

1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP⁺)로 유도된 파킨슨병의 세포 손상에 대한 황백의 신경세포 보호효과

정영석, 정혜미, 서운교
동국대학교 한의과대학 내과학교실

Neuroprotective Effect of Methanol Extract of *Phellodendri Cortex* Against 1-methyl-4-Phenylpyridinium-induced Apoptosis in PC-12 Cells

Young-seok Jung, Hye-mi Jung, Un-kyo Seo

Dept. of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-guk University

ABSTRACT

Background and Objective : The prospects for developing an anti-apoptotic natural component or a compound that exerts a neuroprotective effect with few or no side effects for the treatment of neurodegenerative disease appear favorable. In the present study, we evaluated the effects of the methanol extract of *Phellodendri Cortex* (PC extract) on 1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP⁺)-induced apoptosis in PC-12 cells.

Materials and Methods : We used the methanol extract of *Phellodendri Cortex* (PC extract). PC-12 cells were cultured by RPMZ-1640. We found the PC extract's gene expression (Bax, Bcl-2) by using RT-PCR. We examined the PC extract's protein expression (Bcl-2, Bax, cytochrome c, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), caspase-3) by SDS-PAGE and Western blot.

Results : Apoptosis in MPP⁺-induced PC-12 cells was accompanied by an increased Bax/Bcl-2 ratio, release of cytochrome c to the cytosol and the activation of caspase-3. PC extract inhibited the down-regulation of Bcl-2 and the up-regulation of Bax, as well as the release of mitochondrial cytochrome c into the cytosol. In addition, PC extract attenuated caspase-3 activation and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP).

Conclusion : These results suggest that the neuroprotective potentials of PC extract against MPP⁺-induced apoptosis can be, at least partially, ascribed to its anti-apoptotic effects in PC-12 cells.

Key words : *Phellodendri Cortex*, Parkinson's disease, PC-12 Cell, MPP⁺

1. 緒 論

최근 노인 인구의 급증과 더불어 다양한 신경 퇴행성 뇌질환(neurodegenerative disorders) 환자의 증가로 이에 대한 치료와 예방에 관심이 고조되고

있다¹. 신경 퇴행성 뇌질환은 신경의 퇴행성 변화로 인해 운동장애, 기억장애, 인지장애 등 여러 가지 병증을 유발하는 질병으로, 이 중 파킨슨병은 뇌 흑색치밀부(substantia nigra pars compacta: SNpc)의 멜라닌 색소를 함유한 도파민 신경의 세포 사멸과 선조체(striatum)의 도파민 결핍으로 인해 진전(tremor), 운동완서(bradykinesia), 근육경직(rigidity), 비정상적 자세(postural instability), 운동 불능(akinesia) 등의 증상을 나타내는 질환으

· 교신저자: 서운교 경기도 성남시 분당구 수내3동 87-2
동국대학교 분당한방병원 2내과
TEL: 031-710-3751 FAX: 031-710-3780
E-mail: high418@hanmail.net

로 알려져 있다^{2,3}.

파킨슨병의 현재까지 치료 방법은 주로 도파민 전구물질인 L-dopa를 투여하여 도파민을 보충하는 방법을 사용하였으나, 많은 임상 연구에서 지속적인 L-dopa의 사용이 심각한 부작용을 초래하는 것으로 알려져^{4,5}, 최근에는 파킨슨병의 발병원인과 도파민신경 세포의 사멸기전에 관련된 인자들에 대한 연구를 통하여 파킨슨병을 예방하고 병의 진행을 완화시킬 수 있는 새로운 치료법 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다^{5,6}.

파킨슨병에 관한 연구들은 신경독을 사용하여 만든 모델에서 주로 수행되고 있는데 특히 catecholamine성 신경만을 선택적으로 파괴하는 것으로 알려진 6-hydroxydopamine (6-OHDA)와 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)이 널리 사용되며, MPTP의 대사물인 MPP⁺는 도파민 신경세포의 사멸을 유발하는 물질로 알려져 있으며 파킨슨병의 세포 실험에서 신경 독성 물질로 사용되고 있다^{7,8}.

황백(黃柏: *Phellodendri Cortex*)은 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱의 효능이 있다고 알려져 있다⁹. 황백에 대한 실험 연구로는 김 등¹⁰의 활성산소 제거 및 지질과산화 억제효과에 대한 연구, Mori 등¹¹의 면역반응 조절에 대한 연구, 박 등¹²의 신경 퇴행성 뇌질환에서 염증을 유발하는 신경교세포의 활성 억제에 대한 연구, Uchiyama 등¹³의 약물로 유발된 케양 억제에 대한 연구 및 김 등¹⁴의 대식세포에서 염증 반응 억제에 대한 연구 등이 보고되어 있다. 그러나, 현재까지 황백의 도파민 신경세포 손상에 대한 방어효과와 관련된 약리적 작용에 관한 연구는 보고되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 도파민 신경 세포인 PC-12 cell에서 독성 물질인 MPP⁺를 통해 유발되는 신경세포 손상으로부터 황백 추출물의 신경보호효과 및 세포사멸을 방어하는 기전에 대한 연구를 수행하였다.

II. 實驗

1. 材料

1) 藥材

실험에 사용된 황백은 영천(경북)에서 유통되는 국산한약재로서 (주)광평당제약(울산, 한국)으로부터 원료시험을 통과한 것을 구입하여 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 검정하고 정선한 것을 사용하였다.

2) 시약

Hoechst 33342, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenylterazolium bromide (MTT), 1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP⁺), dimethyl sulfoxide (DMSO), anti-β-actin monoclonal antibody(mAb), skim milk 등은 Sigma社(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS), RPMI-1640 배지는 HyClone社(Logan, UT, USA) 제품을 사용하였으며, penicillin/streptomycin 용액과 trypsin-EDTA는 Gibco BRL社(Div. of Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. Improm-IITM reverse transcriptase와 PCR Taq-polymerase kit는 Promega社(Madison, WI 53711, USA)에서 구입하였으며, Affinity-purified goat anti-mouse bcl-2, bax, caspase-3 p17 antibodies, anti-rabbit/ anti-mouse IgG는 Santa Cruz Biotechnology社(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, affinity-purified rabbit anti-mouse cytochrome c antibody는 BD Pharmingen社(BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 제품을 사용하였고, rabbit anti-mouse PARP antibody는 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Nitrocellulose membrane, ECL Western detection reagent, protein assay solution, 30% acrylamide solution 등은 Amersham Bioscience社(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였고, X-ray film과 develop solution은 Kodak社(Burnaby, British Columbia, CA)에서 구입하여

사용하였다.

