도파민 유도성 SH-SY5Y 세포독성에 대한 遠志의 방어기전 연구

이지용 · 박재현 · 김경렬 · 김태헌* · 강형원 · 류영수

원광대학교 한의과대학 신경정신과교실

Protective Effects of Radix Polygalae on Dopamine-induced Cell Death in Human SH-SY5Y Dopaminergic Neuroblastoma Cells

Ji Yong Lee, Jae Hyeon Park, Kyung Yeol Kim, Tae Heon Kim*, Hyung Won Kang, Young Su Lyu

Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

In oriental medicine, *Radix Polygalae*(*RP*) has been to treat tremors et al. But the mechanism how to decrease tremors was not known. The purpose of this study was to investigate the effect of *RP* on neurodegenerative disease. We used *RP* to execute the study of this defense mechanism on dopamine-induced cell death in human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells. MTT assay was used to know the cytotoxicity of dopamine and the defense mechanism. As a result of this experiment, dopamine had cytotoxicity in human SH-SY5Y cells, but when it treated with *RP*, the cell survival rate increased. This suppressed the cell apoptosis, activation of caspase-3 protease, production of ROS, and repair of membrane potential change. In conclusion, *RP* has the protective effect on dopamine-induced cell death in human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells, so this could be an effective agent on the neurodegenerative disease like Parkinsonism.

Key words : SH-SY5Y, *Radix Polygalae*, Dopamine, Neurodegenerative disease

서 론

파킨슨병(Parkinson's disease)이란 주로 震顫, 근육의 剛直, 그리고 몸 동작이 느려지는 徐動 등의 운동장애가 나타나는 질환으로, 흑색질로부터 시작하여 선조체에 분포하는 도파민분비 신경세포의 점진적인 퇴화를 수반하는 신경학적 장애로서, 뇌에서 도파민(Dopamine)이라는 신경전달물질이 부족하게 되어 생기는 만성질환이다[1].

파킨슨병은 韓醫學에서의 '震顫'이라는 증상과 유사한데, 內經[2] <素問 · 至眞要大論>에서 "諸風掉眩 皆屬於肝"의 '掉'가 震顫을 가리키는 것으로 震顫의 증상을 최초로 언급하였고, 淸代에 張[3]은 "蓋木盛則生風生化.....手足動而 頭不動也"라 하여 최초로 震顫을 한 개의 독립된 병명으로 인식하였으며, 震顫이 나타나는 부위에 따라 頭抖, 手顫, 足顫, 舌顫 등으로 언급되어 왔다[4]. 震顫에 대한 한의학적인 연구로는 金 등[5-6]의 震顫에 관한 실험적 연구, 天麻, 葛根, 釣鉤藤水針 등의 항경련 작용에 관한 실험적 연구[7-9] 등을 접할 수 있었으나 아직은 그리 많지 않은 실정이다.

遠志는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 多年生 草本인 遠志의 뿌리를 건조한 것으로서, 그 歸經은 心腎이고 性味는 苦辛溫 등으로 분류되어 있으며, 주로 寧心安神, 祛痰利竅劑로 사용되어 오고 있다[10-12]. 遠志를 이용한 연구로는 黃[13]이 遠志 수침액이 腦星狀細胞에서 TNF-α 生成 및 TNF-α mRNA의 발현을 抑制한다고 보고하였으며, 朴[14]은 遠志 Saponin이 利尿效果와 中樞抑制效果가 있다고 하는 등 몇몇 부분적으로 있으나 파킨슨병과 관련된 抗痙攣 연구는 접할 수 없었다.

이에 저자는 흑색질의 신경세포 손상으로 인해 도파민분비 신경세포의 퇴화로 유도될 수 있는 퇴행성 뇌질환인 파킨슨병과 관련하여, 도파민을 생성하는 사람 섬유아세포종 SH-SY5Y 세포를 이용하여 세포고사를 유도하고 이에 유효한 遠志의 방어기전을 연구하였다. 또한 dopamine을 이용하여 세포고사 기전을 유도하고 Flow cytometry 분석법과 핵 염색법 등을 통해서 세포고사 현상을 확인하였다. 이러한 세포고사 기전을 규명하기 위하여 Caspase protease의 활성, PARP의 절단, Bak의 발현 변화, 미토콘드리아 막전위 변화를 살펴 보았으며, 이후 dopamine에 의한

* 교신저자 : 김태헌, 광주시 주월동 543-8번지, 원광대 광주한방병원
· E-mail : jayou88@dreamwiz.com Tel : 062-670-6471
· 접수 : 2004/02/06 · 수정 : 2004/03/24 · 채택 : 2004/04/02

세포고사에 遠志가 유의한 방어효과를 나타내었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 遠志 수침액의 조제

본 실험에 사용한 遠志(Radix Polygalae 이하RP)는 원광대학교 전주한방병원에서 75 g을 구입한 후 정선하여 약탕기에 適量의 증류수(200 cc)를 넣고 약 3시간 달여서 조제하였다. 조제한 수침액은 여과하여(약 10 g) 냉동건조한 다음 4 ℃에 보관하여 실험시 적당량의 증류수에 희석한 다음 멸균 처리(autoclave 121 ℃, 15분)하여 사용하였다.

2) 시약

Dopamine은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여, phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 용해한 후, 0.2 μm filter(Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용하여 여과한 후에 사용하였다. 세포배양에 사용한 세포배양판은 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였고, poly (ADP-ribose) polymerase(PARP), Caspase-3, Bak, Phospho-H2AX 항체는 Santa Cruz사 (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Hoechst 33258, Horseradish peroxidase(HRP), Dimethyl sulfoxide(DMSO), JC-1, Rhodamine 123 등은 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며, 세포배양액 RPMI, fetal bovine serum(FBS), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

사람 섬유아세포종 SH-SY5Y 세포를 10 cm 세포배양판에 부착한 후, 10 % 우태아혈청이 포함된 세포배양액 RPMI으로 5 % CO_2, 95 % 대기공기 및 37 ℃가 유지된 세포배양기에서 배양하였다. 24시간 간격으로 계대 배양하였으며, 세포배양액을 교체한 후 안정화 상태에 있는 세포에서 dopamine에 의한 세포사멸 현상 및 이를 회복시키는 한약재와 관련한 분자생물학적 실험을 수행하였다.

