

배양대뇌신경세포 저산소증모델에서 유해산소생성억제 및 사립체막전위 소실방지에 의한 반하(半夏)의 신경세포사 억제 효능

권건록 · 문일수¹ · 이원철^{2*}

동국대학교 한의과대학 내과학교실, ¹동국대학교 의과대학 해부학교실, ²부산대학교 한의학전문대학원

Received January 5, 2009 / Accepted May 8, 2009

Neuroprotective Effects of *Pinelliae Rhizoma* Water-Extract by Suppression of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Membrane Potential Loss in a Hypoxic Model of Cultured Rat Cortical Cells. Gun-Rok Kwon, Il-Soo Moon¹ and Won-Chul Lee^{2*}. *Dept. of Oriental Medicine, and ¹Department of Anatomy, Dongguk University ²Pusan National University School of Oriental Medicine* - Oxidative stress by free radicals is a major cause of neuronal cell death. Excitotoxicity in hypoxia/ischemia causes an increase in reactive oxygen species (ROS) and a loss of mitochondrial membrane potential (MMP), resulting in dysfunction of the mitochondria and cell death. *Pinelliae Rhizoma* (PR) is a traditional medicine for incipient stroke. We investigated the effects of PR Water-Extract on the modulation of ROS and MMP in a hypoxic model using cultured rat cortical cells. PR Water-Extract was added to the culture medium at various concentrations (0.25~5, 5.0 µg/ml) on day *in vitro* 12(DIV12), given a hypoxic shock (2% O₂/5% CO₂, 37°C, 3 hr), and cell viability was assessed on DIV15 by Lactate Dehydrogenase Assay (LDH assays). PR Water-Extract showed a statistically significant effect on neuroprotection (10~15% increase in viability; p<0.01) at 1.0 and 2.5 µg/ml in normoxia and hypoxia. Measurement of ROS production by H₂DCF-DA stainings showed that PR Water-Extract efficiently reduced the number and intensity of ROS-producing neurons, especially at 1 hr post shock and DIV15. When MMP was measured by JC-1 stainings, PR Water-Extract efficiently maintained high-energy charged mitochondria. These results indicate that PR Water-Extract protects neurons in hypoxia by preventing ROS production and preserving the cellular energy level.

Key words : Cortical cell culture, hypoxia, MMP, *Pinelliae Rhizoma*, ROS

서 론

뇌신경세포는 세포 생존을 위하여 혈액 순환에 의한 지속적인 영양과 산소의 공급을 필요로 한다. 임상에서 뇌신경세포는 뇌허혈 및 심정지 등으로 인한 심박출량 감소, 폐질환 및 이산화탄소 중독 등으로 인한 혈중 산소분압의 저하 등에 의해 저산소증 상태에 빠지게 된다. 일시적인 저산소·허혈 상태는 비가역적인 신경 세포사를 유발하며 손상 중심부에서 일어나는 세포괴사(necrosis)와 손상 주변부(penumbra)에서 일어나는 세포고사(apoptosis) 기전으로 진행되며[9,11,29], 산화 스트레스는 이 두 기전을 유발하는 중요 원인 중 하나이다. 신경세포 사멸의 주된 원인 가운데 하나는 흥분독성(excitotoxicity)에 의해 생성되는 자유기(free radical)로 인한 산화 스트레스이다. 흔히 자유기(free radical)라 불리어지는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 및 활성질소종(reactive nitrogen species; RNS)은 가장 안정한 형태의 산소인 삼중항산소(³O₂)가 산화, 환원과정에서 환원되어 생성되는 일중항산소인 superoxide anion (¹O₂⁻)과 hydrogen peroxide

(H₂O₂), hydroxyl radical ([·]OH)을 비롯하여 내인성·외인성 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 만들어지는 nitric oxide ([·]NO) 및 peroxynitrite (ONOO⁻)와 같은 짝짓지 않은 상태의 자유 라디칼로서, 이들은 산화적 스트레스(oxidative stress) 및 질산화적 스트레스(nitrosative stress)로 작용하여 여러 조직에서 세포막의 변화, 효소활성의 감소, DNA 손상시켜 세포 손상에 매우 중요한 인자로 작용하게 된다[1,3,8,13,20].

산소분자는 미토콘드리아의 에너지 생산과정인 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)에서 전자수용체로 작용하기 때문에 동물세포의 생존에 필수적이다[12]. 따라서 일시적인 저산소·허혈 상태에서도 신경세포는 저산소와 포도당 결핍으로 ATP 대사장애가 발생하여 허혈 손상으로 취약한 부위에 선택적으로 심한 손상이 유발된다. 이는 즉각적으로 발생하지 않고 수 시간에서 수일에 걸쳐 서서히 일어나며 이러한 세포사의 과정을 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)라고 한다. 지연성 신경세포사의 주요한 기전의 하나가 세포고사이다[16,18,19]. 하지만 짧은 시간이라도 심각한 산소 고갈 상태는 뇌신경세포의 세포괴사를 유발시킬 수도 있다[7]. 미토콘드리아는 ATP의 생성 외에도 세포내 Ca²⁺의 항상성 유지와 ROS 및 RNS의 생성을 담당한다[22]. 뇌허혈과 같은 흥분독성 상태에서는 미토콘드리아의 Ca²⁺ 조절에 과부하

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-1015, Fax : +82-51-510-1020

E-mail : heart@pusan.ac.kr

가 발생하고 ROS 및 RNS의 생성이 증가되며[26], 이로 인해 막투과성에 변화가 일어나 미토콘드리아의 막전위 (mitochondrial membrane potential, MMP)가 소실되어 ATP를 합성할 수 없게 되며, 이는 세포괴사와 세포고사를 유발하는 중요한 원인이 된다[22,28].

