

# 遠志가 뇌혈류 저하에 의한 흰쥐 뇌조직의 산화적 손상과 해마신경세포 자연사에 미치는 영향

구용모<sup>#</sup>, 곽희준, 권만재, 송민철, 이지승, 신정원, 손낙원<sup>\*</sup>

경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공

## Effects of Polygalae Radix on Brain Tissue Oxidative Damage and Neuronal Apoptosis in Hippocampus Induced by Cerebral Hypoperfusion in Rats

Yong-Mo Koo<sup>#</sup>, Hee-Jun Kwak, Man-Jae Kwon, Mincheol Song, Ji-Seung Lee, Jung-Won Shin, Nak-Won Sohn<sup>\*</sup>

Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

### ABSTRACT

**Objectives** : Polygalae Radix (POL) has an ameliorating effect on learning and memory impairment caused by cerebral hypoperfusion. In regard to POL's action mechanism, this study was carried out to investigate the effects of POL on oxidative damage and neuronal apoptosis induced by cerebral hypoperfusion in rats.

**Methods** : The cerebral hypoperfusion was induced by permanent bilateral common carotid artery occlusion (pBCAO) in Sprague-Dawley rats. POL was administered orally once a day (130 mg/kg of water-extract) for 28 days starting at 4 weeks after the pBCAO. Superoxide dismutase (SOD) activities and malondialdehyde (MDA) levels in the brain tissue were measured using ELISA method. Expressions of 4-hydroxynonenal (4HNE) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) were observed using immunohistochemistry. In addition, neuronal apoptosis was evaluated with Cresyl violet staining, TUNEL labeling, and immunohistochemistry against Bax and caspase-3.

**Results** : POL treatment significantly increased SOD activities and significantly reduced MDA levels in the cerebral cortex. The up-regulations of 4HNE and 8-OHdG expression caused by pBCAO in the CA1 of hippocampus were significantly attenuated by POL treatment. POL treatment also restored the reduction of CA1 thickness and CA1 neurons caused by pBCAO and significantly attenuated the apoptotic markers including TUNEL-positive cells, Bax, and caspase-3 expression in the CA1 of hippocampus.

**Conclusions** : The results show that POL attenuated the oxidative damage in brain tissue and neuronal apoptosis in the hippocampus caused by the cerebral hypoperfusion. It suggests that POL can be a beneficial medicinal herb to treat the brain diseases related to cerebral hypoperfusion.

**Key words** : Polygalae radix, Cerebral hypoperfusion, Oxidative damage, Neuronal apoptosis, 4HNE, 8-OHdG

### 서론

산화적 손상 (oxidative damage)이란 과도한 활성산소

(reactive oxygen species, ROS)의 생성으로 세포의 단백질과 지방질 및 DNA가 손상되는 것으로<sup>1)</sup>, 뇌조직은 산화적 손상에 특히 취약한 특성을 가지고 있는데<sup>2)</sup>, 이것은 뇌조직이

\*Corresponding author : Nak-Won Sohn, Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

· Tel : +82-31-201-2747 · E-mail : sohnnw@khu.ac.kr

#First author : Yong-Mo Koo, Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

· Tel : +82-31-201-2747 · E-mail : kikif@naver.com

· Received : 14 December 2015 · Revised : 14 January 2016 · Accepted : 14 January 2016

높은 산소 이용률을 보이고, 고도불포화지방산 (polyunsaturated fatty acid) 함량이 높으며, 산화환원-활성 금속 (redox-active metal)들을 가지고 있기 때문이다<sup>2)</sup>. 이러한 신경세포의 산화적 손상은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease)과 파킨슨씨병 (Parkinson's disease)을 포함한 다양한 신경퇴행성 질환의 유발과 진행에 영향을 미치며, 노화를 촉진하는 인자가 된다<sup>1,3)</sup>. 알츠하이머병에서 산화적 손상은 신경세포의 사멸을 유발하고,  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) 침착을 촉진하며,  $A\beta$ 의 신경독성을 증가시켜 인지장애를 악화시킨다<sup>4)</sup>. 파킨슨씨병은 산화적 손상에 의해 dopamine 신경세포의 퇴화가 촉진된 결과로 설명하고 있다<sup>5)</sup>. 이러한 신경퇴행성 질환들의 유발에 중추신경계 염증 (neuroinflammation), 신경세포에 대한 흥분성독성 (excitotoxicity), 미토콘드리아의 기능장애 등이 관여하고 있으며, 이러한 인자들 또한 산화적 손상과 밀접하게 연관되어 있다<sup>1,6)</sup>. 특히 산화적 손상은 세포핵의 DNA와 미토콘드리아 DNA에 손상을 유발하므로 신경세포의 사멸은 물론 노화를 촉진하게 된다<sup>7,8)</sup>.

한편으로, 遠志 (Polygalae Radix)는 중추신경계 질환들과 인지장애 개선에 가장 많이 사용되는 한약물 중 하나이다<sup>9)</sup>. 실험연구를 통해 遠志는  $A\beta$ 와 N-methyl-D-aspartate (NMDA)에 의한 신경세포의 손상을 억제하는 작용<sup>10,11)</sup>, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)에 의한 dopamine 신경세포의 손상을 보호하는 작용이 보고되었다<sup>12)</sup>. 또한 실험동물의 *in vivo* 연구에서  $A\beta$  또는 scopolamine 투여에 의한 학습과 기억 장애를 개선하는 효능이 보고되었고<sup>13-15)</sup>, 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 기억장애를 개선하는 효능이 보고되었다<sup>16)</sup>. 이러한 효능의 작용기전과 관련하여, 遠志의 유효성분인 tenuigenin, polygalasponin, oligosaccharide ester 등이 항산화작용을 통해 신경세포 손상을 방지하고 노화를 억제하며, 인지장애를 개선한다고 보고되었으나<sup>16-19)</sup>, 遠志 자체로는 뇌조직의 산화적 손상에 대한 연구를 찾아보기 어렵다.