2) 세포생존율 측정

사람 섬유아세포종 SH-SY5Y 세포를 24 well 세포배양판에 1×10^5 cells/ml씩 분주하여 24시간 세포배양판에 부착시키고, 안정화된 세포에 dopamine을 일정시간 처리하여 MTT(0.5 mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 살아 있는 세포에 의해 MTT로부터 생성된 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 540 nm 파장에서 ELISA reader(THERMO max, USA)로 읽어 흡광도를 측정하였다. 측정한 formazan 생성 정도는 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

3) 핵 염색(Hoechst staining)

정상세포군과 실험조건의 세포핵 형태를 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. 먼저 4 % formaldehyde 용액으로 세포를 고정시킨 다음, PBS로 2번 세척하였다. 핵 염색 dye인 Hoechst 33258을 10 μM로 희석하여 10분간 염색하고 다시 PBS로 세척한 후 형광 광학 현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용하여 핵 형태를 관찰하면서 10×10의 배율로 사진을 찍었다.

4) Caspase family cysteine protease 활성도 측정

정상세포군과 실험조건의 세포를 4 ℃에서 30분간 세포 파쇄용액(1 % Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol(DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)으로 파쇄하여 14,000 rpm으로 15분 원심분리를 하고 이 때 얻어진 상층액은 bicinchroninic acid(BCA) 용액에 30분간 반응시켜 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 정량하였다. 정량하여 얻어진 100 μg의 세포 파쇄액은 caspase assay buffer(100 mM HEPES, 10 % sucrose, 0.1 % chaps, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 2 mM DTT, pH 7.5)에 희석되어 형광표지된 기질과 37 ℃에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer로 caspase activity (caspase3: AMC-DEVD, caspase8: Z-IETD-AFC, caspase9: Ac-LEHD-AFC)를 측정하였다. 이 때의 파장은 excitation wavelength(380 nm)와 emission wavelength(460 nm)를 사용하였다.

5) Western blotting

정상세포와 실험조건의 세포를 포집하여 세포 파쇄용액으로 4 ℃에서 파쇄한 후, BCA용액으로 동량이 되게 정량하였다. 두 배의 sample buffer(5 mM EDTA, 4 % sodium dodesyl sulfate(SDS), 20 % glycerol, 200 mM Tris, pH 6.8, 0.06 % bromophenol blue)를 혼합한 후, 100 ℃에서 3분간 가열하여 단백질 변성을 유도하고 10 % sodium dodesyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질을 0.8 mA/㎠의 전기를 걸어주어 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5 % skim milk로 만들어진 blocking buffer를 이용하여 상온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. 일차항체를 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시키고 TBS-T로 10분간 3회 세척한 후, 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated HRP(TBS-T로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 nitrocellulose membrane을 상온에서 1시간 반응시켜 ECL kit(Amersham Co., England)를 이용하여 필름에 노출시켰다.

6) ROS 측정

정상세포군과 실험조건의 세포의 상층액을 96 wells 세포배양판에 각각 100 μℓ씩 분주하고 0.2-0.4 μM HRP와 1-2 μM scopoletin을 실온에서 10분 반응시켰다. 생성된 H_2O_2에 의해 감소된 scopoletin의 형광을 대조군과 비교하여 fluorometer (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA)로 450 nm의 파장에서 측정하여 대조군에 의한 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

7) Flow cytometry 분석

정상세포군과 실험조건의 세포를 모아서 원심분리를 한 다

음, DCF dye를 이용하여 Flow cytometry 분석을 시행하였다. 활성산소만을 특이적으로 구분하여 나타난 그래프를 정상세포군과 비교하여 이동(shift)한 만큼 나타내었다.

8) 미토콘드리아 염색(JC-1, Rhodamin 123 staining)

정상세포군과 실험조건의 세포에 미토콘드리아만을 특이적으로 염색하는 dye인 JC-1, Rhodamine 123이 포함된 세포배양액으로 교체해 준 다음 세포배양기에서 30분간 반응시킨 후에 세포배양액을 제거하고 세포표면을 PBS로 3번 세척하였다. PBS를 완전히 제거한 뒤, 살아있는 세포상태를 유지하기 위해서 슬라이드 글라스로 세포표면을 조심스럽게 덮은 다음 역상 광학현미경(Nikon Eclipse TE 300, Japan)을 이용해서 10×10의 배율로 사진을 찍었다.

9) 결과 산출

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하여 그 결과를 standard t-test를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

1. Dopamine과 遠志가 세포독성에 미치는 영향

Dopamine의 세포독성을 알아보고자 사람 섬유아세포종 SH-SY5Y 세포에 dopamine을 농도별, 시간별로 처리하고 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. SH-SY5Y 세포에 dopamine을 50, 100, 200, 400 μM되게 농도별로 12시간 처리한 후, 세포생존율이 농도 의존적으로 감소되고 있음을 확인하였다(Fig. 1A). Dopamine에 의한 세포독성의 시간 의존적인 변화를 알아보고자 SH-SY5Y 세포에 dopamine 200 μM을 처리하고 시간적 차이에 의한 세포독성을 관찰하였다. SH-SY5Y 세포에 200 μM의 dopamine을 처리하고 3시간이 지나면서부터 세포의 독성이 나타나기 시작하였으며, 6시간이 경과하자 정상세포에 비해 세포생존율이 20 % 감소하였고 12시간이 경과하자 세포생존율이 정상세포에 비해 50 %가 감소하였다(Fig. 1B).

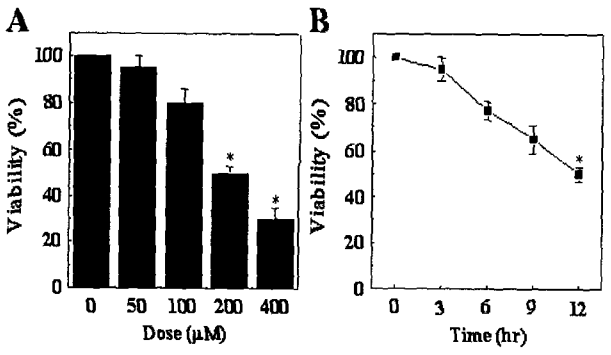

Fig. 1. Dopamine decreased the viability of dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells in a dose and time-dependent manner. (A) Cells were treated with various concentrations of dopamine for 12 hr. (B) Cells were treated with 200 μM dopamine for the indicated periods. Cell viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean±S.D. of three independent experiments. *, P<0.01, **, P<0.001.

