

우슬 물추출물의 허혈성 뇌 손상에 대한 보호효과 연구

오태우¹, 박기호¹, 이미영², 최고야², 박용기^{1*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 한국한의학연구원

Effects of the water extract from *Achyranthis Radix* on serum-deprivation-induced apoptosis in PC12 cells and transient cerebral middle artery occlusion-induced ischemic brains of rats

Tae-Woo Oh¹, Ki Ho Park¹, Mi Young Lee², Goya Choi², Yong-Ki Park^{1,*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

2 : Aging Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseongdae-ro, Yuseong-gu, 305-811, Daejeon, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : This work was designed to investigate the effect of The root of *Achyranthes japonica* Nakai (AJN) water extract on serum deprivation-reperfusion-induced apoptosis in PC-12 cells and transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO)-induced ischemic brains of rats.

Methods : Apoptosis in PC12 cells was induced by serum deprivation and reperfusion. The cells were treated with AJN water extract at doses of 0.5 and 1.0 mg/ml for 24 hr after inducing the apoptosis. Cell viability was determined by WST-1 assay. The expression of caspase-3 protein was determined by Western blot. Ischemic brains were prepared from tMCAO-induced ischemic rats after oral administration with AJN at dose of 50 and 100 mg/kg, and then brain infarction was measured by TTC staining.

Results : AJN significantly increased the cell viability in apoptotic-induced PC-12 cells, and also decreased the expression of caspase-3 protein. Furthermore, the administration of AJN significantly inhibited tMCAO-induced brain infarction in rats.

Conclusions : Our results suggest that AJN extract has a neuroprotective property via suppressing the apoptosis in PC12 cells and the infarction of ischemic brains.

Key words : *Achyranthes japonica* Nakai, Neuroprotection, anti-apoptotic, PC-12 cell, Cerebral ischemia-reperfusion

서 론

뇌경색(ischemia)은 뇌의 동맥이 막히거나 파열됨으로써 뇌 조직의 죽음을 초래하는 뇌혈관 질환으로 뇌 손상뿐 아니라 알츠하이머병이나 간질 등의 다양한 신경학적 장애를 수반하는 중요 뇌질환 중 하나이다¹⁻²⁾. 즉, 뇌혈관이 막혀 뇌 조직에 산소와 영양분의 공급이 원활하지 못하여 신경이 손상됨으로써 일어나는 질환인 것이다. 뇌 허혈 시 허혈 중심부

(core)는 심한 허혈 손상으로 신경세포막이 파괴되어 괴사형태의 세포사멸(apoptosis)이 유발되고, 허혈 주변부(penumbra)는 소량의 산소와 포도당만 공급(10~20 ml/100 g/min)됨으로써 세포기능이 일시적으로 정지되는 상태에 빠지게 된다. 따라서 허혈 주변부 세포들은 혈류가 다시 공급되면 기능이 회복되거나, 재관류 조직손상(reperfusion injury) 또는 지연성 세포사멸이 일어나게 된다³⁾. 이러한 허혈 주변부의 세포손상인 지연성 세포사멸은 세포막 손상 없이 세포핵의

*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실.
· Tel : 054-770-2661, · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr.
· 접수 : 2012년 2월 10일 · 수정 : 2012년 3월 4일 · 채택 : 2012년 3월 16일

손상이 먼저 일어나는 사멸기전에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다^{3,4}. 이러한 세포사멸의 기전 연구는 배양세포에 혈청이나 배양인자의 제거, 배양세포에 항암제 등의 화학물이나 세포사멸 유도 인자의 처리, 또는 자외선이나 방사선을 이용한 물리적 처리 등 여러 가지 자극을 가하는 방법으로 연구되고 있다⁵.

세포사멸은 신호전달 단계(Signalization phase), 조절과 실행단계(Control & execution phase) 및 구조적 변화 단계(Structural alteration phase)로 구분하며⁶, 발생과정상 불필요하거나 노화된 세포나 각종 손상을 입은 세포를 제거하기 위해 유전적으로 결정되어지는 세포자살 프로그램의 활성화에 의해 일어나는 세포사멸(programmed cell death)의 한 형태⁷, 정상적인 태아의 발달과 노화, 그리고 면역기능과 조혈계의 유지에 중요한 역할을 한다⁸. 반면 세포사멸의 비정상적인 조절은 암의 초기발생과 화학요법에 저항성을 지니는 종양세포의 형성⁹, 자가면역질환¹⁰, 후천성 면역결핍증¹¹ 그리고 신경퇴화¹² 등에 관여하는 것으로 알려져 있고, 세포사멸의 형태는 세포의 축소, 세포막에 수포형성, 크로마틴의 수축과 핵의 분해에 따른 apoptotic body 형성 등을 특징으로 한다¹³.

쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai, AJN)은 한국, 중국, 일본 등의 아시아 지역에 광범위하게 분포하는 비름과(Amaranthaceae) 다년초 식물이고, 이것의 뿌리를 건조한 것을 우슬이라 하며 한방에서 성미가 짝하며, 맛은 쓴맛과 신맛을 가지고, 신장과 간장의 경락에 작용하며, 어혈을 제거하며 십이경맥을 도우며 혈액순환을 촉진하고, 혈액을 생성하는 효능과 인체의 상부로 오르는 열을 떨어뜨리는 효능이 있으며 다른 약을 허리나 다리 쪽으로 이끄는 효능이 있다고 알려져 있다¹⁴⁻¹⁶. 그 외 우슬은 이뇨, 진통, 소증, 구어혈 등의 치료에 사용되고 있으며, 항염증, 항암작용, 간보호, 항산화 등의 생물학적 활성도 보고되고 있다¹⁷⁻¹⁹. 또한 우슬의 생리활성 성분으로 oleanolic acid, saponin, metamorphosis hormone, inokosterone, ecdysone, polysaccharide, 20-hydroxyecdysone, steroid 계열인 β -sitosterol, stigmasterol, rubrosterone 등이 보고되어 있다^{20,21}.

이에 본 연구에서는 혈청 제거-재관류(serum deprivation-reperfusion)를 이용하여 세포사멸이 유도된 PC12 세포에서 우슬 물추출물의 효과를 확인하고, 일시적 국소 뇌동맥 폐쇄(transient middle cerebral artery occlusion)에 의해 허혈성 뇌 손상이 유발된 흰쥐에서의 뇌경색 발생에 대한 효과를 확인함으로써 우슬 물추출물의 뇌신경보호효과의 가능성을 평가하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용된 우슬은 한국 전남 영암군의 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai; AJN)을, (주)광명당제약(울산, 한국)에서 제약화 한 것을 구입하여 관능검사 후 제조한 물추출물을 한국한의학연구원(KIOM)으로부터 제공받아 사용하였다. 약재 표본은 한국한의학연구원에 보관하였다(표본번호 KIOM010079).

2) 시약

본 실험에 사용된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, fetal bovine serum(FBS), horse serum, penicillin-streptomycin(P/S) 등 세포배양 시약은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, 실험에 사용된 WST-1 reagent는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서, anti-caspase-3 monoclonal antibody (mAb)는 Cell signaling(MA, USA)사에서, goat anti-rabbit, goat anti-mouse mAb는 각각 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다. 또한 X-ray film(Kodak Co, Ltd, Burnaby, British Columbia), ECL solution(Pierce Co, IL, USA), protein assay solution(BioRad Laboratories, Inc, CA, USA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-tetrazolium bromide Sigma, St Louis, CA, USA)을 사용하였으며, 기타 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상을 사용하였다.

2. 방법

2-1. 추출물 제조

우슬 건조약재에 10배량의 1차 증류수를 가하여 환류냉각기를 장치하고 히팅맨틀(heating mantle)을 이용해 2시간 동안 열탕한 후 전액을 3겹 거즈와 왓만 여과지로 여과하였다. 잔류물을 다시 같은 방법으로 2차 추출하였으며, 1,2차 추출액을 혼합하여 동결건조기(Bondiro, Ilshin Lab, Korea)에서 동결건조함으로써 우슬의 물추출물 건조분말을 얻었다. 이때 우슬 물추출물의 수득률은 건조약재 대비 50.91%였다. 우슬 물추출물은 실험직전 멸균된 1× 인산완충액(1x, PBS)에 완전히 녹여서 사용하였다.

2-2. 세포실험

(1) 세포 배양

흰쥐의 pheochromocytoma 세포인 PC-12 세포는 한국 세포주은행(서울, 한국)으로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양은 37°C의 5% CO₂, 95% air 조건에서 5% horse serum, 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin을 포함하는 RPMI1640 배지를 배양액으로 하여 배양하였으며, 이때 poly-L-lysine (Sigma, Saint Louis, MO, USA)으로 코팅된 배양 용기를 이용하였다.

(2) 세포사멸 유도

세포사멸을 유도하기 위해 이전에 보고되었던 방법²²인 혈청제거(serum-deprivation) 및 재관류(reperfusion) 방법을 사용하였다. 즉, 6-well plate에 PC12 세포(3×10⁵ cell/well)를 분주하여 하룻밤 배양한 후 다음 날 완전 배지를 모두 제거하고 혈청이 제거된 배지(serum free media)로 교환한 후 5% CO₂ 상태에서 6 시간 또는 12시간 배양하였다.

