작용한다[5,24]. RA는 T cell apoptosis를 강력하게 억제하며[3,36], 척수신경 세포배양에서 생존세포수를 2~3배 증가시키고, 2차 및 3차 가지돌기의 수를 증가시킨다[34,35].

저산소증에서 황금에 의하여 RAR α 의 발현이 된다면 이는 신경세포사를 방지하는데 도움이 될 것으로 예상된다. 이에 본 연구에서는 배양한 흰쥐 대뇌신경세포의 저산소증 모델에서 면역세포화학염색(Immunocytochemistry, IC) 기법과 *in situ* hybridization(ISH) 기법으로 항산화스트레스효소인 HO-1의 발현을 mRNA 및 단백질 수준에서 관찰한 바, RAR α 이 신경세포에서 유의하게 발현이 증가되었다.

재료 및 방법

약재

실험에 사용된 황芩(*Scutellaria baicalensis* GEORGI, SB)은 대한약전 및 대한약전 외 한약 규격주해[32]에 근거하여 동국대학교 경주한방병원에서 구입하였다.

황芩 물추출액 제조

황芩(85.227 mg)에 12.5 ml의 증류수를 넣어 균질화하고 상온에서 4시간, 4°C에서 18시간 혼든 후, 이를 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45 μ m)한 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의 양은 1 ml 추출액 3 튜브를 동결 건조한 후 평균치를 사용하였다.

신경세포 배양

임신 18일(embryonic day 18 : E₁₈)의 Sprague-Dawley계 흰쥐의 대뇌피질신경세포를 Brewer 등[33]의 방법에 따라 배양하였다. 즉, E₁₈의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아를 취하고 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37°C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1 mM sodium pyruvate와 10 mM HEPES (pH 7.4)가 첨가된 HBSS용액(Invitrogen Life Technology) 5 ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1 ml Hank's 용액으로 옮기고 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 이 후 분산된 세포를 모으고 세포수를 측정된 다음 약 1,500cells/mm²되도록 B27을 첨가한 plating neurobasal media (Invitrogen Life Technology)(100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I, 0.1 ml 25 mM glutamate, 0.1 ml 25 mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 5% CO₂ 배양조에서 배양한 다음 2~3일 간격으로 배양액을 feeding neurobasal media(100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I)로 1/3씩 교환하였다.

저산소증 유발

Culture plate를 CO₂ Water Jacketed Incubator(Forma Scientific Inc.)를 이용하여 2% O₂/5% CO₂ 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소 환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

Immunocytochemistry(IC)

1.1. 배양용기(24-well plate)를 얼음 위에 올려놓고 배양액을 500 μ l의 ice-cold D-PBS(0.1 g/L CaCl₂, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L MgCl₂·6H₂O, 8.0 g/L NaCl, 2.16 g/L NaH₂PO₄·7H₂O)로 교환하였다. D-PBS를 4°C methanol(500 μ l)로 교환하고 5분 후 -20°C methanol(500 μ l)로 다시 교환한 다음 -20°C에서 20분간 두었다. Methanol을 ice-cold D-PBS(500 μ l)로 교환하고 15분 후 preblock solution[0.05% triton, 5% normal goat serum in h-PBS(20 mM NaPO₄, pH 7.4, 450 mM NaCl)]을 넣어 4°C에서 1시간 처리하였다. 1차 항체(anti-RAR α rabbit polyclonal, 1:200, Affinity Biotechnology Inc., Golden, CO, USA; anti-PSD95 (postsynaptic density 95) monoclonal, 1:500, Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY)를 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 혹은 anti-rabbit IgG, Alexa 568-labeled, 1:2,000)를 넣고 1시간 더 반응시킨 후, D-PBS로 15분씩 3회 세척하였다.

유전자 cloning

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 기법으로 합성 primer(F: 5'-tgattctgcaatctgca-3'/R: 5'-catggagcctgggatct-3', amino acid 269-344)를 이용하여 RAR α 단백질의 아미노말단에 해당하는 413bp를 증폭하였다. 증폭된 DNA 절편을 pCRII-TOPO transcription vector(Invitrogen Life Science)에 삽입하고, 삽입된 방향을 DNA sequencing으로 확인하였다.

