

## 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 황금(黃芩)에 의한 heme oxygenase-1의 표현증가

이원철 · 김완식 · 신길조 · 문일수<sup>1</sup> · 정승현\*

동국대학교 한의과대학 내과학교실, <sup>1</sup>동국대학교 의과대학 해부학교실

Received April 12, 2007 / Accepted May 14, 2007

**Upregulation of heme oxygenase-1 by *Scutellaria baicalensis* GEORGI Water-Extract in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells.** Won Chol Lee, Wan Sik Kim, Gil Jo Shin, Il Soo Moon<sup>1</sup> and Seung Hyun Jung\*. Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, and <sup>1</sup>Department of Anatomy, College of Medicine, Dongguk University, Gyeongju, 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 heme oxygenase-1 (HO-1), which has important biological roles in regulating mitochondrial heme protein turnover and in protecting against conditions such as hypoxia, neurodegenerative diseases, or sepsis. Rat cerebrocortical day In vitro (DIV)12 cells were grown in neurobasal medium. On DIV12 cells were treated with SB (20 µg/ml) and given a hypoxic shock (2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 3 hr) on DIV14. *In situ* hybridization results revealed that SB upregulated HO-1 mRNA in neuronal dendrites in both normoxia and hypoxia (38.5% and 59.2%, respectively). At the protein level, SB upregulated HO-1 in the neuronal soma in both normoxia and hypoxia (22.4% and 15.7%, respectively). Interestingly, most significant increase was associated with astrocytes, which increased HO-1 protein by 77.5% compared to SB-untreated culture. These results indicate that SB upregulates both neuronal and glial HO-1 expression, which contributes to the neuroprotection efficacy in hypoxia).

**Key words** – rat cortical cell culture, heme oxygenase, hypoxia, *Scutellaria baicalensis* GEORGI

### 서 론

뇌졸중 (stroke) 을 야기하는 허혈 · 저산소증에 의한 뇌신경세포 손상기전은 신경과학자 및 임상외에게 매우 중요한 관심사이다. 일반적으로 신경세포는 무산소에 가장 민감한 (anoxia-sensitive) 세포이다[2]. 뇌로 공급되는 산소가 심각한 수준으로 저하되면 신경세포는 5분 이내에 ATP의 90%가 저하되며[10], 이는 세포막의 탈분극 (depolarization)[18] 및 Ca<sup>2+</sup>의 세포내 유입, glutamate의 세포 외 유출[40], mitochondria의 막전위 저하 및 활성산소 (reactive oxygen species, ROS) 생성 과잉 등[26,34]을 야기해 세포괴사와 세포자연사를 유발하게 된다.

그러나 신경세포가 저산소증에 대해 전혀 방어능력이 없는 것은 아니다[19,36]. 동물세포는 세포내 산소압의 변화에 반응할 수 있는 유전자 프로그램을 갖고 있어, 몸에 공급되는 산소가 부족하면 산화적 스트레스에 대응하기 위해 항산화스트레스 유전자들의 발현을 증가시키며, 적혈구 생성 (erythropoiesis)과 혈관신생 (angiogenesis)이 촉진된다[16,32]. 또한 줄어든 ATP 생성을 만회하기 위하여 해당 (glycolysis)과 포도당 수송 (glucose transport)에 관여하는

유전자 발현을 증가시켜 포도당 이용 속도를 증가시킨다[9,43-45]. 신경세포에는 다수의 산소감지자 (O<sub>2</sub> sensor)가 있는데 이 가운데 산소에 민감한 Na<sup>+</sup>이온통로와 K<sup>+</sup>이온통로, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 등은 직접 O<sub>2</sub>와 접촉하여 신경세포의 흥분성을 조절하게 된다[39]. 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 (NFκB) 등의 전사인자(transcription factor)를 활성화시켜 특정 유전자들의 발현을 유도한다[17, 38,46]. HIF-1은 저산소증에서 활성화되어 저하된 산소에 적응하는데 필요한 vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin (EPO), 해당효소 (glycolytic enzymes), 포도당 수송단백질(glucose transporters), 세포주기조절단백질(cell cycle regulators), transferrin, heme oxygenase-1 (HO-1), 그리고 inducible nitric oxidative synthase (iNOS) 등의 표현을 유도한다[6,15,41].