3) 기 기

실험에 사용되어진 기기는 Microplater Reader (Asys, Sunnyvale, CA, USA), Deep-freezer Advantage (Queue, USA), Rotary Evaporator(Eyela, Japan), Thermal Cycler (BioRad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA), Orbital Shaker(Finemould Precision IN, Co, Gyeonggi-do, Korea), BioDoc It™ Imaging System(UVP, Cambridge, UK), Western Blot System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), UV-VIS Spectrophotometer (Shimazu, Japan), CO₂ incubator(Thermo Electron Corporation, NH, USA), fluorescence microscopy(Olympus Imaging America Inc, Center Valley, PA 18034-0610, USA) 등이다.

2. 方法

1) 황백 추출물의 제조

건조한 황백(*Phellodendri Cortex*)의 수간피(500 g)를 2 L의 80% 메탄올(MeOH)과 함께 60°C에서 3시간 동안 3회 추출하였다. 추출액을 2겹 여과지와 Wathman filter paper로 여과하여 회전식 증발기(rotary evaporator)에서 감압·농축한 다음 동결·건조하였다. 건조된 황백 추출물의 수득량은 87.5 g이었으며, 수율(yield)은 17.5%로 나타났다. 건조된 황백 추출물은 냉동보관하며, 세포실험 직전에 DMSO에 완전히 녹여서 사용하였다. 이때 DMSO는 세포 생존에 영향을 주지 않도록 세포 배양액에서 0.01% 이하의 농도 유지 되도록 사용하였다.

2) 세포 배양

흰쥐(rat)의 크롬친화성 세포이자 교감신경세포인 PC-12 cell은 American Type Culture Collection(ATCC, The Global Bioresorce Center™, VA, USA)으로부터 구입하였으며, 10% horse serum과 5% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 RPMI-1640 배지(complete medium)를 배양액으로 하여 5% CO₂, 37°C배양기에서 배양하였다.

3) 세포 생존율 측정

PC-12 cell(2.5×10^4 cells/well)을 96-well culture plate에 RPMI complete medium 0.1 ml과 함께 하룻밤 배양한 다음, 다양한 농도(10~30 $\mu\text{g/ml}$)의 황백 추출물을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 또한 MPP⁺에 대한 세포 독성을 조사하기 위하여 다양한 농도(10~100 μM)의 MPP⁺를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 well에 MTT 용액(0.5 mg/ml)을 10 μl 씩 첨가하여 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 후 배양액을 제거하고 보라색의 formazan 결정을 용해하기 위해 0.1 ml의 DMSO 용액을 첨가하여 30 분간 반응하였다. 이를 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조군에 대한 세포 생존율(cell viability) 100%를 기준으로 약물 처리군의 세포 생존율을 계산하였다.

4) 세포 형태변화 관찰

MPP⁺에 의해 세포에 손상이 가면 세포 사멸이 일어나게 되어 핵의 형태적인 변화가 관찰되는데 이를 확인하기 위하여 염색질에 특이적 염색 시약인 Hoechst 33342를 사용하여 세포를 염색 하였다. 즉, PC-12 cell(2.5×10^4 cells/well)을 3 cm culture dish에 RPMI complete medium 3 ml과 함께 하룻밤 배양한 다음, 다양한 농도(10~30 $\mu\text{g/ml}$)의 황백 추출물을 2시간 동안 전처리(pre-treatment)하였다. 여기에 MPP⁺ 70 μM 을 첨가하여 다시 24시간 동안 배양하였으며, 세포를 수거하여 4% paraformaldehyde 용액에서 20분간 고정하였다. 이를 0.02 mol 1x phosphate buffered saline(PBS)으로 3번 세척한 후 암실 조건에서 Hoechst 33342 용액을 10 $\mu\text{g/ml}$ 넣어 10분간 실온에서 반응시켰다. 이를 형광 현미경에서 200× 배율로 관찰하였다.

5) 유전자 발현 조사

PC-12 cell에서 mitochondria로부터 cytochrome c의 분비를 유도함으로써 세포사멸을 유도하는 pro-apoptotic molecule인 bax와 이를 막는 anti-apoptotic molecule인 bcl-2의 유전자 발현에 대한

황백 추출물의 효과를 조사하기 위해 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 수행하였다. PC-12 cell(2×10^5 cells/ml)을 3 cm culture dish에 하룻밤 배양하고 다양한 농도(10~30 $\mu\text{g/ml}$)의 황백 추출물을 처리하여 2시간 동안 배양하였다. 여기에 MPP⁺ 70 μmol 을 처리하여 24시간 동안 배양함으로써 세포 사멸을 유도하였다. 각 세포를 수거하여 5,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 cell pellet으로부터 TRIzol 시약을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA(1 μg)에 oligo-(dT) primer와 Improm-IITM reverse transcriptase를 이용하여 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분 조건으로 cDNA를 합성하였다.

합성된 cDNA에 대한 유전자 증폭반응(PCR)을 수행하기 위해 위에서 mRNA로부터 합성된 cDNA(1 μg)에 specific primers(10 pmol) 1 μl , 10 \times buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μmol dNTP, 1U *Taq* polymerase 등을 혼합한 후 denaturation을 위해 94°C에서 30초, annealing을 위해 55-60°C에서 30초 및 extension을 위해 70°C에서 60초의 조건에서 30-35 cycles을 수행하였다.

PCR 반응의 표준 대조군(internal house keeping gene)로 GAPDHs를 사용하였다. PCR을 위해 사용된 specific primers는 Table 1에 기술하였다.