In vitro transcription에 의한 riboprobe의 제조

유전자가 포함된 pCRII-TOPO 재조합 plasmid를 제한효소를 사용하여 선형화하고(insert의 삽입방향과 선형화할 때 사용한 효소는 각각의 해당그림에 표시하였다.) T7(Roche Molecular Biotechnicals, Indianapolis, IN) 혹은 SP6 RNA polymerase(Invitrogen)를 이용하여 *in vitro* transcription하였다. 이 때 digoxigenin(DIG)으로 표지된 UTP (DIG-UTP) (Roche)를 첨가하여 cRNA를 DIG로 표지하였다.

In situ hybridization(ISH)

InnoGenex *in situ* hybridization(ISH) Kit(Komabiotech,

서울)를 이용하여 ISH를 수행하였다. 면역염색이 끝난 세포에 hybridization buffer 100 μ l를 넣고 50°C에서 30분간 처리한 다음, DIG-labeled cRNA를 첨가하고(20 ng/ml) 50°C에서 16~18시간 처리하였다. PBS로 세척 후 biotin-conjugated anti-DIG 항체를 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다. 다시 PBS로 세척한 다음 alkaline phosphatase-conjugated streptavidin을 넣고 실온에서 20분간 반응시킨 후, BCIP/NBT를 넣어 발색시켰다.

이미지 처리 및 signal intensity 측정

염색된 세포를 CCD camera(Photometrics Inc., Germany)가 장착된 형광현미경(Leica Re search Microscope DM IRE, Germany)으로 관찰하고, QFluoro version V1.0b software(Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)를 이용하여 digital image를 획득하였다. IC의 signal intensity를 측정하기 위하여 digital image는 Photoshop 5.0K (Adobe) software를 이용하여 흑백으로 전환(gray scale 0~255)하고 명암을 반전한 다음, NIH Scion Image (version beta 4.02; Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA)로 분석하였다. ISH image의 가지돌기에 형성된 RNA granule의 수를 측정하기 위하여 ISH 흑백 image를 NIH Scion Image software를 이용하여 분석하였다. 이때 gray scale intensity 50을 threshold로 하여 그 이상을 유효 signal로 보았으며, 반점의 크기는 10~100 pixel로 정의하였다.

통계처리

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

결 과

정상산소환경(normoxia)에서 黃芩이 RAR α mRNA 발현에 미치는 영향

黃芩이 apoptosis 억제 단백질인 RAR α 의 mRNA 발현에 미치는 영향을 ISH 기법으로 조사하였다. RAR α 단백질의 아미노산 259~344에 해당하는 유전자 절편 413bp(Fig. 1A)를 PCR 기법으로 증폭한 결과 예상된 크기의 증폭된 DNA를 확인할 수 있었다(Fig. 1, right panel). 이를 transcription vector인 pCII-TOPO의 HindIII/ApaI site에 cloning하고, DNA sequencing으로 확인하였다(Fig. 1B, left panel). Sense cRNA probe를 만들기 위하여 이 재조합 plasmid를 HindIII로 잘라 선형으로 만들고 T7 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription하였다(Fig. 1B, right panel, S). 이때 DIG-UTP를 첨가하여 cRNA를 DIG로 표지하였다. Antisense

