동의신경정신과 학회지 제22권 제2호(2011년 6월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2011;22(2):163-176

천죽황(*Bambusae concretio silicae*, 天竺黃) 물추출물이 신경전달물질 수용체의 표현에 미치는 영향

윤재홍, 김경민, 김경훈, 신길조, 정승현

동국대학교 한의과대학 대학원

Effects of Water-Extracts of *Bambusae concretio silicae*(BCS, 天竺黃) on the Expression of Neurotransmitter Receptors

Jae-Hong Yoon, Kyung-Min Kim, Kyung-Hun Kim, Gil-Cho Shin, Seung-Hyun Jeong

Graduate School of Oriental Medicine, Dong-Guk University

Abstract

Objectives :

BCS(*Bambusae concretio silicae*) is used as a traditional medicine in Korea for the incipient stroke. Recent reports indicated that BCS has a neuroprotective effect by anti-convulsion effect. However, it's mechanism is not well studied. The purpose of this study was to investigate into the molecular mechanism of BCS for neuroprotection in normoxia of cultured rat hippocampal neurons.

Methods :

BCS (1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 ㎍/㎖) was added to culture media (Neurobasal supplemented with B27) on DIV 0, given a normoxia, and the cell viability was measured by typical phase-contrast images of the cultures with 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 ㎍/㎖ on DIV 21. Effects of BCS on the expression of various synaptic proteins ($GABA_B$ R1, $GABA_B$ R2, GlyR, PSD95) were observed by immunocytochemistry showing on DIV 3, 7 and 21.

Results :

Typical phase-contrast images of the cultures indicated that BCS has a protective effect of rat hippocampal cells in normoxia. The BCS upregulated $GABA_B$ R1 after normoxia on DIV 7, $GABA_A$ β2/3 on DIV 21 and $GABA_B$ R2 on DIV 21. And the BCS downregulated PSD95 after normoxia on DIV 7.

Conclusions :

The present study showed evidence for the efficacy of BCS in Typical phase-contrast images, upregulation of inhibitory neurotransmitter receptors($GABA_B$ R1) and downregulation of PSD95 which eventually protected neuronal cell death in normoxia.

Key Words :

Bambusae concretio silicae, $GABA_A$ β2/3, $GABA_B$ R1, $GABA_B$ R2, GlyR, PSD95, Normoxia

투고 : 2011. 06. 04. 수정 : 2011. 06. 10. 채택 : 2011. 06. 13.
교신저자 : 정승현, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지 동국대학교 일산한방병원 한방내과
Tel) 031-961-9041, Fax) 031-961-9045, E-mail) omdjeong@naver.com

Ⅰ. 緖 論

포유류 중추신경계 신경전달물질은 크게 흥분성과 억제성으로 나눌 수 있다. 주된 흥분성 신경전달물질(excitatory neurotransmitter)인 glutamate는 과다 유리될 경우 강력한 신경독성물질로 작용하여 뇌졸중(stroke), 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 간질(epilepsy) 등 여러 가지 질환의 병변으로 작용한다[1,2]. 따라서 신경세포의 흥분독성을 줄이기 위하여 세포밖공간으로 과유리된 glutamate를 효율적으로 제거하려는 시도를 한다.

한편, γ-aminobutyric acid(GABA)는 중추신경계의 주된 억제성 신경전달물질이다[3,4]. 세포밖으로 유리된 GABA는 이온향상성인 $GABA_A$ 및 $GABA_C$ 수용체와 결합하여 Cl^-를 세포내로 유입시킴으로써 세포막의 과분극을 일으키거나[5], 대사향상성인 $GABA_B$ 수용체를 통하여 신경세포의 흥분성을 억제한다. 따라서 허혈/저산소증에서 흥분독성을 억제하고자 GABA 신호전달경로를 활성시키고자 시도한다.

天竺黃은 靑皮竹과 華思勞竹등의 마디사이에 분비액이 고여 응결한 물질[6]로, 소아의 驚風抽搐이나 癲癎, 驚狂을 치료하고 痰火를 제거하는데 주로 사용되어왔다[7-10]. 최근 실험연구에서는 天竺黃이 glutamate로 유발한 흥분성세포독성을 억제시키고[11], 산화적 글루탐산 독성에 대한 보호활성, 노인성 치매에 대한 보호효과가 있음이 보고되었으며, astrocyte에 대한 보호효과와 세포막지질의 과산화저해 작용이 존재하는 것으로 밝혀졌다[12-3].

이에 저자는 天竺黃 물추출물이 신경전달물질 수용체에 미치는 영향을 알아보고자 배양한 흰쥐 해마신경세포에서 GABA 수용체의 표현과 glutamate transpoter의 표현을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 재료

1) 동물

본 연구는 임신 18일(Embryonic day 18, E18)의 *Sprague-Dawley*계 흰쥐(대한동물실험센터)를 사용하였다.

2) 약재

실험에 사용된 天竺黃은 대한약전 및 대한약전 외 한약 규격주해[14]에 근거하여 동국대학교 부속 한방병원에서 구입하였다.

3) 天竺黃의 물추출물 제조

天竺黃(2 g)에 20 ㎖의 증류수를 넣어 균질화하고 4℃에서 18시간 진탕하였다. 이를 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻고 여과멸균(0.45 ㎛)한 후 소량씩 분주하여 -20℃에 보관하였다. 건조물의 량은 1 ㎖ 추출물 3 튜브를 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

2. 방법

1) 신경세포 배양

임신 18일(embryonic day 18 : E18)의 Sprague-Dawley계 흰쥐 해마신경세포를 Brewer 등[15]의 방법에 따라 배양하였다. E18의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아를 취하고 뇌를 잘라내었다. 해마신경세포조직을 37℃에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1mM sodium pyruvate

와 10mM HEPES (pH 7.4)가 첨가된 HBSS용액(Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen Life Technology) 5 ㎖로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1 ㎖ HBSS 용액으로 옮기고, 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 세포를 분산시켰다. 이후 분산된 세포의 밀도를 측정한 다음 B27을 첨가한 plating Neurobasal media(Invitrogen Life Technology)(100㎖ Neurobasal, 2 ㎖ B27 supplement, 0.25 ㎖ glutamax I, 0.1 ㎖ 25mM glutamate, 0.1 ㎖ 25mM 2-mercaptoethanol)에 약 1,500cells / ㎟가 되도록 접종하여 5% CO_2 배양조에서 배양하였다. 2~3일 간격으로 배양액을 feeding Neurobasal media(10 0㎖ Neurobasal, 2 ㎖ B27 supplement, 0.25 ㎖ glutamax I)로 ⅓씩 교환하였다.