HO-1은 Hsp32로도 알려진 세포보호단백질로서 저산소증 및 허혈에서 활성화되며[7,20], 저산소/허혈, 대뇌경색(cerebral infarction) 그리고 외상성뇌손상 (traumatic brain injury)에서 표현이 증가된다[1,7]. 그리고 허혈에서 HO-1과 다른 heat shock protein (HSP) 단백질들이 신경세포 및 신경교세포에서 빠른 속도로 표현증가가 일어남이 보고되었다[8]. 반면에

#### \*Corresponding author

Tel : +82-54-770-1253, Fax : +82-54-770-1500

E-mail : omdjeong@hanmail.net

HO-2는 constitutive form으로서 증가하지 않는다[7]. Heme oxygenase는 cytochrome pathway를 통하여 철분대사(iron metabolism)에 기능을 한다[42]. HO는 heme을 biliverdin, carbon monoxide (CO) 및 iron으로 분해하는데[34], CO는 강력한 혈관확장제이며, biliverdin과 그 산물인 bilirubin은 강력한 항산화제이다[47]. 따라서 저산소증에서 HO의 증가는 신경세포의 보호에 도움을 줄 것으로 해석된다.

황금(黃芩)은 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 치료하며[51,52], 중풍 치료에 사용되는 대시호탕(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[29]의 흰쥐 전뇌허혈 모델에서의 신경방어효과, 김 등[22]의 저산소증 모델에서 대뇌신경세포 자연사 방지 및 치료 효과, 김 등[23]의 저산소증 모델의 microarray 결과 catalase, HO 등의 증가 보고,尹 등[50]의 저산소증 모델에서 ROS 생산 저하 및 mitochondria 막전위 유지 등이 있다.

저산소증에서 황금에 의하여 HO의 표현이 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, HO-1이 신경세포 및 별아교세포에서 유의하게 표현이 증가되었다.

## 재료 및 방법

### 약재

실험에 사용된 황금(*Scutellaria baicalensis* GEORGI, SB)은 대한약전 및 대한약전 외 한약 규격주해[52]에 근거하여 동국대학교 경주한방병원에서 구입하였다.

### 황금 물추출액 제조

황금(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 µm)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-Dawley*계 흰쥐의 대뇌피질신경세포를 Brewer 등[3]의 방법에 따라 배양하였다. 즉, E18의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5

분간 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, Carlsbad, CA, USA) 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 측정하여 다음 약 1,500 cells/mm<sup>2</sup> 되도록 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% CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator (Forma Scientific Inc., Marietta OHIO, USA)를 이용하여 2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소 환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

### Immunocytochemistry

배양용기(24-well plate)를 얼음 위에 올려놓고 배양액을 500 µl의 ice-cold D-PBS (phosphate-buffered saline) (0.1 g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 g/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 8.0 g/L NaCl, 2.16 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)로 교환하였다. D-PBS를 4°C methanol (500 µl)로 교환하고 5분 후 -20°C methanol (500 µl)로 다시 교환한 다음 -20°C에서 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 (20 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 450 mM NaCl)]을 넣어 4°C에서 1시간 처리하였다. 1차 항체(anti-HO-1 rabbit polyclonal, 1:200, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA; anti-PSD95(postsynaptic density 95) monoclonal, 1:500, Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA)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) 기법

으로 합성 primer (FW 5'-atggagcgtccacagcc-3' ; R: 5'-gccttctgtgcaatcttc-3')를 이용하여 HO-1 단백질의 아미노말단에 해당하는 461bp를 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 Biotechemicals, 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**

InnoGenex in situ hybridization Kit(Komabiotech, 서울)를 이용하여 ISH를 수행하였다. 면역염색이 끝난 세포에 hybridization buffer 100 µl를 넣고 50°C에서 30분간 처리한 다음, DIG-labeled cRNA를 첨가하고(200ng/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, MD, 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 황금이 HO-1 mRNA 발현에 미치는 영향**

황금이 ROS 제거에 관여하는 효소인 HO-1의 mRNA 발현에 미치는 영향을 ISH 기법으로 조사하였다. HO-1 단백질의 아미노말단에 해당하는 유전자 부위(461bp)를 PCR 기법으로 증폭하고(Fig. 1A), transcription vector인 pCRII-TOPO에 cloning하였다(Fig. 1B). Sense cRNA probe를 만들기 위하여 이 재조합 plasmid를 BamHI으로 잘라 선형으로 만들고 T7 RNA polymerase를 이용하여 in vitro transcription하였다(Fig. 1B, right panel). 이때 DIG-UTP를 첨가하여 cRNA를 DIG로 표지하였다. Anti-sense cRNA probe를 만들기 위하여 이 재조합 plasmid를 EcoRV로 잘라 선형으로 만들고 SP6 RNA polymerase를 이용하여 in vitro transcription하였다(Fig. 1B, right panel).