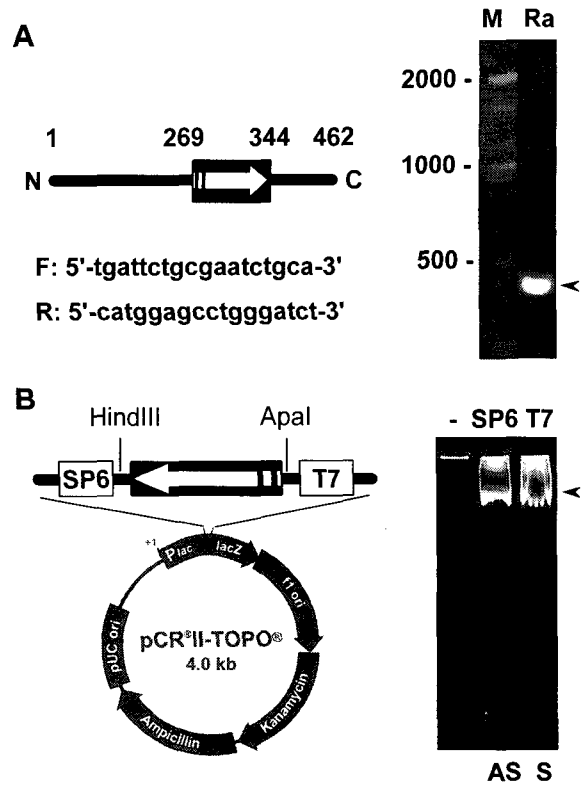


Fig. 1. *In vitro* transcription of RAR α gene. The DNA fragment corresponding to amino acid 269-344 of RAR α protein was amplified by PCR using the primers shown in A. The amplified DNA fragment (arrowhead in the lane Ra in panel A) was subcloned into pCII-TOPO vector (B). The identity and orientation of insertion was confirmed by DNA sequencing. The recombinant DNA was linearized by digestion with HindIII or ApaI, and *in vitro* transcription was performed with T7 or SP6 RNA polymerase, respectively (B). M, DNA size marker in base pairs. Ra, RAR α . AS, antisense. S, sense.

cRNA probe를 만들기 위하여 재조합 plasmid를 ApaI으로 잘라 선형으로 만들고 SP6 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription하였다(Fig. 1B, right panel, AS).

DIV12의 배양세포에 黃芩(20 μ g/ml)을 처리한 후 DIV14에 정상산소 환경에서 RAR α mRNA 발현을 antisense RNA probe를 이용하여 관찰하였다(Fig. 2). RAR α mRNA는 핵, 세포체, 가지돌기에 발현되었다(Fig. 2A). 핵에서의 발현 정도를 densitometer로 측정한 결과 黃芩을 처리한 배양에서 약간 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2B). 가지돌기에서는 RAR α mRNA의 분포가 과립(granule) 형태로 발현되었다. 따라서 가지돌기에 분포하는 mRNA granule의 수를 조사한 결과, 黃芩(20 μ g/ml)을 처리한 시험군에서 RAR α mRNA 과립의 수는 상당히 증가하였다(69.8%, p=0.001)(Fig. 2C).

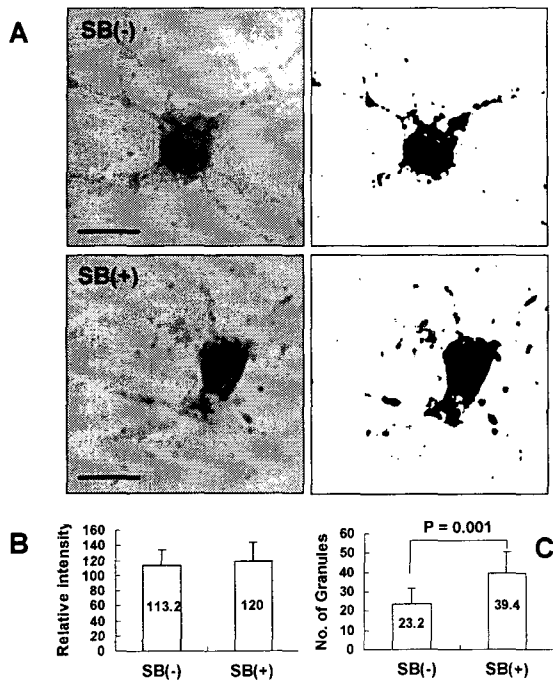


Fig. 2. *In situ* hybridization showing the expression RAR α mRNA in normoxia. SR (20 ug/ml) was added to cortical cultures on DIV 12. On DIV 14, cultures were subjected to ISH with DIG-labeled anti-sense RAR α cRNA (A, left panels). The images were converted into gray 255 scale, the threshold of signal intensity was cut at 50 (A, right panels), and the number of particles (defined as 10-100 pixels) were counted (C). Scale bar, 20 μ m.

저산소증(hypoxia)에서 黄芩이 RAR α mRNA 발현에 미치는 영향

다음으로 저산소증에서 黄芩이 RAR α mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였다. DIV12의 배양세포에 黄芩(20 ug/ml)을 처리한 후 DIV14에 저산소증을 유도하고, 다시 정상산소 환경에서 2시간 더 배양한 후 DIG-labeled antisense RAR α cRNA를 이용하여 ISH 기법으로 관찰하였다(Fig. 3A). mRNA의 표현정도를 densitometer로 측정한 결과 정상산소 환경에서와 마찬가지로 핵에서의 발현 정도는 변화가 없었다(Fig. 3B). 그러나 가지돌기에 형성된 RAR α mRNA 과립의 수는 상당히 증가되었다(129.8%, p=0.001)(Fig. 3C).