Dopamine에 의한 SH-SY5Y 세포독성에 있어서 遠志의 방어효과를 확인하고자, SH-SY5Y 세포에 dopamine 200 μM과 遠志를 50, 100, 200 ㎍/ml되게 농도별로 12시간 처리한 후, MTT assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 遠志는 dopamine에 의한 SH-SY5Y 세포독성을 농도 의존적으로 방어하였으며, 遠志 200 ㎍/ml을 처리하였을 때는 dopamine을 단독으로 처리한 세포군과 비교하여 세포생존율이 30 %정도 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 또한 다양한 항산화제들도 dopamine을 단독으로 처리한 세포군과 비교하여 세포생존율이 정상수준 가까이 회복됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). Fig. 2B에 나타난 결과에서 다양한 항산화제의 dopamine 독성 억제효과로 보아 dopamine 독성에 산화성 손상이 관여하고 있음을 추측하게 한다[15-16].

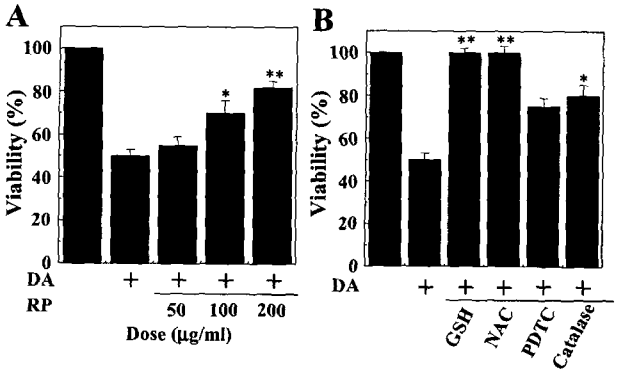

Fig. 2. RP and antioxidants protected dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells from dopamine. A. Cells were treated with various concentration of RP and followed by the addition of 200 μM dopamine for 12 hr. B. Cells were treated with antioxidants(GSH 10mM, NAC 10mM, PDTC 50 nM, catalase 100 U/ml) and followed by the addition of 100 μM dopamine for 12 hr. The viability was measured by MTT assay. Results represent as the mean±S.D. of three experiments. *, P<0.01, **, P<0.001.

2. Dopamine과 遠志가 세포고사에 미치는 영향

Dopamine에 의한 사람 섬유아세포종 SH-SY5Y 세포의 형태학적인 변화를 알아보고자 SH-SY5Y에 dopamine 200 μM을 처리하고 12시간이 경과한 후 4 % paraformaldehyde로 세포를 고정하고, 핵 염색 dye인 Hoechst 33258로 핵 염색을 시행하였다. 정상세포에서는 타원형이고 둥근 형태의 핵이 관찰되었으나, 200 μM의 dopamine을 처리한 실험군에서는 세포고사의 형태학적 특징 중 하나인 염색사 응축(chromatin condensation)현상과 핵 분절(nuclear fragmentation)현상이 관찰되었으며, dopamine과 함께 200 ㎍/ml의 遠志를 12시간 처리한 실험군에서는 전체적으로 염색사의 응축현상과 핵 분절현상이 많이 감소되어 정상세포와 비슷한 수준으로 관찰되었다(Fig. 3).

3. Dopamine과 遠志가 caspase protease 활성에 미치는 영향

Dopamine에 의한 사람 섬유아세포종 SH-SY5Y 세포의 세포고사 과정에 caspase protease family들의 활성이 관여하는지를 확인하고자 caspase계 cysteine proteases 중에서 caspase -2, -3, -8 및 -9 cysteine proteases의 활성변화 정도를 조사하였다. SH-SY5Y 세포

에 200μM의 dopamine을 처리한 후, 3시간 후부터 caspase-3 protease가 활성되기 시작하여 6시간에 3배의 활성을 보였으며, 12시간에 가장 최고치(5배)를 나타내었다(Fig. 4B). 또한 caspase-9 protease의 활성 역시 dopamine 처리 후 서서히 활성되기 시작하여 12시간에 2배까지 활성되었다(Fig. 5B). 그러나 caspase-2와 caspase-8 protease의 활성 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4A, 5A).

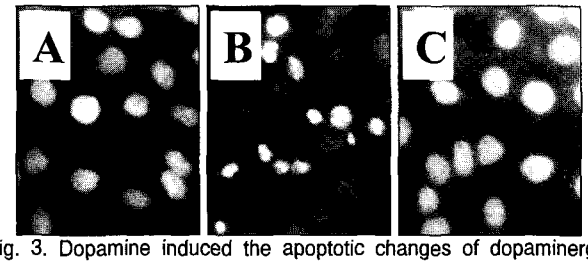

Fig. 3. Dopamine induced the apoptotic changes of dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Nuclear fragmentation shown in dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells treated with dopamine revealed by Hoechst 33258 staining. (A) Control cells. (B) Cells treated with 200 μM dopamine for 12 hr. (C) Cells treated with RP (200 μg/ml) and followed by the addition of 200 μM dopamine.

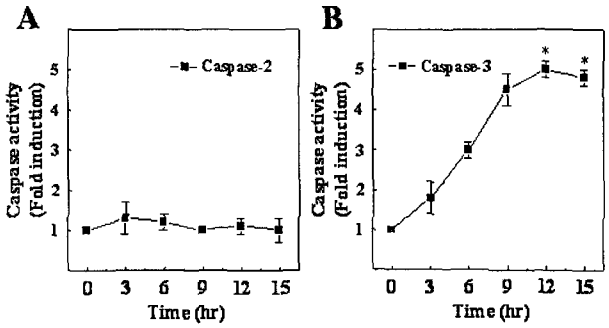

Fig. 4. Activation of caspase-2 and caspase-3 proteases in dopamine-treated dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells were seeded for 12 hr and followed by the addition of 200 μM dopamine for various periods. Lysate from cells was used to measure activity of caspase-2 protease using fluorogenic peptides Z-VDVAD-AFC(50 μM) as a substrate. Lysate from cells was used to measure activity of caspase-3 protease using fluorogenic peptides Ac-DEVD-AMC(50 μM) as a substrate. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control values. Results represent as the mean±S.D. of three experiments. *, P<0.01, **, P<0.001.