그러므로 본 연구에서 遠志가 뇌조직의 산화적 손상에 미치는 영향을 관찰하고자 흰쥐에서 양측 총경동맥을 영구적으로 폐쇄하는 방법에 의해 만성적인 뇌혈류 저하를 유발하고, 遠志 물추출물을 4주간 경구투여한 다음 뇌조직에서 산화적 손상 지표들인 superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (4HNE) 및 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)의 변화를 관찰하였으며, 해마에서 신경세포 손상에 대한 영향을 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL), Bax와 caspase-3 발현을 관찰한바 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 나라바이오텍 (Nara Biotechnology, Seoul, Korea)에서 구입한 280-300 g의 수컷 Sprague-Dawley 흰 쥐를 사용하였다. 실험동물의 사육과 처치는 경희대학교 실험동물윤리위원회의 방침과 동물실험관련 규정을 따랐으며, 실험

에 사용한 흰쥐는 온도 (21-23 °C), 습도 (40-60%)와 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균공수와 사료를 자유롭게 공급하며 사육되었고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

### 2. 약물의 제조 및 투여

본 실험에 사용한 遠志 (the root of *Polygala tenuifolia* Willd., Polygalaceae; POL)는 (주)허브메디에서 구입하였다. 세절한 遠志 200 g을 2,500 ml의 물과 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 끓기 시작한 후부터 1시간 동안 전탕하고, 1차 여과한 전탕액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 -70 °C, 10 mmHg에서 동결 건조하여 39.0 g의 추출물을 얻었다. 수율은 19.5% 이었으며, 사람 체중비례 투여량의 10배인 130 mg/kg을 실험동물의 1회 투여량으로 하여 1일 1회 4주 동안 (총 28일간) 경구투여 하였다.

### 3. 실험군의 구분

실험동물을 무작위로 4개 군으로 구분하였다. 대조군 (Control)의 실험동물에는 양측 총경동맥의 영구폐쇄 (permanent bilateral common carotid artery occlusion, pBCAO)를 실시하였고, Sham군 (Sham)은 대조군과 같이 pBCAO를 실시하기 위한 준비수술은 하였으나 pBCAO는 실시하지 않은 군으로 하였다. 遠志추출물 투여군 (POL)은 대조군과 같이 pBCAO를 실시하고, 4주 후부터 4주 동안 (pBCAO 실시 후 5-8주, 총 28일간) 遠志추출물을 경구투여한 실험동물로 구성하였다. 정상군은 pBCAO 및 약물투여 등 아무런 처치를 않은 군으로 실험 지표들의 기준으로 삼았으며 실험결과를 제시하지는 않았다. 실험동물은 각 군 당 12마리씩, 총 48마리를 사용하였다.

### 4. 양측 총경동맥의 영구 폐쇄

만성적인 뇌혈류 저하를 유발하기 위해 pBCAO를 실시하였다. 실험동물을 10 mg/kg의 tiletamine과 zolazepam (50 : 50 ; Zoletil, Virbac Laboratoris, Carros, France) 복강 주사로 마취하였으며, 수술 동안 Electronic Temperature Controller (CMA150, CMA, Sweden)를 사용하여 정상체온 (37 ± 0.5 °C)을 유지하였고, 추가적인 마취가 필요할 시 1.0% isoflurane (with 70% N<sub>2</sub>O + 30% O<sub>2</sub> gas)의 흡입마취를 실시하였다. 전경부 피부를 절개하고 주위 혈관 및 신경들의 손상없이 총경동맥을 분리하여 5-0 굵기의 수술실로 고리를 만든 다음 자연적으로 풀리지 않도록 2차례 이상 완전하게 결찰하였다. 이후 전경부 근육과 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였으며, 마취에서 깨어난 후 신경학적 이상 행동을 보이는 실험동물은 실험에서 제외하였다.

### 5. 뇌조직의 처리

각 군의 실험동물을 무작위로 6마리씩 나누어 6마리는 SOD와 MDA 측정용으로, 6마리는 조직염색용으로 사용하였다. SOD와 MDA 측정용 실험동물은 단두로 희생시키고

즉시 뇌를 적출한 다음 얼음 위에서 대뇌피질과 해마를 분리하여 dry ice-isopentane 용액으로 급속 동결시키고, 무게를 측정하여 기록한 후 측정 전까지 -80 °C에 보관하였다. 조직염색용 실험동물은 Zoletil로 깊게 마취한 다음 개흉하고, 심장을 통하여 0.05 M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출하여 24시간 동안 post-fixation하고, sucrose 용액에 담귀 침전시킨 다음 뇌조직을 dry ice-isopentane 용액으로 동결시켰다. 동결조직은 cryocut으로 30 µm 두께의 횡단절편으로 제작하여 조직염색에 사용하였다.

## 6. SOD와 MDA의 ELISA 측정

분리된 대뇌피질과 해마 조직을 각각 Tris-HCl buffer에 넣어 균질화하고 상층액을 원심분리 하였으며, 단백질 총량은 Bradford 방법<sup>20)</sup>을 사용하여 정량하였다. SOD 측정은 OxiSelect™ Superoxide Dismutase Activity Assay kit (STA-340, Cell Biolabs, USA)를, MDA 측정은 OxiSelect™ MDA Adduct ELISA kit (STA-332, Cell Biolabs, USA)를 사용하였으며, 각 회사가 제공하는 측정방법 설명서에 따라 시행하였고, 각 표본마다 2회 반복 측정하였다. 간단히 설명하면, SOD는 96-well microtiter plate에 각각의 정샘플 10 µl, xanthine solution 5 µl, chromagen solution 5 µl, SOD assay buffer 10 µl, 증류수 40 µl를 넣어 준비한 다음 최종적으로 10 µl의 xanthine oxidase solution을 가하여 37 °C에서 1시간동안 반응시키고, microplate reader를 사용하여 90 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA는 MDA conjugate가 코팅된 well plate에 50 µl의 측정샘플을 넣고 실온에서 10분간 반응시키고, anti-MDA antibody를 50 µl를 가하여 실온에서 1시간 반응시킨 다음 wash buffer로 세 번 씻고, HRP conjugate 2차항체 100 µl를 가하여 다시 실온에서 1시간 반응시켰다. 이후 wash buffer로 다시 3번 씻고, 100 µl의 substrate solution을 가하여 20분간 반응시킨 후 100 µl의 stop solution을 가하여 반응을 정지시키고 즉시 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 7. 뇌조직의 염색