2) Tryphan blue 염색

0.4% tryphan blue(Sigma, T-8154; in 0.81% NaCl and 0.06% 2HPO4)를 이용하여 죽은 세포를 염색하고 현미경으로 관찰하였다. 세포를 feeding neurobasal media로 세척하였다. 0.4% tryphan blue 용액과 HBSS용액을 1:1로 섞어 각 well에 500 ㎕씩 처리해준 후 10분간 배양조에 두었다가, HBSS용액 1 ㎖로 4~5회 세척하였다.

3) 면역세포화학염색(immunocytochemistry)

배양용기(24-well plate)를 얼음 위에 올려놓고 배양액을 500 ㎕의 ice-cold D-PBS(0.1g / ℓ CaCl2, 0.2g / ℓ KCl, 0.2g / ℓ KH2PO4, 0.1g / ℓ MgCl2-6H2O, 8.0g / ℓ NaCl, 2.16g / ℓ Na2HPO4-7H2O)로 교환해 주었다. D-PBS를 4°C methanol(500㎕)로 교환하고 5분 후 -20°C methanol(500㎕)로 다시 교환한 다음 -20°C에서 20분간 두었다. Methanol을 ice-cold D-PBS(500㎕)로 교환하고 15분 후 preblock solution[0.05% triton, 5% normal goat serum in h-PBS(20mM NaPO4, pH 7.4, 450mM NaCl)]을 넣어 4°C에서 1시간 처리하였다. 1차항체[excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1; 1:250, mouse monoclonal, clone 4D6.2 from Chemicon (#MAB1587). ; excitatory amino acid transporter 1(EAAT1; 1:100, rabbit polyclonal. Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany (#Sc-15316); glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:1000, mouse monoclonal, Sigma G3893); GABAB R1 (1:500; rabbit polyclonal antibody, Chemicon #AB5850); GABAB R2 (rabbit polyclonal antibody, Chemicon #AB5848); GABAA β2/3 (mouse monoclonal clone 62-3G1, Upstate Biotechnology Inc., Millipore, Billerica, Massachusetts, USA); GlyR (1:500; mouse monoclonal clone mAb4a) (Synaptic Systems, Göttingen, Germany); PSD95 (1:1,000; chicken polyclonal UCT-C1, Dr. Randall Walikonis, University of Connecticut, CT, USA)]를 넣고 4°C에서 1시간 반응시킨 후 실온에서 preblock solution으로 20분씩 3회 세척하였다. 형광물질이 표지된 2차항체(Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-chicken IgG, 각각 1:500; Molecular Probe)를 넣고 1시간 더 반응시킨 후, D-PBS로 15분씩 3회 세척하였다. coverslip은 DABCO mounting solution (100 mg of 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane/ml of 90% glycerol+10% PBS, pH 7.4)을 이용하여 mounting 하였다.

4) 이미지 처리, 신호강도(signal intensity)의 측정 및 surface plot

염색된 세포를 CCD camera(Photometrics Inc., Germany)가 장착된 형광현미경(Leica Re search

Microscope DM IRE, Germany)으로 관찰하고, FW4000 software(Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)를 이용하여 digital image를 획득하였다. 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, Frederick, Maryland, USA)를 이용하여 2D rolling mode로 background subtraction 한 다음 spot의 mean density를 측정하였다. Surface plot은 반전된 이미지를 NIH Scion Image software를 이용하여 grayscale mode로 작성하였다.

5) 통계처리

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

Ⅲ. 結 果

1. 정상산소(normoxia)에서 天竺黃의 배양 신경세포의 보호효능

배양 시작부터 天竺黃(0-10.0 ㎍/㎖)를 첨가하여 배양하고 day *in vitro*(DIV) 21에 촬영한 위상차현미경 영상을 Fig.1A에 나타내었다. tryphan blue 염색하여 세포 생존율을 조사한 결과, DIV 21에는 많은 세포가 사망하여 대조군에서 생존율이 46.2±8.76%이였다. 天竺黃을 1.0, 2.5, 5.0, 혹은 10.0 ㎍/㎖ 농도로 처리하였을 경우 각각 53.2±13.0, 59.8±9.4, 67.1±12.1 및 40.3±10.4%의 생존율을 나타내었는데, 이는 대조군에 비하여 각각 15.2, 29.4, 45.2 및 -13.9%의 증가에 해당하였으며, 2.5 및 5.0%의 경우는 매우 유의한($p<0.01$) 증가, 10.0%의 경우 유의한 감소($p<0.05$)를 하였다(Fig. 1B). 따라서 이후의 실험은 5.0 ㎍/㎖의 농도로 天竺黃을 처리하였다.

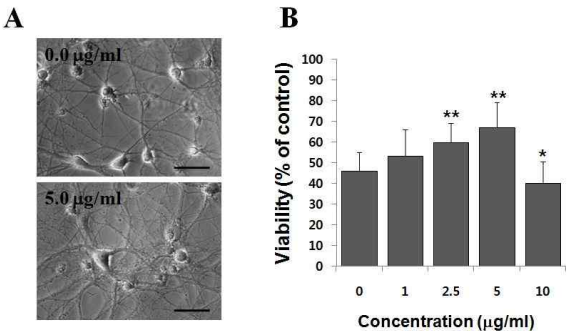


Fig. 1. **Neuroprotective effects of BCS. Rat hippocampal cells were dissociated and grown in the presence of BCS water -extracts.**
A : Typical phase-contrast images of the cultures with 0.0 and 5.0 ㎍/㎖ on DIV 21.
B : Statistics. Cultures with indicated concentrations of BCS were stained with tryphan blue on DIV 21. Cell viabilities were expressed as percents of the total cell number. Statistic significance was assessed by Mann-Whitney *U*-test.
* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, Scale bar : 50 ㎛.

2. 天竺黃 물추출물이 GABA 수용체의 표현에 미치는 영향

1) DIV 3일째의 변화

DIV 3에 신경세포를 $GABA_A$ β2/3 항체로 면역염색한 형광현미경사진을 흑백 반전하여(Fig. 2b), 위상차현미경 사진(Fig. 2a)과 함께 Fig. 2에 나타내었다. $GABA_A$ β2/3의 표현이 매우 약하였지만 box 부분을 확대하여 보면 $GABA_A$ β2/3의 cluster가 분명히 보였으며, NIH Scion Image software를 사용하여 surface plot한 결과를 Fig. 2C에 나타내었다. cluster들(n=15-200, 4-5 cells)의 강도(density)를 통계학적으로 분석한 결과 天竺黃을 처리한 시험군은 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2D).