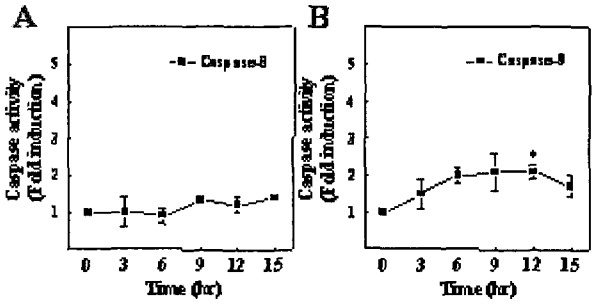

Fig. 5. Activation of caspase-8 and caspase-9 proteases in dopamine-treated dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells were seeded for 12 hr and followed by the addition of 200 μM dopamine for various periods. Lysate from cells was used to measure activity of caspase family protease using fluorogenic peptides Z-IETD-AFC as a substrate. Lysate from cells was used to measure activity of caspase-9 protease using fluorogenic peptides Ac-LEHD-AFC as a substrate. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control values. Results represent as the mean±S.D. of three experiments. *, P<0.01, **, P<0.001.

이러한 dopamine에 의한 caspase proteases의 활성을 遠志가 억제하는지를 알아보기 위해 SH-SY5Y 세포에 200μM의 dopamine과 遠志를 농도별(50, 100, 200μg/ml)로 12시간 처리한 후, caspase proteases(caspase -3, -9)의 활성을 측정하였다. 그 결과 200μM의 dopamine과 200μg/ml의 遠志를 12시간 처리하였을 때, caspase-3과 caspase-9의 활성이 정상세포 수준 가까이 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

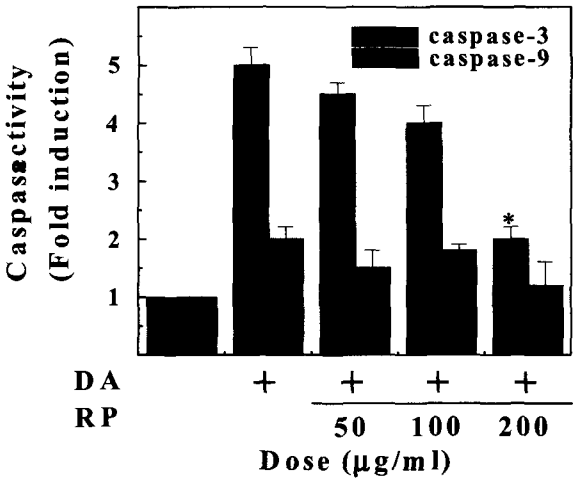

Fig. 6. Protective effects of RP on the dopamine-induced caspase activation in dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells were treated with various concentrations of RP and followed by the addition of 200 μM dopamine for 12 hr. Lysate from cells was used to measure activity of caspase family protease using fluorogenic peptides Ac-DEVD-AMC (50 μM) for caspase-3 protease, and Ac-LEHD-AFC for caspse-9 protease as substrates. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control values. Results represent as the mean±S.D. of three experiments. *, P<0.01, **, P<0.001.

4. Dopamine과 遠志가 PARP 절단에 미치는 영향

세포고사의 매개체인 caspase-3 protease의 활성은 DNA 합성의 촉매 효소인 116 kDa의 PARP[poly(ADP-ribose) polymerase] 단백질을 절단하여 이 효소를 불활성화시키며, 이는 DNA의 손상을 회복하지 못하도록 함으로써 세포고사를 촉진시키는 기능을 한다[17-18]. 사람 섬유아세포종 SH-SY5Y 세포에 200μM의 dopamine을 처리하여 caspase-3 protease의 활성을 확인하였으므로, 이하 caspase-3 pro-form의 감소와 PARP의 절단을 알아보고자 200μM의 dopamine을 처리한 세포를 포집하여 세포 파쇄액를 얻고 전기영동한 후, caspase-3 및 PARP에 대한 항체를 사용하여 Western blotting을 시행하였다. Western blotting상에서도 caspase-3 pro-form이 서서히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 그 결과 PARP의 pro-form이 dopamine을 처리한 지 6시간이 경과하면서부터 절단됨을 관찰하였다(Fig. 7). Dopamine에 의한 caspase-3와 PARP의 절단에 遠志가 미치는 영향을 알아보고자 SH-SY5Y 세포에 200μM의 dopamine과 遠志를 50, 100, 200 μg/ml되게 농도별로 12시간 처리하여 절단되었던 caspase-3와 PARP의 회복여부를 관찰하였다. 그 결과 200 μM의 dopamine과 200 μg/ml의 遠志를 12시간 처리한 실험군에서 caspase-3와 PARP의 pro-form이 정상수준 가까이 회복됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 8).

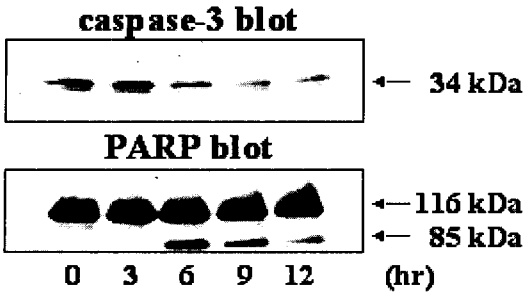

Fig. 7. Cleavage of caspase-3 and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in dopamine-treated dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells were treated with 200 μM dopamine for various periods. Lysate from cells was separated on 12.5% SDS-PAGE. Caspase-3 on the nitrocellulose membrane was proved by anti-caspase-3 antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit. PARP on the nitrocellulose membrane was proved by anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

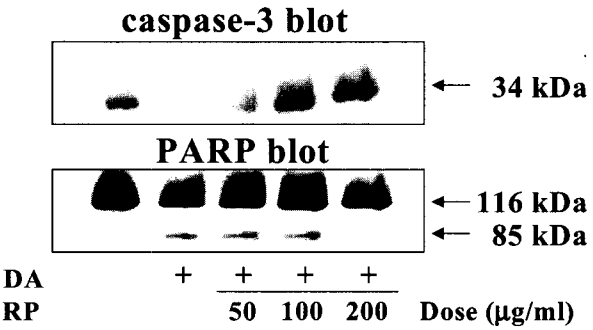

Fig. 8. Protective effects of RP on the dopamine-induced caspase-3 and poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) cleavage of dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells were treated with various concentrations of RP and followed by the addition of 200 μM dopamine for 12 hr. Lysate from cells was separated on 12.5% SDS-PAGE. Caspase-3 on the nitrocellulose membrane was proved by anti-caspase-3 antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit. PARP on the nitrocellulose membrane was proved by anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