(3) 세포 생존율 측정

우슬추출물에 의한 세포독성과 세포사멸 유도 후 세포생존도 변화에 대한 효과를 확인하기 위해서 WST-1 assay를 수행하였다. 먼저 6-well plate에 세포(3×10⁵ cell/well)를 분

주하여 하룻밤 배양한 후 우슬추출물 0.5~1 mg/ml 농도를 처리하여 2시간 배양하였다. 이후 배지를 완전히 제거하고 1× PBS로 3회 세척한 다음 혈청이 제거된 배양액으로 교체한 후 12시간 배양하였다. 여기에 WST-1 시약을 200 μ l/well 씩 넣은 후 37°C CO₂ incubator에서 암실상태를 유지하면서 반응 시킨 후 반응액을 96-well plate에 100 μ l/well씩 옮겨서 Microplate Reader에서 420 nm 흡광도를 측정하였다.

(4) Western blot

우슬추출물이 혈청제거에 따라 세포사멸이 유도된 PC12 세포로부터 발현되는 세포사멸 유도 단백질인 caspase-3의 발현을 억제하는지 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 먼저, PC12 세포에 독성이 없는 농도범위의 우슬추출물을 2시간 동안 전처리한 다음, 혈청을 제거한 배지로 교체하여 12 시간 배양을 하였다. 각 세포를 수거하여 1× PBS로 3회 씻은 후 lysis buffer(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin)를 이용해서 lysis시켰다. 이후 단백질이 들어있는 상등액을 회수하여 각 sample에 존재하는 단백질을 정량하고, 30 μ g 단백질을 2 × sample buffer와 섞어 12% SDS-polyacrylamide gel (1.5 M Tris base, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS, 30% acrylamide, 10% ammonium persulfate, TEMED) 상에서 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝난 gel상의 단백질을 NC membrane으로 transfer시키고 각 membrane은 항체와 비특이적 결합을 막기 위해 5% skim milk로 실온에서 1시간 반응 시켰다. 반응을 끝낸 membrane에 5% skim milk에서 30분간 반응시킴으로써 blocking한 후 1차 항체와 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 이를 0.05% Tween이 들어간 TBS로 3회 세척한 후 다시 2차 항체인 anti-IgG conjugated HRP와 실온에서 1시간 동안 반응시켰으며, 다시 0.05% Tween이 포함된 TBS로 3회 세척한 후 ECL용액을 이용하여 x-ray film에 감광시켰다.

2-3. 동물실험

(1) 일시적 국소 뇌허혈 동물모델 제작

Sprague Dawley 흰쥐를 80% N₂O와 20% O₂에 혼합한 1.5% isoflurane으로 흡입하여 마취시키고, 보온패드를 사용하여 체온을 약 37±0.5°C로 유지하면서 중대뇌동맥을 폐색하였다. 즉 마취하에서 목의 정중선을 따라 경부를 절개하고 미주신경에 손상을 주지 않도록 주의하면서 좌측 총경동맥(Common carotid artery CCA), 내경동맥(Internal carotid artery ICA), 외경동맥(External carotid artery ECA)을 분리한 다음, 총경동맥과 외경동맥을 결찰하고 내외경동맥의 분지점으로부터 내경동맥 내로 probe를 삽입하고 그 바로 위쪽을 결찰하였다. Probe는 4-0 nylon surgical thread의 한쪽 끝을 가열하여 구형으로 만든 다음 20~25mm 길이로 잘라서 사용하였다. 90분간 결찰(occlusion) 한 후 probe를 제거하여 24시간 동안 재관류(reperfusion)시켰다. 동물이 마취에서 회복된 다음 Bederson의 방법²⁴⁾에 따라 꼬리를 중심으로 들었을 때, 몸의 불균형, 앞발의 좌우모양, 왼쪽 선회 등으로 신경학적 행동장애를 측정하였다.

(2) 검액의 투여

실험동물을 대조군(vehicle)과 실험군(sample group)으로 나누고, 실험군은 다시 서로 다른 농도(50, 100, 200mg/kg)의 우슬추출물을 경구 투여 한 군으로 나누었으며, 대조군은 약물 대신 1× PBS를 투여하였다.

(3) 허혈성 뇌손상 부위의 뇌경색 측정

중대뇌동맥 폐색 24시간 경과 후 흰쥐를 1.5% isoflurane으로 흡입 마취시킨 다음 뇌를 적출하고 뇌 주형틀을 이용하여 frontal pole에서 2 mm 두께로 잘라 7개의 뇌 관측 절편을 만들어 0.9% 생리식염수에 녹인 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 염색약으로 10분간 염색하였다. TTC 용액으로 붉게 염색된 뇌 절편을 4% paraformaldehyde 용액으로 고정시킨 후 각 절편의 뒤편 영상을 카메라로 촬영하고 경색면적을 경색을 일으킨 반구의 전체면적에서 염색이 되지 않은 경색면적을 백분율로 나타내어 각 7개의 절편들의 평균을 계산하였다.