정상산소환경(normoxia)에서 黄芩이 RAR α 단백질 발현에 미치는 영향

다음으로 단백질 수준에 黄芩이 정상산소 환경에서 apoptosis 억제에 관여하는 효소인 RAR α 의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. DIV12의 배양세포에 黄芩(20 ug/ml)을 처리한 후 DIV14에 정상산소 환경에서 RAR α 의 발현을 항체를 이용하여 IC 기법으로 관찰하였다(Fig. 4). 이때 PSD95 단

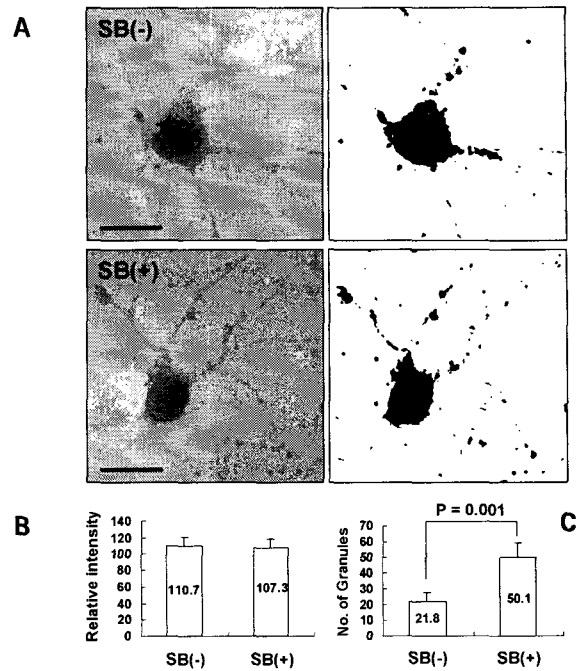


Fig. 3. *In situ* hybridization showing the expression RAR α mRNA in hypoxia. SR (20 ug/ml) was added to cortical cultures on DIV12. On DIV14, cultures were exposed to hypoxia and subjected to ISH with DIG-labeled anti-sense RAR α cRNA (A, left panels). The images were converted into gray 255 scale, the threshold of signal intensity was cut at 50 (A, right panels), and the number of particles (defined as 10-100 pixels) were counted (C). Scale bar, 20 μ m.

백질에 대한 항체를 이중 염색하여 신경세포를 확인하였다. RAR α 는 신경세포의 세포체에서 강하게 발현되었다(Fig. 4A). 발현의 정도를 관찰하고자 RAR α 면역염색 이미지를 흑백으로 전환하고 음양을 반전시킨 후(Fig. 4B), 신경세포 세포체의 신호강도(signal intensity)를 측정할 결과 黄芩으로 처리한 배양에서 상당히 증가하였으며(78.8%, p=0.004) (Fig. 8C), 가지돌기에서도 이에 상응하는 증가가 있었다.

저산소증(hypoxia)에서 黄芩이 RAR α 단백질 발현에 미치는 영향

다음으로 黄芩이 저산소증에서 RAR α 의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. DIV12의 배양세포에 黄芩(20 ug/ml)을 처리한 후 DIV14에 저산소증을 유도하고, 다시 정상산소 환경에서 2시간 더 배양한 후 RAR α 의 발현을 IC 기법으로 항체를 이용하여 관찰하였다(Fig. 5). RAR α 는 정상산소 환경에 비하여 저산소증에서 더 강하게 발현되었는데, 황금을 처리한 시험군에서 더욱 더 많이 발현하였다(Fig. 5A). 정상산소 환경에서와 같은 방법으로 신경세포에서의 발현정도를 측정한 결과 黄芩을 처리한 시험군의 세포체에서 유의하게 증가

