

흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 황련의 활성산소 생성 억제와 신경세포사 억제

최주리 · 신길조 · 이원철 · 문일수¹ · 정승현*

동국대학교 한의과대학 내과학교실, ¹동국대학교 의과대학 해부학교실

Received December 18, 2007 / Accepted February 13, 2008

Suppression of Reactive Oxygen Species Production by Water-extracts of *Coptidis Rhizoma* Enhances Neuronal Survival in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells. Ju Li Choi, Gil Jo Shin, Won Chul Lee, Il Soo Moon¹ and Seung Hyun Jung*. *Department of Oriental Medicine, and ¹Department of Anatomy, Dongguk University - Pathophysiological oxidative stress results in neuronal cell death mainly due to the generation reactive oxygen species (ROS). In low oxygen situation such as hypoxia and ischemia, excessive ROS is generated. *Coptidis Rhizoma* (CR) is a traditional medicine used for the incipient stroke. In this report we show that CR water extracts (1 µg/ml) exhibited protective effects of neuronal cell death in a hypoxic model (2% O₂/5% CO₂, 37°C, 3 hr) of cultured rat cortical cells. We further show that CR water extracts significantly reduced the intensity of green fluorescence after staining with H₂DCF-DA on one hour and three days after hypoxic shock and in normoxia as well. Our results indicate that CR water extracts prevent neuronal death by suppressing ROS generation.*

Key words : *Coptidis Rhizoma*, cortical culture, hypoxia, neuron, reactive oxygen species

서 론

뇌혈관 질환은 인구의 노령화로 발병률이 점차 증가하고 있으며[13], 사망 또는 비가역적인 신경학적 손상을 남기게 된다. 허혈(ischemia), 저산소증(hypoxia), 그리고 외상(trauma)에 따른 신경세포의 지연성 세포사의 병인에는 미토콘드리아의 기능 이상이 중요하게 기여한다[6,9,32,36]. 일시적 허혈(transient ischemia)은 세포내 Ca²⁺의 증가를 야기하고[31], 증가된 칼슘은 미토콘드리아 속으로 격리되나[41], 과도한 Ca²⁺은 미토콘드리아의 생물에너지 기능장애(bioenergy dysfunction)를 유발한다[33].

Ca²⁺은 두 가지 방식으로 미토콘드리아를 손상시킨다[34]. 첫째는 calpain proteases 및 phospholipases와 같은 분해효소나 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 생성하는 효소들을 활성화시키는 것이고[25,35,37], 둘째는 mitochondrial permeability transition (MPT)을 활성화시켜 비선택적인 통과구멍(conductance pore)을 미토콘드리아 내막에 만들어 미토콘드리아 외막의 파열까지 초래하는 것이다[5,17,30]. 이 가운데 ROS에 의한 산화 스트레스가 허혈과 재관류[4,12,28], 무산소(anoxia)[1], 저산소증[38]에서 신경세포사의 주된 요인으로 작용한다. 실제로 많은 보고에서 미토콘드리아 내에 다량의 Ca²⁺ 축적이 허혈/재관류 및 흥분독성(excitotoxicity) 동안 다량의 ROS가 생성되었다[11,22-24].

황련(黃連, *Coptidis Rhizoma*; CR)은 미나리아재비과

(*Ranunculaceae*)에 속한 다년생 초본인 황련(*Coptis japonica* MAKINO) 또는 기타 동속 식물의 뿌리를 거의 제거한 뿌리 줄기를 건조한 것으로 성한(性寒), 미고(味苦)하여 청열조습(淸熱燥濕), 사화해독(瀉火解毒)의 효능이 있어[19], 혈압강화제 및 감염성 질환에 사용된다[20]. 허혈/저산소증과 관련된 연구에서 황련은 경구 투여한 흰쥐 신장의 허혈-재관류 모델에서 신장 기능 장애를 완화할 뿐 아니라 산화스트레스에 의한 세포자연사를 억제하였다[10]. 또한 황련은 ONOO⁻에 유도된 산화손상을 억제하며 이 효능은 황련의 주요 alkaloid인 berberine에 기인하는 것으로 밝혀졌다[40]. 이 결과는 황련이 항산화 효능이 탁월함을 시사한다.

본 연구에서는 저산소증을 유발한 흰쥐 대뇌피질세포 배양에서 황련이 신경세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하고, 그 기전으로 ROS의 생성 억제에 미치는 영향을 형광 색소인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)를 사용하여 정서적으로 관찰하였다.