2-4. 통계처리

모든 결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean)±표준오차(standard error; SE)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 GraphPad Prism program의 Student t-test를 수행하여 p 값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포독성

PC-12 세포에 대한 우슬 추출물의 독성을 평가하기 위해서 여러 농도의 우슬 추출물을 처리하여 24시간 배양한 후 WST-1 assay를 수행하였다. 그 결과, 우슬 추출물(AJN)을 0.1, 0.5, 1 mg/ml 농도로 처리하였을 때 세포 생존도는 각각 98.33±3.08%, 96.25±4.33%, 93.77±3.95%, 96.52±2.99%로 측정되어 우슬 추출물은 PC12 세포에서 1 mg/ml 농도까지 독성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

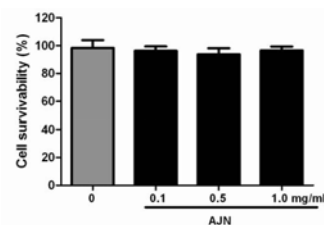


Fig. 1. Effect of Achyranthis Radix water extract on cell viability in PC12 cells. Cells were treated with AJN water extract at concentrations of 0.1, 0.5 and 1 mg/ml for 24 hr, and cell viability was determined by WST-1 assay. Values are means±SE of three indifferent experiments.

2. 세포생존율에 대한 효과

먼저 PC12 세포에서 혈청 제거로 인한 유도되는 세포 생존율의 감소를 확인하기 위해서 세포를 혈청 제거 조건에서 6시간과 12시간 배양한 후 WST-1 assay를 수행하였다. 그

결과, 혈청이 제거 되지 않은 정상세포에서는 세포생존율이 6 시간에 다소 증가하였으나, 12 시간이 지난 후에는 일정하게 유지되었다(Fig. 2). 그러나 혈청을 제거한 세포사멸 유도 세포에서의 세포생존율은 6시간에는 64.7%, 12시간에는 56.2%로 측정되어 배양시간에 의존적으로 세포생존도가 감소하였다. 따라서 이후 실험에서는 12시간 혈청 제거 배양 조건으로 수행하였다.

다음은 세포사멸이 유도된 PC12 세포에서의 우슬추출물의 보호효과를 확인하기 위해서 세포를 혈청 제거 조건으로 12 시간 배양한 후 우슬추출물을 0.5, 1 mg/ml 농도로 처리하여 세포생존도를 측정하였다. 그 결과, 우슬추출물을 처리한 세포에서 농도 의존적으로 세포생존도가 증가하였으며, 우슬추출물이 세포사멸로부터 세포를 보호하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

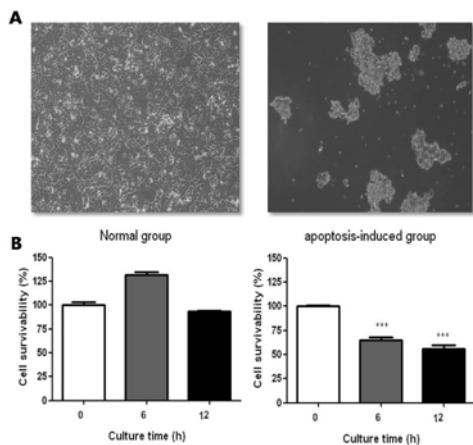


Fig. 2. Effect of serum deprivation on cell viability in PC12 cells. Cells were cultured in serum-free medium for 6 hr or 12 hr, and cell viability was determined by WST-1 assay. Values are means±SE of three indifferent experiments. ***p<0.001 vs. 0 hr culture group.

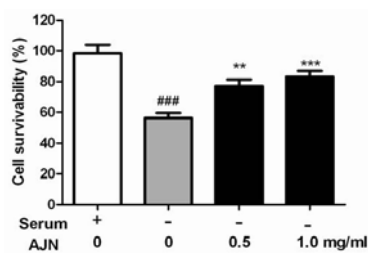


Fig. 3. Effect of Achyranthis Radix water extract on serum deprivation-induced cell death in PC12 cells. Cells were cultured in serum-free medium for 12 hr, and then treated with AJN water extract at concentrations of 0.5 and 1 mg/ml for 24 hr. Cell viability was determined by WST-1 assay. Values are means±SE of three indifferent experiments. ###p<0.001 vs. normal cells; and **p<0.01, ***p<0.001 vs. serum deprivation group.

2. Caspase-3 단백질 발현에 대한 효과

혈청 제거에 의해 세포사멸이 유도된 PC12 세포에서 세포사멸 유도 단백질인 caspase-3의 발현에 대한 우슬 추출물의 효과를 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 그 결과, 정상세포는 caspase-3의 발현이 낮게 나타났으며, 혈청 제거에 의해 세포사멸이 유도된 세포에서 현저히 증가되었다

(Fig. 4). 또한 혈청 제거로 증가된 caspase-3 단백질의 발현은 우슬 추출물을 1 mg/ml 농도로 처리하였을 때 유의적으로 감소하였다.