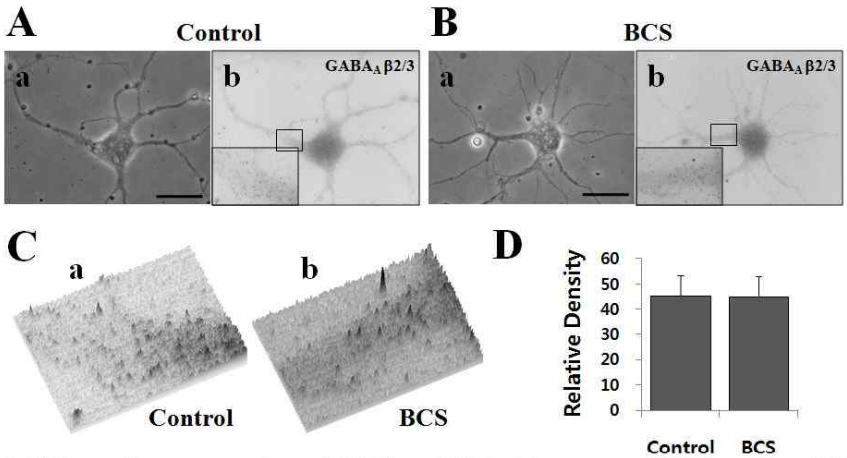


Fig. 2. Effects of BCS on the expression of GABA$_A$ β2/3 in hippocampal neurons on DIV 3.
Dissociated rat hippocampal neurons cultured without (A, Control) or with BCS were immunostained with anti-GABA$_A$ β2/3 antibody on DIV 3. Phase-contrast (*a*) and inverted black/white images of fluorescence (*b*) microscopic images of typical neurons were shown. The small boxed area of *b* is also shown as magnified image, and their surface plots were shown in *C*. D indicates Statistics of relative density. Densities of each clusters in inverted images were measured using NIH Scion Image software. Statistic significance was assessed by Mann-Whitney *U*-test. Scale bar : 20 μm.

DIV 3 신경세포를 GABA$_B$ R1 항체로 면역염색한 형광현미경사진을 흑백 반전하여(Fig. 3b), 위상차현미경 사진(Fig. 3a)과 함께 Fig. 3에 나타내었다. GABA$_A$ β2/3와 마찬가지로 GABA$_B$ R1의 표현도 강하지는 않았지만 분명한 cluster를 형성하였으며(Fig. 3B, inset), box 부분의 surface plot한 결과를 Fig. 3C에 나타내었다. cluster들(n=15-200, 4-5 cells)의 강도는 天竺黃을 처리한 시험군과 대조군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3D).

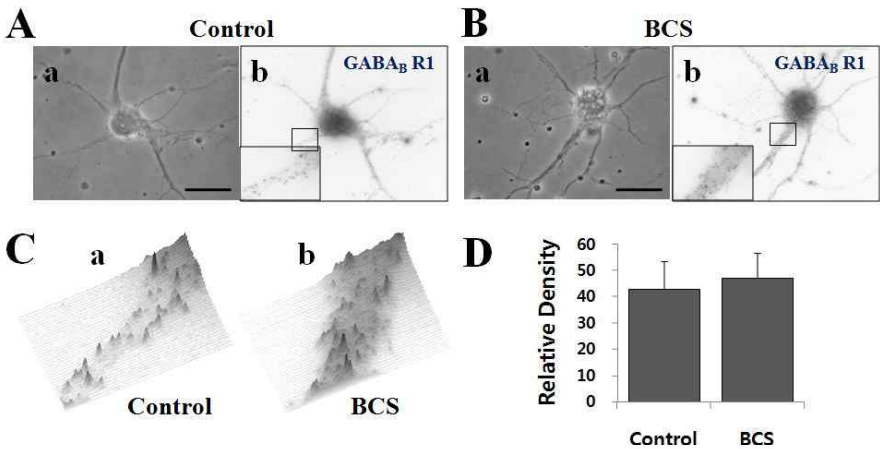


Fig. 3. Effects of BCS on the expression of GABA$_B$ R1 in hippocampal neurons on DIV 3.
Dissociated rat hippocampal neurons cultured without (A, Control) or with BCS were immunostained with anti-GABA$_B$ R1 antibody on DIV 3. Phase-contrast (*a*) and inverted black/white images of fluorescence (*b*) microscopic images of typical neurons were shown. The small boxed area of *b* is also shown as magnified image, and their surface plots were shown in *C*. D indicates Statistics of relative density. Densities of each clusters in inverted images were measured using NIH Scion Image software. Statistic significance was assessed by Mann-Whitney *U*-test.
Scale bar : 20 μm. ** : $p<0.01$.

2) DIV 7일째의 변화

DIV 7에 신경세포를 $GABA_A$ β2/3 항체로 면역염색한 형광현미경사진을 흑백 반전하여(Fig. 4b), 위상차현미경 사진(Fig. 4a)과 함께 Fig. 4에 나타내었다. box 부분을 확대하여 보면 $GABA_A$ β2/3의 cluster가 분명하게 보였으며(insets), surface plot한 결과를 Fig. 4C에 나타내었다. cluster들(n=15-200, 4-5 cells)의 강도는 天竺黃을 처리한 시험군과 대조군 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 4D).