재료 및 방법

약재 및 물추출액 제조

실험에 사용된 황련은 대한약전 및 대한약전 외 한약 규격주해[18]에 근거하여 동국대학교 경주 한방병원에서 구입하였다. 황련(2 g)에 20 ml의 증류수를 넣어 균질화하고 상온에서 4시간, 4°C에서 18시간 진탕하였다. 이를 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.2 µm)한 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의량은 1 ml 추출액 3 튜브를 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

*Corresponding author

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

E-mail : omdjeong@naver.com

신경세포 배양

임신 18일(embryonic day 18: E₁₈)의 *Sprague-Dawley*계 흰쥐 대뇌피질신경세포를 Brewer 등[7]의 방법에 따라 배양하였다. 즉, E₁₈의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통 속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아를 취하고 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37°C에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1mM 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's용액으로 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/mm²가 되도록 B27을 첨가한 plating neurobasal media (Invitrogen Life Technology) (100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I, 0.1 ml 25mM 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., Mareta, OH, USA)를 이용하여 2% O₂/5% CO₂ 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소 환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

LDH 측정

배양 10일(10 day *in vitro*: DIV)에 황련 1.0 µg/ml 농도로 처리하고 3일간 배양한 후, 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소 환경 배양조에 옮기고 계속 배양한 다음 3일째에 각각 배양액 20 µl를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate (NADH 1 mg/ml)를 20 µl씩 가한 다음, 상온에서 2분간 혼든 후 37°C에서 30분간 더 혼들었다. 발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20 µl씩 가하고 상온에서 20분간 혼든 후, 0.4 N NaOH를 100 µl씩 가하고 상온에서 15분간 더 혼든 다음 ELISA reader로 흡광도(OD₄₅₀)를 측정하였다.

활성산소(ROS) 생성세포 염색

ROS 생성세포는 형광 색소인 H₂DCF-DA (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하여 관찰하였다. DIV 10에 황련 1.0 µg/ml로 처리하고 3일간 배양한 후 저산소증을 유발하기 직전, 유발 후 1시간과 유발 후 1, 3일에 각각 염색하였다. H₂DCF-DA 처리 전에 세포를 feeding neurobasal

media로 씻어주었다. H₂DCF-DA를 최종 농도 10 nM이 되도록 배양액에 넣고 10분 동안 CO₂ 배양조에서 배양시킨 후 feeding neurobasal media로 두 번 씻어준 다음 형광현미경으로 관찰하였다. H₂DCF-DA는 dimethylsulfoxide (DMSO)로 5 mM의 stock을 만들고 이를 feeding neurobasal media로 500배 희석하여(최종농도 10 nM) 세포에 처리하였다.

통계처리

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

결 과

저산소증에서 황련이 신경세포사멸에 미치는 영향

추출물이 저산소증을 유도한 신경세포를 보호하는 효능을 조사하기 위하여 흰쥐 E₁₈ 대뇌신경세포를 뉴로베이잘 배지에 배양하고 DIV 10에 황련 1.0 µg/ml를 처리하고 3일간 더 배양한 후, DIV 13에 배양용기를 특수 이산화탄소 배양조(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 배양하면서 세포의 생존율을 LDH 방법으로 조사한 결과, 대조군에 비하여 황련을 첨가하기 직전(DIV 10)에는 100.8±2.01%, 저산소증을 유발하기 직전(DIV 13), 유발 후 1일(DIV 14), 3일(DIV 16), 5일(DIV 18)에 각각 98.16±4.62, 108.98±4.24, 122.74±4.60(p<0.01), 128.88±2.64% (p<0.01)의 생존율을 나타내었다(Fig. 1). 이는 황련 물추출물이 저산소증에서 신경세포 사망 억제 효능이 있음을 의미한다.

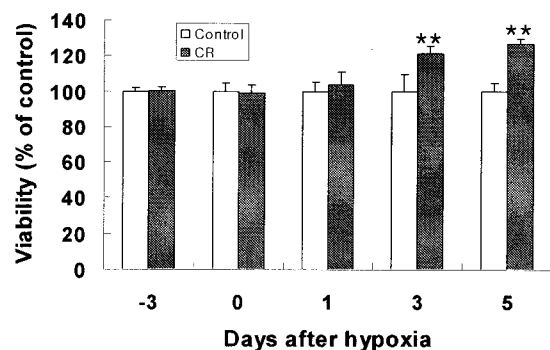


Fig. 1. Neuroprotection of *Coptidis Rhizoma* (CR) water extracts in hypoxia. E₁₈ rat cortical neurons were grown in Neurobasal medium supplemented with B27. CR (1.0 µg/ml) were added on DIV 10 and hypoxic shock (2% O₂/5% CO₂, 3 hr) was given on DIV 13. Then, cultures were incubated in normoxia. Cell viability was measured by LDH assay (n=8) and expressed with percent of control cultures. **, p<0.01.