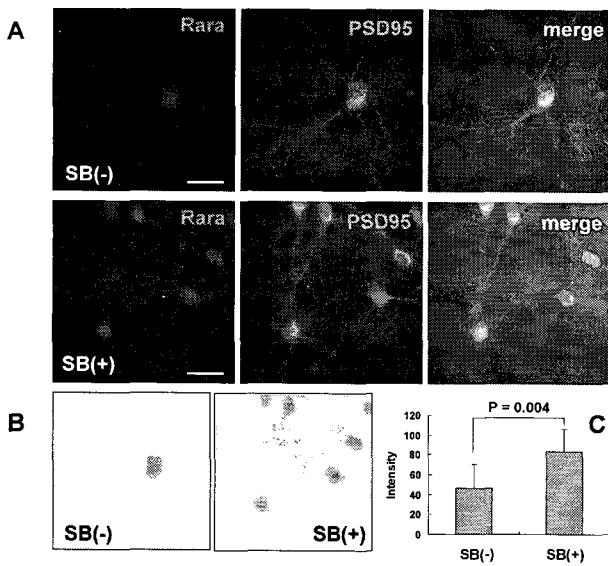


Fig. 4. Immunocytochemistry showing expression of RARα in normoxia. SR (20 ug/ml) was added to cortical cultures on DIV12. On DIV14, cultures were subjected to doublestaining with anti-RARα and anti-PSD95 antibodies which are labeled with Alexa 568 (red) and Alexa 488 (green) fluors, respectively. Separate and merge images are shown in A. The RARα immunocytochemistry images were converted into gray 255 scale, signal was inverted (B), and the signal intensities in the soma was measured (C). Scale bar, 20 um.

하였으며(23.6%, p=0.001)(Fig 9B, Fig. 9C), 가지들기에도 이에 상응하는 증가가 있었다.

고 찰

생약제 黃芩은 꿀풀과(Labiatae)에 속한 다년생 초본인 黃芩(*Scutellaria baicalensis* GEORGI)의 뿌리를 박피하여 건조한 것[41]으로 <東醫寶鑑> [42]에서는 “성한(性寒), 미고(味苦), 무독(無毒)하며 열독(熱毒), 골증(骨蒸), 한열왕래(寒熱往來), 열갈(熱渴), 황달(黃疸), 장벽설리(腸澀泄痢), 담열(痰熱), 위열(胃熱)을 다스린다”고 하였으며 사실화(瀉實火), 계습열(除濕熱), 지혈(止血)의 효능이 있어 풍열(風熱), 습열(濕熱)로 인한 상초질환(上焦疾患)에 사용된다. 또한 담연응성(痰涎壅盛), 졸중(卒中) 등 습담(濕痰), 풍열(風熱)로 인한 중풍 급성기에 다용되는 방풍통성산(防風通聖散), 우황청심원(牛黃清心元), 대시호탕(大柴胡湯)[43], 열다한소탕(熱多寒少湯)[44] 등의 중요 구성 약제이며 약리학적인 효능으로는 항염증작용, 항미생물작용, 해열작용, 강압작용, 신경안정작용 등이 있다 [19,45]. 黃芩에 관한 실험적 연구로 李 등[22]은 黃芩이 면역기능, 미생물 증식 및 세균번이에 미치는 영향을 보고하였다. 특히 李 등[21]은 흰쥐의 전뇌허혈 모델에서 黃芩의 신경방어효과를 보고하였으며, 金 등[16]은 黃芩이 정상산소 환경

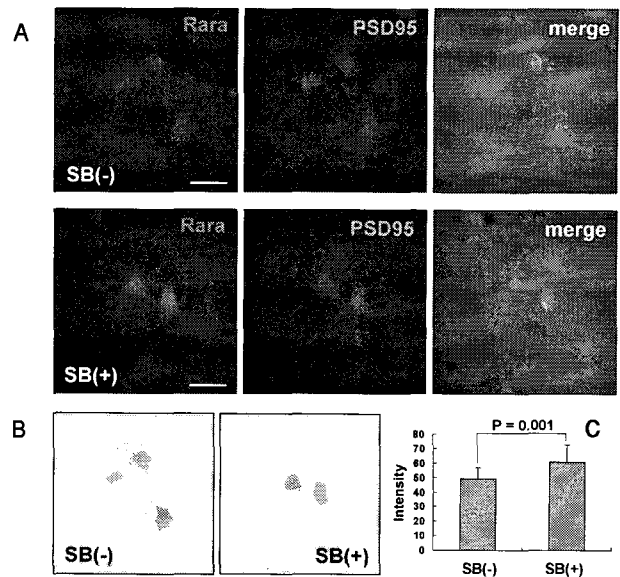


Fig. 5. Immunocytochemistry showing expression of RARα in hypoxia. SR (20 ug/ml) was added to cortical cultures on DIV12. On DIV14, cultures were exposed to hypoxia and subjected to doublestaining with anti-RARα and anti-PSD95 antibodies which are labeled with Alexa 568 (red) and Alexa 488 (green) fluors, respectively. Separate and merge images are shown in A. The RARα immunocytochemistry images were converted into gray 255 scale, signal was inverted (B), and the signal intensities in the soma was measured (C). Scale bar, 20 um.