5. Dopamine과 遠志가 세포사멸 촉진 단백질 Bak에 미치는 영향

세포고사 신호전달 과정에 관여하는 Bcl2 가족은 기능적인 면에서 크게 세포사멸 억제기능과 세포사멸 촉진기능으로 대별된다. Bcl2, Bfl-1, BAG-1, A1 및 Mcl-1은 세포사멸을 억제하는 기능을 하나, Bax를 비롯하여 Bad, Bak, Bid, Bim 등은 세포사멸 촉진 기능을 하여 세포사멸 억제 단백질과 촉진 단백질 간의 상대적인 발현 양에 의해 Bcl2 가족 구성원간의 결합을 조절하는 신호전달계도 세포의 사멸이나 생존에 직접적인 영향력을 발휘하고 있다[19-21]. 그러므로 dopamine에 의한 사람 섬유아세포종 SH-SY5Y 세포사멸에 촉진기능을 하는 Bak의 발현 양의 변화를 관찰하였다. 정상세포에 200 μM의 dopamine을 처리하여 Bak의 시간 의존적인 발현 양의 변화를 관찰하였다. 정상세포에 200 μM의 dopamine을 처리하고 시간이 경과함에 따라 Bak의 발현 양이 서서히 증가하고 있음을 확인할 수 있었으며(Fig. 9), 200 μM의 dopamine과 遠志를 50, 100, 200 μg/ml되게 농도별로 처리한 실험군에서는 증가한 Bak의 발현 양이 정상세포 수준 가까이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 10). 또한 세포고사 초기단계에 이중가닥 DNA가 손상되고 손상된 DNA에 의하여 histone 단백질의 인산화가 유도된다는 많은 보고들이 있다. 그러므로 dopamine에 의한 사람 섬유아세포종 SH-SY5Y 세포고사 초기단계에 있어서 DNA 손상에 의한 histone 단백질 인산화의 변화를 관찰하였다. 그 결과 dopamine이 SH-SY5Y 세포에서 histone 단백질 H2AX의 인산화를 유도하고 있음을 확인하였다[22-23].

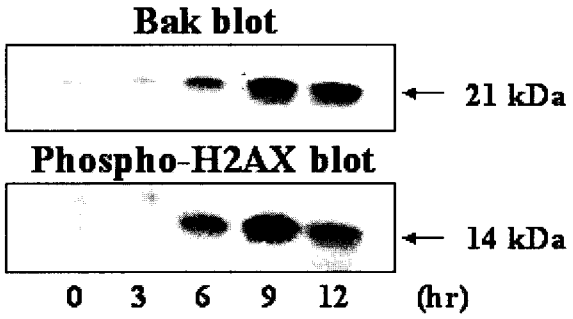

Fig. 9. Increasement of Bak and phospho-H2AX in dopamine-treated dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells were treated with 200 μM dopamine for various periods. Lysate from cells was separated on 15% SDS-PAGE. Bak on the nitrocellulose membrane was proved by anti-Bak antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit. Phospho-H2AX on the nitrocellulose membrane was proved by anti-phospho-H2AX antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

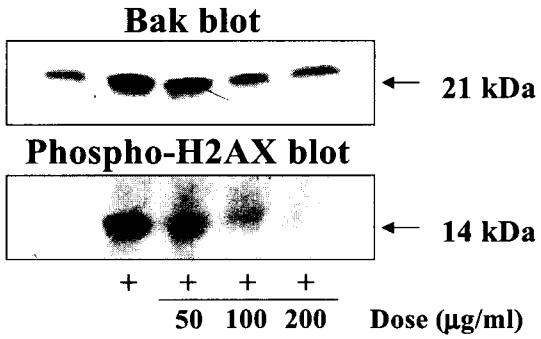

Fig. 10. Protective effects of RP on the dopamine-induced Bak and phospho-H2AX increasement of dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells were treated with various concentrations of RP and followed by the addition of 200 μM dopamine for 12 hr. Lysate from cells was separated on 15% SDS-PAGE. Bak proved by anti-Bak antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit. Phospho-H2AX proved by anti-phospho-H2AX antibody and the immunoreactive band was visualized by ECL kit.

6. Dopamine과 遠志가 ROS 생성에 미치는 영향

Dopamine에 의한 사람 섬유아세포종 SH-SY5Y 세포의 세포고사 과정에 활성산소종이 관여하는지를 알아보고자 다양한 항산화제와 같이 dopamine을 처리한 후 세포생존율을 관찰하였다. 그 결과 Fig. 2B에서 항산화제 GSH와 NAC는 dopamine 단독 처리시 감소한 세포생존율을 정상세포와 동일한 수준으로 회복시켰으며, PDTC와 catalase도 遠志가 회복시킨 세포생존율과 비슷한 결과를 보였다. 이는 dopamine에 의한 SH-SY5Y 세포의 세포고사 과정에 활성산소종이 관여하였으리라는 추측을 하게 하므로, dopamine 처리에 의한 직접적인 ROS 생성을 측정하였다. SH-SY5Y 세포에 200 μM의 dopamine을 시간별로 처리하고

scopoletin assay를 이용하여 ROS 생성변화를 관찰하였다. 정상세포와 비교하여 dopamine 단독 처리시 H2O2의 생성량이 시간의존적으로 증가하여 6시간에는 1.5배, 12시간에는 2.5배 가량 증가함을 관찰하였다(Fig. 11A). 200 μM의 dopamine과 遠志를 50, 100, 200 ㎍/ml되게 농도별로 처리한 실험군에서는 증가한 H_2O_2의 생성량이 정상세포 수준 가까이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 11B). 또한 ROS에만 특이적으로 반응하는 dye인 DCF를 사용하여 Flow cytometry 분석을 시행한 결과, 정상세포(A)에 비해 dopamine을 단독 처리한 실험군(B)이 왼쪽으로 현저히 이동한 것을 관찰하였다. 200 μM의 dopamine과 200 ㎍/ml의 遠志를 같이 처리한 실험군(C)에서는 정상세포 수준 가까이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 12).

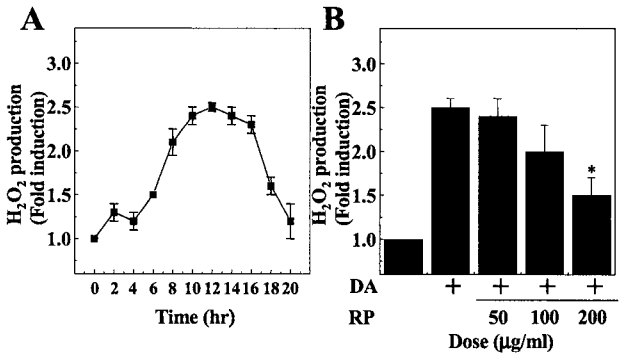

Fig. 11. Protective effects of RP on the dopamine-treated ROS induction of dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells were treated with 200 μM dopamine for various periods (A). Cells were treated with various concentrations of RP and followed by the addition of 200 μM dopamine for 12 hr (B). Cells were analyzed their ROS induction by scopoletin assay.