Table 1. Primers for PCR in PC12 cells

Primers		Sequences				
bcl-2	Sense	5'-CAC	CCC	TGG	CAT	CTT
	Antisense	5'-GTT	GAC	GCT	CCC	CAC
bax	Sense	5'-GCA	GGG	AGG	ATG	GCT
	Antisense	5'-TCC	AGA	CAA	GCA	GCC
GAPDH	Sense	5'-CTC	GTG	GAG	TCT	ACT
	Antisense	5'-GTC	ATC	ATA	CTT	GGC

6) 단백질 발현 조사

PC-12 cell로부터 세포사멸 관련 단백질들인 bcl-2, bax, cytochrome c, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), caspase-3 등의 발현에 대한 황백 추출물의 효과를 조사하기 위해 단백질 발현 조사 방법인 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)와 Western blot을 수행하였다. 즉, PC-12 cell(2×10^5 cells/ml)을 3 cm culture dish에 다양한 농도(10~30 $\mu\text{g/ml}$)의 황백 추출물을 처리하여 2시간 동안 배양하였다. 여기에 MPP⁺ 70 μmol 을 처리하여 24시간 동안 배양함으로써 세포 사멸을 유도하였다. PC-12 cell을 수거하여 1 \times ice-cold PBS로 두 번 세척한 다음 lysis buffer(1 mol Tris-HCl, 5 mol NaCl, 0.5% Triton X-100, protease inhibitor cocktail) 100 μl 를 넣어 세포를 완전히 용해(lysis)시켰다. 이를 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 회수한 다음, Bradford protein assay 용액과 bovine serum albumin(BSA) 표준 용액을 이용하여 단백질 양을 정량하였다. 분리된 단백질 중 20 μg 의 단백질을 10% polyacrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였으며, 이후 gel을 분리하여 nitrocellulose(NC) membrane에 옮기고 (transfer), 5% skim milk로 실온에서 1시간 동안 membrane을 blocking 하였다. 각 membrane에 표적 단백질에 대한 일차항체(primary antibody)를 150 mM NaCl과 0.5% Tween-20이 첨가된 10 mM Tris-HCl(TBS-T) 용액으로 희석하여(1:3000) 넣은 후 4°C에서 하룻밤 반응하였다. 다음날, membrane을 TBS-T 용액으로 3회 세척하고 TBS-T로 희석된(1:5000) horseradish peroxidase-conjugated 이차항체(secondary antibody)를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 TBS-T로 3회 세척한 다음 enhanced chemiluminescence detection system을 이용하여 X-ray film에 감광시켰다. 각 단백질의 발현양을 비교하기 위해 대조군으로 house keeping protein인 β -actin에 대한 일차항체를 이용하여 위와 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

7) 통계

모든 실험 결과는 3회 반복실험에 대한 평균±표준오차(standard error of mean: SEM)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 SPSS로 검정하여 p 값이 ≤ 0.05 인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 結果

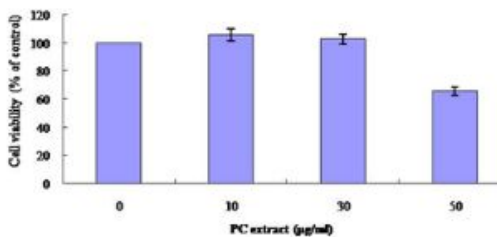
1. MPP⁺로 유도된 세포독성에 대한 황백 추출물의 세포 증식 효과

세포생존율(cell viability: %)을 측정한 결과, 10~30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 황백 추출물의 PC-12 cell에 대한 독성은 대조군 100%를 기준으로 각각 $105.06 \pm 2.89\%$ 와 $102.12 \pm 3.16\%$ 로 측정되어 독성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 1A).

한편, MPP⁺에 의한 세포 독성을 측정한 결과, 70 μmol MPP⁺를 24시간 처리한 세포에서는 세포 생존율이 $80.21 \pm 2.24\%$ 로 세포만 배양한 경우에 비해 20% 정도 감소하였다(Fig. 1B).

또한, MPP⁺에 의한 세포 생존도 감소에 대한 황백 추출물의 증식 효과를 조사한 결과, 10 $\mu\text{g/ml}$ 과 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 황백 추출물을 70 μmol MPP⁺에 의해 세포 생존율이 감소한 PC-12 cell에 처리 하였을 때, 각각 $89.57 \pm 2.96\%$ 와 $92.90 \pm 2.60\%$ 로 측정되어 기준값보다 각각 약 9.3%, 약 12.7% 정도 증가하였다(Fig. 1B).

A



B

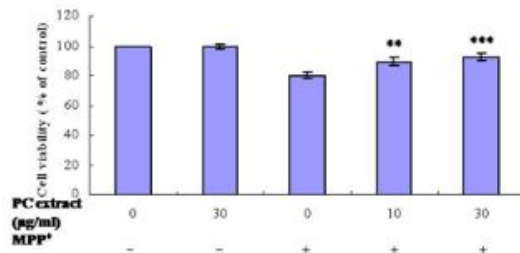


Fig. 1. Cytotoxic effect and protective effect of the methanol extract of *Phellodendri cortex* (PC) in PC-12 cells.

(A) The cells were treated with different concentrations of PC for 24h, after which the cell viability was measured by MTT assay. (B) PC-12 cells were pre-treated for 2h with 10 or 30 $\mu\text{g/ml}$ PC extract prior to exposure to 70 μM MPP⁺ for 24h. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. MPP⁺ alone.

2. MPP⁺로 유도된 세포 핵 변화에 대한 황백 추출물의 효과

세포 형태변화 관찰 결과, 세포만 배양한 경우 세포핵의 형태는 난원형의 둥근 정상적인 형태(oval shaped round)로 파란색 형광이 일정하게 나타나는 것을 관찰하였다(Fig. 2A). 한편, 70 μmol 의 MPP⁺를 24시간 처리한 세포의 핵은 염색질이 밝아지고 주름지게 변화하였으며, 세포사멸이 일어난 세포의 일반적인 현상인 핵이 작고 진해지는 양상을 관찰하였다(Fig. 2B). 반면, 황백 추출물을 10 또는 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 전처리한 세포에서는 MPP⁺에 의한 변화가 감소되어 보호 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2C & 2D).

3. 세포사멸 분자들에 대한 황백 추출물의 조절 효과

1) bcl-2와 bax의 유전자 발현에 대한 효과

reverse trancription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행한 결과, 세포만 배양하였을 때는 bcl-2 유전자의 발현이 bax 보다 높게 발현되고 있어 anti-apoptosis를 유지하고 있는 반면, 70 μmol

의 MPP⁺를 처리하였을 때는 bcl-2의 유전자 발현은 감소하고 bax의 유전자 발현은 증가하여 MPP⁺가 apoptosis를 유도하는 것으로 나타났다(Fig. 3A). 반면, 황백 추출물을 10과 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 세포에서는 bcl-2의 유전자 발현이 농도의존적으로 증가하였고, bax의 발현은 감소하여 MPP⁺에 의해 유도된 세포 사멸이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 3B).