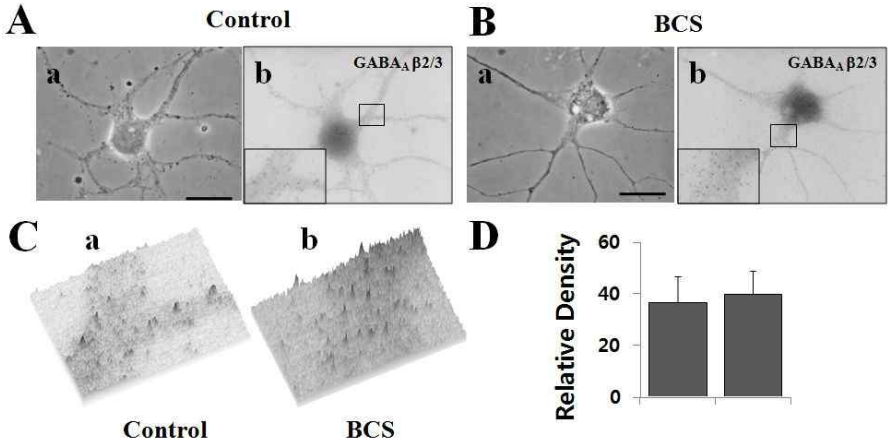


Fig. 4. Effects of BCS on the expression of $GABA_A$ β2/3 in hippocampal neurons on DIV 7.
Dissociated rat hippocampal neurons cultured without (A, Control) or with BCS were immunostained with anti-$GABA_A$ β2/3 antibody on DIV 7. Phase-contrast (*a*) and inverted black/white images of fluorescence (*b*) microscopic images of typical neurons were shown. The small boxed area of *b* is also shown as magnified image, and their surface plots were shown in *C*. D indicates Statistics of relative density. Densities of each clusters in inverted images were measured using NIH Scion Image software. Statistic significance was assessed by Mann-Whitney *U*-test. Scale bar : 20 μm.

DIV 7에 신경세포를 $GABA_B$ R1 항체로 면역염색한 형광현미경사진을 흑백 반전하여(Fig. 5b), 위상차현미경 사진(Fig. 5a)과 함께 Fig. 5에 나타내었다. box 부분을 확대한 사진(insets)을 NIH Scion Image software를 사용하여 surface plot한 결과를 Fig. 5C에 나타내었다. 통계분석한 결과 시험군의 cluster들(n=15-200, 4-5 cells)의 강도는 대조군에 비하여 매우 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 5D). 이는 天竺黃 물추출물이 $GABA_B$ R1의 표현을 증가시키는 것으로 해석된다.

DIV 7 신경세포를 PSD95 항체로 면역염색한 사진을 흑백 반전하여(Fig. 6b) 위상차현미경 사진(Fig. 6a)과 함께 나타내었다. 이 시기에 PSD95의 표현은 매우 약하였다. 그러나 box 부분을 확대하여 보면 PSD95의 cluster를 확인할 수 있었으며(insets), 이의 surface plot결과를 Fig. 6C에 나타내었다. cluster들(n=15-200, 4-5 cells)의 강도를 통계분석한 결과 天竺黃을 처리한 시험군은 대조군에 비하여 유의하게($p < 0.05$) 감소되었다(Fig. 6D). 이는 天竺黃 물추출물이 흥분성 연접의 생성을 억제함을 시사한다.

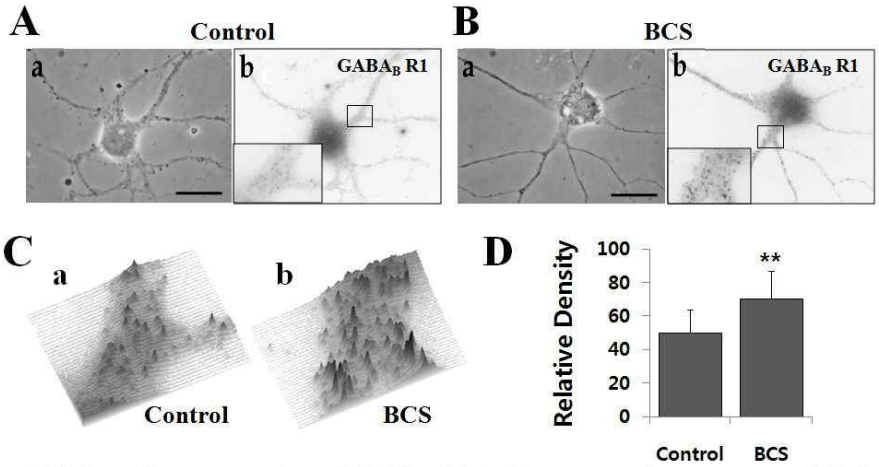


Fig. 5. Effects of BCS on the expression of GABA$_B$ R1 in hippocampal neurons on DIV 7.
Dissociated rat hippocampal neurons cultured without (A, Control) or with BCS were immunostained with anti-GABA$_B$ R1 antibody on DIV 7. Phase-contrast (*a*) and inverted black/white images of fluorescence (*b*) microscopic images of typical neurons were shown. The small boxed area of *b* is also shown as magnified image, and their surface plots were shown in *C*. D indicates Statistics of relative density. Densities of each clusters in inverted images were measured using NIH Scion Image software. Statistic significance was assessed by Mann-Whitney *U*-test.
Scale bar : 20 μm. ** : $p<0.01$.

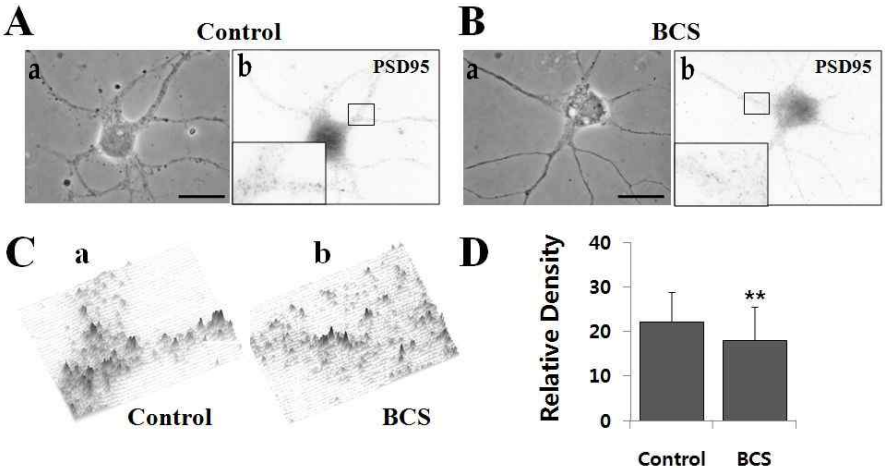


Fig. 6. Effects of BCS on the expression of PSD95 in hippocampal neurons on DIV 7.
Dissociated rat hippocampal neurons cultured without (A, Control) or with BCS were immunostained with anti-PSD95 antibody on DIV 7. Phase-contrast (*a*) and inverted black/white images of fluorescence (*b*) microscopic images of typical neurons were shown. The small boxed area of *b* is also shown as magnified image, and their surface plots were shown in *C*. D indicates Statistics of relative density. Densities of each clusters in inverted images were measured using NIH Scion Image software. Statistic significance was assessed by Mann-Whitney *U*-test.
Scale bar : 20 μm. ** : $p<0.01$.