### 1) Cresyl violet 염색

뇌조직 신경세포들의 조직학적 소견을 관찰하기 위해, 0.5% cresyl violet 용액에 3분간 염색한 다음 수세하고 80%, 90%, 95% 및 100% ethanol을 사용하여 탈수하고, 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

### 2) TUNEL 염색

신경세포의 자연사 관찰을 위해서 TACS 2 TdT-DAB in situ Apoptosis Detection kit (Trevigen, Cat# 4810-30-K, USA)를 사용하였으며, 그 방법은 다음과 같다. 뇌조직을 PBS로 세척하고 cytonin에서 30분간 반응시킨 다음 다시 PBS로 세척하고, TdT labeling buffer에 5분간 반응시킨 뒤, labeling reaction mix (TdT dNTP mix, TdT enzyme,

50x Mn<sup>2+</sup> stock, 1x TdT labeling buffer)로 37 °C humidity chamber에 1시간 동안 반응시켰다. 이후 TdT stop buffer로 반응을 멈추고, 다시 PBS로 세척한 후 37 °C humidity chamber에서 strep-HRP solution에 10분간 반응시켰다. 이후 과정이 끝나면 3,3'-diamino-benzidine tetrachloride (DAB, Sigma-Aldrich, USA)로 발색반응을 일으킨 다음 수세하고 탈수, 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

### 3) Immunohistochemistry

뇌조직 절편을 0.05 M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10분간 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain, USA)과 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 PBS로 3회 씻어낸 후, mouse anti-4HNE (1:200, ab48506, Abcam, UK)와 mouse anti-8OHdG (1:200, ab62623, Abcam, UK), rabbit anti-Bax antibody (1:200, ab7977, Abcam, UK), rabbit anti-caspase-3 antibody (1:300, BS1518, BioWorld, USA)를 1차항체로 사용하여 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4 °C에서 반응시켰다. 이후 2차항체에 반응시키고, avidin-biotin complex (Vector Laboratories, USA) 방법에 따라 0.05% DAB (Sigma-Aldrich, USA)로 발색한 다음 통상적인 면역조직화학염색법에 따라 조직표본을 제작하였다. 희소돌기아교세포 표식자인 GSTpi와 4HNE 및 8OHdG의 이중면역형광염색을 위해서는 rabbit anti-GSTpi (1:200, #153949, Abcam, UK)와 각각의 1차항체에 반응시키고, 2차항체로 Cy2-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch, USA)와 Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:500, Jackson Immuno Research, USA)를 사용하였다.

## 8. 뇌조직의 관찰

면역조직화학염색된 4HNE와 8-OHdG, Bax, caspase-3는 CCD카메라 (DP70, Olympus, Japan)가 장착된 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였으며, 발현의 변화를 정량적으로 비교하기 위해 조직영상을 CCD카메라를 통해 컴퓨터에 저장하고, ImageJ software (Ver. 1.44p, NIH, USA)를 사용하여 해마의 CA1과 치아이랑 (dentate gyrus, DG) 부위에서 면역염색 발현의 강도를 측정하였고, CA1에서 신경세포 층의 두께와 신경세포 수를 측정하였다. 각 실험동물 당 4장의 조직표본, 각 조직표본 당 4개의 시야에서 측정하여 그 평균값을 각 실험동물의 측정치로 사용하였다.

## 9. 통계처리

본 논문에 제시된 자료들은 Mean ± Standard error로 표시되었으며, 각 자료의 통계적 유의성 검증은 Student's *t*-test를 사용하여 *p* < 0.05 이상의 유의수준으로 검정하였다.

## 결 과

### 1. 뇌조직의 superoxide dismutase 활성도 변화

대뇌피질과 해마 조직에서 SOD 활성도를 측정한 결과, 대뇌 피질에서 Sham군은  $159.1 \pm 6.4$  U/mg tissue 이었고 Control군은  $111.9 \pm 5.5$  U/mg tissue로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있는 감소를 나타내었으며, POL군은  $139.3 \pm 10.8$  U/mg tissue로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있는 증가를 나타내었다. 해마 조직에서 Sham군은  $112.8 \pm 13.5$  U/mg tissue 이었고 Control군은  $67.9 \pm 4.0$  U/mg tissue로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 감소를 나타내었으며, POL군은  $86.1 \pm 3.6$  U/mg tissue로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 증가를 나타내었다(Fig. 1).

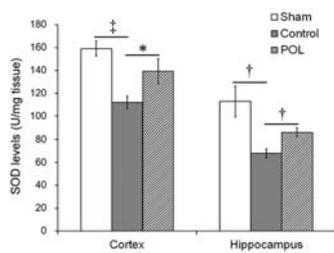


Fig. 1. Effect of Polygalae Radix (POL) on superoxide dismutase (SOD) activities in the cerebral cortex and the hippocampus. Data are represented by mean  $\pm$  SEM ( $n=6$  in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups or between Control and POL groups (\*,  $p < 0.05$ ; †,  $p < 0.01$ ; ‡,  $p < 0.001$ ).