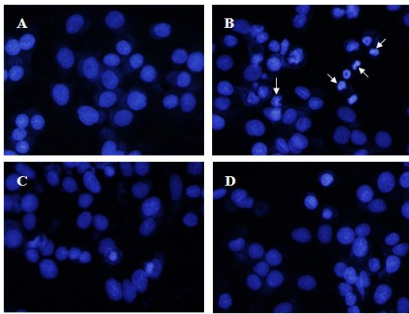


Fig. 2. Morphological analysis of nuclear chromatin in PC-12 cells as determined by Hoechst 33342 staining.

The cells were treated with MPP⁺ in the absence or presence of PC extract. (A), control conditions; (B), after exposure to 70 μM MPP⁺ for 24h; (C) and (D), cells displayed condensed chromatin and apoptotic nuclei. PC-12 cells were pretreated with different concentrations of PC extract for 2h prior to exposure to 70 μM MPP⁺ for another 24h. Photographs were presented a fluorescence microscope at 200 \times magnification. Representative data shown were selected from three independent experiments. The arrows indicate apoptotic cells.

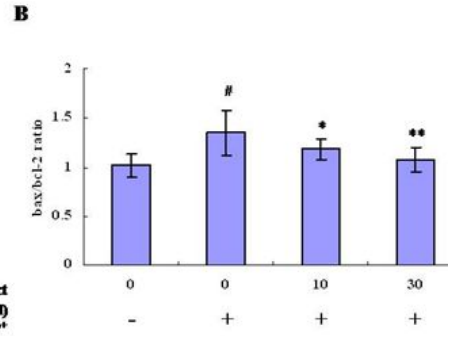
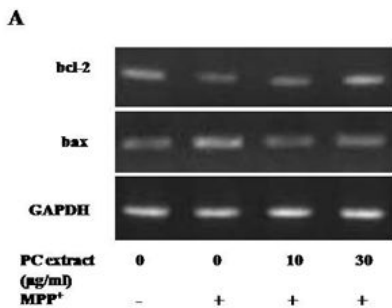


Fig. 3. Effect of PC extract on the mRNA expression of bcl-2 and bax induced by MPP⁺ treatment of PC-12 cells.

The cells were treated with MPP⁺ in the absence or presence of PC extract. (A) RT-PCR was then performed to determine the bax and bcl-2 mRNA levels. (B) The bax to bcl-2 ratio was determined by densitometric analysis. GAPDH transcripts are shown as an internal reference for amplification of cDNA.

#P<0.0001, *P<0.05, **P<0.01 vs. MPP⁺ alone.

2) bcl-2와 bax의 단백질 발현에 대한 효과

SDS-PAGE와 Western blot을 수행한 결과, bcl-2의 단백질 발현은 유전자에서의 결과와 유사하게 70 μmol 의 MPP⁺를 처리하였을 때 현저히 감소한 반면, bax의 유전자 발현은 유의적으로 증가하여 결과적으로 bax/bcl-2의 발현비율이 증가되었고(Fig. 4A), MPP⁺에 의해 유도된 bax/bcl-2의 단백질 발현 비율의 증가는 황백 추출물 10 $\mu\text{g/ml}$ 과 30 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때, bcl-2의 발현은 증가하고, bax의 발현은 다소 감소하여 결과적으로 bax/bcl-2의 비율이 유의적으로 감소되었다(Fig. 4B).

3) caspase-3, PARP, cytochrome c 발현에 대한 효과

SDS-PAGE와 Western blot을 수행한 결과, 세포만 배양하였을 때는 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 분비가 관찰되지 않았으며, 70 μmol 의 MPP⁺를 처리하였을 때 미토콘드리아에서 cytochrome c의

분비가 증가되었고, 황백 추출물을 각각 10 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 세포에서는 cytochrome c의 분비가 두 농도 모두에서 억제되었다(Fig. 5A).

활성화된 caspase-3(active caspase-3)는 세포만 배양하였을 때는 매우 낮게 발현이 관찰되는 반면, MPP^+ 를 24시간 처리하였을 때, 현저히 발현이 증가되었고, 황백 추출물을 각각 10 $\mu\text{g/ml}$ 과 30 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 세포에서는 농도 의존적으로 active caspase-3의 발현이 감소하였으며, PARP는 세포만 배양하였을 때는 매우 낮게 발현되는 반면, MPP^+ 의 처리에 의해 활성화되는 caspase-3에 의해 116-kDa에서 89-kDa의 분절로 분리(cleavage)되었고, 황백 추출물을 각각 10 $\mu\text{g/ml}$ 과 30 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 세포에서는 농도 의존적으로 89-kDa의 PARP cleavage가 감소되었다(Fig. 5B).

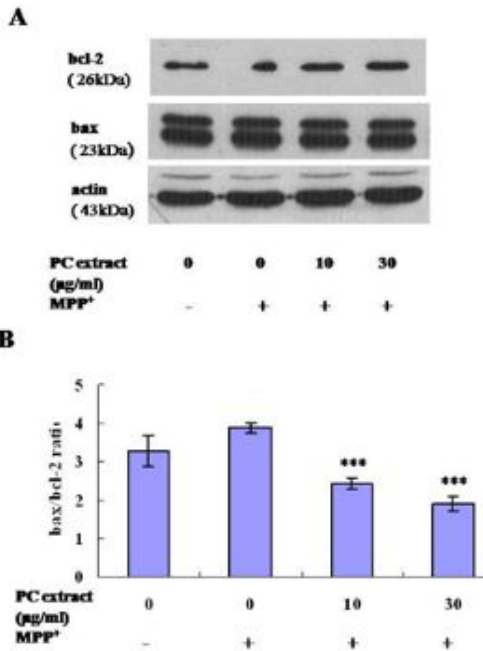


Fig. 4. Effect of PC extract on the protein expression of bcl-2 and bax induced by MPP^+ -treatment of PC-12 cells.

(A) Western blot analysis was performed to determine the bax and bcl-2 protein levels.

(B) The bax to bcl-2 ratio was determined using a densitometer and then plotted. *** $P < 0.001$, vs. MPP^+ alone.