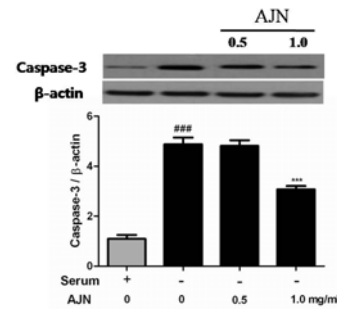


Fig. 4. Effect of Achyranthis Radix water extract on serum deprivation-induced expression of caspase-3 protein in PC12 cells. Cells were cultured in serum-free medium for 12 hr, and then treated with AJN water extract at concentrations of 0.5 and 1 mg/ml for 24 hr. Expression of caspase-3 was determined in cell lysates by Western blot, and suggested representative figure. All western blot figures were imaged by ImageJ program of three independent experiments, and values are means±SE of three indifferent experiments. ###p<0.001 vs. normal cells; and **p<0.01, ***p<0.001 vs. serum deprivation group.

3. 일시적 국소 뇌허혈 동물의 뇌경색에 대한 효과

우슬추출물의 세포사멸에 대한 보호효과를 바탕으로 허혈성 뇌졸중에 대한 개선 효과를 확인하기 위해 중대뇌동맥 폐쇄(occlusion 90 min, reperfusion 24 hr)로 허혈성 손상이 유발된 흰쥐에 우슬추출물을 50, 100, 200 mg/kg 용량으로 단회 투여 후 뇌 조직을 적출하여 TTC 염색으로 뇌경색의 부피를 측정하였다. 그 결과, 허혈 유발군(vehicle)은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 허혈성 손상으로 뇌경색이 발생함으로써 뇌경색 부피가 29.72±12.7%로 측정되었으며, 허혈 유발 후 우슬추출물을 투여한 군에서는 50, 100, 200 mg/kg 용량에서 각각 27.74±5.26%, 24.95±13.74%, 22.83±8.98%로 측정되어 100, 200 mg/kg 투여군에서 유의적으로 뇌경색 부피가 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

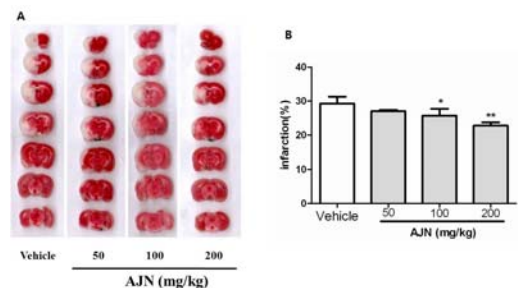


Fig. 5. Effect of Achyranthis Radix water extract on brain infarction in ischemic rats. Ischemic rats were prepared by transient middle cerebral artery occlusion (80 min) and reperfusion (24 hr), and orally administrated with saline or AJN water extract at doses of 50, 100 and 200 mg/kg after reperfusion. (A) Brain infarction was determined by TTC staining. (B) Infarct volumes in saline-administrated vehicle group and AJN-administrated group (n=5, respectively) are expressed as the percentage of hemisphere volumes, and presented as the means±SE. p<0.05 and **p<0.01 vs. vehicle group.

고 찰

최근 우리나라는 노령인구가 증가됨에 따라 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병 등 각종 뇌질환에 의한 사망이 전체 사망 원인에서 우위를 차지하면서, 사회경제적 비용도 급격히 증가하여 뇌질환 치료제 개발에 대한 필요성이 절실히 요구되고 있다¹⁾. 뇌졸중은 단일질환으로는 국내 사망률 1위 질환으로 치료 후에도 반신마비나 언어장애 등 심각한 후유증을 남기고 장기간의 회복과정을 요구하는 만성 혈관 질환이다²⁾.

뇌 안의 모세혈관을 통한 산소 공급은 뇌 세포들의 에너지 대사를 위한 매우 중요한 단계이며, 뇌 혈류의 차단은 국소적 뇌경색의 유발과 수 분 이내 뇌경색 중심부위의 가역적 손상이 일어나게 되고, 빠른 세포사멸을 유도하게 된다²⁵⁾. 신경세포의 사멸은 허혈 발생 직후부터 급격하게 발생되는데 임상학적으로 이를 막는 치료법은 발병 3시간 이내 혈전용해제를 이용해 혈액을 다시 재관류시키는 것인데 사실상 이 방법은 시간적 제한에 따른 현실적 어려움이 많은 것으로 보고 있다. 따라서 손상된 신경세포의 치료는 주로 중심부가 아닌 뇌경색 주변부의 지연성 세포사멸을 막는 것으로 산소와 포도당의 재공급으로 일시적으로 정지되어 있던 세포들의 기능을 회복시킬 수 있는 것으로 보고 있다³⁴⁾. 따라서 최근에는 신경보호제 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 신경세포의 괴사와 세포사멸을 막는 것은 허혈성 뇌손상 치료에 있어 매우 중요한 전략이 될 수 있다.