3) DIV 21일째의 변화

DIV 21에 신경세포를 GABA$_A$ β2/3, GABA$_B$ R1 및 PSD95 항체로 면역염색하여 얻은 이미지를 흑백 반전한 사진을 위상차현미경 사진과 함께 Fig. 7에 나타내었다. 이 시기에는 GABA$_A$ β2/3의 표현이 매우 강하였다. box 부분을 확대하여 보

면 분명한 $GABA_A$ β2/3의 cluster가 보였으며, 이의 흑백반전 이미지를 NIH Scion Image software를 사용하여 surface plot한 결과를 Fig. 7C에 나타내었다. 天竺黃을 처리한 시험군의 cluster들(n=15-200, 4-5 cells)의 강도는 대조군에 비하여 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 7D).

DIV 21에 $GABA_B$ R1의 표현도 매우 강하였는데(Fig. 7), box 부분을 확대하여 보면 분명한 $GABA_B$ R1의 cluster를 확인할 수 있었다(insets). box 부분의 흑백반전 이미지를 surface plot한 결과를 Fig. 7C에 나타내었다. cluster들(n=15-200, 4-5 cells)의 강도를 통계적으로 분석한 결과 天竺黃을 처리한 시험군(Fig. 8B)은 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 7D).

DIV 21에 PSD95는 매우 강하게 표현되었다(Fig 7). box 부분을 확대하여 보면 PSD95의 cluster를 확인할 수 있었으며, 이의 흑백반전 이미지를 surface plot한 결과를 Fig. 7C에 나타내었다. cluster들(n=15-200, 4-5 cells)의 강도는 天竺黃을 처리한 시험군(Fig. 7B)이 대조군에 비하여 그 표현이 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 7D).

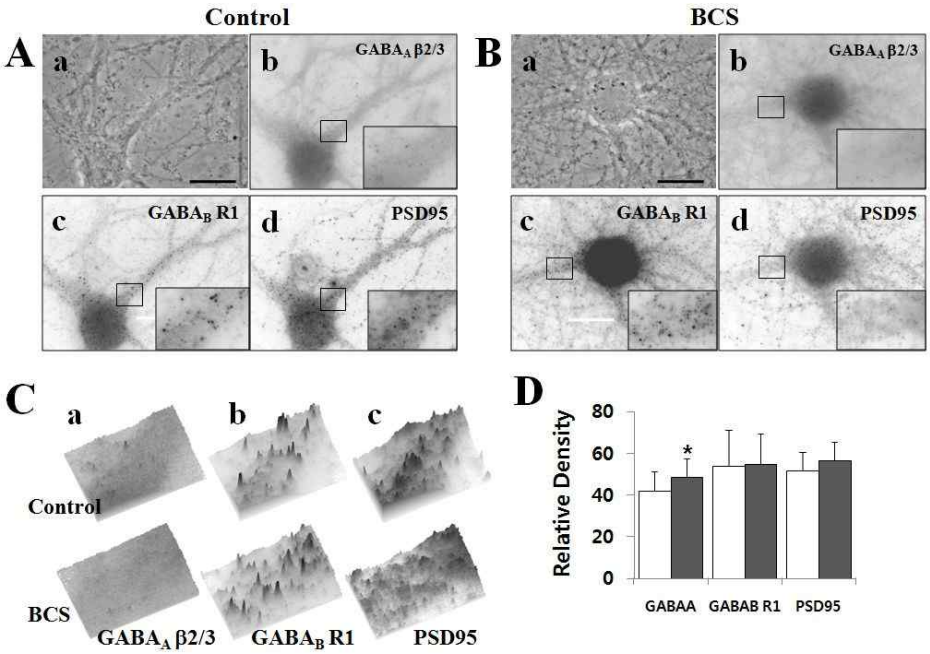


Fig. 7. Effects of BCS on the expression of $GABA_A$ β2/3, $GABA_B$ R1, PSD95 in hippocampal neurons on DIV 21.

Dissociated rat hippocampal neurons cultured with (B, BCS) or without (A, Control) BCS were immunostained with corresponding antibodies on DIV 21. Phase-contrast (*a*) and inverted black/white images of fluorescence (*b,c,d*) microscopic images of typical neurons were shown. The small boxed area of *b,c,d* is also shown as magnified image, and their surface plots were shown in *C*. D indicates Statistics of relative density. Densities of each clusters in inverted images were measured using NIH Scion Image software. Statistic significance was assessed by Mann-Whitney *U*-test. Scale bar : 20 μm. * : $p<0.05$.

DIV 21 신경세포를 $GABA_B$ R2와 glycine 수용체(GlyR) 항체로 면역염색한 이미지를 흑백반전한 사진과 위상차현미경 사진을 함께 Fig. 8에 나타내었다. $GABA_B$ R2의 표현도 매우 강하였

으며, box 부분을 확대하여 보면 분명한 $GABA_B$ R1의 cluster를 확인할 수 있었다(insets). box 부분의 흑백반전 이미지를 surface plot한 결과를 Fig. 8C에 나타내었다. cluster들(n=15-200, 4-5 cells)의 density를 측정하고 통계적으로 분석한 결과 天竺黃을 처리한 시험군은 대조군에 비하여 매우 유의한($p < 0.01$) 차이를 나타내었다(Fig. 8D).

DIV 21에 GlyR의 표현도 매우 강하여, box 부분을 확대하여 보면 GlyR의 강한 cluster가 나타났다(Fig. 8, insets). box 부분의 흑백반전 이미지를 surface plot한 결과를 Fig. 8C에 나타내었는데, cluster들(n=15-200, 4-5 cells)의 강도는 시험군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다(Fig. 8D).