반하(半夏, *Pinelliae Rhizoma*; PR)는 천남성과에 속하는 다년생 초본인 끼무릇의 알뿌리를 7-8월에 채집하여 외피를 제거하고 햇빛에 말린 것으로 신온(辛溫)한 성질을 가진다. 조습화담(燥濕化痰), 소비산결(消痞散結), 강역지구(降逆止嘔)하는 효능이 있어, 습담옹체(濕痰壅滯), 해수기역(咳嗽氣逆), 결흉증(結胸證), 매핵기(梅核氣), 구토(嘔吐) 등에 활용되고 있으며[17], 특히 성향정기산(星香正氣散), 도담탕(導痰湯) 등 중풍(中風) 급성기의 처방(處方)에 사용된다[14]. 반하에 대한 실험적 연구로는 Oshio 등[25]의 반하의 진토활성성분에 대한 보고는 있으나, 저산소증을 유발한 배양한 대뇌신경세포에서 반하의 세포사 방지에 대한 연구는 없었다. 이에 본 연구에서는 저산소증을 유발한 흰쥐 대뇌신경세포에 반하를 전처리한 후 신경세포사 억제 효과를 관찰하고, 생성되는 ROS 양의 변화와 미토콘드리아의 막전위에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

약재 및 물추출액의 제조

실험에 사용된 반하는 대한약전 및 대한 약전의 한약(생약) 규격주해[15]에 근거하여 동국대학교 부속 한방병원에서 구입하였다. 반하(2 g)을 20 ml의 증류수에 넣어 균질화하고 4°C에서 18 시간 진탕하였다. 이를 15,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45 µm)한 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보관하였다. 건조물의량은 1 ml 추출액 3 튜브를 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

신경세포 배양

동물

임신 18일(embryonic day 18: E₁₈)의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대상으로 대뇌피질신경세포를 Brewer 등[4]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 5 분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1 mM sodium pyruvate와 10 mM HEPES (pH 7.4)가 첨가된 HBSS용액(Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen Life Technology) 5 ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1 ml HBSS용액으로 옮기고, 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 세포를 분산시켰다. 이후 분산된 세포의 밀도를 측정하는 다음 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 약 1,500 cells/mm²가 되도록 접종하여 5% CO₂ 배양조에서 배양하였다. 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, 37°C 환경에서 3 시간 처리하여 저산소증을 유발하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양세포를 정상산소 환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

LDH assay

배양 12일(12 day *in vitro*: DIV 12)에 반하를 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 µg/ml의 농도별로 처리하고 2일간 배양한 후 DIV 14에 저산소증을 유발하였다. 저산소증 유발 후 3일에 배양액 20 µl를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate (NADH 1 mg/ml)를 20 µl씩 가한 다음, 상온에서 2 분간 혼든 후 37°C에서 30 분간 더 혼들었다. 발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20 µl씩 가하고 상온에서 20 분간 혼든 후 0.4 N NaOH를 100 µl씩 가하고 상온에서 15 분간 더 혼든 다음, ELISA reader로 흡광도(ABS₄₅₀)를 측정하였다.

Trypan blue 염색

0.4% trypan blue (Sigma, T-8154; in 0.81% NaCl and 0.06% 2HPO₄)를 이용하여 죽은 세포를 염색하고 현미경으로 관찰하였다. DIV 12에 반하를 2.5 µg/ml의 농도로 전처리하고 2일간 배양하고 DIV 14에 저산소증을 유발하였다. 저산소증 유발직전과 유발 후 1 시간, 3 일, 5 일에 각각 trypan blue로 염색하여 세포 생존율을 조사하였다. Trypan blue 처리 전에 세포를 feeding neurobasal media로 세척하였다. 0.4% trypan blue 용액과 HBSS용액을 1:1로 섞어 각 well에 500 µl씩 처리해준 후 10 분간 배양조에서 배양하였다. HBSS용액 1 ml로 4~5회 세척한 다음 현미경으로 관찰하였다.

Mitochondrial membrane potential(MMP) 관찰

MMP는 형광 색소인 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1)를 사용하여 관찰하였다. DIV 12에 반하 2.5 µg/ml를 전처리하고 2 일간 배양한 후 저산소증을 유발하기 직전과 유발 후 1 일, 3 일, 5 일에 각각 염색하였다. JC-1 처리 전에 세포를 feeding neurobasal media로 세척하였다. JC-1을 최종농도 1 ng/ml가 되도록 배양액에 넣고 20분 동안 CO₂ 배양조에서 배양시킨 후 feeding neurobasal media로 두 번 세척한 다음 형광현미경으로 관찰하였다. JC-1은 DMSO에 0.5 mg/ml로 stock을 만들고 이를 feeding neurobasal media로 2,000배 희석하여(1 ng/ml) 세포에 처리하였다.

활성산소(ROS) 및 활성질소(RNS) 생성세포 염색

ROS 및 RNS 생성세포는 형광 색소인 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)를 사용하여 관찰하였다. DIV 12에 반하 2.5 µg/ml로 전처리하고 2 일간 배양한 후 저산소증을 유발하기 직전과 유발 후 1 시간, 1 일, 3 일에 각각 염색하였다. H₂DCF-DA 처리 전에 세포를 feeding neurobasal media로 세척하고, H₂DCF-DA를 최종 농도 10 nM이 되도록 배양액에 넣고 10 분 동안 CO₂ 배양조에서 배양시켰다. 이를 feeding neurobasal media로 두 번 세척한 다음 형광 현미경으로 관찰하였다. H₂DCF-DA는 dimethylsulfoxide (DMSO)로 50 mM의 stock을 만들고 이를 feeding neurobasal media로 5,000배 희석하여 10 nM 농도로 세포에 처리하였다.

이미지 처리 및 신호강도(signal intensity) 측정

염색된 세포를 CCD camera (Photometrics Inc., Germany)가 장착된 형광현미경(Leica Re search Microscope DM IRE, Germany)으로 관찰하였으며, QFluoro version V1.0b software (Leica Microsystems AG, Germany)를 이용하여 digital image를 얻었다. 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, USA)를 이용하여 2D rolling mode로 background subtraction을 한 다음 singal intensity를 측정하였다. MMP 측정의 경우 particle를 minimum pixel 5로 정의하고 mean intensity를 측정하였다.