우슬에 대하여 동의보감²⁹⁾에는 “성질은 짝하며, 맛은苦辣하고 무독하며, 남자의 陰消와 노인의 遺尿를 다스리며, 寒濕의 痿痹와 膝痛으로 인한 屈伸하지 못하는 것과 骨髓를 메우고, 陰氣를 리하게 하고, 머리털이 희는 것과 陰痿가 일어나는 것을 막으며, 腰脊痛을 치료하고, 墮胎시키고, 월경을 통하게 한다” 고 되어 있다. 우슬의 현대 약리적 효과는 진통작용, 혈압강화작용, 고혈압, 류마티스, 관절통과 같은 울혈의 치료, 이노 치료, 강장제 등의 효과가 알려져 있다³⁰⁻³³⁾. 또한 우슬의 성분으로는 oleanolic acid, saponin, metamorphosis hormone, inokosterone, ecdysone, polysaccharide, 20-hydroxyecdysone, steroid 계열인 β -sitosterol, stigmasterol, rubrosterone 등이 보고되어 있다^{20,21)}. 본 연구에서는 쇠무릎(*Achyranthes japonica*)의 물추출물을 제조하여 PC-12 세포에서 혈청 제거에 의한 세포사멸에 대한 보호효과와 중뇌동맥 폐쇄에 의한 허혈성 뇌손상 유발 흰쥐의 뇌 조직에서의 뇌경색 발생 억제 효과를 검증함으로써 우슬의 뇌신경보호효과를 확인하였다.

PC-12 세포는 흰쥐의 부신 수질(adrenal medulla)에 발생한 크롬친화세포종(Pheochromocytoma)으로부터 유래된 세포인데, 뇌의 도파민성 뉴런 계열은 아니지만 신경성 성장인자(nerve growth factor, NGF)를 처리하면 다양한 신경 특이적 유전자를 발현함으로써 신경세포로 최종 분화, 교감신경세포와 유사한 특성을 나타내게 된다. 분화된 PC12 세포는 도파민, 노르에피네프린과 같은 카테콜아민을 합성하고 저장할 수 있으며, 도파민 운반체를 발현하게 된다²⁶⁾. 또한 PC-12 세포는 신경세포사멸 연구에 매우 유용한 세포배양모델로서 소 태아 혈청(fetal bovine serum)의 농도가 세포사멸 조건을 결정하는데 중요하게 작용하기 때문에 혈청을 제거한 배양조건으로 쉽게 세포사멸을 유도할 수 있으며, 배양액

내 소태아혈청의 농도는 세포사멸 조건을 결정하는데 중요하게 작용하고, Bcl-x, Bax, caspase-3 등과 같은 세포사멸 조절 단백질들을 활성을 측정할 수 있다^{27,28)}. 본 연구에서는 혈청을 제거한 배양 조건으로 12시간 배양함으로써 PC12 세포의 세포사멸을 유도하였으며, 혈청 제거로 인해 세포 생존도가 감소하고 세포 형태가 변형되었으며 caspase-3 단백질의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 또한, 우슬 물추출물의 세포사멸로 인한 세포생존도 감소를 증가시키고 caspase-3의 발현을 억제시킴으로써 세포사멸로부터 보호하는 것으로 나타났다.

세포의 죽음은 세포괴사와 세포사멸로 나누어지는데 이것은 세포 외부의 환경과 저산소-허혈의 강도에 의해 결정되며 세포 내 에너지 대사가 중요한 작용을 한다고 보고 있다³⁴⁾. 즉, 뇌 세포는 외부에 손상자극으로부터 세포 내 에너지(ATP, Ca^{+2}) 농도를 낮추어 세포가 괴사 단계로 가는 것을 억제하고, 또한 세포사멸로 진행하기 위한 새로운 유전자 발현에 관여하게 된다. 따라서 세포 배양액 내 포도당이나 산소가 고갈된 저산소-허혈 상태는 세포가 에너지를 만들 수 없는 상태가 되기 때문에 당연히 세포사멸로 이어질 수 밖에 없으나, 배양액 내 산소만 고갈되고 포도당이 있는 상태에서는 해당과정을 통해 에너지를 생성할 수 있으므로 세포사멸 과정이 지연될 것이다³⁵⁾. 따라서 배양세포에서 세포사멸을 유발하기 위한 방법에 대해 많은 연구가 이루어져 왔고 일반적으로 배양액으로부터 혈청이나 배양인자를 제거하는 방법과 배양세포에 방사선이나 자외선, 화학물질 등을 물리적으로 처리하여 유발 시키는 방법 등이 사용되고 있다³⁶⁾.