DIV12의 배양세포에 황금(20 µg/ml)을 처리한 후 DIV14에 정상산소 환경에서 HO-1 mRNA 발현을 anti-sense RNA

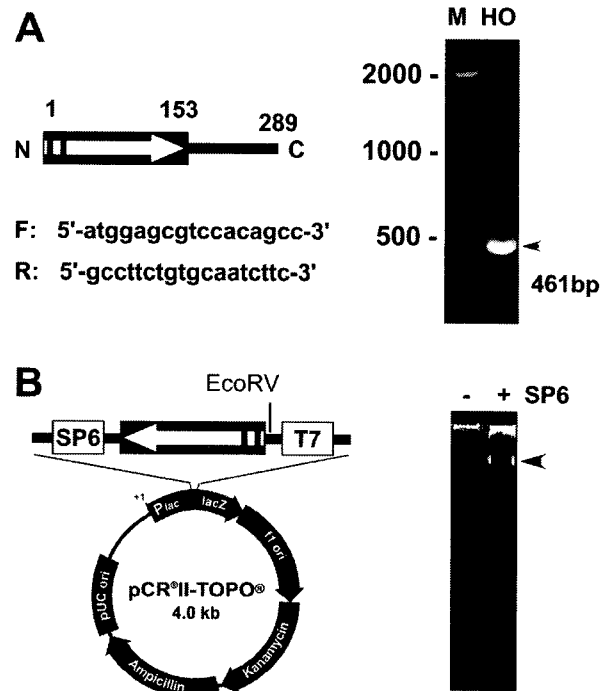


Fig. 1. In vitro transcription of the HO-1 gene. The DNA fragment (461bp, N-terminal 153 amino acids) was amplified by PCR using the primers shown in A. The amplified DNA fragment (arrowhead in the lane HO in panel A) was subcloned into pCII-TOPO vector (B). The identity and orientation of insertion was confirmed by DNA sequencing. The recombinant DNA was linearized by digestion with EcoRV, and in vitro transcription was performed with SP6 RNA polymerase to make anti-sense cRNA (B). M, DNA size marker in base pairs.

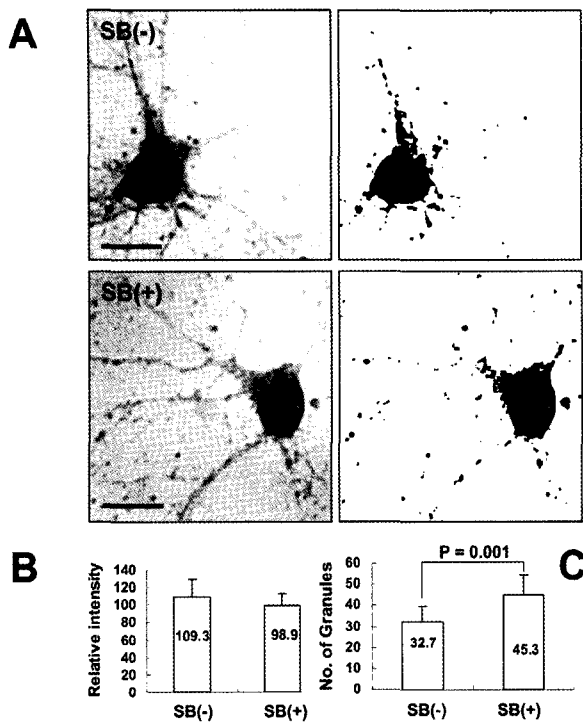


Fig. 2. *In situ* hybridization showing the expression HO-1 mRNA in normoxia SR (20  $\mu$ g/ml) was added to cortical cultures on DIV12. On DIV14, cultures were subjected to ISH with DIG-labeled anti-sense HO-1 cRNA (A, left panels). The images were converted into gray 255 scale, the threshold of signal intensity was cut at 50 (A, right panels), and the number of particles (defined as 10-100 pixels) were counted (C). Scale bar, 20  $\mu$ m.

probe를 이용하여 관찰하였다(Fig. 2). HO-1 mRNA는 핵, 세포체, 가지돌기에 발현되었다(Fig. 2A, left panels). 핵에서의 발현 정도를 densitometer로 측정된 결과 황금을 처리한 배양에서 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2B). 그러나 가지돌기에 형성된 HO-1 mRNA 과립의 수는 유의하게 증가하였다(38.5%,  $P = 0.001$ )(Fig. 2C).

**저산소증(hypoxia)에서 황금이 HO-1 mRNA 발현에 미치는 영향**

다음으로 황금이 저산소증에서 HO-1 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였다. DIV12의 배양세포에 황금(20  $\mu$ g/ml)을 처리한 후 DIV14에 저산소증을 유도하고, 다시 정상산소 환경에서 2시간 더 배양한 후 DIG-labeled anti-sense HO-1 cRNA를 이용하여 ISH 기법으로 관찰하였다(Fig. 3). 핵에서의 발현 정도를 densitometer로 측정된 결과 황금을 처리한 배양에서 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3B). 그러나 가지돌기에 형성된 HO-1 mRNA 과립의 수는 상당히 증가되었다(59.2%,  $P = 0.001$ )(Fig. 3C).