결과 및 고찰

저산소증에서 반하가 신경세포사에 미치는 영향

LDH는 세포의 손상을 측정하는 효소로[23], LDH를 포함한 조직이 파괴될 때 혈중으로 흘러나와 혈중 농도가 상승되며, 특히 심근경색, 간질환, 중추신경 계통 등의 진단과 세포독성의 확인 등[2]에 사용되고 있다. DIV 12에 반하를 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 µg/ml의 농도별로 전처리하고 2 일간 더 배양한 후 저산소증(2% O₂/5% CO₂, 37°C, 3 hr)을 유발하고, 3 일 후에 LDH assay 방법으로 세포 생존율을 조사하였다. 그 결과 실험군은 1.0, 2.5 µg/ml 농도에서 각각 110.7% 및 115.9%의 생존율을 보여 대조군에 비해 매우 유의한 증가(p<0.01)를 보였다(Fig. 1). 저산소증에서 시간에 따른 반하의 효과를 알아보기 위하여 같은 방법으로 2.5 µg/ml의 농도로 반하를 전처리하고 저산소증을 유발 직전과 유발 후 1 시간, 3 일, 5 일에 세포 생존율을 tryphan blue staining 방법으로 조사하였다. 저산소증 유발 직전의 경우 실험군은 생존율이 85.2%로서 대조군 76.2%에 비하여 매우 유의한 증가(p<0.01)를 보였다. 저산소증 유발 후 1 시간에는 별 차이를 보이지 않았지만 3 일,

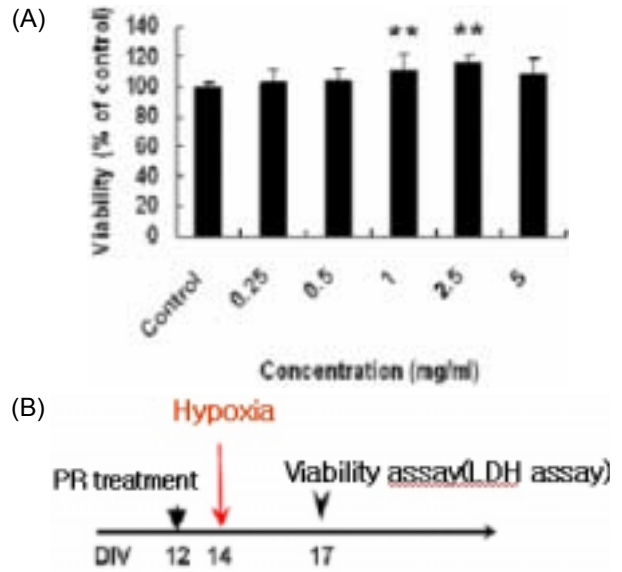


Fig. 1. Determination of optimal concentration for neuro-protective effect of PR in hypoxia (LDH assay). PR was added at the indicated concentrations to cortical cultures on DIV 12. Cells were given hypoxic shock on DIV 14, and cell viability was assayed on DIV 17 by lactase dehydrogenase (LDH) in the medium. A, LDH assay. **, p<0.01. B, Experimental scheme. *PR: *Pinelliae Rhizoma*

5 일 후에는 각각 10.2%, 17.8%로 매우 유의한 증가(p<0.01)를 보였다(Fig. 2).

이상의 결과에서 살펴보면 반하를 전처리한 실험군에서 저산소증에서 2.5 µg/ml까지 농도 의존적으로 세포생존율이 증가되었으며(115.9%), 그 이상의 농도에서는 감소되었다. 또한 저산소증 유발 후 1 시간에는 대조군과 차이가 없다가, 시간이 흐르면서 점점 반하의 효능이 높게 나타남을 보여주었다. 저산소증 유발 직후 곧바로 사망하는 세포들은 괴사에 의한 것으로 알려져 있기 때문에 반하는 괴사에 의한 급성 세포사는 억제할 수 없지만 괴사 과정에 의한 지연성 세포사에는 유의한 효능을 나타내는 것으로 해석된다. 이러한 해석을 뒷받침하는 증거로서 저산소증 유발 3 일 및 5 일 후에는 핵이 농축되어 작아진 세포들을 흔히 볼 수 있었다. 이는 세포괴사의 특징으로 반하를 전처리한 실험군에서는 이러한 세포수가 현저히 낮았다.

저산소증에서 반하가 MMP에 미치는 영향

MMP는 미토콘드리아의 내외막의 이온 구성 차이에 따라 가지게 되는 일정한 전압차를 말한다[5]. 높은 MMP는 미토콘드리아에서 ATP를 생산하는 원동력으로 MMP의 소실은 곧 세포 손상과 직결된다[27]. 또한 근래에는 미토콘드리아의 ATP 생산 외에도, 세포내 Ca²⁺의 항상성 유지와 ROS 및 RNS 생산 등의 역할들이 밝혀지면서[26] 세포사에 있어서 미토콘

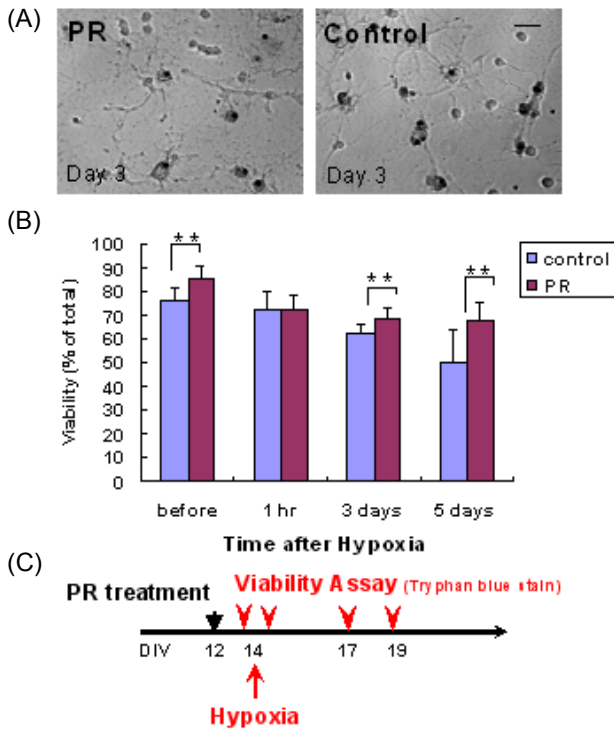


Fig. 2. Time sequence neuroprotective effect of PR in hypoxia (Trypan blue-staining). PR was added at 2.5 μ g/ml to cortical cultures on DIV 12. Cells were given hypoxic shock on DIV 14, and cell viability was assayed by trypan blue staining. A, Phase contrast images after trypan blue staining. B, Statistics. **, $p < 0.01$. C, Experimental scheme.