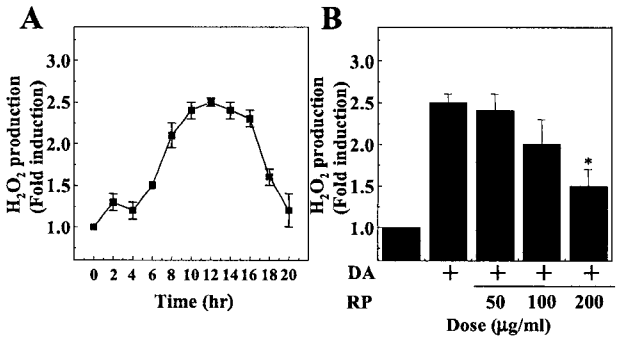

Fig. 12. Protective effects of RP on the dopamine-treated ROS induction of dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells were treated with 200 μM dopamine for 12 hr (B). Cells were treated with RP(200 ㎍/ml) and followed by the addition of 200 μM dopamine for 12 hr (C). Cells were analyzed their ROS induction by Flow cytometry. (A) Control cells.

7. Dopamine과 遠志가 미토콘드리아에 미치는 영향

세포사멸 신호전달과정에 있어서 미토콘드리아는 심한 손상을 받는다. 세포고사가 일어나는 세포에서는 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 세포질로 방출되고, 방출된 cytochrome c와 Apaf-1이 caspase-9 protease를 활성화시킨다. 미토콘드리아만을 특이적으로 염색하는 dye인 Rhodamine 123을 이용하여 정상세포와 사람 섬유아세포종 SH-SY5Y 세포에 200 μM의 dopamine을 12시간 처리한 실험군에 염색하여 미토콘드리아의 막전위에 어떤 변화가 있는지를 관찰하였다. Rhodamine 123으로 염색한 경우, 정상세포는 미토콘드리아가 세포질 일부에 점을 찍은 듯이 모여있으며(punctuated form), dopamine 단독 처리시에는 세포질 전체에 퍼져 있음(diffused form)을 관찰할 수 있었다(Fig. 13B). 이 결과는 dopamine 처리에 의한 정상세포 미토콘드리아의 막전위에 변화가 있음을 의미한다. 다음으로 SH-SY5Y 세포에 10 ㎍/ml의 200 μM의 dopamine과 遠志 200 ㎍/ml을 12시간 처리하여 미토콘드리아의 막전위 변화를 관찰한 결과 정상수준 가까이 회복되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 13C).

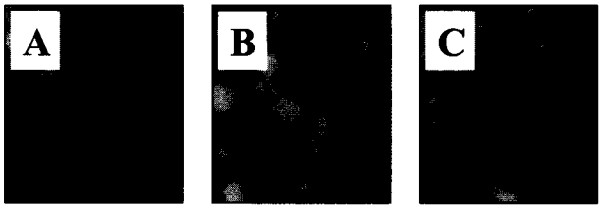

Fig. 13. Protective effects of RP on change of mitochondrial permeability transition in dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine. Cells were treated with 100 μM dopamine for 12 hr. Others were treated with RP(200 ㎍/ml) and followed by the addition of 100 μM dopamine for 12 hr. Mitochondria of cells were stained with Rhodamine 123. (A) Control cells. (B) Cells treated with 100 μM dopamine for 12 hr. (C) Cells treated with RP(200 ㎍/ml) and followed by the addition of 100 μM dopamine.

고 찰

震顫이란 振掉, 顫振이라고도 하는데 빈도가 1초당 3~6회로 일정한 불수의 운동을 말하며, 대개 上下肢의 말초부위에서 볼 수 있으나 때로는 體幹·頭部·顔面·턱·혀 등으로 파급되어 나타날 수 있고, 노인에게서 다발하며 남성이 여성에 비하여 다발하는 질환이다[24]. 가벼운 경우에는 頭搖 또는 手足微顫이 있을 뿐으로 작업과 정상적인 생활을 유지할 수 있으나, 증상이 重한 경우에는 頭部의 震遙가 크고 심하면서 痙攣縮轉하듯이 동작되며 兩手 및 上下肢의 震顫이 멈추지 않고 간혹 項强이나 四肢拘急을 겸할 때도 있다[24].

震顫은 정도에 따라서 微細震顫과 粗大震顫으로 나눌 수 있고, 또 震顫이 오는 시기에 따라서 정지시 震顫과 企圖震顫으로 나누고 있다. 靜止時 震顫은 靜時에만 현저하고 隨意運動時에는 震顫하지 않는 것이며, 企圖震顫은 隨意運動時에만 현저하게 震顫하는 것을 말한다[25]. 또한 顔面筋, 眼瞼, 口脣, 때로는 四肢의 근육이 국소적으로 일과성의 가벼운 경련이 와서 자기의 의사와는 무관하게 불수의적 震顫을 유발시키는 瞤動症이 있는데 이것은 주로 Tic으로 분류하고 있으며, 이들 震顫이 四肢의 운동에까지 이상을 초래하여 끊임없이 불규칙하고 목적없이 비교적 빠른 震顫을 일으키는 것은 舞蹈病으로 분류해 놓고 있다[25].

黃 등[25-26]은 경련성 질환을 심인성, 갑상선기능항진성, 가족성 또는 유전성, 노인성, 중독성, Pakinson's disease, Wilson's disease, 企圖震顫, 書痙등으로 분류하고 있으며, 病因으로는 주로 手足의 근긴장, 共同운동, 불수의운동 등을 담당 조절하고 있는 선조체, 담창구, 시상하핵, 시상, 흑질 등의 대뇌피질 추체외

로계영역의 병변으로 유발된다고 인식하고 있고, 宋 등[27]은 신경전달물질의 증감변화로 인해 腦內 feed back mechanism 혼란을 야기시키고 그 결과 腦內 상호조절작용의 실조를 유발시켜서 일부 경련성 질환이 야기된다고 설명하고 있다. 현재까지 알려진 腦內의 신경전달물질은 20여종인데 그중 noradrenaline, dopamine, serotonin, acetylcholine, GABA (gamma-aminobutyric acid) 등이 추체외로계의 기능에 관여한다고 알려져 있다[25].