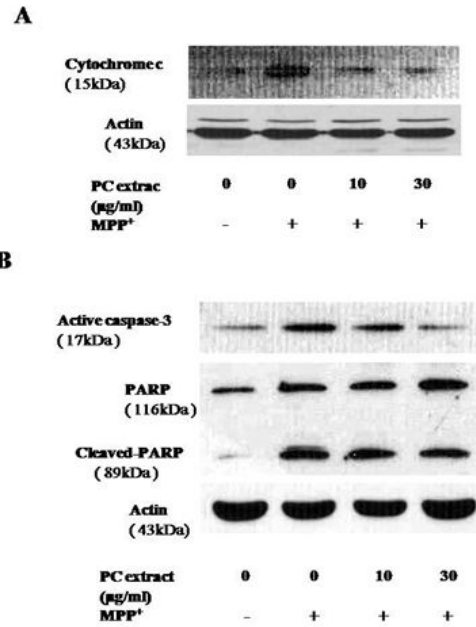


Fig. 5. Effect of PC extract on the release of cytochrome c from the mitochondria into the cytosol and on the caspase-3 activity and PARP cleavage induced by MPP^+ treatment in PC-12 cells.

(A) Cytosolic proteins were prepared from cells that were or were not pretreated with PC extract for 2h prior to incubation in the presence of 70 μM MPP^+ for 24h. Western blot analysis was then performed to evaluate the release of cytochrome c from the mitochondria into the cytosol. PC extract blocked the release of cytochrome c from the mitochondria into the cytosol. (B) Attenuation of MPP^+ -induced caspase-3 activity and PARP cleavage by PC extract as determined by Western blot analysis.

IV. 考 察

현대 사회의 특징인 고령인구의 증가로 신경 퇴행성 뇌질환 환자의 수가 급격히 증가하고 있으며

이는 사회적인 그리고 국가적인 부담이 되고 있다. 따라서 다양한 신경 퇴행성 뇌질환의 예방과 치료를 위한 한약제제 개발에 대한 연구는 시대적으로 절실하게 요구되고 있는 분야이다¹⁵. 대부분의 신경 퇴행성 뇌질환은 신경계의 정보 전달에 가장 중요한 신경 세포의 사멸, 신경 세포와 신경 세포 사이의 정보전달을 하는 시냅스 형성의 문제이거나 기능상의 변화, 신경의 전기적 활동성의 이상적 증가 또는 감소 등을 통한 신경의 퇴행으로 야기되어^{9,16} 운동장애, 기억장애, 인지장애 등 여러 가지 병증을 유발하는 질병으로, 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 헌팅톤병(Huntington's disease) 등이 있다¹⁶⁻¹⁸.

이 중 파킨슨병은 아직 발병 원인이 명확히 밝혀지지 않은 대표적인 신경 퇴행성 질환으로, 전 세계에서 60세 이상 노인들의 1%가 걸리는 운동장애 질환이다¹⁵. 증상은 점진적으로 진행되며, 일차적으로 떨림, 근육경직, 운동시작 불능과 반사능력 상실로 나타나고 이차적으로는 정신 장애를 일으키기도 하는 난치성 질환이다¹⁸. 파킨슨병은 뇌의 흑색치밀부에 있는 도파민 신경세포의 변성에 의한 도파민 부족과 선조체에 분포하는 신경 섬유의 소실, 죽어가는 신경세포로부터 생성되는 루이소체(Lewy body)란 단백질 덩어리의 응집 등으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁻²⁰. 또한 파킨슨병의 병인과 진행에 있어 산화적 스트레스(oxidative stress)의 역할은 흑색질에서 glutathione 농도의 감소, 지질과산화 생성물의 증가, 활성 산소 생성의 증가 및 철 이온 농도의 증가 등으로도 설명되고 있다^{19,20}. 일단 한번 손상을 받은 신경 세포는 재생되지 않기 때문에 신경 세포를 보호하는 방법에 대한 연구가 매우 중요하며, 현재 세계 각국의 연구자들이 뇌신경 손상의 확산을 제한하는데 필요한 신경보호 제제를 개발하기 위해 많은 연구를 진행하고 있다. 그러나 아직까지도 그 효과가 증명된 신경세포 보호제는 개발되고 있지 않은

실정이다.

최근에는 다양한 한약재들을 이용하여 파킨슨병을 예방하거나 치료하려는 시도가 이루어지고 있는데, 예를 들어 인삼 추출물의 파킨슨병 동물에서의 신경 보호 효과²¹, 은행잎 추출물의 파킨슨병 동물에서 levodopa에 의한 신경 손상으로부터의 보호 효과²², 천둥신 덩굴(*Tripterygium wilfordii* Hook F) 추출물의 trichloride 성분에 의한 MPP⁺에 의한 도파민 신경세포 사멸에 대한 보호효과²³, 다양한 폴리페놀류들(polyphenolic compounds)의 항산화 활성을 통한 신경 보호 효과²⁴ 등 다양한 연구결과가 보고되고 있다.

황백(黃柏: *Phellodendri Cortex*)은 운향과(芸香科: Rutaceae)에 속한 황백나무(落葉喬木: *Phellodendron amurense* Rupr.)의 주피(樹皮)를 벗긴 수간피(樹幹皮)로서, 그 성분은 berberine, palmitine, phellodendrine, jatrorrhizine 등과 같은 알칼로이드 성분들이 보고되어 있다.

《神農本草經》^{25,26}에서는 “性寒味苦無毒. 主五臟腸胃中結熱 黃疸 腸痔 止洩痢 女子漏下赤白 陰蝕瘡, 殺疳蟲, 疥癬, 治目熱赤痛, 口瘡, 除骨蒸癆熱.”이라 하여 性味와 效能을 밝히고 있고, 《丹溪心法》²⁵에서는 “足少陰手厥陰本經藥, 足太陽引經藥也. 又瀉膀胱火, 亦治龍火, 有瀉火補陰之功”이라 하여 歸經과 效能을 밝히고 있다. 또한 《萬病回春》²⁷에서는 “黃栢苦寒, 降火滋陰, 骨蒸濕熱, 下血堪任.”이라 하였고, 《本草求真》²⁸에서는 “苦獨入少陰瀉火, 入膀胱瀉熱. 凡人病因火亢見骨蒸癆熱, 目赤耳鳴, 消渴便閉, 及濕熱爲病而見諸痿癱瘓, 水瀉熱痢, 黃疸水腫, 治血瘍風, 漏下白痢. 與夫諸痛瘡瘍, 蝨蟲內攻.”이라 하여 황백의 效能과 治病에 대해 언급하고 있다. 이를 종합하여 보면, 황백의 性味는 苦寒하고, 腎, 膀胱, 大腸經에 歸經한다. 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱의 효능이 있어 濕熱瀉痢, 黃疸, 帶下, 熱淋, 脚氣, 痿躄, 骨蒸癆熱, 盜汗, 遺精, 瘡瘍腫毒, 濕疹瘙癢의 증상을 치료하는데 사용된다⁹. 따라서 임상에서는 濕熱病證인 腸炎(痢疾), 帶下(陰炎), 濕