드리아의 중요성이 부각되고 있다[10]. 뇌신경세포 손상으로 세포내 Ca^{2+} 의 과량유입, oxidant chemicals의 불균형이 발생하면 MMP 소실, 전자전달계인 호흡사슬의 와해, ROS 과잉생산, 미토콘드리아 막 사이 단백질 용해 및 세포내 Ca^{2+} 과 glutathion 과다유입 등 미토콘드리아의 복합적인 기능부전이 발생하여 세포사가 유발된다[21,24]. 미토콘드리아에서 생산된 ROS 및 RNS는 미토콘드리아에 작용하여 새로운 산화 스트레스로 작용하게 된다[6]. 따라서 세포사 과정에서 ROS 및 RNS의 생성을 감소시켜 산화적 스트레스와 질산화적 스트레스를 억제하게 되면 MMP가 유지될 것이며, 이는 세포사를 방지하는 하나의 방법으로 제시될 수 있을 것이다.

JC-1은 낮은 농도에서는 monomer로 존재하여 녹색형광 (green fluorescence)을 내며, 높은 농도에서는 J-aggregate를 형성하여 넓은 범위의 흥분스펙트럼(broad excitation spectrum)을 나타내기 때문에 MMP를 측정하는 민감한 색소로 이용되고 있다. 에너지가 높은 MMP는 JC-1을 바탕질(matrix)로 유입한 후 J-aggregate를 형성하여 적색형광(red fluorescence)을 낸다. 따라서 MMP가 높게 유지되는 높은 활성도의 미토콘드리아는 형광현미경으로 관찰하면 적색형광을 낸다. DIV 12에 반하 2.5 μ g/ml를 전처리하고 2 일간 배양

한 후 DIV 14에 저산소증을 유발하였다. 저산소증 유발직전과 유발 후 1 일, 3 일, 5 일에 JC-1으로 염색하고 미토콘드리아의 염색강도를 측정하였다. 적색형광의 경우 반하는 전반적으로 대조군에 비하여 강하게 염색되는 미토콘드리아의 비율을 증가시켰다(Fig. 3C, Fig. 4C, Fig. 5C, Fig. 6C). 반면에 녹색형광의 경우 실험군은 대조군과 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3D, Fig. 4D, Fig. 5D, Fig. 6D). 이는 반하에 의하여 미토콘드리아 내막의 MMP가 높게 유지되고 있음을 의미한다.

저산소증에서 반하가 ROS 및 RNS의 생성에 미치는 영향 ROS와 RNS는 미토콘드리아 내막의 전자전달계효소들의

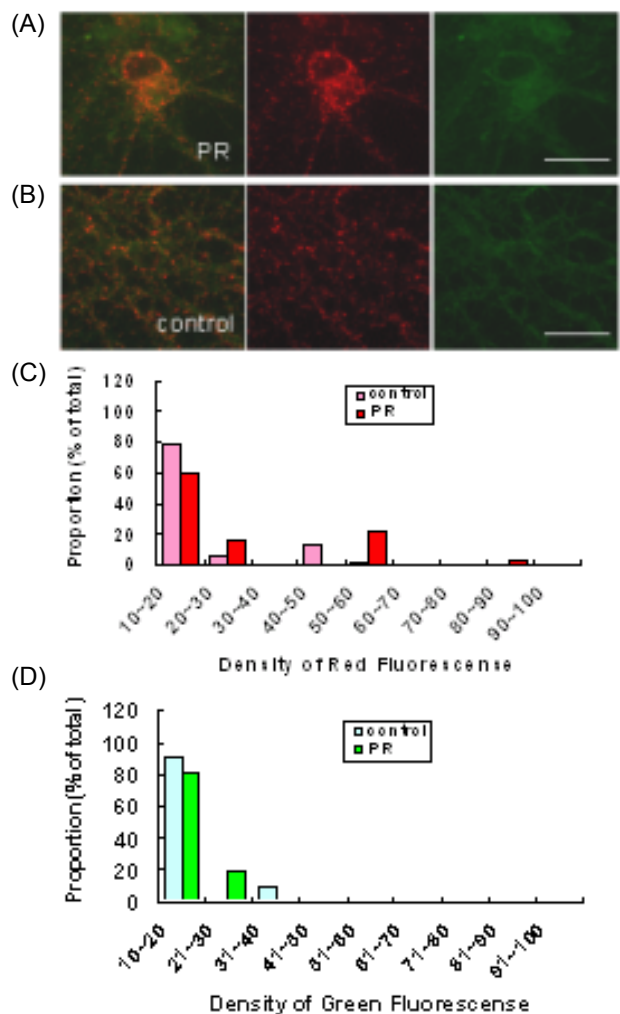


Fig. 3. Effects of PR on MMP in normoxia (before hypoxic shock). PR (2.5 μ g/ml) was added to cortical cultures on DIV 12. Cells were stained with JC-1 (1 ng/ml) on DIV 14 right before hypoxic shock. Examples of typical fluorescence image of sample (A) and control (B) cultures along with separate red and green images. Signal intensities were measured as described in Materials and Method. Distribution of spot densities were shown for red (C) and green (D) signals.