### 2. 뇌조직의 malondialdehyde 농도 변화

대뇌피질과 해마 조직에서 MDA 농도를 측정한 결과, 대뇌 피질에서 Sham군은  $4.01 \pm 0.13$  nmol/mg tissue 이었고 Control군은  $5.43 \pm 0.27$  nmol/mg tissue로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있는 증가를 나타내었으며, POL군은  $4.42 \pm 0.30$  nmol/mg tissue로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있는 감소를 나타내었다. 해마 조직에서는 Sham군은  $4.76 \pm 0.23$  nmol/mg tissue, Control군은  $5.97 \pm 0.21$  nmol/mg tissue 이었으며, POL군은  $5.16 \pm 0.43$  nmol/mg tissue로 Control군에 비해 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

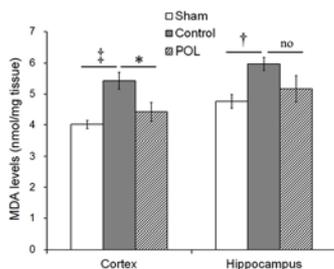


Fig. 2. Effect of Polygalae Radix (POL) on malondialdehyde (MDA) levels in the cerebral cortex and the hippocampus. Data are represented by mean  $\pm$  SEM ( $n=6$  in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups or between Control and POL groups (\*,  $p < 0.05$ ; †,  $p < 0.01$ ; ‡,  $p < 0.001$ ).

### 3. 해마 CA1에서 4-hydroxynonenal과 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 발현의 변화

해마 CA1에서 4HNE와 8-OHdG 발현 정도를 측정한 결과, 4HNE는 Sham군의  $120.4 \pm 2.4$ 에 비해 Control군은  $148.0 \pm 5.7$ 로 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 증가를 나타내었으며, POL군은  $129.9 \pm 3.0$ 으로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게 4HNE 발현 정도가 감소하였다. 또한 8-OHdG 발현 정도는 Sham군의  $151.7 \pm 3.2$ 에 비해 Control군은  $212.3 \pm 9.8$ 로 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있는 증가를 나타내었고, POL군은  $168.1 \pm 6.4$ 로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 8-OHdG 발현의 감소가 관찰되었다(Fig. 3).

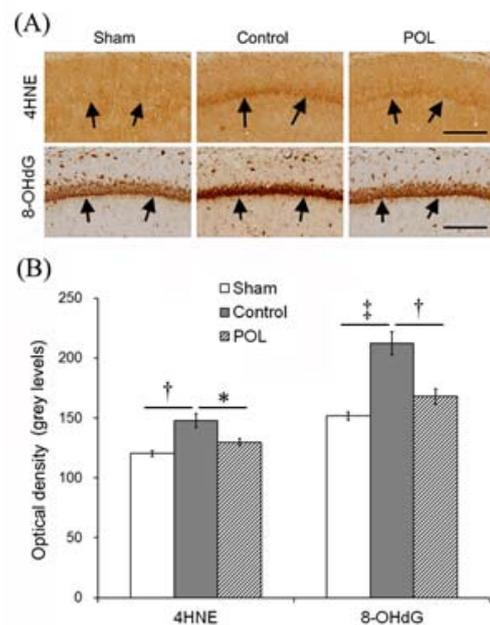


Fig. 3. Effect of Polygalae Radix (POL) on 4HNE- and 8-OHdG-expressing cells in the hippocampus. (A) Representative photographs of the 4HNE and 8-OHdG immuno-stained hippocampus. Scale bars in CA1 and DG sections are  $200 \mu\text{m}$ , applicable to all sections. (B) Changes of the optical densities of 4HNE- and 8-OHdG-expressing cells in the CA1 hippocampus. Data are represented by mean  $\pm$  SEM ( $n=6$  in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups or between Control and POL groups (\*,  $p < 0.05$ ; †,  $p < 0.01$ ; ‡,  $p < 0.001$ ).

### 4. 해마 CA1 두께 및 신경세포 수의 변화

해마 CA1의 두께를 측정한 결과, Sham군의  $56.7 \pm 1.5 \mu\text{m}$ 에 비해 Control군은  $25.4 \pm 2.1 \mu\text{m}$ 로 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있는 감소를 나타내었으며, POL군은  $46.6 \pm 5.3 \mu\text{m}$ 로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있게 CA1 두께의 감소가 억제되었다(Fig. 4B). 또한 CA1의  $500 \mu\text{m}$  길이에서 신경세포 수를 측정한 결과, Sham군은  $166.0 \pm 6.7$  개 /  $500 \mu\text{m}$ , Control군은  $114.4 \pm 8.2$  개 /  $500 \mu\text{m}$ 로 Sham군에 비해 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있는 감소를 나타내었고, POL군은  $144.0 \pm 7.1$  개 /  $500 \mu\text{m}$ 로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게 CA1 신경세포 수의 감소가 억제되었다(Fig. 4C).

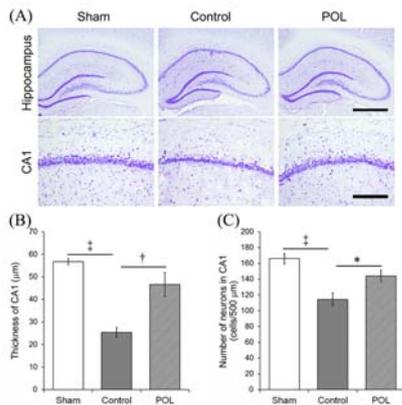


Fig. 4. Effect of Polygalae Radix (POL) on the thickness of CA1 and the number CA1 neurons in the hippocampus. (A) Representative photographs of the cresyl violet-stained hippocampus. Scale bar in Hippocampus section is 1.0 mm and scale bar in CA1 section is 200 µm. (B) Changes of the thickness of CA1 hippocampus. (C) Changes of the number of CA1 neurons. Data are represented by mean ± SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups or between Control and POL groups (\*,  $p < 0.05$ ; †,  $p < 0.01$ ; ‡,  $p < 0.001$ ).