한편, 일시적인 중뇌동맥 폐쇄에 의한 국소 뇌허혈 흰쥐 모델은 허혈 중심부의 괴사와 주변부의 지연성 세포사멸이 모두 공존하는 실험모델로 임상적인 중풍환자의 병태와 유사하고, 행동양상이 비슷한 특징이 있어 사람의 중풍 실험모델로도 널리 사용되고 있다³⁸⁾. 본 모델에서 국소적 뇌경색이 유발되면 수 분 내에 내피 부종으로 인해 모세혈관 내경이 좁아지게 되며 또한 무산소성 에너지 대사 산물인 젖산이 축적되는데 이는 혈관내피세포, 신경세포 및 신경아교세포의 세포부종을 초래함으로써 뇌경색 유발 후 1~3일 후 뇌-혈관장벽(Blood-brain barrier)의 손상이 최고점에 이르게 된다. 즉, BBB의 손상에 따른 혈장의 유출과 외부 물질의 출입은 조직 부종을 발생시키고 결국 관류장애로 인한 뇌혈관 손상과 신경세포의 산소와 에너지 대사 장애로 이어져 신경세포의 손상과 세포사멸을 유도하게 된다³⁷⁾. 본 연구에서는 우슬 물추출물의 신경보호 효과를 확인하기 위하여 세포배양모델 외 국소 뇌허혈 흰쥐 모델을 제작하였으며, 우슬 물추출물의 투여에 의해 뇌경색의 부피가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

이상의 결과로부터 우슬 물추출물은 혈청을 제거를 통해 세포사멸이 발생한 PC12 세포에서 세포증식을 유도하고, caspase-3의 발현을 억제시킴으로써 세포를 보호하였으며, 중뇌동맥 폐쇄로 인한 허혈성 뇌졸중 유발 흰쥐에서 뇌경색의 부피를 감소시킴으로써 뇌조직을 보호하는 것으로 나타났다.

결 론

본 연구에서는 신경세포사멸 세포모델과 허혈성 뇌졸중 등

물모델에서 우슬 물추출물의 신경보호효과를 확인하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다

1. 우슬추출물은 PC-12 세포에서 혈청제거로 인한 세포사멸로부터 세포증식을 유도하였다.
2. 우슬추출물은 PC-12 세포에서 세포사멸에 따른 caspase-3 발현 증가를 유의적으로 억제하였다.
3. 우슬추출물은 허혈성 뇌졸중 흰쥐에서 뇌경색의 부피를 유의적으로 감소시켰다.

따라서 우슬은 신경세포 사멸을 막고, 허혈성 손상에 따른 뇌경색 발생을 감소시킴으로써 뇌 신경보호 효과가 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업(B100049) 및 2010년도 한국한의학연구원의 연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Park SY, Goo YD, Kim WK, Treatment of brain II, development trends and strategies for stroke treatment, Promising future business item analysis of issues(BA407), Korea Institute of Science and Technology Information, 2005 : 1-63.
2. Kim ES, Park DU, Lee JE, Treatment of brain I, Industrial Market Analysis, Korea Institute of Science and Technology Information, 2006 : 25-55.
3. Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW, Very delayed infarctoin after mild focal cerebral ischemia : a role for apoptosis? J Cereb Blood Flow Metab 1996 ; 16 : 195-201.
4. Li Y, Chopp M, Jiang N, Yao F, Zaloga C, Temporal profile of In Situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat, J Cereb Blood Flow Metab 1995 ; 15 : 389-97.
5. Danno K, Horio T. Formation of UV-induced apoptosis relates to the cell cycle, Br J Dermatol, 1992 ; 107 : 423-28.
6. Golstein P. Controlling cell death, Science, 1997 ; 275 : 1081-2.
7. Thompson CB, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, Science, 1995 ; 267 : 1456-62.
8. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, Br J Cancer, 1972 ; 26 : 239-57.
9. Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, Kyriakls JM, Zon LI, Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-jun, Nature, 1994 ; 372 : 794-8.
10. Williams GT, Apoptosis in the immune system, J Pathol, 1994 ; 173 : 1-4.
11. Camilleri B, Davi F, Feuillard J, Bourgeois C, Seilhean D, Hauw JJ, Raphael M, High expression of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and Bcl-2 oncoprotein in acquired immunodeficiency syndrome-related primary brain lymphomas, Blood, 1995 ; 86 : 432-5.
12. Behl C, Hovey L, Krajewski S, Schubert D, Reed JC, Bcl-2 prevents killing of neuronal cells by glutamate but not by amyloid beta protein, Biochem Biophys Res Comm, 1993 ; 197 : 949-56.
13. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR, Cell death : The significance of apoptosis, Int Rev Cytol, 1980 ; 68 : 251-306.
14. Ma A, Guo H, Effect of radix Achyranthis bidentatae on memory and endurance, Zhong Yao Cai, 1998 ; 21 : 624-6.
15. Yang Z, Zhang B, Cai L, Study on processing conditions of wine baked radix Achyranthis bidentatae, Zhong Yao Cai, 2000 ; 23 : 681-2.
16. Wang T, Cui SY, Suo YR, Lu RH, Studies on water-soluble chemical constituents in root of Achyranthes bidentata, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2004 ; 29 : 649-52.
17. Kim JH, KI JY, Ann JY, Park HJ, Kim HJ, Kwak HB, Oh JM, Kim YK, . Inhibitory Effects of Achyranthis Bidentatae Radix on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption, Kor J Herbology, 2010 ; 25(1) : 65-74.
18. Kim CS, Park YK, The therapeutic effect of Achyranthis Radix on the collagen-induced arthritis in mice, Kor J Herbology, 2010 ; 25(4) : 129-35.
19. Park JS, Seong NS, Lee YJ, Comparative study on the anti-oxidative effects of Achyranthis Japonicae Radix, Achyranthis Bidentatae Radix and Cyathulae Radix, Kor J Herbology, 2007 ; 22(4) : 155-67.
20. Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E, *Lactobacills reuteri* as therapeutic agent in acute diarrhoea in young children, J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr, 1997 ; 24 : 399-404.
21. Marcone MF, Jahaniaval F, Aliee H, Kakuda Y, Chemical characterization of Achyranthes bidentata seed, Food Chemistry, 2003 ; 81 : 7-12.
22. Kim MS, SO HS, Park JS, Lee KM, Moon BS, Lee