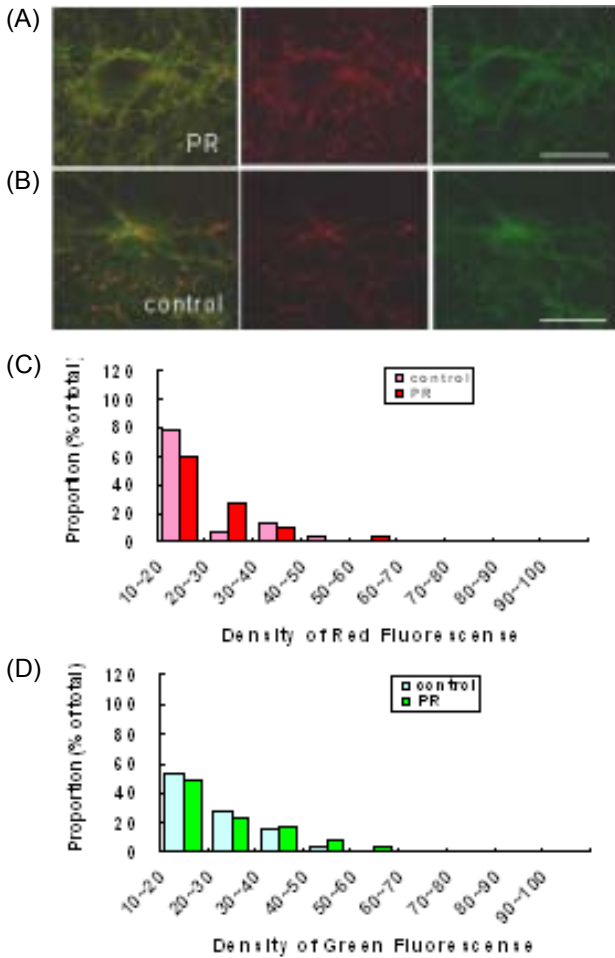


Fig. 4. Effects of PR on MMP in hypoxia (1 day after hypoxia shock). PR (2.5 $\mu\text{g/ml}$) was added to cortical cultures on DIV 12, and hypoxic shock was given on DIV 14. Cells were stained with JC-1 (1 ng/ml) on DIV 15. Examples of typical fluorescence image of sample (A) and control (B) cultures along with separate red and green images. Signal intensities were measured as described in Materials and Method. Distribution of spot densities were shown for red (C) and green (D) signals.

활성을 억제하여 MMP를 소실시켜 세포사를 유발하므로 저산소증에서 과도한 ROS와 RNS가 생성되면 이는 세포사의 중요한 원인이 된다[3,20]. 따라서 ROS와 RNS의 생성억제 혹은 신속한 제거는 세포사를 방지하는 중요한 기전으로 작용할 수 있다. 본 연구에서는 반하가 저산소증에서 ROS와 RNS에 미치는 영향을 형광물질인 H₂DCF-DA를 이용하여 조사하였다. H₂DCF-DA는 ROS 가운데 hydrogen peroxide (H₂O₂), peroxy radical 그리고 RNS인 peroxynitrite anion에 의하여 산화되어 녹색형광을 나타낸다. DIV 12에 반하 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 를 전처리하고 2일간 배양한 후 DIV 14에 저산소증을 유발하고 H₂DCF-DA로 염색하였다. 저산소증 유발 직전과 유발 후 1시간, 3일, 5일에 각각 염색한 결과, 반하는 전반적으로

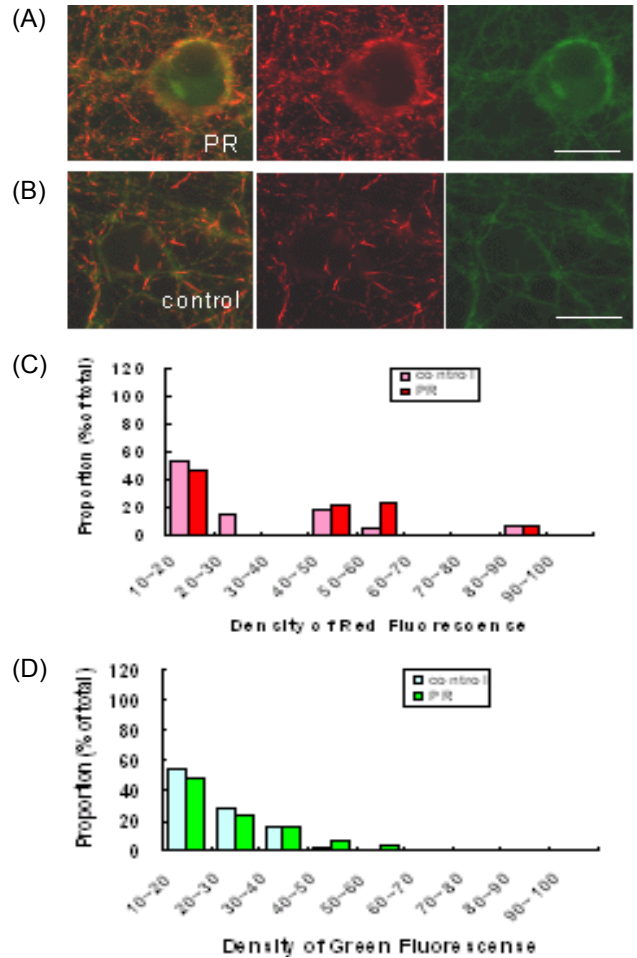


Fig. 5. Effects of PR on MMP in hypoxia (3 days after hypoxia shock). PR (2.5 $\mu\text{g/ml}$) was added to cortical cultures on DIV 12, and hypoxic shock was given on DIV 14. Cells were stained with JC-1 (1 ng/ml) on DIV 17. Examples of typical fluorescence image of sample (A) and control (B) cultures along with separate red and green images. Signal intensities were measured as described in Materials and Method. Distribution of spot densities were shown for red (C) and green (D) signals.

H₂DCF-DA에 염색되는 세포 비율을 현저하게 낮추는 것으로 나타났다. 실험군에서는 저산소증을 유발직전 즉, 정상산소 환경에서도 H₂DCF-DA에 염색되는 세포 비율이 7.1%로서 대조군 24.2%에 비하여 매우 낮았으며(Fig. 7C), 염색의 강도도 대조군에 비하여 현저하게 낮았다(Fig. 7D). H₂DCF-DA에 염색되는 세포 비율이 저산소증 유발 후 1시간, 3일, 5일 후에는 각각 5.4, 5.2, 7.4%로서 대조군 17.3, 14.2, 18.8%에 비하여 유의적으로 감소되었다(Fig. 8C, Fig. 8C, Fig. 10C). 또한 염색의 강도도 반하를 전처리한 실험군에서는 대조군에 비하여 현저히 낮았다(Fig. 8D, Fig. 9D, Fig. 10D). 저산소증 유발 후 시간별로 H₂DCF-DA에 염색되는 ROS 및 RNS 세포비율은 저산소증 유발 후 1시간, 3일, 5일에서 실험군과 대조군