### 5. 해마에서 TUNEL 양성세포 수의 변화

해마 CA1과 DG 구역에서 각각 TUNEL 양성세포 수를 측정한 결과, CA1에서 Sham군은  $2.0 \pm 0.4$  개 /  $10^5 \mu\text{m}^2$ , Control군은  $43.6 \pm 3.1$  개 /  $10^5 \mu\text{m}^2$ 으로 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있는 증가를 나타내었으며, POL군은  $28.8 \pm 3.3$  개 /  $10^5 \mu\text{m}^2$ 으로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 TUNEL 양성세포 수의 감소를 나타내었다(Fig. 5). DG 구역에서는 Sham군은  $5.2 \pm 1.2$  개 /  $10^5 \mu\text{m}^2$ , Control군은  $60.6 \pm 4.0$  개 /  $10^5 \mu\text{m}^2$ 이었으며, POL군은  $50.4 \pm 3.9$  개 /  $10^5 \mu\text{m}^2$ 으로 Control군에 비해 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 5).

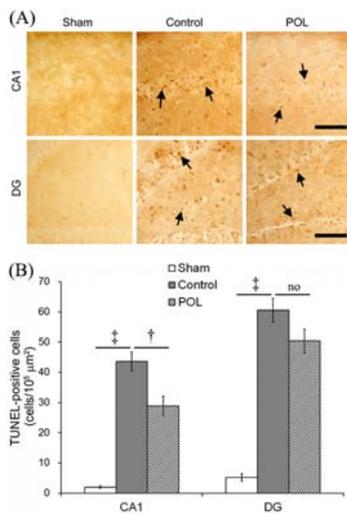


Fig. 5. Effect of Polygalae Radix (POL) on the TUNEL-positive cells in the hippocampus. (A) Representative photographs of the TUNEL-labeled hippocampus. Scale bars in CA1 and DG sections are 100 µm. (B) Changes of the number of TUNEL-positive cells in the CA1 and DG of hippocampus. Data are represented by mean ± SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups or between Control and POL groups (\*,  $p < 0.01$ ; †,  $p < 0.001$ ).

### 6. 해마에서 Bax 발현의 변화

해마 CA1과 DG 구역에서 각각 Bax 발현 정도를 측정된 결과, CA1에서 Sham군의  $90.3 \pm 3.7$ 에 비해 Control군은  $117.2 \pm 6.1$ 로 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 증가를 나타내었고, POL군은  $98.1 \pm 4.0$ 으로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게 Bax 발현 정도가 감소하였다(Fig. 6). DG 구역에서는 Sham군은  $78.8 \pm 9.3$ , Control군은  $107.9 \pm 6.3$ 이었으며, POL군은  $89.5 \pm 5.4$ 로 역시 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게 Bax 발현 정도가 감소하였다(Fig. 6).

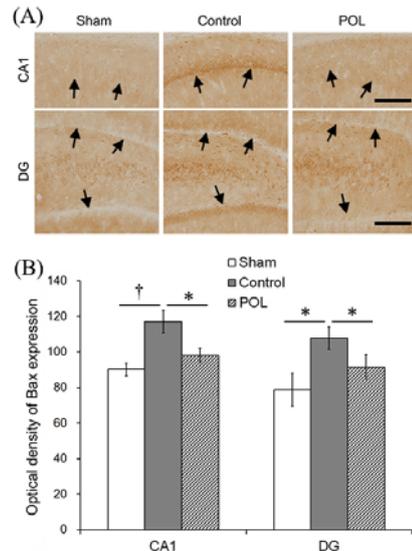


Fig. 6. Effect of Polygalae Radix (POL) on the Bax-expressing cells in the hippocampus. (A) Representative photographs of the Bax-immuno-stained hippocampus. Scale bars in CA1 and DG sections are 200 µm. (B) Changes of the optical density of the Bax-expressing cells in the CA1 and DG of hippocampus. Data are represented by mean ± SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups or between Control and POL groups (\*,  $p < 0.05$ ; †,  $p < 0.01$ ).

### 7. 해마에서 caspase-3 발현의 변화

해마 CA1과 DG 구역에서 각각 caspase-3 발현 정도를 측정된 결과, CA1에서 Sham군의  $84.5 \pm 1.3$ 에 비해 Control군은  $147.8 \pm 7.5$ 로 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있는 증가를 나타내었으며, POL군은  $99.8 \pm 5.3$ 으로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있게 caspase-3 발현 정도가 감소하였다(Fig. 7). DG 구역에서는 Sham군은  $96.6 \pm 2.4$ , Control군은  $161.9 \pm 7.3$ 이었으며, POL군은  $116.8 \pm 8.1$ 로 Control군에 비해 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 caspase-3 발현 정도의 감소를 나타내었다(Fig. 7).

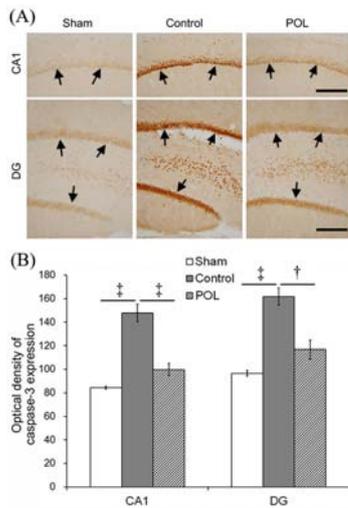


Fig. 7. Effect of Polygalae Radix (POL) on the caspase-3-expressing cells in the hippocampus. (A) Representative photographs of the caspase-3 immuno-stained hippocampus. Scale bars in CA1 and DG sections are 200  $\mu$ m. (B) Changes of the optical density of the caspase-3-expressing cells in the CA1 and DG of hippocampus. Data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups or between Control and POL groups ( $\dagger$ ,  $p < 0.01$ ;  $\ddagger$ ,  $p < 0.001$ ).

## 고찰

遠志는 원지과 (Polygalaceae)에 속한 다년생 초본인 원지 (*Polygala tenuifolia* Willd.)의 뿌리를 건조한 것으로 寧心安神, 益智, 祛痰開竅의 작용으로 心神不安, 驚悸, 不眠, 健忘, 精神錯亂, 神志恍惚 등을 치료하는 효능이 있다고 하였으며<sup>21)</sup>, 중추신경계 질환과 인지기능 장애의 개선에 가장 많이 사용되는 한약물 중 하나이다<sup>9)</sup>. 본 연구에서는 이러한 효능의 遠志가 다양한 중추신경계 질환의 유발과 진행에 관여하는 뇌 조직의 산화적 손상에 대한 영향을 관찰하고자 하였다. 뇌혈류의 저하는 뇌 신경세포에 산화적 손상을 유발하므로 양측 총경동맥을 폐쇄하여 만성적인 뇌혈류 저하를 유발하였다<sup>22, 23)</sup>.