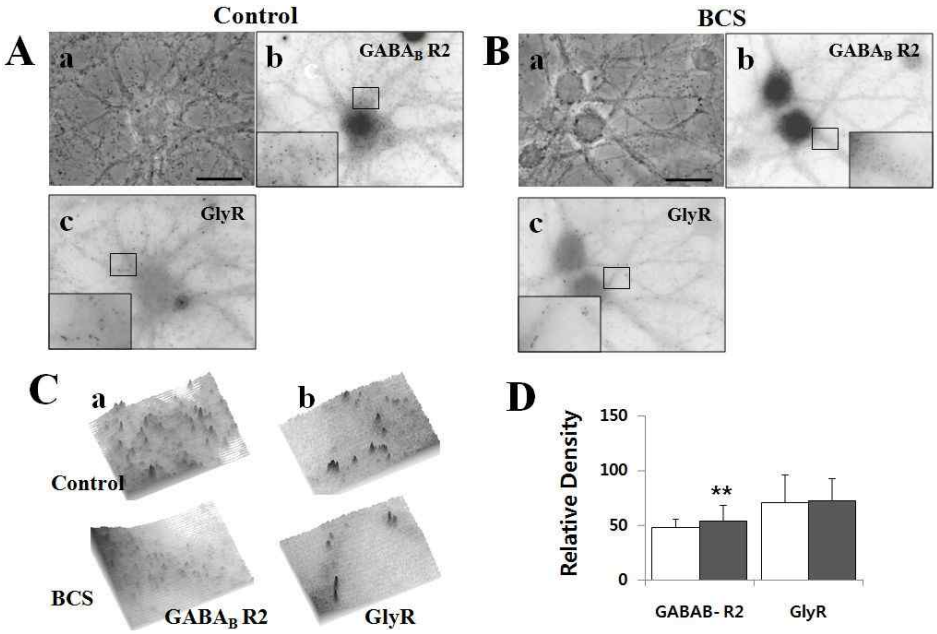


Fig. 8. Effects of BCS on the expression of $GABA_B$ R2 and GlyR in hippocampal neurons on DIV 21.
Dissociated rat hippocampal neurons cultured with (B, BCS) or without (A, Control) BCS were immunostained with corresponding antibodies on DIV 21. Phase-contrast (*a*) and inverted black/white images of fluorescence (*b,c*) microscopic images of typical neurons were shown. The small boxed area of *b,c* is also shown as magnified image, and their surface plots were shown in *C*. D indicates Statistics of relative density. Densities of each clusters in inverted images were measured using NIH Scion Image software. Statistic significance was assessed by Mann-Whitney *U*-test. Scale bar : 20 μm. ** : $p<0.01$.

Ⅳ. 考 察

GABA(γ-aminobutyric acid)는 glycine과 함께 포유류 중추신경계의 주된 억제성 신경전달물질이다[3,4]. GABA에 의한 억제가 없다면 뉴런들은 glutamate의 영향에 의해 지속적으로 활동전위를 보내고, 결국에는 지나친 발화로 인한 세포의 죽음을 초래한다. GABA 작용을 인위적으로 차단하거나 glutamate와 비슷하면서 더 강력한 물질을 처리하여 GABA 억제를 무력화시키면 이러한 결과를 관찰할 수 있다. Glutamate의 과다한 작용과 이로 인한 신경세포의 손상은 뇌졸중을 비롯한 뇌혈관성 질환이나 간질, 또는 알츠하

이며 치매 등에서 발생하고 있다. 어떤 사람들은 중국요리를 먹은 뒤 약하게 glutamate 독성을 경험하기도 한다. GABA 억제는 정신질환 약물의 작용방식과도 관계있다. 예를 들면 긴장과 불안을 완화시켜주는 valium은 GABA의 능력을 향상시켜 glutamate를 조절하는 작용을 한다. 공포회로망에서 활동전위를 만들어 냄으로써 불안과 걱정을 초래하는 흥분성 입력은 valium이나 유사약물을 복용하면 약화된다[16]. 억제성 신경전달물질인 GABA에 반응하는 수용체는 분자구조 및 기능적 관점에서 3종류의 서브타입으로 분류되어 있다. 이 중에서 이온채널 내장형 수용체는 $GABA_A$ 및 $GABA_C$ 수용체인데, 이들은 Cl^- 이온을 세포내로 유입시켜 신경세포의 과분극을 초래하여 신경세포의 활성을 억제한다[5]. $GABA_A$수용체를 구성하는 아단위는 α, β, γ 및 δ의 4종류로 이루어지고[17], 각각 6,4,3 및 1개의 서브타입이 존재한다[18,19]. $GABA_A$ 수용체가 활성화되면 Ca^{2+}통로를 억제하고[20-2], Kir3-type K^+이온통로를 열어 과분극을 초래하여 신경세포의 활성을 억제한다[23]. 간질환자의 경우 α2, α1, β2, β3, γ2 아단위의 표현이 증가되었는데[24], 이는 억제성 수용체인 GABA 수용체를 많이 표현하여 세포의 활성을 줄이는 세포전략으로 해석된다. $GABA_A$ 수용체가 이온채널형 수용체인 반면 $GABA_B$ 수용체는 G 단백결합수용체(G-protein coupled receptors, GPCR)이다. $GABA_B$ 수용체의 아단위는 R1과 R2의 2종류로 이루어지는데[25,26], GPCR의 작용에 의해 활성화된 $G_{\alpha i/o}$ 아단위를 통하여 adenylyl cyclase를 억제시키고[27], 이것은 유전자 전사인자(transcription factors) 및 인산화효소(kinases)에 영향을 미친다[28-30]. 한편, $GABA_B$ 수용체를 매개로 한 작용에서는 Cl^-이 전혀 관여하지 않고 Ca^{2+}, K^+ channel이 관여한다[31-3]. 연접전 $GABA_B$ 수용체의 자극은 세포내로의 Ca^{2+} 유입을 감소시켜 신경전달물질의 유리를 억제한다[10-2]. 연접후 $GABA_B$ 수용체는 K^+이온통로를 열어 느린 억제성 시냅스후전위(slow inhibitory postsynaptic current, sIPSC)를 유도함으로서 세포막을 과분극시키고 흥분성 전류를 차단한다[13]. 따라서 $GABA_B$ 수용체가 활성화되면 신경세포의 활성을 억제하기 때문에 허혈/저산소증에서 일어나는 glutamate 흥분독성(excitotoxicity)을 억제하는 효과를 얻는다. Glycine은 중추신경계 특히 척수, 뇌간, 시신경의 중추신경계에서 신경전달억제물질이다. Glycine 수용체가 활성화되면 Cl^-이 이온투과수용체를 통해서 뉴런으로 들어오게 되고, 이는 억제성시냅스후전위를 유발한다[34-6].

天竺黃은 靑皮竹과 華思勞竹등에 기생하는 竹黃蜂이 咬傷한 후 竹節間에 분비액이 고여 凝結한 塊狀의 물질로서, 性味는 甘寒하고 心, 肝, 膽經으로 歸經한다[6]. 淸熱豁痰, 凉心定驚, 祛風熱의 효능이 있어 熱病神昏譫妄, 中風痰迷不語, 小兒驚風抽搐, 癲癎을 치료하는데 사용되어 왔다[7]. 이는 전통적으로 抱龍丸, 金箔鎭心丸, 安神丸등의 처방에 반영되어 경련을 치료하는데 응용되었다.