에서 세포사망 보호효과, 저산소증 모델에서 apoptosis 기전 중 Bcl-2의 발현 증가, caspase-3의 activity 감소에 유효하게 작용하여 뇌졸중 발병 후 발생하는 대뇌신경 세포사에 예방 효과가 있는 것으로 보고하였다.

뇌졸중은 허혈·저산소증에 의한 신경세포사망으로 야기된다. 산소분자는 세포 생존에 필수적 요소로 mitochondria의 에너지 생산과정인 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)에서 전자수용체로 작용한다. 신경세포는 산소결핍에 가장 민감한 세포로 여겨져 왔다[2]. 뇌로 공급되는 산소가 심각한 수준으로 떨어지면 에너지 고갈이 일어나 세포막의 탈분극이 일어나고[12,18] 이로써 Ca²⁺ influx, Na⁺ 농도구배의 소실, 세포의 glutamate 농도의 증가가 야기된다[29]. 이런 손상에 따른 신경세포의 사멸은 팽창과 용해에 의해 즉시 일어나는 과정(necrosis)과, 수 일을 두고 천천히 일어나는 programmed cell death 과정(apoptosis)으로 구분된다.

IC는 항원항체반응의 원리를 이용하여 특정 물질의 세포내 소재를 검색하는 기법으로, 형광항체법(immunofluorescence)은 특이성이 높고 감도가 예민하므로 의학이나 생물학분야에 광범위하게 응용되어 왔다. 한편 PCR 기법과 함께 분자생물학기법 중의 하나인 ISH 기법은 세포나 조직에 존재하

는 특정한 핵산부위를 검출해 낼 수 있는 첨단기법이다. 이는 probe(탐침자)를 이용하여 조직과 세포 내의 특정 mRNA 발현을 조직의 변형없이 관찰할 수 있는 검사방법으로, 염색체나 배양된 세포, 냉동조직 절편이나 파라핀 절편 등을 모두 이용할 수 있다.

본 연구에서는 배양한 흰쥐 대뇌신경세포의 저산소증 모델에서 IC 기법과 ISH 기법으로 RAR α 의 발현을 관찰하여 황색이 세포사 억제에 관여하는 단백질 및 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 황색(20 ug/ml)을 처리한 세포는 RAR α mRNA를 과립형태로 가지돌기에 표현하며, 정상산소 환경 및 저산소증에서 가지돌기에 형성된 과립들의 수가 대조군에 비하여 현저히 증가하였다. 이러한 mRNA의 증가는 단백질 수준에서도 그대로 대변되어 IC 기법으로 조사한 결과 RAR α 단백질이 세포체 및 가지돌기에 시험관에서 상당히 발현이 증가됨을 확인되었다.

Retinoic acid(RA)는 세포의 생존, 분화 및 증식에 중요한 역할을 하며, 유전자 전사인자인 all-trans retinoic acid(RA) receptors(RARs)에 의하여 신호전달이 이루어지고, 세 가지(RAR α , β 및 γ) 아형이 존재한다[5]. RARs는 retinoid X(9-cis RA) receptors(RXR)와 결합하여 heterodimerization을 함으로서 유전자 전사인자로 작용한다[5,24]. RA는 T cell apoptosis를 강력하게 억제하며[3,36], 척수신경세포배양에서 생존세포수를 2~3배 증가시키고, 2차 및 3차 가지돌기의 수를 증가시킨다[34,35]. 그러나 blastocyst 연구에서는 RA에 의하여 apoptosis가 일어남이 보고되었다[15,37]. 이러한 상반된 RA의 기능에 대하여는 그 기전이 잘 알려지지 않고 있다. 최근 Yin 등의 보고[37]는 RA가 세포의 종류와 특정 상태에 따라 어떤 관련 단백질을 유도하느냐에 따라 그 기능이 상반된 결과를 초래할 수 있음을 보여준다. RA는 human acute promyelocytic leukemia(APL) 환자의 blast 및 NB4 APL model에서 TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)을 유도하여 세포사를 초래한다[1,7]. 그러나 Bcl2A1를 외적(ectopic)발현시키거나 RA로 유도하면, TRAIL에 의하여 시작된 apoptosis로부터 PLB985 세포를 보호한다[37]. Bcl2A1은 다양한 종류의 세포와 인자에 의해 유도되는 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다[6]. 흥미롭게도 Bcl2A1를 과발현시키면 TRAIL의 주변분비성 세포사 유도 활성(paracrine death-inducing activity)을 줄인다. 결과적으로 Bcl2A1의 발현은 TRAIL의 효능을 억제함으로써 세포의 생명을 연장(apoptosis 억제)시킨다. 아마도 TRAIL-initiated Bid-mediated mitochondrial death signaling과 Bcl2A1 anti-apoptotic action의 정도의 차이가 세포의 생사를 결정하는 것으로 해석된다.