ROS는 산화적 손상을 일으키는 물질로서 SOD, glutathione peroxidase 및 catalase 등의 항산화 효소들에 의해서 제거 된다<sup>1)</sup>. 이중 SOD는 superoxide ( $O_2^-$ )를 산소와 과산화수소로 변환시키는 촉매 효소이며, 구리 (Cu), 아연 (Zn), 망간 (Mn), 철 (Fe) 및 니켈 (Ni)을 보조인자로 가지고 있는데, 이들 중에서 거의 모든 진핵세포생물이 포함하고 있는 Cu-Zn-SOD (SOD1)가 세포질에서 항산화 작용을 수행하여 ROS 생성을 억제하는 등의 산화적 손상을 보호하는 작용을 한다<sup>24)</sup>. 같은 맥락으로, 알츠하이머병 등 산화적 손상에 의한 다양한 신경퇴행성 질환에서 SOD 수치가 저하되어 있으며<sup>25)</sup>, 항산화제 장기간 투여로 인해 증가된 SOD 활성은 ROS를 제거하여 신경세포 손상을 억제한다는 것은 이미 잘 알려져 있다<sup>1)</sup>. 한편, MDA는 ROS가 고도불포화지방질 (polyunsaturated lipids)을 분해함으로써 생성되는 것으로<sup>26)</sup>, 이는 활성 aldehyde의 일종으로 세포독성으로 작용할 뿐 아니라, DNA의 deoxyadenosine과 deoxyguanosine에 작용하여 손상시키므로 돌연변이 유발물질로도 작용한

다<sup>27)</sup>. MDA의 발생은 자연적이며, 조직에서 MDA 수치가 증가하는 것은 산화적 손상 정도를 판정하는 지표로 활용된다<sup>28)</sup>. 본 연구에서는 만성적인 뇌혈류를 유발한 상태에서 遠志를 4주간 투여한 결과 대뇌피질과 해마 조직에서 SOD 수치가 유의하게 증가하였다. 또한 뇌조직의 MDA 수치를 측정된 결과, pBCAO의 대조군은 대뇌피질과 해마 모두에서 MDA 수치가 유의하게 증가하였고, 遠志투여군은 대뇌피질에서 MDA 수치를 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 이전의 연구에서 遠志 및 遠志 유효성분들이 항산화작용이 있다는 보고들<sup>16-19)</sup>과 함께 살펴보면 遠志는 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 뇌조직의 산화적 손상에 유의한 효능이 있는 것으로 판단된다.

산화적 손상은 지질 과산화 (lipid peroxidation)를 촉진하는데, 세포 내에서 지질 과산화의 결과로 생성되는  $\alpha, \beta$ -unsaturated hydroxyalkenal의 일종인 4HNE는 산화적 손상의 정도에 따라 증가된다<sup>29)</sup>. 세포 내에서 4HNE가 소량 발현되었을 때는 항산화나 세포 재생기전에 관여하는 등의 이로운 영향을 주는 반면, 과발현 되었을 때는 DNA 분해를 유도하는 caspase를 활성화 시키고 미토콘드리아에서 cytochrome C 분리를 촉진하여 세포를 사멸에 이르게 한다<sup>30)</sup>. 그러므로 4HNE 또한 산화적 손상을 판정하는 지표가 되며, 만성적인 염증이나 알츠하이머병과 같은 퇴행성 중추신경계질환, 동맥경화증, 당뇨병, 및 암 등 다양한 질병의 병리기전에 관여하고 있다<sup>31)</sup>. 4HNE 발현을 면역조직화학염색으로 관찰한 본 연구의 결과, 遠志는 해마 CA1에서의 4HNE 발현 증가를 유의하게 억제하였다. 또한 산화적 손상의 부산물들을 제거하는 효소의 일종으로 산화적 손상이 유발된 부위의 위치 확인 표식자로 사용되는 GSTpi<sup>32)</sup>와 4HNE를 이중면역형광염색하여 관찰한 결과, GSTpi와 4HNE 발현이 해마 CA1의 pyramidal cell layer에서 일치하였다. 이러한 결과들은 遠志가 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 CA1 pyramidal cell layer의 산화적 손상을 유의하게 억제한 것을 보여주는 것이다.

산화적 손상에 의해 세포핵과 미토콘드리아 DNA가 손상되는 것은 세포가 사망하는 중요한 기전 중 하나이며, 여기에는 8-OHdG나 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG)이 관련한다<sup>33)</sup>. 세포를 손상시키는 산소유리기 중 하나인 수산화 (hydroxyl radical,  $\bullet$ HO)에 의해 세포내 DNA가 손상되고, 이 손상이 DNA strand의 nucleobase 중 guanine에 작용하여 8-OHdG가 생성되며<sup>34)</sup>, 8-OHdG는 DNA에 대한 산화적 손상을 관찰하는 명확한 지표이다<sup>35)</sup>. 면역조직화학염색으로 8-OHdG 발현을 관찰한 본 연구의 결과, pBCAO의 대조군은 해마 CA1과 DG 모두에서 8-OHdG 발현이 유의하게 증가하였으며, 遠志투여군은 CA1과 DG 모두에서 8-OHdG의 과발현을 유의하게 억제하는 것이 관찰되었다. 지금까지 만성적인 뇌혈류 저하 상태의 뇌조직에서 4HNE 및 8-OHdG 발현에 미치는 영향을 통해 遠志의 산화적 손상에 대한 작용을 연구한 보고는 없었다. 본 연구의 결과, 遠志는 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 대뇌피질과 해마 조직의 SOD 활성 감소를 유의하게 증가시키고, 대뇌피질에서 MDA 증가를 억제하였으며, 해마 CA1에서 4HNE와 8-OHdG의 과발현을 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 遠志 및 遠志의 유효성분들이 항산화작용을 나타낸다는 이전의 연구결과들과 일치하는 것이며, 또한 遠志가 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 기억장애를 개선하

는 효능이 있다는 이전의 연구<sup>16)</sup>를 보강하는 결과이다.