熱黃疸, 關節炎, 末梢神經炎에 응용되고, 火熱病證인 癰腫瘡瘍, 化膿性濕疹(皮膚炎), 咽喉炎, 結膜炎, 口舌炎에 응용되며, 陰虛熱 相火로 인한 肺結核, 骨蒸熱, 腎臟炎(血尿), 膀胱炎 등에 응용된다.²⁹

이와 같이 임상에서 황백은 濕熱로 인한 實熱證에 사용되고 있을 뿐만 아니라, 陰虛熱 相火로 인한 虛熱證에도 사용되고 있음에 착안하여 퇴행성 뇌질환에서 항염증효과 이외에도 뇌신경세포 자체를 보호하는 효과가 있을 것으로 생각하였다. 특히, 뇌 질환에 효과가 있을 것으로 사료되는 것은 한 방에서 腎은 主骨髓하고 腦는 髓之海이므로 髓의 부족으로 인한 陰虛熱 相火가 발생하여 퇴행성 뇌질환에서 뇌신경손상이 발생한 것을 치료할 수 있는 한약재로서 황백을 실험하였다.

박¹²의 이전 보고에서 황백이 뇌신경교세포의 염증 억제효과를 통한 뇌 신경보호의 가능성을 시사한 바에 대한 기전을 규명하기 위하여 본 저자는 황백이 뇌신경교세포의 염증 억제효과 뿐만 아니라 뇌 신경세포 보호효과가 있을 것으로 사료되어 본 연구에서는 MPP⁺로 유도된 세포 사멸에서 황백 메탄올 추출물의 도파민 신경 세포의 보호효과와 작용 기전에 대해 조사하였다.

MPP⁺로 유발된 파킨슨병에 관한 연구는 신경 독성 물질들을 사용하여 만든 모델에서 주로 시행되고 있는데 특히 catecholamine성 신경만을 선택적으로 파괴하는 것으로 알려진 6-OHDA와 MPTP가 널리 사용되고 있다. 이 중 파킨슨병 연구 모델로 널리 사용되는 신경 독소인 MPTP는 체내로 흡수되어 뇌혈관 장벽(brain-blood barrier)을 통과한 다음 정상세포(astrocyte)에서 monoamine oxidase B(MAO-B)에 의해 1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP⁺)로 대사되어 기저핵의 흑질에 있는 도파민성 신경 세포에만 선택적으로 작용하는데 특히 미토콘드리아의 전자전달계 I(mitochondrial complex I)을 억제함으로써 세포 독성을 통해 도파민 신경 세포에 손상을 주게 되어⁷, 파킨슨병과 유사한 특징적인 소견들을 유발하게 된다³⁰. 본 연

구에서 흰쥐 도파민성 신경세포주인 PC-12 cell은 도파민성 세포에서 선택적 신경 독소인 MPP⁺에 의해 농도 의존적으로 신경 세포의 사멸이 유발되었고, 황백 추출물은 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지는 단독으로 도파민성 신경세포의 증식과 사멸에 유의한 영향을 주지 않았으나, MPP⁺ 투여 전에 배양액에 처리함으로써 MPP⁺ 독성으로부터 이들 도파민 신경 세포를 효과적으로 보호하는 것을 확인하였다.

다양한 유전자와 그들의 단백질은 미토콘드리아 기전을 통해 세포사멸에 영향을 주게 되는데, 그 중 bcl-2 family는 세포 사멸을 조절하는 유전자들의 그룹으로 bcl-2 family의 어떤 유전자가 어떤 효과를 나타내는지 정확한 기전은 명확하지 않지만, 미토콘드리아를 통한 세포 사멸 유도에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{31,32}. 비정상적인 신경 세포의 사멸은 다양한 뇌질환을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 생화학적으로 caspase 계열의 효소 활성을 필요로 한다. Caspase의 활성은 소위 mitochondrial pathway와 cytosolic pathway에 의해 매개될 수 있으나, 신경 세포 사멸의 과정은 전형적인 mitochondrial pathway에 의하여 매개되는 것으로 생각된다^{31,32}. 최근 몇 년 동안 bcl-2 family 중 pro-apoptotic member로 알려져 있는 bax 단백질이 신경 세포의 apoptosis를 관장하는 가장 핵심적인 인자임이 밝혀졌으며 bax를 둘러싼 조절 메카니즘에 대한 연구가 이루어지고 있다³⁴. 포유류 세포에서는 bcl-2 family 단백질들을 기능에 따라 anti-apoptotic group과 pro-apoptotic group으로 구분하며, pro-apoptotic group은 bax, bak, box 등이 있고 anti-apoptotic group에 bcl-2, bcl-XL 등이 있다. 신경 세포 사멸의 초기 활성화 단계에는 Nervous growth factor와 같은 신경 성장인자의 부족으로 야기되는데 기전은 정확하지 않으나 MLK(multiple lineage kinase)와 같은 단백질 인산화 효소의 활성이 있고, 이에 의한 JNK의 인산화와 JNK 활성화에 의한 하위 산물인 c-JUN 단백질의 인산화와 같은 과정들이 연속적으로 진행되