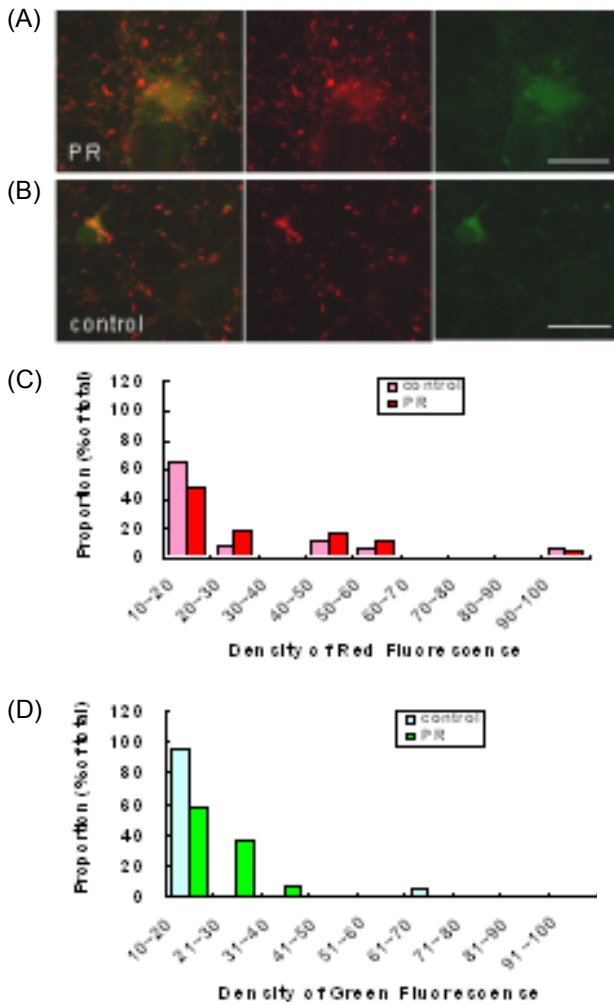


Fig. 6. Effects of PR on MMP in hypoxia (5 days after hypoxia shock). PR (2.5 $\mu\text{g/ml}$) was added to cortical cultures on DIV 12, and hypoxic shock was given on DIV 14. Cells were stained with JC-1 (1 ng/ml) on DIV 19. Examples of typical fluorescence image of sample (A) and control (B) cultures along with separate red and green images. Signal intensities were measured as described in Materials and Method. Distribution of spot densities were shown for red (C) and green (D) signals.

모두 유의성 있는 변화를 보였으며(Fig. 11A), 염색의 강도는 저산소증 유발 후 1 시간과 3 일에 매우 유의하게 나타났다(Fig. 11B).

반하를 전처리한 실험군에서는 전반적으로 녹색형광을 내는 세포들의 수가 매우 적었으며, 대조군에 비하여 형광의 강도도 매우 유의하게 낮았다. 저산소증을 유발시키기 전에는 대조군과 실험군 모두에서 강한 형광을 내는 세포의 빈도는 높지 않았다. 그러나 대조군에서는 흔히 1~2 μm 크기의 반점 (spot)으로 염색되는 녹색형광이 세포질과 신경세포가지를 따라 흩어져 나타났다. 이를 MMP 결과와 비교해 보면 그 분포와 크기로 보아 미토콘드리아로 추정할 수 있다. 특이한 점은

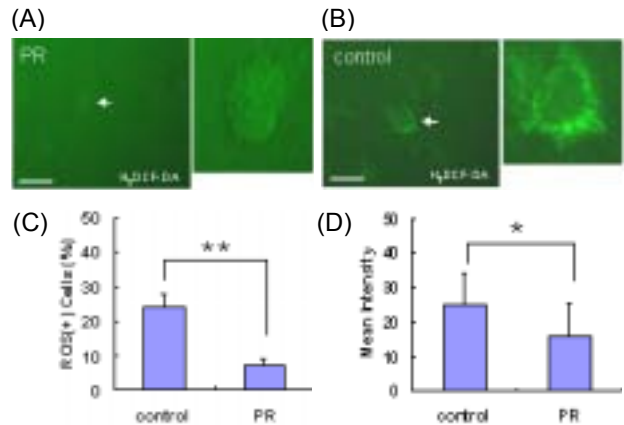


Fig. 7. Effects of PR against ROS and RNS generation (before hypoxic shock). PR (2.5 $\mu\text{g/ml}$) was added to cortical cultures on DIV 12. Cells were given hypoxic shock on DIV 14, and stained with H₂DCF-DA (10 nM) on right before hypoxic shock. Typical ROS and RNS-generating (ROS(+)) cells (arrows) are shown enlarged in insets. A, PR-treated. B, control. C, Percentage of ROS(+) cells. **, $p < 0.01$. D, Relative intensity of staining. *, $p < 0.05$.

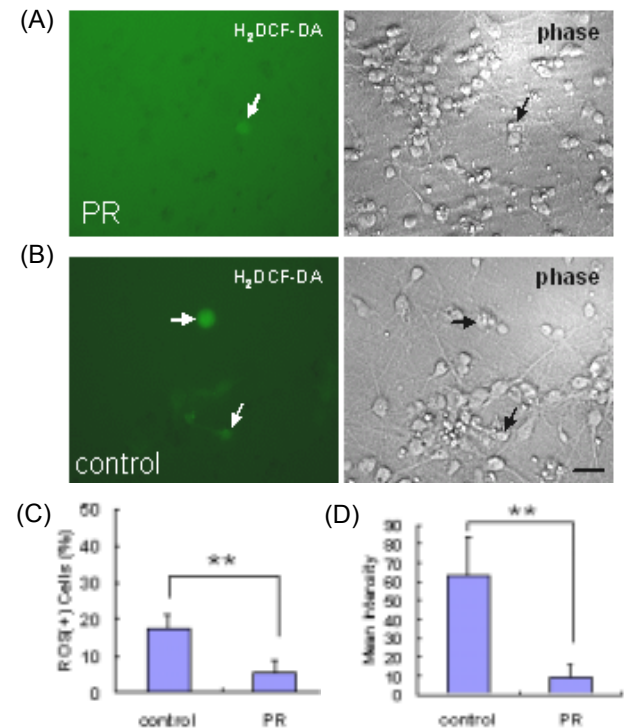


Fig. 8. Effects of PR against ROS and RNS generation (1 hr after hypoxic shock). PR (2.5 $\mu\text{g/ml}$) was added to cortical cultures on DIV 12. Cells were given hypoxic shock on DIV 14, and stained with H₂DCF-DA (10 nM) one hour after hypoxic shock. Fluorescence (H₂DCF-DA) and phase-contrast are shown side by side. ROS(+) cells are marked as arrows. A, PR-treated. B, Control. C, Percentage of ROS(+) cells. D, Relative intensity of staining. **, $p < 0.01$.