한의학에서는 內經 <素問 · 至眞要大論>[2]에 "諸風掉眩 皆屬於肝……散于四末 則手足動而頭不動也"라 하여 '掉'가 震顫을 가리키는 것으로 震顫의 증상을 최초로 언급하였고 肝과 관계가 있다고 보았으며, 淸代 張[3]은 "蓋本盛則生風生化……手足動而頭不動也"라 하여 최초로 震顫을 한 개의 독립된 병명으로 인식하였다. 病機를 살펴보면 王[28]은 "肝主風……木氣鼓之 故動"이라 하여 內經의 뜻과 일치하게 肝風으로 보았고, 許 등[29-30]은 心血虛, 氣血內傷으로 보았으며, 樓[36]는 "風火相乘……虛亦有之 治各不同也"라 하여 風熱, 風寒, 風痰濕痰, 虛症으로 보았고, 傅[37]는 "產婦失血旣多……顫由氣虛也"라 하여 氣虛로 보았으며, 劑[38]는 肝鬱氣滯, 風痰內阻, 肝腎陰虛, 氣血虧損, 瘀血阻絡으로 보았다.

역대 문헌에서 震顫과 유사한 증상으로는 瘛, 瘲瘲, 攣에서 찾아볼 수 있는데 瘛에 대해 살펴보면, 王[28]은 "熱因鬱卽愈甚……大小筋俱受熱害而剛瘛"이라 하여 鬱熱이 傷筋하여 瘛이 된다고 하였고, 張[34]은 "產後發瘛乃陰血大虧證也……無非血燥血枯之病"이라 하여 瘛病을 血枯, 血燥의 病이라 하였다. 瘲瘲에 대해서 樓[31]는 "河曰諸熱脅瘲……亦癇瘲筋攣 此肝虛也"라 하여 病因을 風熱, 心火虛寒, 心火實熱, 脾虛肝乘, 肝虛 등으로 보았고, 張[34]은 心氣虛, 心火旺, 脾虛生風, 肝熱生風, 熱傷元氣 등에 의해 발생한다고 보았다. 攣에 대해서 王 등[28,31,34]은 肝主筋이므로 攣은 肝과 관계가 있다고 보았고, 傅[32]는 "蓋血虧則筋病……筋自縮急"이라 하여 血이 虧損되면 筋病이 오고 氣가 不順해도 筋에 縮急이 온다고 하였으며, 巢[35]는 筋急의 원인을 風冷으로 보았다.

以上의 瘛, 瘲瘲, 攣등을 살펴보면 臟器로는 肝, 心, 脾와 관련이 많고 病機는 心脾兩虛, 肝血不足, 肝熱生風, 風熱, 風冷, 氣滯 등으로 발생하기 쉽다고 한 것으로 보아 이는 震顫의 病機와 類似하다고 볼 수 있다.

震顫의 治法으로 張[3]은 肝木實熱하면 瀉靑丸, 肝木虛熱하면 六味地黃丸, 肝木虛弱하면 逍遙散, 挾痰일때는 導痰湯, 脾胃虛弱일 때는 六君子湯을 用하였고, 王[28]은 氣虛에는 蔘朮湯, 心虛에는 補心丸, 挾痰일 때 導痰湯, 노인의 震顫에는 定振丸을 사용하였으며, 葉[32]은 氣虛로 인한다고 하여 壯氣元陽을 위주로 補中益氣湯을 사용하였다. 劑[36]는 平肝熄風하는 羚角鉤藤湯, 滋陰熄風하는 二甲復脈湯, 除風化痰하는 導痰湯, 祛風散寒하는 黃芪桂枝五物湯, 健脾熄風하는 六君子湯, 養血熄風하는 定振丸을 사용하였다.

震顫 등을 포함한 뇌의 퇴행성 질환에 많이 쓰이는 遠志는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 多年生 本草인 遠志의 뿌리를 건조한 것으로서, 心腎으로 歸經하고 性味는 苦辛溫 등으로 分類되어 있으며 寧心安神, 祛痰利竅劑로서 주로 心經과 腎經의 藥으로 사용되었다[10-12]. 遠志를 이용한 實驗 및 文獻報告로, 朴[14]은 遠志 saponin이 이뇨효과와 중추신경 抑制 효과가 있다고 하였으며, 黃[13]은 遠志에 의한 腦 星狀細胞로부터 염증성 세포활성물질 분비의 억제 효과가 있다 하였고, 康[37]은 遠志와 石菖蒲의 단독 및 혼합투여가 白鼠의 뇌손상에 일부 효과가 있다 하였으며, 金[38]은 遠志가 IL-1α 분비를 억제하는 효과가 있다고 하였다.

의학이 발달하면서 인간의 평균수명이 늘어나고 노인인구가 늘어남으로써 더불어 노인성 질환의 주원인으로 신경계 질환이 증가 추세에 있으며, 이는 사회적인 문제로 연결되고 있다. 현재 우리나라에서는 신경계 질환들이 그 중요성에도 불구하고 효과적인 치료가 불가능한 것으로 여겨져 기초 의학 및 임상적 연구의 중심적 영역에서 소외되어 왔는데, 다행히 최근에 여러 신경계 질환들의 기전들이 생명공학의 발달로 점차 밝혀지고 있는 실정이다.

세포고사(apoptosis)는 일반적으로 개체발생시 발생되는 생리학적, 병리학적 현상으로 신경계에서도 발생하며, 특히 파킨슨병(Parkinson's disease) 및 알쯔하이머병(Alzheimer's disease)을 포함한 많은 신경퇴행성 뇌질환에서 나타나는 세포사로서, 본 연구에서는 파킨슨병에서 중요한 작용을 하는 도파민 유도성 SH-SY5Y 세포사멸 과정과 遠志의 세포사멸 방어기전을 실험적으로 규명하기 위하여 dopamine에 의한 세포독성이 세포고사 현상임을 확인하고, 遠志의 dopamine 세포독성에 대한 방어효과를 관찰하였다. 그리고 세포사멸 기전의 성격을 규명하기 위하여 dopamine으로 처리한 세포의 caspase proteases의 활성, PARP의 절단, Bak 발현의 변화, 미토콘드리아의 막전위 변화를 살펴보았으며, 이후 遠志의 세포고사 방어효과를 관찰하였다.