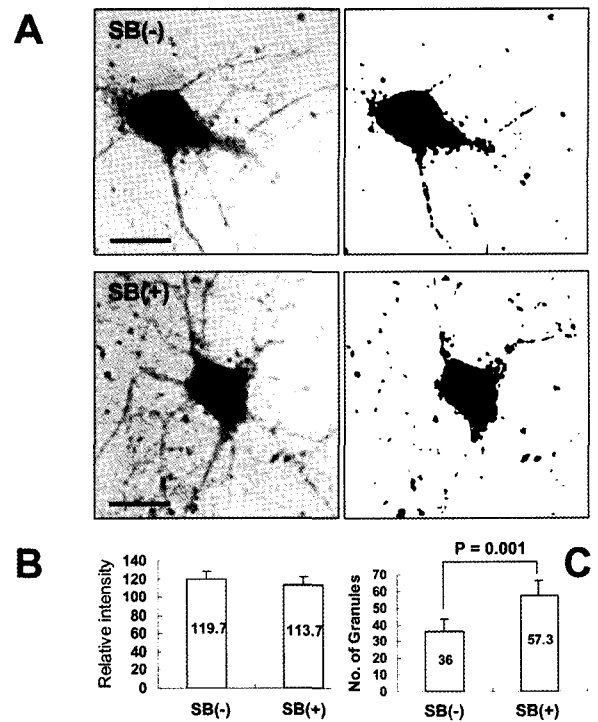


Fig. 3. *In situ* hybridization showing the expression HO-1 mRNA in hypoxia. SR(20  $\mu$ g/ml) was added to cortical cultures on DIV12. On DIV14, cultures were exposed to hypoxia (2% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 3 hr) and subjected to ISH with DIG-labeled antisense HO-1 cRNA (A, left panels). The 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  $\mu$ m.

**정상산소환경(normoxia)에서 황금이 HO-1 단백질 발현에 미치는 영향**

황금이 정상산소 환경에서 ROS 제거에 관여하는 효소인 HO-1의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. DIV12의 배양세포에 황금(20  $\mu$ g/ml)을 처리한 후 DIV14에 정상산소 환경에서 HO-1의 발현을 항체를 이용하여 IC 기법으로 관찰하였다(Fig. 4). 이때 PSD95 단백질에 대한 항체를 이중염색하여 신경세포를 확인하였다. HO-1은 신경세포의 핵에서는 강하게 발현되었으나 세포체에서는 약했으며, 가지돌기에서는 더 약하게 발현되었다. 반면에 PSD95를 발현하지 않고, 형태적으로 별아교세포(astrocyte)로 보이는 세포에서는 강하게 발현되었다(Fig. 4A). 발현의 정도를 관찰하고자 HO-1 면역염색 이미지를 흑백으로 전환하고 음양을 반전시킨 후(Fig. 4B) 신경세포의 핵과 세포체의 신호강도(signal intensity)를 측정하였다. 그 결과 HO-1은 신경세포의 핵에서는 황금에 의한 발현 변화가 거의 없었으나 세포체에서는 유의하게 증가하였다(22.4%,  $P = 0.005$ )(Fig. 4C).

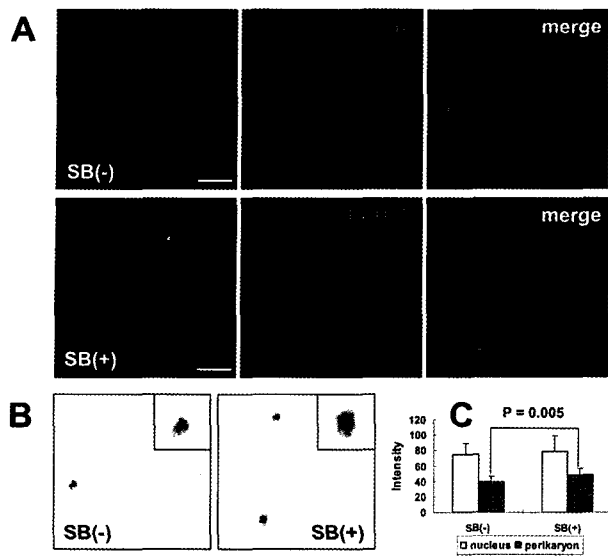


Fig. 4. Immunocytochemistry showing expression of HO-1 in normoxia. SR(20  $\mu\text{g/ml}$ ) was added to cortical cultures on DIV12. On DIV14, cultures were subjected to double-staining with anti-HO and anti-PSD95 antibodies which are labeled with Alexa 568 (red) and Alexa 488 (green) fluors, respectively. Separate and merge images are shown in A. The HO-1 immunocytochemistry images were converted into gray 255 scale, signal was inverted (B), and the signal intensities in the nuclei and perikarya were measured separately (C). Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ .