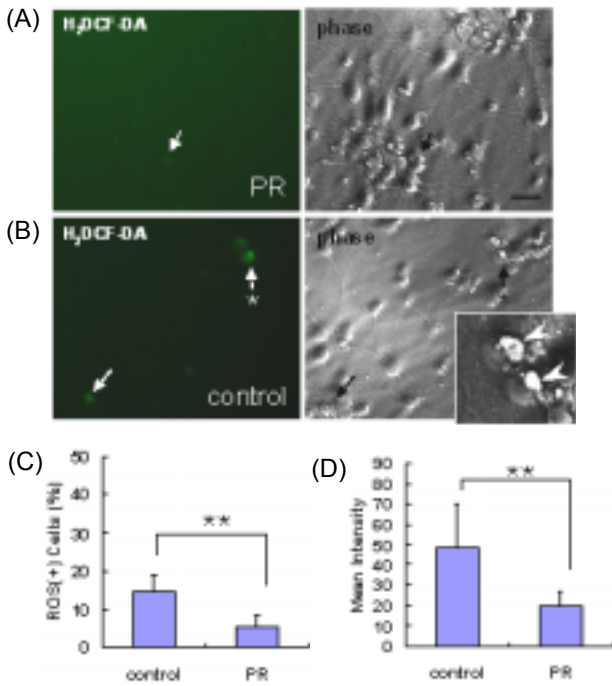


Fig. 9. Effects of PR against ROS and RNS generation (3 days after hypoxic shock). PR (2.5 μ g/ml) was added to cortical cultures on DIV 12. Cells were given hypoxic shock on DIV 14, and stained with H₂DCF-DA (10 nM) 3 days after hypoxic shock. Fluorescence (H₂DCF-DA) and phase-contrast are shown side by side. ROS(+) cells are marked as arrows. An arrow with asterisk indicates a characteristic cell with condensed nuclei and swollen soma, and shown enlarged in inset of B. A, PR-treated. B, Control. C, Percentage of ROS(+) cells. D, Relative intensity of staining. **, p<0.01.

이러한 반점을 보이는 신경세포가 반하를 전처리한 실험군에서는 거의 찾아보기 힘들었다. 이는 반하에 의하여 미토콘드리아에서 생성되는 ROS 및 RNS가 현저히 줄어들었음을 의미한다. 저산소증 유발 이후에도 실험군에서는 강한 형광을 내는 세포를 찾아내기 힘들었다. 반면 대조군에서는 형광세포의 빈도도 높았고, 강도도 실험군에 비하여 현저히 높았다. 특히 강도의 차이는 저산소증 유발 후 1 시간에 가장 컸는데, 이는 저산소증 유발 직후에 ROS 및 RNS가 가장 많이 생성되며 이 시기에 반하가 ROS 및 RNS의 생성을 현저하게 억제시켜 결국 세포사 억제 효능을 갖는 것으로 해석된다.

요 약

본 연구는 저산소증에서 반하가 대뇌신경세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 E18의 배양 흰쥐 대뇌신경세포를 반하로 전처리한 후, LDH assay와 trypan blue 염색으로 세포 생존율을 측정하였고, H₂DCF-DA, JC-1 염색으로 MMP, ROS 및 RNS 변화를 조사하였다. 이에 반하는 저산소증으로 유발

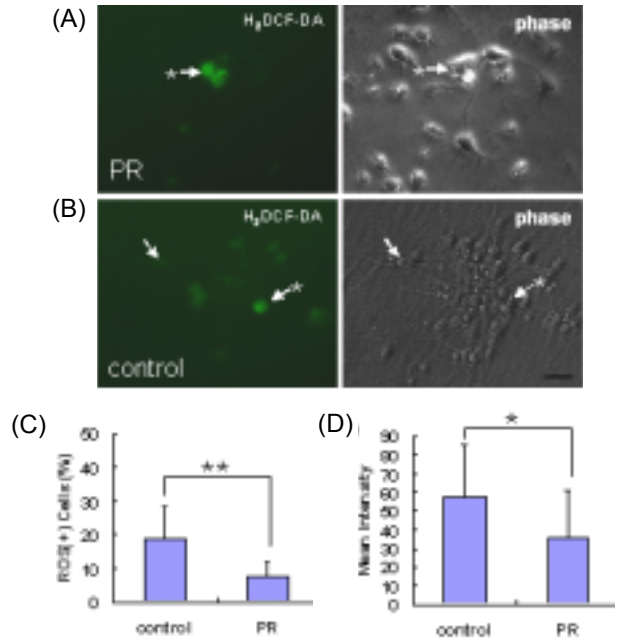


Fig. 10. Effects of PR against ROS and RNS generation (5 days after hypoxic shock). PR (2.5 μ g/ml) was added to cortical cultures on DIV 12. Cells were given hypoxic shock on DIV 14, and stained with H₂DCF-DA (10 nM) 5 days after hypoxic shock. Fluorescence (H₂DCF-DA) and phase-contrast are shown side by side. ROS(+) cells are marked as arrows. An arrow with asterisk indicates a characteristic cell with condensed nuclei and swollen soma. A, PR-treated. B, Control. C, Percentage of ROS(+) cells. **, p<0.01. D, Relative intensity of staining. *, p<0.05.