H₂DCF-DA 염색을 이용한 ROS의 측정

H₂DCF-DA는 세포막 투과성으로서 세포내에 들어가면 esterase에 의하여 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF)로 변환된다. H₂DCF는 민감하게 산화되어 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 바뀌어 초록(green) 형광을 낸다. 저산소증을 유발하고 3일 후 H₂DCF-DA를 이용하여 ROS 생성 세포를 관측한 사진을 Fig. 2에 나타내었다. 초록형광을 내는 세포들(asterisk)은 그렇지 않은 세포(arrow)에 비하여 세포체가 팽윤되어 있는 것이 분명히 나타났다. 이는 세포가 손상을 받아 ROS를 많이 생성하고 있는 것으로 해석된다.

정상산소 환경(normoxia)에서 황련이 활성산소(ROS)의 생성에 미치는 영향

H₂DCF-DA 염색을 이용하여 황련이 ROS 생성에 미치는 영향을 조사하였다. DIV 10에 황련 1.0 µg/ml를 처리하고 3일간 배양한 후 저산소증을 유발하기 직전(DIV 13)에 H₂DCF-DA로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다(Fig. 3). 황련을 첨가하지 않은 대조군의 경우 ROS를 생성하는 세포가 흔히 발견되었으며 그 강도도 높았다(Fig. 3A). 가끔 세포내 점박이(puncta) 모양으로 형광을 내는 세포가 관측되었는데(Fig. 3A, inset) 이는 ROS를 생성하는 미토콘드리아들이므로 보인다. 반면에 황련을 처리한 실험군에서는 정상산소 환경 하에서 H₂DCF-DA에 염색되는 세포의 빈도가 7%로 대조군 15%에 비하여 매우 낮았다(Fig. 3B & 3C). 또한 형광의 강도에 있어 현저한 차이가 있어 대조군에서 거의 2배 강하였다(26.6:14.6, Fig. 3D). 이는 ROS를 생성하는 세포의 수 뿐 아니라 생성하는 량도 대조군에서 유의하게 많음을 의미한다(p<0.01).

저산소증(hypoxia)에서 황련이 활성산소(ROS)의 생성에 미치는 영향

DIV 10에 황련 1.0 µg/ml를 처리하고 3일간 배양한 후 저

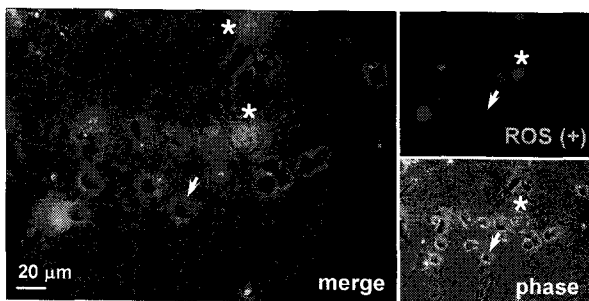


Fig. 2. Visualization of ROS-positive cells. Cells were given hypoxic shock on DIV 13, and stained with H₂DCF-DA (10 nM) 3 days after shock. This micrograph shows a typical field of highly green-fluorescent cells and its phase-contrast images. ROS producing, swollen cells were indicated by asterisks and apparently healthy one by an arrow.

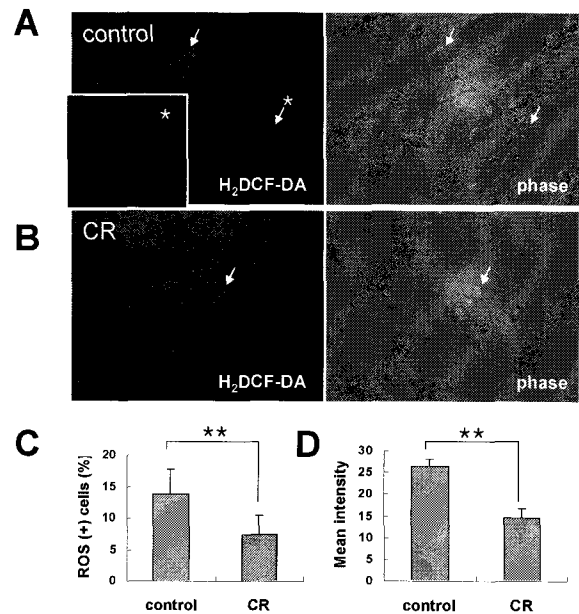


Fig. 3. Suppression of ROS generation by CR water extracts in a hypoxic model in normoxia. CR (1.0 µg/ml) was added to cortical cultures on DIV 10. Cells were given hypoxic shock on DIV 13, and stained with H₂DCF-DA (10 nM) on DIV 13. A and B: Typical micrographs of fluorescence (H₂DCF-DA) and phase-contrast images. ROS producing cells were indicated by arrows. One cell marked by an arrow with an asterisk is shown enlarged in inset. Note green-fluorescent puncta in the soma; C: Relative percentage of ROS (+) and ROS (-) cells; D: Relative intensity of the ROS (+) cells. **, p<0.01