**저산소증(hypoxia)에서 황금이 HO-1 단백질 발현에 미치는 영향**

다음으로 황금이 저산소증에서 HO-1의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. DIV12의 배양세포에 황금(20  $\mu\text{g/ml}$ )을 처리한 후 DIV14에 저산소증(5%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ , 37°C, 3 hrs)을 유도하고, 다시 정상산소 환경에서 2시간 더 배양한 후 HO-1의 발현을 항체를 이용하여 IC 기법으로 관찰하였다(Fig. 5). HO-1은 정상산소 환경에 비하여 저산소증에서 더 강하게 발현되었으며, 특히 별아교세포로 보이는 신경교세포에 더욱 강하게 발현되었다(Fig. 5A, a). 정상산소 환경에서와 같은 방법으로 신경세포와 신경교세포에서의 발현 정도를 측정 한 결과 신경세포(15.7%,  $P = 0.048$ ), 신경교세포(77.5%,  $P = 0.001$ ) 모두에서 황금을 처리한 배양에서 유의하게 증가하였다(Fig. 5B, Fig. 5C).

**고찰**

생약제 황금은 꿀풀과(Labiatae)에 속한 다년생 초본인 황금(*Scutellaria baicalensis* GEORGI)의 뿌리를 剝皮하여 건조한 것[34]으로 <東醫寶鑑> [55]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

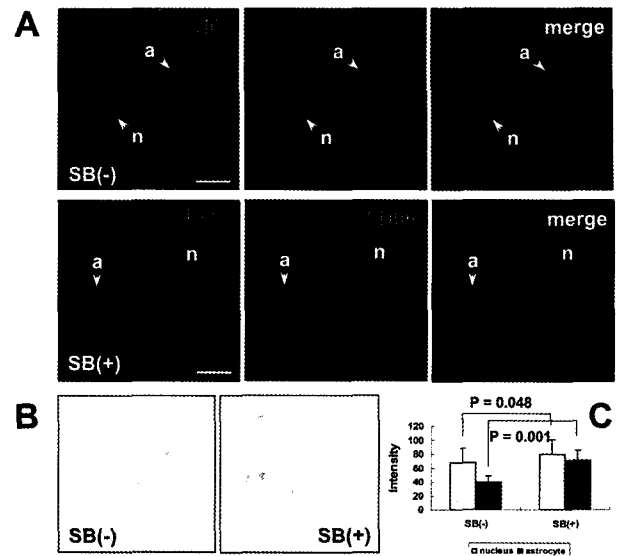


Fig. 5. Immunocytochemistry showing expression of HO-1 in hypoxia. SR(20  $\mu\text{g/ml}$ ) was added to cortical cultures on DIV12. On DIV14, cultures were exposed to hypoxia (2%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ , 3 hr) and subjected to doublestaining with anti-HO and anti-PSD95 antibodies which are labeled with Alexa 568 (red) and Alexa 488 (green) fluors, respectively. Separate and merge images are shown in A. The HO-1 immunocytochemistry images were converted into gray 255 scale, signal was inverted (B), and the signal intensities in the soma and dendrites were measured separately (C). Neurons and astrocytes were marked by arrowheads with a and n, respectively. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ .

(胃熱)을 다스린다”고 하였으며 사실화(瀉實火), 제습열(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(中風) 급성기에 다용되는 방풍통성산(防風通聖散), 우황청심원(牛黃清心元), 대시호탕(大柴胡湯)[56], 열다한소탕(熱多寒少湯)[57] 등의 중요 구성 약재이며 약리학적인 효능으로는 항염증작용, 항미생물작용, 해열작용, 강압작용, 신경안정작용 등이 있다 [24,56]. 황금에 관한 실험적 연구로 이 등[30]은 황금이 면역 기능, 미생물 증식 및 세균번식에 미치는 영향을, 김[24]은 황금의 혈관이완효과에 관한 연구를, 박 등[37]은 ROS의 유해 작용에 대한 황금 성분의 생체 보호작용에 관한 연구 등을 보고하였다. 특히 이 등[28]은 흰쥐의 전뇌허혈 모델에서 황금의 신경방어효과를 보고하였으며, 김 등[22]은 황금이 정상 산소 환경에서 세포사망 보호효과, 저산소증 모델에서 apoptosis 기전 중 Bcl-2의 발현 증가, caspase-3의 activity 감소에 유효하게 작용하여 뇌졸중 발병 후 발생하는 대뇌신경 세포 사에 예방 효과가 있는 것으로 보고하였다.

뇌졸중은 허혈·저산소증에 의한 신경세포사망으로 야기

된다. 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[18,24] 이로써  $Ca^{2+}$  influx,  $Na^+$  농도구배의 소실, 세포외 glutamate 농도의 증가가 야기된다[40]. 이런 손상에 따른 신경세포의 사망은 팽창과 용해에 의해 즉시 일어나는 과정(necrosis)과, 수 일을 두고 천천히 일어나는 programmed cell death 과정(apoptosis)으로 구분된다.