어 세포사멸 활성 신호의 핵 내 유입이 일어나게 된다³⁵. 신경 세포 사멸의 전이 단계(transition)는 bcl-2 family 중 bcl-2 단백질에 의해 매개되며, 미토콘드리아에 의해서 세포 사멸이 돌아갈 수 없는 비가역적인 과정으로 전환되는 과정이다. 이 과정의 핵심적인 기전은 세포질 내 단량체로 존재하던 bax 또는 bak 단백질이 중합체를 형성하며 미토콘드리아 외막에 삽입되는 것이다. bcl-2의 생존 촉진 기능과 bax의 사멸 촉진 기능이 서로 길항 작용을 일으키고 있는데, 두 단백질의 발현 양 조절에 의해 생존과 사멸이 결정되게 된다^{34,35}. bcl-2 family에서 bax와 bcl-2는 미토콘드리아 막의 투과성에 영향을 미치는데, 특히 bax는 세포질에 존재하는 공극 형성 단백질로 미토콘드리아 막 바깥 면으로 이동한 후 막의 투과성에 영향을 미쳐 미토콘드리아 안에 있는 cytochrome c가 세포질로 분비되도록 한다. 따라서, 신경 세포 사멸의 실행 단계(execution)는 bax 단백질의 활성화 및 미토콘드리아 유입으로 전자 전달계의 조효소로 작용하고 있는 cytochrome c와 같은 세포사멸 촉진 인자를 방출하는 것으로 연결된다³³. bcl-2는 막의 투과성을 안정화하여 미토콘드리아가 본래의 모습을 유지할 수 있도록 하는데, 이로 인해 cytochrome c의 분비가 억제됨으로써 세포 사멸이 억제되게 된다³⁶. 세포 사멸 과정의 초기 단계에서의 세포 생존은 우선적으로 bcl-2 family의 pro-apoptosis 단백질과 anti-apoptosis 단백질 간의 균형에 달려 있으며, bax/bcl-2의 비는 bax와 bcl-2 각각의 농도 보다 세포사멸의 좋은 예측 인자가 된다. 또한 bax/bcl-2의 비가 감소한다는 것은 cytochrome c의 분비와 caspase-3의 활성이 억제되었다는 것을 의미한다³⁷. 본 연구에서 황백 추출물의 anti-apoptotic 유전자인 bcl-2의 발현과 pro-apoptotic 유전자인 bax의 발현에 대한 효과를 조사한 결과, MPP⁺에 의해 증가되는 bax/bcl-2의 비율을 황백 추출물이 유의적으로 억제하는 것으로 나타났으며(Fig. 3.4), 황백 추출물이 bax/bcl-2 발현 비율을 감소시킴

으로써 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 방출을 억제시키는 것으로 나타났다(Fig. 4). 또한 본 연구를 통해 황백 추출물이 MPP⁺에 의해 증가된 PC-12 cell의 bax/bcl-2의 비를 개선시키고, cytochrome c의 방출을 억제시킴으로써 세포사멸로부터 세포를 보호한다는 사실을 알 수 있었다.

Cytochrome c는 생체 내에서 전자 전달에 관계하는 단백질로서 아미노산 약 100여개 잔기로 구성되는 polypeptide와 보결분자족으로 구성되며, 이것과 공유 결합한 c형 heme 한 개를 갖는 heme 단백질이다. 일단 미토콘드리아로부터 방출된 cytochrome c는 세포질 내에 존재하는 Apaf1, procaspase-9 등과 결합하여 apoptosome이라고 불리는 단백질 복합체를 형성하고 이 복합체에 의하여 실행 caspase의 하나인 caspase-3가 활성화된다. 활성화된 caspase-3에 의하여 DNA cleavage, nuclear condensation, cytoplasmic bleb 등 세포 사멸의 전형적인 과정이 진행되게 된다^{33,38}.

MPP⁺에 의해 유도되는 활성화된 caspase-3의 증가는 PARP의 분열을 수반하게 되는데, caspase-3는 시스테인 단백질분해군의 일종으로 세포 내에서는 비활성 효소원으로 존재하지만 다양한 자극에 의해 DNA가 손상되면 caspase가 활성화되어 세포 사멸 신호전달에 중요한 조절자로 작용하게 된다. 신경 퇴행성 뇌질환의 경우에는 산화적 손상이 유발하는 여러 세포 사멸 경로 중에서 사립체 손상에 의한 cytochrome c의 유출, caspase-3 활성 및 PARP 절단 증이 관련되는 세포 사멸의 하위 경로를 통해 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성측삭경화증과 같은 신경 퇴행성 뇌질환의 발병 기전에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{3,16}. 따라서 항산화제를 이용하여 cytochrome c 유출을 줄이고 caspase 활성을 억제함으로써 세포 사멸을 방지하려는 노력을 퇴행성 질환의 실험 모델에서 시도하고 있다³⁹⁻⁴¹. 본 연구에서 황백 추출물은 PC-12 cell에서 MPP⁺에 의해 증가된 caspase-3의 발현과 PARP cleavage 및 cytochrome c의 방출을 효과적

으로 억제시킴으로써 신경 세포 사멸로부터 보호한다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 5).

이상의 결과, 황백 추출물은 PC12 도파민 신경 세포에서 MPP⁺에 의해 증가되는 bax/bcl-2의 비율을 감소시키고, caspase-3의 활성을 통해 나타나는 PARP의 cleavage와 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 분비를 억제함으로써 세포사멸로부터 세포를 보호하였다. 따라서 황백이 파킨슨병과 같은 신경 손상을 수반하는 신경 퇴행성 뇌질환에서 신경 보호효과가 있음을 알 수 있다.

V. 結 論

흰쥐의 도파민 신경 세포인 PC-12 cell을 이용하여 황백 메탄올 추출물의 신경 보호 효과와 작용 기전을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PC-12 cell에서 황백은 0~30 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위에서 독성을 나타내지 않았다.
2. 황백은 PC-12 cell에서 MPP⁺에 의해 유도되는 뇌신경 세포 손상으로부터 세포 생존도를 농도 의존적으로 유의성있게 증가시켰다.
3. 황백은 PC-12 cell에서 MPP⁺에 의해 유도되는 핵의 형태적 변화를 억제하였다.
4. 황백은 PC-12 cell에서 MPP⁺에 의해 증가하는 bax/bcl-2의 유전자와 단백질의 발현을 유의성있게 감소시켰다.
5. 황백은 PC-12 cell에서 MPP⁺에 의해 증가하는 caspase-3의 발현과 PARP cleavage 및 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 방출을 유의적으로 감소시켰다.

황백은 PC12 도파민 신경세포에서 MPP⁺에 의해 증가되는 bax/bcl-2의 비율을 감소시킴으로써 caspase-3의 활성 억제를 통해 PARP의 cleavage와 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 분비를 억제하여 세포 사멸로부터 신경 세포를 보호하였다.