신경세포를 시험관내에서 배양하면 배양과정 자체가 세포에 스트레스로 작용하기 때문에 일부 세포는 사멸하게 된다. 이러한 조건은 특정 물질의 세포보호효능을 검증하기 위한 훌륭한 모델이 된다. 본 연구에서는 배양세포의 생존율을 tryphan blue 염색과 면역세포화학 염색방법으로 조사한 결과 天竺黃 물추출물이 배양한 해마신경세포를 유의하게 보호하는 것으로 관찰되었다. 이러한 세포보호효과는 조[11]의 연구에서 天竺黃 메탄올추출물이 glutamate로 유발한 신경독성 억제효과와, 서[12]의 연구에서 신경아세포종 세포에서 天竺黃이 oxidative glutamate 독성에 대한 보호효과를 보인 것은 본 실험의 결과와 부분적으로 일치한다. 그리고 정[13]의 연구에

서 amyloid-β로 독성을 유발한 흰쥐의 astrocyte에 대한 독성억제도 天竺黃의 신경세포 보호효과에 있어서 부분적으로 일치하는 결과를 보인다. 그 기전을 알아보기 위하여 GABA 수용체의 표현에 미치는 영향을 발생단계별로 조사한 결과를 Fig. 9에 종합하여 나타내었다. $GABA_A$ 수용체 아단위 β2/3의 표현은 DIV 3과 DIV 7에는 대조군과 시험군의 차이가 없었지만, DIV 21에는 天竺黃을 첨가한 대조군에서 매우 유의한 증가를 보인 것은 天竺黃이 $GABA_A$ 수용체의 표현을 증가시켜 신경세포를 보호할 수 있음을 시사한다. 또한, $GABA_B$ 수용체 아단위 R1과 R2도 발생단계 전반에서 증가하였으며, R1 아단위는 DIV 7에서 R2 아단위는 DIV 21에서 유의한 증가를 나타내었다. 따라서 天竺黃은 $GABA_{A/B}$ 아단위의 표현을 증가시켜 신경세포의 흥분성을 억제하는 것으로 해석할 수 있다. 그러나 天竺黃 물추출물은 신경세포의 glycine 수용체의 표현에는 영향을 미치지 않았다.

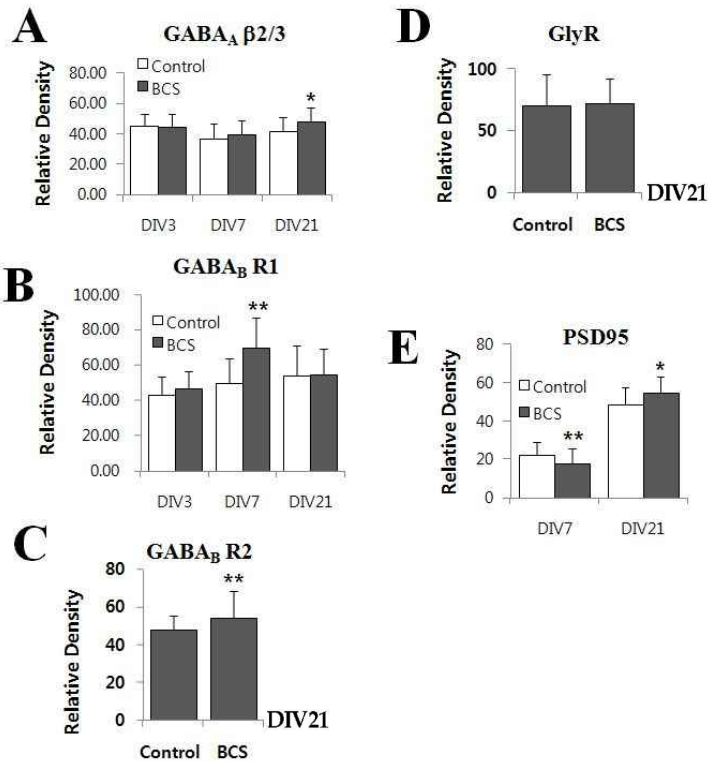


Fig. 9. Summary of effects of BCS on the expression of various synaptic proteins in hippocampal neurons.
* : p<0.05. ** : p<0.01.

한편 흥분성 연접의 표지단백질인 PSD95의 표현은 DIV 7에는 매우 유의하게 감소하였으나, DIV 21에는 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다. DIV 7에 PSD95의 표현이 감소한 것은 天竺黃이 흥분성 연접의 생성을 억제할 수 있는 효과가 있음을 보여주며, 궁극적으로 신경세포의

성숙을 촉진하고 더 건강하게 유지시켜줌으로서 DIV 21에는 PSD95의 표현이 증가되었다고 해석할 수 있다.

지금까지 GABA 수용체에 영향을 미치는 한약물에 대한 연구로는, 蟬退가 신경세포 보호효능이 있으며, 억제성 신경신호전달물질 수용체, 특히 $GABA_B$ 수용체의 표현을 증가시킨다는 연구결과가 있었고[37], 이외에도 加味豨簽丸, 天麻全蠍湯의 항경련효과에 대한 연구, 玄蔘의 항불안 효과에 대한 연구 등이 있었다[38-40]. 본 연구를 통해 天竺黃은 신경세포 보호효능이 있으며, 억제성 신경전달물질수용체의 표현을 증가시키고, 흥분성 연접을 억제시키는 효능이 있다는 것이 새롭게 확인되었다. 따라서 뇌혈관질환, 경련, 간질, 불면증 등에 天竺黃을 활용하여 볼 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅴ. 結 論

본 연구에서는 天竺黃 물추출물이 정상산소환경의 신경세포 보호효과를 알아보고자 배양한 흰쥐 해마신경세포를 tryphan blue 염색 방법으로 조사한 결과, 天竺黃 물추출물은 해마신경세포를 유의하게 보호하였다. 신경전달물질 수용체의 표현에 미치는 영향을 알아본 결과 天竺黃 물추출물은 DIV 21에서 $GABA_A$ β2/3와 $GABA_B$ 수용체 아단위 R2의 표현을 유의하게 증가시켰고, DIV 7에서는 $GABA_B$ 수용체 아단위 R1의 표현을 유의하게 증가시켰다. 한편 天竺黃 물추출물은 DIV 7에서 PSD95의 표현을 유의하게 감소시켰다.