현재로서는 황금에 의한 RAR α 의 발현증가가 저산소증에서 신경세포에 어떠한 영향을 미치는지는 알 수 없다. 그러나 황금에 의한 흰쥐 전뇌허혈 모델에서의 신경방어효과

[21], 저산소증 모델에서 대뇌신경세포 자연사 방지 및 치료 효과[16], 저산소증 모델에서 ROS 생산 저하 및 mitochondria 막전위 유지[38] 등의 효능으로 볼 때 RAR α 의 표현이 세포사를 방지하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

참고 문헌

- Altucci L., A. Rossin, W. Raffelsberger, A. Reitmair, C. Chomienne and H. Gronemeyer. 2001. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL, *Nature Medicine* 7, 680 - 686.
- Bickler, P. E., P.H. Donohoe. 2002. Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia. *J. Exp Biol.* 205, 3579-3586.
- Bissonnette, R. P., T. Brunner, S. B. Lazarchik, N. J. Yoo, M. F. Boehm, D. R. Green and R. A. Heyman. 1995. 9-cis retinoic acid inhibition of activation-induced apoptosis is mediated via regulation of fas ligand and requires retinoic acid receptor and retinoid X receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5576-5585
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, E. K. Evege and P. J. Price. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35, 567-576.
- Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10, 940-954.
- Cheng Q., H. H. Lee, Y. Li, T. P. Parks and G. Cheng. 2000. Upregulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance, which can be overcome by NF-kappaB inhibition, *Oncogene* 19, 4936 - 4940.
- Clarke N., A. M. Jimenez-Lara, E. Voltz and H. Gronemeyer. 2004. Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL, *EMBO J.* 23, 3051 - 3060.
- Ebert, B. L., J. D. Firth and P. J. Ratcliffe. 1995. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J. Biol. Chem.* 270, 29083-29089
- Erecinska, M. and I. A. Silver. 2001. Tissue oxygenation and brain sensitivity to hypoxia. *Resp Physiol.* 128, 263-276.
- Goldberg, M. A., S. P. Dunning and H. F. Bunn. 1988. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science.* 242, 1412-1415.
- Haddad, J. J. and S. C. Land. 2000. O₂-evoked regulation of HIF-1 α and NF κ B in perinatal lung epithelium requires glutathione biosynthesis. *Am. J. Physiol., Lung Cell Mol. Physiol.* 278, L492-L503.
- Hansen, A. 1985. Extracellular potassium concentration in juvenile and adult brain cortex during anoxia. *Acta Physiol. Scand.* 99, 412-428.
- Hochachka, P. W. and P. Lutz. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 130, 435 -459.
- Huang, F. J., C. C. Shen, S. Y. Chang, T. C. Wu and Y. D.