저산소증에서는 특히 ROS가 많이 생성된다. 인체 내 가장 큰 영향을 미치는 자유기인 ROS는 생체 내 산소가 유입되어 세포내에서 이용될 때의 부산물[11], superoxide radical ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), nitric oxide (NO), peroxynitrite (ONOO) 등이 있다[5]. 이들은 세포 내에 존재하는 Super Oxide Dismutase(SOD), catalase, 여러 종류의 peroxidase 등의 항산화효소계와 vitamin E, vitamin C, glutathione과 같은 항산화물질에 의해 제거된다[49,51]. 허혈·저산소증의 재산소화 기간에 nitric oxide (NO)와 superoxide anion ( $O_2^-$ )은 서로 반응하여 매우 반응성이 높은 peroxynitrite (ONOO)를 형성하는데[12], 이 ROS는 신경세포에 독성이 있는 것으로 알려졌다[34]. ROS가 저산소증에서 세포사의 주요 원인임이 밝혀지면서[48], 최근 한약물의 항산화효과 및 신경세포보호에 대한 연구들이 이루어지고 있다[21,30]. 김 등[23]에 의하면 저산소증에서 황금은 SOD 유전자 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한尹 등[50]은  $H_2DCF$ -DA 염색을 이용하여 ROS 가운데  $H_2O_2$ , peroxy radical, peroxynitrite anion을 측정할 결과 황금은 이들의 세포내 농도를 현저히 낮추며, mitochondria의 막전위 유지에도 효능이 있음을 보고하였다.

최근 산소부족 상태에 대한 신경세포 방어 능력이 보고되고 있다[19,36]. 세포는 산소압(oxygen tension)의 변화에 반응할 수 있는 유전자 프로그램과 다수의 산소감지자( $O_2$  sensor)가 있어 이들은 신경세포가 저산소 상태를 받아들이는데 중요한 역할을 한다. 예로서 저산소증에서 산소민감성  $Na^+$  이온통로와  $K^+$  이온통로는 산소분자와 직접 결합하여 흥분성 이온통로를 억제하고 억제성 이온통로를 활성화시켜 세포가 덜 흥분되게 만든다. 또한 NADPH oxidase는 산화환원상태(redox state)에 따라 다른 이온통로 단백질의 이온유입을 조절하거나 다른 영향을 나타낸다[41]. 이러한 영향들 가운데 가장 잘 알려진 산소감지경로는 산소에 민감한 전사인자(transcription factor)인 HIF-1일 것이다[27,40]. HIF-1은 저산소증에서 활성화되며, 이 단백질은 저하된 산소에 적응하는데 필요한 다양한 유전자를 발현시킨다. 이러한 유전자들 가운데는 VEGF, EPO, 해당효소(glycolytic enzymes), 포도당 수송단백질(glucose transporters), 세포주기조절단백질(cell

cycle regulators), transferrin, HO-1, 그리고 iNOS 등이 있다[6,15,41].

IC는 항원항체반응의 원리를 이용하여 특정 물질의 세포내 소체를 검색하는 기법으로 형광항체법(immunofluorescence) 특이성이 높고 감도가 예민하므로 의학이나 생물학분야에 광범위하게 응용되어 왔다. 한편 PCR 기법과 함께 분자생물학기법 중의 하나인 ISH 기법은 세포나 조직에 존재하는 특정한 핵산부위를 검출해 낼 수 있는 첨단기법이다. 본 연구에서는 배양한 흰쥐 대뇌신경세포의 저산소증 모델에서 IC 기법과 ISH 기법으로 항산화스트레스효소인 HO-1의 발현을 관찰하여 황금이 세포사 억제에 관여하는 단백질 및 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

HO-1은 단백질과 mRNA가 모두 정상산소 환경 및 저산소증에서 황금에 의하여 발현이 증가되었다. HO-1 유전자 발현의 유도는 대뇌허혈[14]과 저산소증에서[13]에서 보고되었다. HO-1은 heme을 biliverdin, CO 및 iron으로 분해한다[37]. CO는 강력한 혈관확장제이며, biliverdin과 그 산물인 bilirubin은 강력한 항산화제이다[4]. 또한 HO-1을 과발현시킨 생쥐는 허혈에 더 잘 견디는 것으로 나타났다[28]. 그리고 저산소증에서 transcription factor인 HIF-1이 활성화되는데 이 단백질은 저하된 산소에 적응하는데 필요한 다양한 유전자를 발현시키며 여기에는 HO-1도 포함된다. 따라서 황금에 의한 HO-1 증가는 저산소증에서 신경세포의 보호에 매우 합리적이라 해석된다. 특이한 점은 HO-1은 정상산소 환경 및 저산소증에서 별아교세포에서 신경세포에 비하여 매우 많이 발현되었는데, 이는 별아교세포가 HO-1을 주로 발현하는 세포로서 저산소증에서 신경조직을 보호하는 주된 역할을 담당함을 시사한다.