만성적인 뇌혈류 저하 상태에서 신경세포 손상은 뇌혈류 저하에 따른 산소와 glucose 공급 부족으로 인한 대사 장애가 가장 큰 원인이다<sup>36)</sup>. 세포의 대사 장애는 세포바깥쪽으로 중추신경계에서 주된 흥분성 신경전달물질인 glutamate 축적을 유발하게하고, 과도한 glutamate의 자극은 필연적으로 Ca<sup>++</sup>을 세포내로 과도하게 유입시키는데, 이것이 흥분성세포독성 (excitotoxicity)의 기본 과정으로 세포내 단백질의 분해, 지질의 과산화, ROS의 생성 등으로 세포를 사망에 이르게 한다<sup>37)</sup>. 본 연구에서 遠志가 유의한 항산화 작용을 나타내었으므로 해마의 신경세포 손상에 대한 영향을 관찰하였다. 그 결과, 遠志투여군은 대조군에 비해 해마 CA1의 두께 감소와 신경세포 수의 감소를 유의하게 억제한 것으로 관찰되었다. 또한 세포자연사 과정 중 DNA가 조각으로 갈라지는 현상을 이용하여 개발된 세포자연사 지표인 TUNEL 염색에서<sup>38)</sup>, 遠志투여군은 대조군에 비해 해마의 CA1에서 TUNEL 양성세포 수의 증가를 유의하게 억제한 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 pBCAO에 의한 해마 신경세포의 손상을 억제하는 작용이 있음을 보여주는 것으로 생각된다.

신경세포의 자연사 기전에서 Bax는 대표적인 세포자연사 유발인자이고, caspase-3은 caspase (cystein-aspartic acid protease) 중 하나로 세포자연사를 실행하는 주요 인자로 알려져 있다<sup>39)</sup>. Bax로 인한 세포자연사 과정은, Bax 발현이 mitochondria의 막투과성을 증가시켜 endonuclease G, cytochrome c와 같은 세포자연사 유발인자들의 분비를 증가시킴으로서 유도된다<sup>40)</sup>. Mitochondria에서 분비되는 cytochrome c는 caspase-9과 caspase-3을 활성화형으로 전환시키고, caspase-3이 DNase를 생성하여 세포핵의 DNA를 조각내고, 세포핵의 염색질 응축을 일으키며, 세포골격의 actin을 분해하므로 세포가 사망하게 된다<sup>39,41)</sup>. 이러한 Bax와 caspase-3 발현을 면역조직화학염색으로 관찰한 본 연구의 결과, 遠志는 해마의 CA1과 DG 구역에서 pBCAO에 의해 증가된 Bax와 caspase-3 발현을 대조군에 비해 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 해마 CA1 두께 및 신경세포 수 감소의 억제, TUNEL 양성세포 수 증가의 억제 작용과 함께 遠志가 pBCAO에 의한 해마의 신경세포 자연사를 억제하는 작용이 있음을 보여주는 결과이다. 이전의 연구에서 遠志는 NMDA에 의한 세포내 과도한 Ca<sup>++</sup>의 유입과 ROS 생성을 억제하는 작용이 있다고 하였고<sup>11)</sup>, Aβ<sub>(25-35)</sub>에 의한 신경세포의 축삭 위축을 억제하는 작용이 있으며<sup>10)</sup>, MPTP 독성에 의한 ROS와 NO 생성 및 caspase-3 과발현을 억제하고 흑색질의 도파민성 신경세포 손상을 억제한다고 하였다<sup>12)</sup>. 이러한 결과로 볼 때, 遠志는 산화적 손상에 의한 신경세포 자연사를 억제하는 작용이 있는 것으로 생각된다.

## 결론

遠志가 만성적인 뇌혈류 저하 상태에서 나타나는 뇌조직의 산화적 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위해 흰쥐에서 양측 총경동맥을 영구 폐쇄하는 방법으로 만성적인 뇌혈류

저하를 유발하고 4주 후부터 遠志 물추출물을 4주간 경구 투여한 다음 뇌조직에서 SOD, MDA, 4HNE 및 8-OHdG 발현을 ELISA와 면역조직화학염색으로 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 遠志는 만성적 뇌혈류 저하에 의한 대뇌피질과 해마 조직의 SOD 활성 저하를 유의하게 증가시켰으며, 대뇌피질의 MDA 과발현을 유의하게 억제하였다.
2. 遠志는 만성적 뇌혈류 저하에 의한 해마 CA1의 4HNE과 8-OHdG 과발현을 유의하게 억제하였다.
3. 遠志는 만성적 뇌혈류 저하에 의한 해마 CA1의 두께와 신경세포 수의 감소를 유의하게 증가시켰으며, TUNEL 양성세포 수의 증가를 유의하게 억제하였다.
4. 遠志는 만성적 뇌혈류 저하에 의한 해마 CA1과 DG에서 Bax와 caspase-3 발현의 증가를 유의하게 억제하였다.

이러한 결과들은 遠志가 만성적인 뇌혈류 저하에 의해 유발된 뇌조직의 산화적 손상에서 신경세포 자연사와 지질 과산화 및 DNA 손상을 억제하는 작용이 있는 것을 보여주는 것으로, 만성적인 뇌혈류 저하에 의해 유발되는 뇌혈류 손상의 예방과 치료에 유의한 약물이 될 수 있음을 추측하게 한다.