- Hsuuw. 2003. Retinoic acid decreases the viability of mouse blastocysts *in vitro*. *Hum. Reprod.* **18**, 130-136.
15. Huang, F. J., Y. C. Hsu, H. Y. Kang, S. Y. Chang, Y. D. Hsuuw and K. E. Huang. 2005. Effects of retinoic acid on the inner cell mass in mouse blastocysts. *Fertil Steril*, **83**, 238-242.
 16. Kim, G. H., S. H. Jung, J. W. Kim, H. S. Eom, S. H. Jung, G. J. Shin, W. C. Lee and I. S. Moon. 2003. The effect of *Scutellaria baicalensis* GEORGI Water-Extract in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells. *The Journal of Korean Oriental Internal Medicine*. **3**, 396-405
 17. Kim, S. B., 2003. Effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi on the gene expression in a hypoxic model of cultured rat cortical cells. Dongguk graduate school.
 18. Knickerbocker, D. L. and P. L. Lutz. 2001. Slow ATP loss and the defense of ion homeostasis in the anoxic frog brain. *J. Exp. Biol.* **204**, 3547-3551.
 19. Kriegelstein, J. 1990. Pharmacology and drug therapy of cerebral ischemia. pp347-371. In Schurr, A. and B. M. Rigor (eds), *Cerebral ischemia and resuscitation*, Boca Raton CRC.
 20. Kroemer, G., B. Dallaporta and Resche-Rigon M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Ann. Rev. Physiology.* **60**, 619-642.
 21. Lee, B. C., H. L. Kang, Y. O. Kim, S. Y. Kim, D. K. Ahn, H. K. Park and H. C. Kim. 1999. Neuroprotective Effects of *Scutellariae Radix* on the Brain Ischemia induced by Four - Vessel Occlusion in Rats. *The Korea Association of Herbology* **14**, 89-96.
 22. Lee J. H., S. J. Shin and Y. Moon. 1998. Effect of *Scutellaria baicalensis* Extract on the Immune Functions, Microbial Growth and Mutagenicity. *The Korean Association of Immunobiologists* **20**, 343-348
 23. Levy, A.P., N.S. Levy, S. Wegner and M. A. Goldberg. 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol Chem.* **270**, 13333-13340
 24. Mangelsdorf, D. J., S. A. Kliewer, A. Kakizuka, K. Umesonono and R. M. Evans. 1993. Retinoid receptors. *Recent Prog. Horm. Res.* **48**, 99 - 121.
 25. Nieminen, A. L. 2003. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int Rev Cytol.* **224**, 29-55.
 26. Nilsson, G. E. 2001. Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol Sci.* **16**, 217-221.
 27. Prabhakar, N. R., J. L. Overholt. 2001. Cellular mechanisms of oxygen sensing at the carotid body: heme proteins and ion channels. *Resp. Physiol.* **122**, 209-221.
 28. Prabhaker, N. R. and J. L. Overholt. 2000. Cellular mechanisms of oxygen sensing at the carotid body: heme proteins and ion channels. *Resp. Physiol.* **122**, 209-221.
 29. Rossi, D.J., T. Oshima and D. Attwell. 2000. Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* **403**, 316-321.
 30. Semenza, G. L. 1999. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 551-578.
 31. Semenza, G. L. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin. Genet. Dev.* **8**, 588-594
 32. Semenza, G. L., P. H. Roth, H. M. Fang and G. L. Wang. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **269**, 23757-23763
 33. Semenza, G. L., B. H. Jiang, S. W. Leung, R. Passantino, J. P. Concordet, P. Maire and A. Giallongo. 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **271**, 32529-32537
 34. Wuarin, L. and N. Sidell. 1991. Differential susceptibilities of spinal cord neurons to retinoic acid-induced survival and differentiation. *Dev. Biol.* **144**, 429-435.
 35. Wuarin, L., N. Sidell, J. de Vellis. 1990. Retinoids increase perinatal spinal cord neuronal survival and astroglial differentiation. *Int. J. Dev Neurosci.* **8**, 317-326.
 36. Yang, Y., Ms Vacchio and J. D. Ashwell. 1993. 9-cis-retinoic acid inhibits activation-driven T-cell apoptosis: implications for retinoid X receptor involvement in thymocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 6170-6174.
 37. Yin W., W. Raffelsberger and H. Gronemeyer. 2005. Retinoic acid determines life span of leukemic cells by inducing antagonistic apoptosis-regulatory programs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* Aug;**37(8)**, 1696-708.
 38. Yoon, K. S. 2004. Effects of *Scutellaria baicalensis* GEORGI(黃芩) on the Modulation of ROS, MMP, in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells. Dongguk graduate school.
 39. Lee S. J. 1995. Bon-cho-kang-mok, pp. 580, Daesung Medical press, Seoul.
 40. Wang-Ang. 1989. Bon-cho-bi-yo, pp. 44-45, Komoonsa, Seoul.
 41. Ji H. J., S. I. Lee and D. G. Ann. 1998. Hanyak-Gyugyuk-Juhae, pp. 686-688, Korean medical index com. Seoul.
 42. Heo J. 1999. Dong-Eui-Bo-Gam, pp. 367, 1024, 1937, 1938, Bubinbooks, Seoul.
 43. Hwang D. Y. 1989. Bang Yak Hap Pyun, pp. 120-130, Namsandang, Seoul.
 44. Lee J. M. 1992. Dongyi-Suse-Bowon, Yeogang book publisher.
 45. Kim. H. G. 2000. Pharmacology of Korea, pp. 222-227, Korea medical book publisher.