산소증을 유발하고 H₂DCF-DA로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 저산소증 처리 후 1시간 후에 관찰한 사진을 Fig. 4에 나타내었다. 녹색 형광을 내는 세포는 대조군과 실험군에서 각각 13 및 12%로 유의한 차이가 없었다(Fig. 4C). 그러나 형광의 강도는 5.5배(84:15)로 대조군이 훨씬 더 강했다(Fig. 4D). 저산소증 처리 3일 후에 관찰한 형광사진을 Fig. 5에 나타내었다. 이 경우에는 대조군과 실험군에서 각각 18 및 17%의 세포가 형광을 나타내고 있어 1시간 후 보다 더 많은 세포가 형광을 보였으나 두 군 사이에 유의한 차이가 없었다(Fig. 5C). 그러나 형광의 강도는 3배(60:20) 정도 대조군에서 더 강했다(Fig. 5D). 강하게 형광을 보이는 세포 가운데는 흔히 세포질이 팽윤되어 풍선과 같은 형태로 되고, 핵은 움크러져 있는 모양을 하고 있었다(Fig. 5B, arrow). 저산소증 처리 5일 후에 관찰한 형광사진을 Fig. 6에 나타내었다. 이 경우에는 각각 35 및 32%의 세포가 형광을 나타내고 있어 3일 후 보다 더 많은 세포가 형광을 보였으나 대조군과 실험군 사이에 유의한 차이가 없었다(Fig. 6C). 또한 형광의 강도도 54:52로서 서로 비슷하였다(Fig. 6D). 그러나 3일 후의 경우에 비하여 전반적으로 더 강한 형광을 나타내었다. 이 결과들을 종합하여 ROS 생성의 변화추이를 Fig. 7에 나타

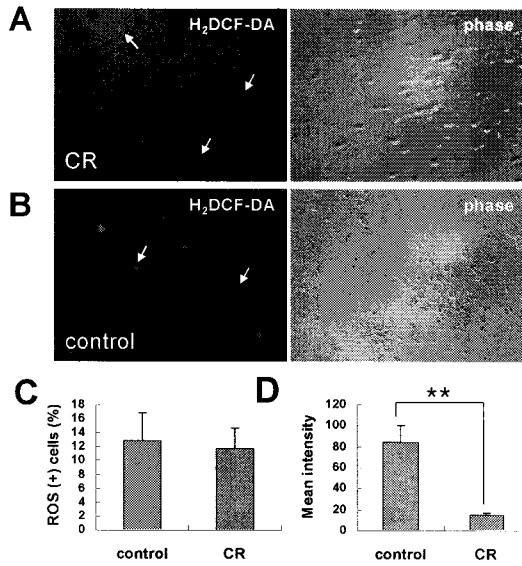


Fig. 4. Suppression of ROS generation by CR water extracts in a hypoxic model (1 hr after hypoxic shock). CR was added and cortical cultures were given hypoxic shock as in Fig. 3. Cultures were stained with H₂DCF-DA (10 nM) at 1 hr after hypoxic shock. A and B: Typical micrographs of fluorescence (H₂DCF-DA) and phase-contrast images. ROS producing cells were indicated by arrows; C: Relative percentage of ROS (+) and ROS (-) cells; D: Relative intensity of the ROS (+) cells. **, *p* < 0.01

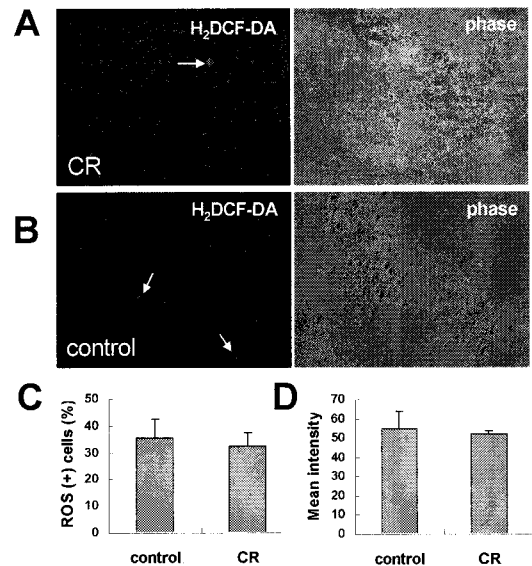


Fig. 6. Effects of CR against ROS generation in a hypoxic model (5 days after hypoxic shock). CR was added and cortical cultures were given hypoxic shock as in Fig. 3. Cultures were stained with H₂DCF-DA (10 nM) 5 days after hypoxic shock. A and B: Typical micrographs of fluorescence (H₂DCF-DA) and phase-contrast images. ROS producing cells were indicated by arrows; C: Relative percentage of ROS (+) and ROS (-) cells; D: Relative intensity of the ROS (+) cells.