參考文獻

1. 서순규. 成人病 老人病學. 서울: 고려의학; 1992. p. 37-49, 77-83, 107-122, 137-9, 142-9.
2. Smith PF. Inflammation in Parkinson's disease: An update. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008 ;9(5):478-84.
3. Camins A, Pallas M, Silvestre JS. Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2008;30(1):43-65.
4. McGeer PL, McGeer EG. Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2008;23(4):474-83.
5. Rock RB, Peterson PK. Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006;1(2):117-26.
6. Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R. Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des*. 2007;13(18):1925-8.
7. R Baskaran, H Karl, YR Yanina, RH Julian, V Arousiak, DH Bruce. Differential expression of transporters for norepinephrine and glutamate in wild type, variant, and WNT1-expressing PC12 cells. *J Biol Chem*. 1993;268(32):23891-7.
8. Lee P, Hur J, Lee J, Kim J, Jeong J, Kang I et al. 15,16-dihydrostanone I suppresses the activation of BV-2 cell, a murine microglia cell line, by lipopolysaccharide. *Neurochem Int*. 2006;48:60-6.
9. 전국한 의과대학 공동교수편집위원회. 본초학. 서울: 영림사; 2007. p. 221-3.
10. KH Kim, SC Ahn, MY Lee, OS Kweon, WK

- Oh, MS Kim et al. Adipocyte differentiation inhibitor isolated from the barks of *Phellodendron amurense*. *Kor J Sci Technol*. 2003;35:503-9.
11. H Mori, M Fuchigami, N Inoue, H Nagai, A Koda, I Nishioka et al. Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response: effect of phellodendrine on cellular and humoral immune responses. *Planta Med*. 1995;61:45-9.
 12. Park YK, Chung YS, Kim YS, Kwon OY, Joh TH. Inhibition of gene expression and production of iNOS and TNF-alpha in LPS-stimulated microglia by methanol extract of *Phellodendri cortex*. *Int Immunopharmacol*. 2007;7:955-62.
 13. Uchiyama T, Kamikawa H, Ogita Z. Anti-ulcer effect of extract from *phellodendri cortex*. *Yakugaku Zasshi*. 1989;109(9):672-6.
 14. Kim KW, Ha KT, Park CS, Jin UH, Chang HW, Lee IS et al. Polygonum cuspidatum, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in RAW 264.7 macrophages. *Vascul Pharmacol*. 2007;47:99-107.
 15. 김은선, 박동운, 이종은. 뇌질환 치료제 (I), 산업시장분석: 한국과학기술 정보연구원; 2006, p. 25-55.
 16. Sendtner M, Thoenen H. Neurodegenerative disease. Oxidative stress and motorneuron disease. *Curr Biol*. 1994;4:1036-9.
 17. Pappolla M, Omar R, Kim K, Robakis. Immunohistochemical evidence of oxidative stress in Alzheimer disease. *Am J Pathol*. 1992;140:621-8.
 18. Jenner P, Olanow C. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1998;3 :S72-S84.
 19. Schapira AH. Progress in neuroprotection in Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2008;15 :5-13.
 20. Stoessl J. Potential therapeutic targets for Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(4):425-36.
 21. Van Kampen J, Robertson H, Hagg T, Drobitch R. Neuroprotective actions of the ginseng extract G115 in two rodent models of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2003;184(1) :521-9.
 22. Cao F, Sun S, Tong ET. Experimental study on inhibition of neuronal toxic effect of levodopa by ginkgo biloba extract on Parkinson disease in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2003;23(2):151-3.
 23. Li FQ, Cheng XX, Liang XB, Wang XH, Xue B, He QH et al. Neurotrophic and neuroprotective effects of triptchlorolide, an extract of Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F, on dopaminergic neurons. *Exp Neurol*. 2003;179(1) :28-37.
 24. Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol*. 2006;545(1):51-64.
 25. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사; 1999, p. 1969.
 26. 鄒澍. 本經疏證. 서울: 대성문화사; 2001, p. 152.
 27. 龔廷賢. 萬病回春. 北京: 人民衛生出版社; 1998, p. 14.
 28. 黃宮繡. 本草求真. 台北: 宏業書局有限公司; 1981, p. 196.
 29. 雷載權, 張廷模. 中華臨床中藥學(上卷). 北京: 人民衛生出版社; 1998, p. 445-9.

30. Guan S, Jiang B, Bao YM, An LJ. Protocatechuic acid suppresses MPP⁺-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death in PC12 cells. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:1659-66.
31. Zhou J, Tang XC. Huperzine A attenuates apoptosis and mitochondria-dependent caspase-3 in rat cortical neurons. *FEBS Lett.* 2002;526:21-5.
32. Grammatopoulos TN, Morris K, Bachar C, Andres MS, Weyhenmeyer RJ. Angiotensin II attenuates chemical hypoxia-induced caspase-3 activation in primary cortical neuronal cultures. *Brain Res Bull.* 2004;62:297-303.
33. Chang SH, Phelps PC, Berezesberger IK, Ebersberger ML Jr, Trump BF. Studies on the mechanisms and kinetics of apoptosis-induced by microinjection of cytochrome c in rat kidney tubule epithelial cells(NRK-52E). *Am J Pathol.* 2000;156:637-49.
34. Yuan J, Lipinski M, Degtarev A. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron.* 2003;40:401-13.
35. Harris CA, Johnson EM, Jr. BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem.* 2001;377:54-60.
36. Jang JH, Surh YJ. Bcl-2 protects against Abeta(25-35)-induced oxidative PC12 cell death by potentiation of antioxidant capacity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320:880-6.
37. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:1899-911.
38. Mattson MP, Furukawa K. Anti-apoptotic actions of cycloheximide: blockade of programmed cell death or induction of programmed cell life? *Apoptosis.* 1997;2:257-64.
39. Yang YL, Meng CH, Ding JH, He HR, Ellsworth K, Wu J et al. Iptakalim hydrochloride protects cells against neurotoxin-induced glutamate transporter dysfunction in vitro and in vivo models. *Brain Res.* 2005;1049:80-8.
40. Liu HQ, Zhang WY, Luo XT, Ye Y, Zhu XZ. Paeoniflorin attenuates neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease by activation of adenosine A1 receptor. *Br J Pharmacol.* 2006;148:314-25.
41. Yoon Y, Kim KS, Hong SG, Kang BJ, Lee MY, Cho DW. Protective effects of *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae) on H₂O₂-induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line. *J Ethnopharmacol.* 2000;69:73-8.