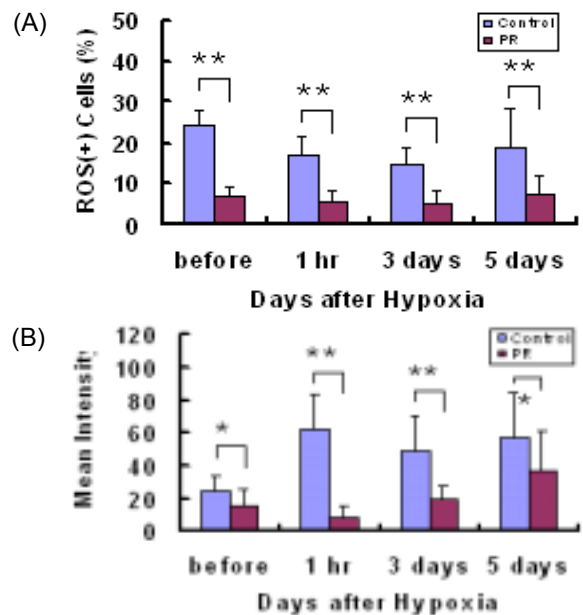


Fig. 11. Summary of Effects of PR against ROS and RNS generation. A, Percentage of ROS(+) cells. **, p<0.01. B, Relative intensity of staining. **, p<0.01. *, p<0.05.

된 대뇌신경세포를 2.5 µg/ml까지 농도의존적으로 세포 생존률을 증가시켰으며, 시간에 따른 생존율을 살펴보면 저산소증 유발 후 1 시간에는 별 차이를 보이지 않았지만 3 일, 5 일 후에는 각각 10.2%, 17.8%로 매우 유의한 증가를 보였다. 저산소증에서 반하가 MMP에 미치는 영향을 보기 위해 저산소증 유발직전과 유발 후 1 일, 3 일, 5 일에 JC-1으로 염색하고 미토콘드리아의 염색강도를 측정 한 결과 적색형광은 실험군에서 전반적으로 대조군에 비하여 강하게 염색되는 미토콘드리아의 비율을 증가시킨 반면 녹색형광은 대조군과 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 즉 반하가 저산소증으로 유발된 MMP의 소실을 감소시킴을 알 수 있다. 또한 반하는 전반적으로 H₂DCF-DA에 염색되는 세포 비율을 현저하게 낮추는 것으로 나타나 저산소증으로 유발된 ROS 및 RNS의 생성을 유의성 있게 감소시켰다. 따라서 반하는 저산소증에서 ROS의 생성을 억제하고 MMP의 소실을 막아 세포의 에너지고갈을 방지함으로써 신경세포를 보호하는 것으로 이해된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Andreadis, A. A., S. L. Hazen, S. A. A. Comhair, and S. C. Erzurum. 2003. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 213-225.
- Arechabala, B., C. Coiffard, P. Rivalland, L. J. Coiffard, and Y. de Roeck-Holtzhauer. 1999. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J. Appl. Toxicol.* **19**, 163-165.
- Beltran, B., A. Mathur, M. R. Duchon, J. D. Erusalimsky, and S. Moncadan. 2000. The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14602-14607.
- 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**, 567-676.
- Evenson, D. P., Z. Darzynkiewicz, and M. R. Melamed. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.* **30**, 279-280.
- Fleury, C., B. Mignotte, and J. L. Vayssiere. 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie.* **84**, 131-141.
- Friedman, J. E. and G. G. Haddad. 1993. Major differences in Ca²⁺, response to anoxia between neonatal and adult rat CA1 neurons: role of Ca²⁺ and Na⁺. *J. Neurosci.* **13**, 63-72.
- Fubini, B. and A. Hubbard. 2003. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1507-1516.
- Fuh, Jr., S. J. Wang, E. B. Larson, and H. C. Liu. 1996. Prevalence of stroke in kinmen. *Stroke.* **27**, 1338-1341.
- Halestrap, A. P., P. M. Kerr, S. Javadov, and K. Y. Woodfield. 1998. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim. Biophys. Acta.* **1366**, 79-94.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge. 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* **8**, 89-193.
- Hansen, A. 1977. Extracellular potassium concentration in juvenile and adult brain cortex during anoxia. *Acta Physiol. Scand.* **99**, 412-420.
- Heales, S. J., J. P. Bolanos, V. C. Stewart, P. S. Brookes, J. M. Land, and J. B. Clark. 1999. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1410**, 215-228.
- Hoe, J. 1999. Dong-Eui-Bo-Gam. pp. 965, 961, 1955, Byuinmoonhwasa, Seoul.
- Ji, H. J. and S. I. Lee. 2007. Hanyack-Gyugyuk-Juhea. pp. 329, Korean index Co., Seoul.
- Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-245.
- Kim, H. C. 2001. Pharmacology of Korea. pp. 346-347, Jipmoondang, Seoul.
- Kirino, T. 1982. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* **239**, 57-69.
- Kirino, T., A. Tamura, and K. Sano. 1985. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Prog. Brain Res.* **63**, 39-58.
- Kirkeby, O. J., S. Kutzsche, C. Risoe, and I. R. Rise. 2000. Cerebral nitric oxide concentration and microcirculation during hypercapnia, hypoxia, and high intracranial pressure in pigs. *J. Clin. Neurosci.* **7**, 531-538.
- Kroemer, G., B. Dallaporta and M. Resche-Rigon. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 619-642.
- Lemasters, J. J., T. Qian, C. A. Bradham, D. A. Brenner, W. E. Cascio, L. C. Trost, Y. Nishimura, A. L. Nieminen, and B. Herman. 1999. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *Bioenerg. Biomembr.* **31**, 305-319.
- Lobner, D. 2000. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis. *J. Neurosci. Methods* **96**, 147-152.
- Nieminen, A. L. 2003. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int. Rev. Cytol.* **224**, 29-55.
- Oshio, H., M. Tsukui, and T. Matsuoka. 1978. Isolation of l-ephedrine from "pinelliae tuber". *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **26**, 2096-2097.
- Rego, A. C. and C. R. Oliveira. 2003. Mitochondrial

- dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* **28**, 1563-1574.
27. Schild, L., J. Huppelsberg, S. Kahlert, G. Keilhoff, and G. Reiser. 2003. Brain mitochondria are primed by moderate Ca²⁺ rise upon hypoxia · reoxygenation for functional breakdown and morphological disintegration. *J. Biol. Chem.* **278**, 25454-25460.
28. Zamzami, N., T. Hirsch, B. Dallaporta, P. X. Petit, and G. Kroemer. 1997. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 185-193.
29. Zimmermann, K. C. and D. R. Green. 2001. How cells die: Apoptosis pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 99-103.