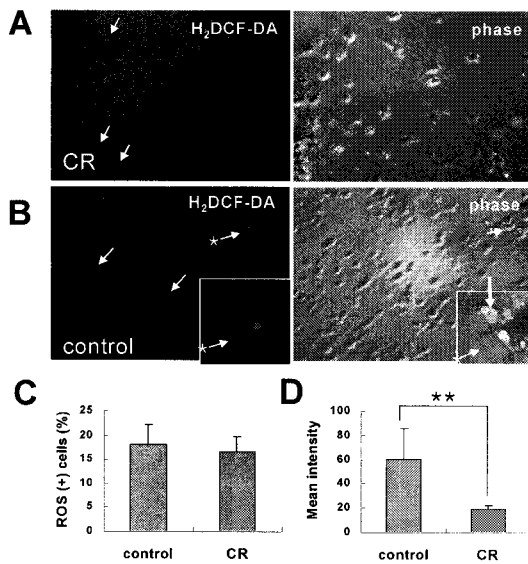


Fig. 5. Suppression of ROS generation by CR water extracts in a hypoxic model (3 days after hypoxic shock). CR was added and cortical cultures were given hypoxic shock as in Fig. 3. Cultures were stained with H₂DCF-DA (10 nM) 3 days after hypoxic shock. A and B: Typical micrographs of fluorescence (H₂DCF-DA) and phase-contrast images. ROS producing cells were indicated by arrows; C: Relative percentage of ROS (+) and ROS (-) cells; D: Relative intensity of the ROS (+) cells. **, *p* < 0.01

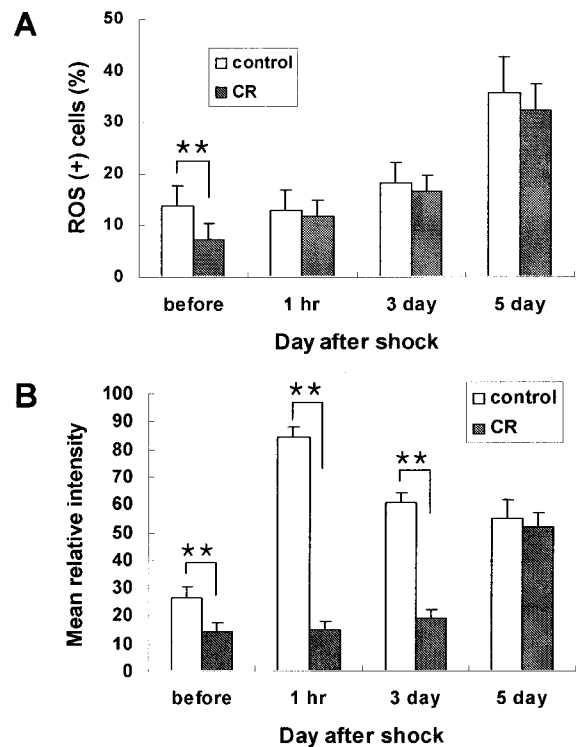


Fig. 7. A summary of temporal changes of ROS production. A: ROS production; B: Relative intensity of the fluorescence. **, *p* < 0.01

내었다. Fig. 7에서 보면 황련에 의하여 ROS 생성 세포의 수는 정상산소 환경에서는 유의하게 감소하였지만, 저산소증 유발 이후에는 대조군과 차이가 없었다. 그러나 형광의 강도에 있어서는 5일째를 제외하면 전반적으로 실험군에서 현저히 감소하였다.