본 연구는 황금이 저산소증에서 HO-1과 같은 항산화효소의 발현을 증가시켜 세포손상을 방지하는 것으로 추정되며, 향후 다른 항산화효소인 superoxide dismutase, catalase 등에 대한 영향을 조사해보는 것도 흥미로운 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Beschoner, R., D. Adjodah, J. M. Schilalo, M. Mittelbronn, I. Pedal, R. Mattern, H. J. Schluesener and R. Meyermann. 2000. Long-term expression of heme oxygenase-1 (HO-1, HSP 32) following focal cerebral infarctions and traumatic brain injury in human. *Acta Neuropathol.* **100**, 377-384.
2. Bickler, P. E. and P. H. Donohoe. 2002. Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia. *J. Exp. Biol.* **205**, 3579-3586.
3. 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.
4. Burmester, T. and T. Hankeln. 2004. Neuroglobin: a respi-

- ratory protein of the nervous system. *News Physiol Sci.* **19**, 110-113.
5. Cai, J. and D. P. Jones. 1998. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J. Biol. Chem.* **273**, 114001-114014.
  6. Carmeliet, P., Y. Dor, J. M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C. J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R. K. Jain, D. Collen, E. Keshet and E. Keshet. 1998. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**, 485-490.
  7. David, J. C., W. C. Boelens and J. F. Grongnet. 2006. Up-regulation of heat shock protein HSP 20 in the hippocampus as an early response to hypoxia of the newborn. *J. Neurochem.* **99**, 570-581.
  8. Dwyer, B. E., R. M. Nishimura and S. Y. Lu. 1995. Differential expression of heme oxygenase 1 in cultured cortical neurons and astrocytes determined by the aid of a new heme oxygenase antibody: response to oxidative stress. *Mol. Brain Res.* **30**, 37 - 47.
  9. 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.
  10. Erecinska, M. and I. A. Silver. 2001. Tissue oxygenation and brain sensitivity to hypoxia. *Resp. Physiol.* **128**, 263-276.
  11. Fridorich, L. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-881.
  12. Fukuyama, N., S. Takizawa, H. Ishida, K. Hoshiai and Y. Shinohara. 1998. Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-infarct region. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 123-129.
  13. Garnier, P., C. Demougeot, N. Bertrand, A. Prigent-Tessier, C. Marie and Beley. 2001. Stress response to hypoxia in gerbil brain: HO-1 and Mn SOD expression and glial activation. *Brain Res.* **893**, 301-309.
  14. Geddes, J. W., L. C. Pettigrew, M. L. Holtz, S. D. Craaddock and M. D. Maines. 1996. Permanent focal and transient global cerebral ischemia increase glial and neuronal expression of heme oxygenase-1, but not heme oxygenase-2, protein in rat brain. *Neurosci. Lett.* **210**, 205-208.
  15. Gleadle, J. M. and P. J. Ratcliffe. 1998. Hypoxia and the regulation of gene expression. *Mol. Med. Today* **4**, 122-129.
  16. 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.
  17. Haddad, J. J. and S. C. Land. 2000. O<sub>2</sub>-evoked regulation of HIF-1 $\alpha$  and NF $\kappa$ B in perinatal lung epithelium requires glutathione biosynthesis. *Am. J. Physiol., Lung Cell Mol. Physiol.* **278**, L492-L503.
  18. Hansen, A. 1985. Extracellular potassium concentration in juvenile and adult brain cortex during anoxia. *Acta Physiol. Scand.* **99**, 412-428.
  19. Hochachka, P. W. and P. Lutz, 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **130**, 435-459.
  20. Kapturczak, M. H., E. Wasserfall, T. Brusko, M. Campbell Thompson, T. M. Ellis, M. A. Atkinson and A. Agarwal. 2004. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses. Evidence from the heme oxygenase-1 deficient mouse. *Am. J. Pathol.* **165**, 1045 - 1053.
  21. Jeon B. H., S. T. Park and B. R. Park. 1997. Effect of Epimedium Koreanum Nakai on Oxidant - Induced Neurotoxicity in Cultured Bovine Oligodendrocytes. *Korean Journal of Physiology & Pathology* **11**, 58-62.
  22. Kim G. H., S. H. Jung, J. W. Kim, H. S. Eom, S. H. Jung, G. H. 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
  23. Kim S. B. 2003 Effects of Scuteellaria baicalensis Georgi on the gene expression in a hypoxic model of cultured rat cortical cells. Dongguk graduate school.
  24. 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.
  25. Krieglstein, J. 1990. Pharmacology and drug therapy of cerebral ischemia, pp.347-371. In Schurr, A. and B. M. Rigor (eds), *Cerebral ischemia and resuscitation*, Boca Raton CRC.
  26. Kroemer, G., B. Dallaporta and M. Resche-Rigon. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Ann. Rev. Physiol.* **60**, 619-642.
  27. Lando, D., D. Peet, D. Whelan and J. Gorman. 2002. Whitelaw M. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science* **295**, 858-861.
  28. Laufs, T. L., S. Wystub, S. Reuss, T. Burmester, S. Saaler-Reinhardt and T. Hankeln. 2004. Neuron-specific expression of neuroglobin in mammals. *Neurosci. Lett.* **362**, 83-86.
  29. 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.
  30. Lee J. H., B. C. Lee, S. T. Park, J. H. Lee, G. C. Lee, B. I. Seo and H. J. Song. 2003. Effect of Salviae Multiorrhizae Radix on Cultured Mouse Myocardial Cells Damaged by Hydrogen Peroxide. *The Korea Association of Herbology* **18**, 21-25.
  31. 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.
  32. 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.
  33. Lipton, S. A., Y. B. Choi, Z. H. Pan, S. Z. Lei, H. S. Chen, N. J. Sucher, J. Loscalzo, D. J. Singel and J. S. Stamler. 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective

- and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364**, 626-632.
34. Liu, Y. and P. R. Ortiz de Montellano. 2000. Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 5297-5307.
  35. Nieminen, A. L. 2003. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int. Rev. Cytol.* **224**, 29-55.
  36. Nilsson, G. E. 2001. Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol Sci.* **16**, 217-221.
  37. Panahian, N., M. Yoshiura and M. D. Maines. 1999. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. *J. Neurochem.* **72**, 1187-1203.
  38. Prabhakar, N. R. and J. L. Overholt. 1988. Cellular mechanisms of oxygen sensing at the carotid body: heme proteins and ion channels. *Resp. Physiol.* **122**, 209-221.
  39. Prabhakar, N. R. and J. L. Overholt. 2001. Cellular mechanisms of oxygen sensing at the carotid body: heme proteins and ion channels. *Resp. Physiol.* **122**, 209-221.
  40. Rossi, D. J., T. Oshima and D. Attwell. 2000. Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake. *Nature* **403**, 316-321.
  41. Royer, C., J. Lachuer, G. Crouzoulon, J. Roux, J. Peyronnet, J. Mamet, J. Pequignot and Y. Dalmaz. 2000. Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of Glut3 and Glut4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid hormone receptors in developing rat brain. *Brain Res.* **856**, 119-128.
  42. Schipper, H. M. 2004. Heme oxygenase expression in human nervous system disorders. *Free Rad. Biol. Med.* **37**, 1995-2011.
  43. Semenza, G. L. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 588-594.
  44. 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.
  45. 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.
  46. Semenza, G. L. 1999. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 551-578.
  47. Stocker, R., Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer and B. N. Ames. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**, 1043-104.
  48. Tada-Oikawa, S., Y. Hiraku, M. Kawanishi and S. Kawanishi. 2003. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. *Life Sci.* **73**, 3277-3288.
  49. Yu, B. P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**, 139-162.
  50. Yun, K. S. 2003 Effects of *Scutellaria baicalensis* GEORGI (황금) on the Modulation of ROS, MMP, in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells. Dongguk graduate school.
  51. Zhang, J. G., M. A. Timenstein, F. A. Nicholls-Grzemski and M. W. Fariss. 2001. Mitochondrial electron transport inhibitors cause lipid peroxidation dependent and independent cell death: protective roll of antioxidants. *Arch. Biochem. Biophysics* **393**, 87-96.
  52. Ji, H. J., S. I. Lee, and D. G. Ann. 1998. Hanyak-Gyugyuk-Juhae, pp 682-688, Korean medical index com. Seoul.
  53. Lee, S. J. 1995. Bon-cho-kang-mok, Deasung Medical press, Seoul.
  54. Wang, A. 1989. Bon-cho-bi-yo, pp177-180, Komoonsa, Seoul.
  55. Hoe, J. 1999. Dong-Eui-Bo-Gam, pp37,1024, 1937, 1938, Bubinbooks, Seoul.
  56. Hwang, D. Y. 1989. Bang-Yak-Hap-Pyun, pp120-123, Namsandang, Seoul.
  57. Lee, J. M. 1992. Dongyi-Suse-Bowon, pp272, Yeogang Book publisher.
  58. Kim, H. G. 2000. Pharmacology of Korea, pp222-227, Korea medical publisher. Seoul.