參考文獻

1. Curtis DR, Johnston GA. Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. Ergeb Physiol. 1974;69:97-188.
2. Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. J Neurochem. 1984;42:1-11.
3. Curtis DR, Duggan AW, Felix D, Johnston GA. GABA, bicuculline and central inhibition. Nature. 1970;226(5252):1222-4.
4. Krnjevic K, Phillis JW. Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. J. Physiol. 1963;165:274-304.
5. Farrant M, Kaila K. The cellular, molecular and ionic basis of GABAA receptor signalling. Prog Brain Res. 2007;160:59-87.
6. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 1999:466.
7. 新文豐出版公司. 新編 中藥大辭典. 中國:新文豐出版公司. 1981:793.
8. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 1997:761.
9. 원광대학교 제21기. 本草求眞. 전북:木과 水. 1999:535.
10. 李梴. 국역 편주의학입문. 서울:남산당. 1981:264.
11. 조정숙, 양재하, 박창국, 이희순, 김영호. 뇌졸중 치료 생약 추출물의 흥분성 신경독성 억제효과. 약학회지. 2000;44(1):29-35.
12. 서영준, 정지천. 신경세포에서 천죽황과 페놀성 물질의 항산화 및 신경보호 효과. 대한한방내과학회지. 2000;21(2):219-25.
13. 정지천, 이우헌. 흰쥐 astrocyte에 있어서 amyloid-β에 의한 독성과 지질과산화에 미치는 천죽황의 영향. 대한한방내과학회지. 1998;19(2):381-91.

14. HJ Ji, SI Lee. *Hanyack-Gyugyuk-Juhea*. Seoul: Korean index Co. 2007.
15. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. J. Neurosci Res. 1993;35:567-676.
16. LeDoux, Joseph 저, 강봉균 역. 시냅스와 자아. 서울:소소. 2005:104-5.
17. Galanopoulou AS. GABA(A) Receptors in Normal Development and Seizures: Friends or Foes? Curr Neuropharmacol. 2008;6(1) :1-20.
18. Drewe JA, Chen JS, Reyes AA, Lan NC. Stable high expression of human gamma -aminobutyric acidA receptors composed of alpha and beta subunits. Life Sci.. 1995; 57(12):1175-82.
19. Pritchett DB, Sontheimer H, Gorman CM, Kettenmann H, Seeburg PH, Schofield PR. Transient expression shows ligand gating and allosteric potentiation of GABAA receptor subunits. Science. 1988;242(4883):1306-8.
20. Loup F, Wieser HG, Yonekawa Y, Aguzzi A, Fritschy JM. Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. 2000;20(14):5401-19.
21. Mintz IM, Bean BP. GABAB receptor inhibition of P-type Ca^{2+}channels in central neurons. Neuron. 1993;10:889-98.
22. Thompson SM, Capogna M, Scanziani M. Presynaptic inhibition in the hippocampus. Trends Neurosci. 1993;16:222-7.
23. Poncer JC, McKinney RA, Gahwiler BH, Thompson SM. Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. Neuron. 1997;18:463-72.
24. Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA. G protein-coupled inwardly rectifying K+ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. Neuron. 1997;19:687-95.
25. Bettler B, Kaupmanna K, Bowery N. GABAB receptors: drugs meet clones. Current Opinion in Neurobiology. 1998;8(3):345-50.
26. Marchall FH, White J, Mailn M, Green A, Wise A. GABAB receptors function as heterodimers. Biochem Soc Trans. 1999Aug ;27(4):530-5.
27. Hill DR. GABAB receptor modulation of adenylate cyclase activity in rat brain slices. Br J Pharmacol. 1985;84:249-57.
28. Steiger JL, Bandyopadhyay S, Farb DH, Russek SJ. cAMP response element-binding protein, activating transcription factor-4, and upstream stimulatory factor differentially control hippocampal GABABR1a and GABABR1b subunit gene expression through alternative promoters. J Neurosci. 2004;24 :6115-26.
29. Diverse-Pierluissi M, Remmers AE, Neubig RR, Dunlap K. Novel form of crosstalk between G protein and tyrosine kinase pathways. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94 :5417-21.
30. Couve A, Thomas P, Calver AR, Hirst WD, Pangalos MN, Walsh FS, et al. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation

facilitates GABAB receptor-effector coupling. Nat Neurosci. 2002;5:415-24.
31. Ren X, Mody I. Gamma-hydroxybutyrate reduces mitogenactivated protein kinase phosphorylation via GABAB receptor activation in mouse frontal cortex and hippocampus. J Biol Chem. 2003;278:42006-11.
32. Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M. et al., International union of pharmacology; XXXIII. Mammalian γ-aminobutyric acid B receptors: structure and function, Pharmacol Rev 54 2002;247-64.
33. Calver AR, Davis CH, Pangalos MN. GABAB receptors: from monogamy to promiscuity, Neurosignals 11 2002;299-314.
34. Liu QR, Lopez-Corcuera B. Mandiyan S, et al. Cloning and expression of a spinalcord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. J Biol Chem. 1993; 268:22802-8.
35. Jursky F, Nelson N. Localization of glycine neurotransmitter transporter (GLY2) reveals correlation with the distribution of glycine receptor. J Neurochem. 1995;64:1026-33.
36. Kim XM, kingsmore SF, Han H. et al. Cloning of the human glycine transporter type 1:molecular and pharmacological characterization of novel isoform variants and chromosomal localization of the gene in the human and mouse genomes. Mol Phamacol. 1995;45:608-17.
37. 김석열. 선퇴(Cryptotympana pustulata Fabricus, 蟬退) 물추출물이 배양한 흰쥐 해마신경세포의 신경전달물질 수용체의 표현에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2009:1-29.
38. 서종훈, 김동현, 이동웅, 김근우, 구병수. 가미희첨환(加味稀僉丸)이 GABA성(性) 신경전달에 미치는 영향에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 2008;19(1):43-54.
39. 김성욱, 공대종, 안현국, 김근우, 구병수. 천마전힐탕의 신경수용체 효능활성에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 2004;15(1):77-86.
40. 최윤희, 정지욱. Elevated Plus-Maze를 이용한 현삼의 항불안 효과: GABA 신경계와의 관련성 연구. 동의생리병리학회지. 2010;24(3) :476-83.