고 찰

활성산소(ROS)는 유기호흡 생물의 정상적인 대사과정과 내외부의 자극에 의하여 끊임없이 생성된다. 유기호흡 생물들은 다양한 종류의 효소 및 비효소적 활성산소 제거체계(ROS scavenging system)를 개발하여 산화손상에 대항하고 있다. 예로서 manganese superoxide dismutase (SOD2)는 미토콘드리아에 위치하고 있으면서 superoxide가 생성되면 바로 그 자리에서 H_2O_2 로 전환한다. 이어서 H_2O_2 는 peroxisome과 cytosol에서 catalase 혹은 glutathione peroxidase에 의하여 해독된다[21,39]. 그러나 뇌허혈·저산소 등과 같은 흥분독성(excitotoxicity) 상황에서는 ROS의 생성이 촉진되어 방어체계의 한계를 넘는 산화스트레스를 유발하여 신경세포 사멸을 야기한다[8]. 따라서 흥분독성 상태에서 ROS 생성을 억제하면 세포사를 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

황련은 미고(味苦) 무독(無毒)하여 심경(心經)으로 들어가 사심(瀉心)하고 비위(脾胃) 중의 습열(濕熱)을 빼낸다. 열독(熱毒)을 없애 명목진간(明目鑢肝)하는 효능이 있으며 장벽(腸滯)과 하리농혈(下痢膿血)을 치료하고, 소갈(消渴) 변조(煩燥) 경계(驚悸) 등을 멎게 한다[14]. 반하사심탕(半夏瀉心湯), 삼황사심탕(三黃瀉心湯), 황련해독탕(黃連解毒湯), 회춘양격산(回春涼膈散) 등의 처방이 황련의 특징을 잘 나타내준다. 본 연구에서는 황련의 물추출액이 저산소증을 유도한 대뇌 신경세포의 세포사 억제효능을 LDH방법으로 조사한 결과 추출액을 첨가한 실험군은 대조군에 비하여 저산소증 유도 1, 3, 5일 후에 각각 8.98 ± 4.24 , 22.74 ± 4.60 ($p < 0.01$), 28.88 ± 2.64 ($p < 0.01$)의 생존율 증가를 나타내었다. 이는 황련 물추출물이 저산소증에서 신경세포 사망 억제 효능이 있음을 의미한다.

저산소증에서 세포사의 주된 원인 가운데 하나는 흥분독성에 의하여 유도된 미토콘드리아 유래의 ROS에 의한 세포 손상과 MMP의 소실에 의한 세포 에너지 고갈이다. 황련이 ROS 생성에 미치는 영향을 $H_2DCF-DA$ [3]를 이용하여 조사하였다. 정상산소환경에서 $H_2DCF-DA$ 에 염색되는 세포가 전체 세포 가운데 15%였다. 이는 정상산소환경에서도 ROS를 상당한 수준으로 생성하는 세포가 많이 존재함을 의미한다. 더구나 일부 세포에서는 ROS 염색이 점박이(puncta)로 나타났는데 이는 그 크기와 분포 및 빈도로 보아 아마도 미토콘드리아인 것으로 추정된다. 이 사실은 ROS의 주된 생성이 미토콘드리아임을 재확인한다. 배지에 황련 물추출물을

첨가한 경우 ROS를 생성하는 세포가 7%로 줄어들었으며, 형광의 강도에 있어서도 현저한 차이가 있었는데, 이는 ROS를 생성하는 세포의 수 뿐 아니라 세포 당 생성하는 량도 대조군에서 유의하게 많음을 의미한다.

저산소증 처리 후 1시간 후에는 실험군에서도 형광을 나타내는 세포가 증가하여(12%) 대조군(13%)과 유의한 차이가 없었다. 그러나 형광의 강도는 저산소증 유도 전에 비하여 전반적으로 강하게 나타났으며, 실험군과 비교할 때 대조군이 5.5배로 훨씬 더 강했다. 이는 저산소증 유도 후 1시간에는 많은 세포에서 ROS가 생성되며, 황련은 그 생성량을 현저히 줄임을 의미한다. 이러한 전반적인 형광의 표현양상은 저산소증 유도 후 3일에도 지속되었다. 그러나 형광을 내는 세포는 대조군(18%) 및 실험군(17%)에서 모두 증가하였으며, 형광의 강도는 3배 정도 대조군에서 더 강했다. 이는 저산소증 유도 후 3일에는 ROS 생성이 더 활발하게 일어나며 황련은 이를 유의하게 억제함을 의미한다. 그리고 강하게 형광을 보이는 세포 가운데는 흔히 세포질이 팽윤되어 풍선과 같은 형태로 되고, 핵은 움크러진 모양을 하고 있는 세포가 흔히 발견되었다. 이런 세포들은 세포사에 이른 것으로 추정된다.