## References

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007 ; 39 : 44-84.
2. Liu H, Zhang J. Cerebral hypoperfusion and cognitive impairment: the pathogenic role of vascular oxidative stress. *Int J Neurosci*, 2012 ; 122 : 494-9.
3. Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging*. 2002 ; 23 : 655-64.
4. Tamagno E, Bardini P, Guglielmotto M, Danni O, Tabaton M. The various aggregation states of beta-amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free Radic Biol Med*, 2006 ; 41 : 202-12.
5. Tretter L, Sipos I, Adam-Vizi V. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 2004 ; 29 : 569-77.
6. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration:

- cause or consequence? *Nat Med*. 2004 ; 10 Suppl : S18–25.
7. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. 2004 ; 266 : 37–56.
  8. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000 ; 29 : 222–30.
  9. Jesky R, Hailong C. Are herbal compounds the next frontier for alleviating learning and memory impairments? An integrative look at memory, dementia and the promising therapeutics of traditional chinese medicines. *Phytother Res*. 2011 ; 25 : 1105–18.
  10. Naito R, Tohda C. Characterization of anti-neurodegenerative effects of *Polygala tenuifolia* in A $\beta$ (25–35)-treated cortical neurons. *Biol Pharm Bull*. 2006 ; 29 : 1892–6.
  11. Lee HJ, Ban JY, Koh SB, Seong NS, Song KS, Bae KW, Seong YH. Polygalae radix extract protects cultured rat granule cells against damage induced by NMDA. *Am J Chin Med*. 2004 ; 32 : 599–610.
  12. Choi JG, Kim HG, Kim MC, Yang WM, Huh Y, Kim SY, Oh MS. Polygalae radix inhibits toxin-induced neuronal death in the Parkinson's disease models. *J Ethnopharmacol*. 2011 ; 134 : 414–21.
  13. Park EK, Shim ES, Jung HS, Sohn NW, Sohn YJ. Effects of Chongmyung-tang, Polygalae Radix and Acori Graminei Rhizoma on A $\beta$  Toxicity and Memory Dysfunction in Mice. *Korean J Orient Int Med*. 2008 ; 29 : 608–20.
  14. Sun XL, Ito H, Masuoka T, Kamei C, Hatano T. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on scopolamine-induced impairment of rat spatial cognition in an eight-arm radial maze task. *Biol Pharm Bull*. 2007 ; 30 : 1727–31.
  15. Park CH, Choi SH, Koo JW, Seo JH, Kim HS, Jeong SJ, Suh YH. Novel cognitive improving and neuroprotective activities of *Polygala tenuifolia* Willdenow extract, BT-11. *J Neurosci Res*. 2002 ; 70 : 484–92.
  16. Son YH, Kim SJ, Chung MC, Cho DG, Cho WS, Shin JW, Park DI, Sohn NW. Effects of Polygalae Radix on  $\beta$ -Amyloid Accumulation and Memory Impairment Induced by Chronic Cerebral Hypoperfusion in Rats. *Kor J Herbol*. 2014 ; 29 : 73–83.
  17. Chen YJ, Huang XB, Li ZX, Yin LL, Chen WQ, Li L. Tenuigenin protects cultured hippocampal neurons against methylglyoxal-induced neurotoxicity. *Eur J Pharmacol*. 2010 ; 645 : 1–8.
  18. Liu P, Hu Y, Guo DH, Lu BR, Rahman K, Mu LH, Wang DX. Antioxidant activity of oligosaccharide ester extracted from *Polygala tenuifolia* roots in senescence-accelerated mice. *Pharm Biol*. 2010 ; 48 : 828–33.
  19. Xu SP, Yang YY, Xue D, Liu JX, Liu XM, Fan TP, le Pan R, Li P. Cognitive-enhancing effects of polygalasaponin hydrolysate in a $\beta$ (25–35)-induced amnesic mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011 ; 2011 : 839720.
  20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 ; 72 : 248–54.
  21. Kim HC. *Herbal Pharmacology*. Seoul : Jipmoondang. 2001 : 379–81.
  22. Castaño Guerrero Y, González Fragueta ME, Fernández Verdecia I, Horruitiner Gutiérrez I, Piedras Carpio S. Changes in oxidative metabolism and memory and learning in an cerebral hypoperfusion model in rats. *Neurologia*. 2013 ; 28 : 1–8.
  23. Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 2007 ; 54 : 162–80.
  24. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). *Free Radic Biol Med*. 1988 ; 5 : 363–9.
  25. Casado A, Encarnación López-Fernández M, Concepción Casado M, de La Torre R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res*. 2008 ; 33 : 450–8.
  26. Frankel EN, Neff WE. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochim Biophys Acta*. 1983 ; 754 : 264–70.
  27. Voitkun V, Zhitkovich A. Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. *Mutat Res*. 1999 ; 424 : 97–106.
  28. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005 ; 15 : 316–28.
  29. Siems W, Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med*. 2003 ; 24 : 167–75.
  30. Chen R, Yang L, McIntyre TM. Cytotoxic phospholipid oxidation products. Cell death from mitochondrial damage and the intrinsic caspase cascade. *J Biol Chem*. 2007 ; 282 : 24842–50.
  31. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, Chapple S, Cohen G, Feher J, Grune T, Lengyel G, Mann GE, Pamplona R, Poli G, Portero-Otin M, Riahi Y, Salvayre R, Sasson S,

- Serrano J, Shamni O, Siems W, Siow RC, Wiswedel I, Zarkovic K, Zarkovic N. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2010 ; 44 : 1125-71.
32. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995 ; 30 : 445-600.
33. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998 ; 78 : 547-81.
34. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004 ; 266 : 37-56.
35. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009 ; 27 : 120-39.
36. Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A. Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003 ; 30 : 266-72.
37. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 2010 ; 460 : 525-42.
38. Allen RT, Hunter WJ 3rd, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1997 ; 37 : 215-28.
39. Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol.* 2003 ; 53 (suppl 3) : S61-72.
40. Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann NY Acad Sci.* 1999 ; 887 : 18-30.
41. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* 2000 ; 256 : 12-8.