- HS, Kim TY, Moon SK, Park RK. Hwansodan protects PC12 cells against serum-deprivation-induced apoptosis via a mechanism involving Ras and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway. *General Pharmacology*. 2000 ; 34 : 227-35.
23. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol. Pharmaceut. Bull.* 1996 ; 19 : 1518-20.
24. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986 ; 17(3) : 472-76.
25. Lo EH, Moskowitz MA, Jacobs TP. Exciting, radical, suicidal: How brain cells die after stroke. *Stroke*. 2005 ; 36 : 189-92.
26. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976 ; 73 : 2424-28.
27. Rong P, Bennie AM, Epa WR, Barrett GL. Nerve growth factor determines survival and death of PC12 cells by regulation of the bcl-x, bax, and caspase-3 genes. *J Neurochem*. 1999 ; 72 : 2294-300.
28. Quirk SM, Harman RM, Cowan RG. Regulation of fas antigen (Fas, CD95)-mediated apoptosis of bovine granulosa cells by serum and growth factors. *Biol Reprod*. 2000 ; 63 : 1278-1284.
29. Huh J. Tonguibogam, seoul : Hyesungsa. 1994.
30. Lee SD, Kim KS. The effect of *Achyranthis Radix* and *Apitoxin Aqua*-acupuncture on cellular immune responses to LPS-induced arthritis in mice. *J Kor Acupuncture & Moxibustion Society*. 1999 ; 16 : 287-315.
31. Do WS, Kim KH, Kim KS. Effect of aqua-acupuncture(Cortex Ulmi Pumilae, Ramulus Cinnamomum, Radix achyranthis, Apitoxin · Calculus Bovis · Fel Ursi · Moschus compound) in mice with lipopolysaccharide induced arthritis. *J Kor Acupuncture & Moxibustion Society*. 2001 ; 18 : 157-69.
32. Li XP. Experimental study on anti-senility of the 4 famous Chinese herbs produced in Huaqing area. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 1991 ; 11 : 486-7.
33. Jung SM, Choi SI, Park SM, Heo TR. Antimicrobial effect of *Achyranthes japonica* Nakai extracts against *Clostridium difficile*. *Kor J Food Sci Technol*. 2007 ; 39 : 564-8.
34. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*. 1997 ; 57 : 1835-40.
35. Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY, Engler RL. Preconditioning rabbit cardiomyocytes. Role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. *J Clin Invest*. 1996 ; 97 : 2391-98.
36. Danno K, Horio T. Formation of UV-induced apoptosis relates to the cell cycle. *Br J Dermatol*. 1992 ; 107 : 423-428.
37. Ding Y, Li J, Luan X, Ding YH, Lai Q, Rafols JA, Phillis JW, Clark JC, Diaz FG. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. *Neuroscience*. 2004 ; 124 : 583-591.
38. Song HY, Park YK. Neuroprotective effect of modified *Boyanghwano-Tang* and the major medicinal plants, *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix* on ischemic stroke in rats. *Kor J Herbology*. 2010 ; 25(2) : 71-79.