황련의 항산화 효능은 여러 논문에서 보고되었다. 황련추출물은 ONOO⁻와 그 전구체인 산화질소(NO) 및 superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$)를 제거한다[40]. 또한 ONOO⁻를 생성하게 하는 실험모델인 in-vivo lipopolysaccharide/허혈-재관류 실험에서 황련추출물의 투여는 ONOO⁻의 수준을 낮추었으며 항산화 효소들인 superoxide dismutase, catalase 그리고 glutathione peroxidase의 활성이 감소하는 것을 현저히 억제하였다. 황련의 이런 항산화 효능은 알칼로이드 특히, berberine에 기인하는 것으로 밝혀졌다[40]. 그리고, 황련에서 분리한 알칼로이드인 magnoflorine은 high-density lipoprotein (HDL)의 Cu^{2+} 로 유도되는 지질과산화물을 억제하는 효과가 있다[16]. 흰쥐의 허혈-재관류 실험에서 황련추출물은 콩팥(kidney)의 손상을 줄였는데, 이 경우 glutathione/glutathione disulfide 비율 및 항산화 효소들인 superoxide dismutase와 catalase의 활성이 황련추출물을 경구 투여한 쥐에서 증가하였다[10]. 또한 콩팥세포의 DNA 분질이 황련추출물을 경구 투여한 쥐에서 현저히 감소하였다. 이는 황련 물추출물이 산화스트레스에 의한 세포자연사로부터 콩팥세포를 보호함을 시사한다. 이와 같은 보고들은 본 연구결과와 매우 잘 일치한다.

황련의 주요 알칼로이드인 berberine은 여러 가지 약리효능이 있다. berberine은 알츠하이머병 치료제인 Galanthamine과 유사한 acetylcholinesterase의 저해제로서[16], 신경성장인자 NGF의 활성을 도와 신경세포의 분화를 촉진시킨다[29]. 그리고 흰쥐 알츠하이머병 모델에서 berberine의 위내 투여(intragastric administration)는 공간기억손상을 현저히

호전시키며[42], human neuroglioma H4 cell에서 berberine은 A β 의 수준을 낮춘다. 본 연구를 포함한 이러한 결과들은 항련을 알츠하이머병 치료제 및 항산화제로 개발할 수 있음을 시사한다[2].

References

1. Abramov, A. Y., A. Scorziello and M. R. Duchon. 2007. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J. Neurosci.* **27**, 1129-1138.
2. Asai, M., N. Iwata, A. Yoshikawa, Y. Aizaki, S. Ishiura, T. C. Saido and K. Maruyama. 2007. Berberine alters the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein to decrease Abeta secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 498-502.
3. Bass, D. A., J. W. Parce, L. R. Dechatelet, P. Szejda, M. C. Seeds and M. Thomas. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* **130**, 1910-1917.
4. Benzi, G., O. Pastoris and M. Dossena. 1982. Relationships between gamma-aminobutyrate and succinate cycles during and after cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* **7**, 193-201.
5. Bernardi, P., K. M. Broekemeier and D. R. Pfeiffer. 1994. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 509-517.
6. Blomgren, K., C. Zhu, U. Hallin and H. Hagberg. 2003. Mitochondria and ischemic reperfusion damage in the adult and in the developing brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 551-559.
7. 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.
8. Cai, J. and D. P. Jones. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J. Biol. Chem.* **273**, 11401-11404.
9. Calabrese, V., G. Scapagnini, A. M. Giuffrida Stella, T. E. Bates and J. B. Clark. 2001. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem. Res.* **26**, 739-764.
10. Cho, E. J., T. Yokozawa, S. H. Rhee and K. Y. Park. 2004. The role of Coptidis Rhizoma extract in a renal ischemia-reperfusion model. *Phytomedicine.* **11**, 576-584.
11. Dykens, J. A. 1994. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA²⁺ and Na⁺: implications for neurodegeneration. *J. Neurochem.* **63**, 584-591.
12. Fiskum, G., A. N. Murphy and M. F. Beal. 1999. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *Cereb. Blood Flow Metab.* **19**, 351-369.
13. Fuh, Jr., S. J. Wang, E. B. Larson and H. C. Liu. 1996. Prevalence of stroke in kinmen. *Stroke.* **27**, 1338-1341.
14. Hoe, J. 2003. *Dong-Eui-Bo-Gam.* pp. 1654, 2019, 2976. Yeogang Book publisher, Seoul.
15. Hung, T. M., J. P. Lee, B. S. Min, J. S. Choi, M. Na, X. Zhang, T. M. Ngoc, I. Lee and K. Bae. 2007. Magnoflorine from coptidis rhizoma protects high density lipoprotein during oxidant stress. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1157-1160.
16. Ingkaninan, K., P. Phengpa, S. Yuenyongsawad and N. Khorana. 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. *J. Pharm. Pharmacol.* **58**, 695-700.
17. Javadov, S. and M. Karmazyn. 2007. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol. Biochem.* **20**, 1-22.
18. Ji, H. J. and S. I. Lee. 1997. *Hanyack-Gyugyuk-Juhea.* pp. 153, Korean index Co., Seoul.
19. Kim, H. C. 2001. *Pharmacology of Korea.* pp. 134-137, Jipmoondang, Seoul.
20. Kim, H. G. 2000. *Pharmacology of Korea.* pp. 329-333, Korea medical publisher, Seoul.
21. Kim, K. H., A. M. Rodriguez, P. M. Carrico and J. A. Melendez. 2001. Potential mechanisms for the inhibition of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Antioxid. Redox Signal.* **3**, 361-373.
22. Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho and A. E. Vercesi. 1995. Ca²⁺-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *Am. J. Physiol.* **269**, 141-147.
23. Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho and A. E. Vercesi. 1996. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett.* **378**, 150-152.
24. Kowaltowski, A. J., L. E. Netto and A. E. Vercesi. 1998. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**, 12766-12769.
25. Nakahara, I., H. Kikuchi, W. Taki, S. Nishi, M. Kito, Y. Yonekawa, Y. Goto and N. Ogata. 1992. Changes in major phospholipids of mitochondria during postischemic reperfusion in rat brain. *Neurosurg.* **76**, 244-250.
26. Poot, M. and R. C. Pierce. 1999. Detection of apoptosis and changes in mitochondrial membrane potential with chloromethyl-X-rosamine. *Cytometry.* **36**, 359-360.
27. Rogakou, E. P., W. Nieves-Neira, C. Boon, Y. Pommier and W. M. Bonner. 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.* **275**, 9390-9395.
28. Sciamanna, M. A., J. Zinkel, A. Y. Fabi and C. P. Lee. 1992. Ischemic injury to rat forebrain mitochondria and cellular calcium homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1134**, 223-232.
29. Shigeta, K., K. Ootaki, H. Tatemoto, T. Nakanishi, A.

- Inada and N. Muto. 2002. Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells by a *Coptidis Rhizoma* extract and protoberberine alkaloids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2491-2494.
30. Siesjo, B. K., E. Elmer, S. Janelidze, M. Keep, T. Kristian, Y. B. Ouyang and H. Uchino. 1999. Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochir. Suppl.* **73**, 7-13.
 31. Silver, I. A. and M. Erecinska. 1992. Ion homeostasis in rat brain in vivo: intra- and extracellular Ca^{2+} and H^+ in the hippocampus during recovery from short-term, transient ischemia. *Cereb. Blood Flow Metab.* **12**, 759-772.
 32. Sims, N. R. and M. F. Anderson. 2002. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochem. Int.* **40**, 511-526.
 33. Sims, N. R. and W. A. Pulsinelli. 1987. Altered mitochondrial respiration in selectively vulnerable brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat. *Neurochem.* **49**, 1367-1374.
 34. Starkov, A. A., C. Chinopoulos and G. Fiskum. 2004. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium.* **36**, 257-264.
 35. Wagner, K. R., M. Kleinholz and R. E. Myers. 1990. Delayed decreases in specific brain mitochondrial electron transfer complex activities and cytochrome concentrations following anoxia/ischemia. *Neurol. Sci.* **100**, 142-151.
 36. Weinberg, J. M., M. A. Venkatachalam, N. F. Roeser and I. Nissim. 2000. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2826-2831.
 37. Wingrave, J. M., K. E. Schaecher, E. A. Sribnick, G. G. Wilford, S. K. Ray, D. J. Hazen-Martin, E. L. Hogan and N. L. Banik. 2003. Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *Neurosci. Res.* **73**, 95-104.
 38. Xu, W., L. Chi, B. W. Row, R. Xu, Y. Ke, B. Xu, C. Luo, L. Kheirandish, D. Gozal and R. Liu. 2004. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neurosci.* **126**, 313-323.
 39. Xu, Y., K. K. Kiningham, M. N. Devalaraja, C. C. Yeh, H. Majima, E. J. Kasarskis and D. K. St. Clair. 1999. An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *DNA Cell Biol.* **18**, 709-722.
 40. Yokozawa, T., A. Ishida, Y. Kashiwada, E. J. Cho, H. Y. Kim and Y. Ikeshiro. 2004. *Coptidis Rhizoma*: protective effects against peroxynitrite-induced oxidative damage and elucidation of its active components. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 547-556.
 41. Zaidan, E. and N. R. Sims. 1994. The calcium content of mitochondria from brain subregions following short-term forebrain ischemia and recirculation in the rat. *Neurochem.* **63**, 1812-1819.
 42. Zhu, F. and C. Qian. 2006. Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* **7**, 78.