먼저 dopamine의 세포독성과 遠志의 dopamine 세포독성 방어효과를 살펴보고자 MTT assay를 이용하여 dopamine을 처리한 SH-SY5Y 세포의 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 농도, 시간 의존적으로 세포생존율이 감소하였으며(Fig. 1), SH-SY5Y 세포에 200 μM의 dopamine과 200 ㎍/ml의 遠志를 12시간 처리하여 세포생존율을 측정하였을 때 200 μM의 dopamine을 단독처리한 실험군에 비해 세포생존율이 30 % 정도 증가하였음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). 또한 dopamine에 의한 세포사멸과정이 다양한 신호전달기전을 통하여 세포고사를 유도한다고 알려져 있다. 최근 세포고사를 유도하는 신호전달기전으로 중요성이 제기되고 있는 caspase protease family는 염증반응 및 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 현재 14종류가 알려져 있다. 그 중 caspase-3 protease는 caspase cascade의 하위단계에 위치하여 상위단계에 위치한 caspase-8과 caspase-9의 활성신호가 합류하는 효소로서 손상된 DNA 회복에 관련된 단백질인 PARP를 절단하여 세포고사를 유도한다[17-18]. 또한 cytochrome c는 정상적으로는 미토콘드리아의 내 외막 사이에 존재하여 전자전달자 역할을 수행하며, 세포고사 당시 세포질로 방출되어 Apaf-1, procaspase-9과 결합하여 caspase-9 protease를 활성화시키고 단계적으로 caspase 계열을 활성화시킨다[20-21].

본 연구에서는 dopamine에 의한 SH-SY5Y 세포사멸에 세포고사가 유도됨을 알아보기 위해 200 μM의 dopamine을 12시간 단독 처리한 SH-SY5Y 세포에 핵 염색을 시행하여 형광현미경으

로 관찰한 결과, 세포고사의 형태학적 특징인 염색사 응축 및 핵 분절현상을 확인하였다(Fig. 3B). 이후 200 μM의 dopamine과 함께 200 ㎍/ml의 遠志를 처리한 후의 핵 염색을 시행한 결과 염색사 응축 및 핵 분절현상이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 3C).

이 결과로 dopamine에 의한 SH-SY5Y 세포의 사멸과정이 세포고사를 매개로 이루어지며, 遠志가 dopamine에 의한 SH-SY5Y 세포사멸을 어느 정도 방어하고 있음을 관찰했다. 또한 세포고사와 관련된 caspase protease family들의 활성과 PARP의 절단 여부를 확인하였고, 이후 遠志의 dopamine 세포독성 방어효과를 관찰하였다. Dopamine을 단독 처리한 SH-SY5Y 세포에서 caspase-3과 caspase-9이 활성을 보였으며, 특히 caspase-3 protease는 최고 5배의 활성을 보였다(Fig. 4, 5). 또한 caspase-3 protease 활성에 따른 PARP 절단을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 그리고 SH-SY5Y 세포에 dopamine과 遠志를 처리하여 caspase-3과 caspase-9 protease의 활성, PARP의 절단이 정상수준 가까이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6, 8). 세포고사 과정에서 미토콘드리아는 막전위에 변화를 일으켜 치명적인 손상을 받는다. Dopamine에 의한 미토콘드리아의 막전위 변화를 알아보고자, 200μM의 dopamine을 12시간 처리하고 Rhodamine 123으로 미토콘드리아를 염색하여 본 결과, 미토콘드리아의 막전위 변화를 관찰할 수 있었으며, dopamine과 遠志를 같이 처리하였을 때는 미토콘드리아 막전위의 변화가 거의 없음을 확인할 수 있었다(Fig. 13).

이 같은 실험결과를 종합해 보면, 도파민 유도성 SH-SY5Y 세포의 사멸과정에 dopamine의 산화작용으로 인한 활성산소종의 생성이 주요한 세포고사 기전으로 작용하였으며, 遠志가 도파민 유도성 SH-SY5Y 세포의 사멸을 감소시키는 것으로 보여지므로, 파킨슨병과 같은 신경퇴행성질환에 보다 유용한 효과를 보여주리라 본다. 그러므로 遠志의 구체적인 작용기전에 관한 더 깊고 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

Dopamine 유도성 SH-SY5Y 세포독성에서 遠志의 방어효과에 관한 연구를 수행한 결과 다음과 같은 유의한 결론을 얻었다. Dopamine은 SH-SY5Y 세포에서 농도, 시간 의존적으로 세포독성을 나타내었으며, dopamine과 遠志를 같이 처리한 결과 SH-SY5Y 세포의 세포생존율이 30 % 증가하였다. Dopamine을 처리한 SH-SY5Y 세포에서 세포고사의 형태학적 특징 중 하나인 염색사 응축, 핵 분절현상이 관찰되어 세포고사 현상임을 확인하였고 이후 dopamine과 遠志를 같이 처리한 결과 세포고사가 억제되는 것을 관찰하였다. Dopamine은 SH-SY5Y 세포에 caspase-3와 caspase-9 protease를 활성화시켰으며, 특히 caspase-3 protease의 경우 최고 5배의 높은 활성을 보였다. SH-SY5Y 세포에 dopamine과 遠志를 같이 처리한 경우, caspase-3와 caspase-9 protease의 활성이 정상세포 수준 가까이 감소되는 것을 관찰하였다. Caspase-3 protease의 활성에 따른 PARP의 절단, 세포사멸 촉진 단백질 Bak의 발현 증가를 확인하였으며, dopamine과 遠志를 같이 처리한 결과, 정상세포 수준 가까이 회복되는 것을 관찰하였다. Dopamine은 SH-SY5Y 세포독성 유발과정에 ROS를 생성하였으며, dopamine과 遠志를 같이 처리한 결과 유의하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. Dopamine은 SH-SY5Y 세포에 미토콘드리아 막전위 변화를 유도하였으며, dopamine과 遠志를 같이 처리한 결과 미토콘드리아의 막전위 변화가 전체적으로 정상세포 수준으로 회복되었다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 遠志가 도파민 유도성 SH-SY5Y 세포의 사멸을 감소시키는 것으로 보여 향후 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 뇌질환 치료를 위한 구체적인 임상연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. Marsden CD. Neuromelanin and Parkinson's disease. J Neural Transm 19:121-141, 1983.
2. 王琦 外 : 黃帝內經素問今釋, 서울, 成輔社, pp.439, 1983.
3. 張璐 : 張氏醫通, 上海科學技術出版社, pp.291-292, 294, 296, 297, 1990.
4. 조금탁 : 中醫症狀鑑別診斷學, 北京, 人民衛生出版社, pp.32-33, 94-95, 134-135, 200-201, 1984.
5. 金德坤 : 加味鉤藤飮의 抗痙攣作用에 관한 實驗的 硏究, 大韓韓醫學會誌, 14(1), pp.24-30, 1993.
6. 金在亨 : 淸心溫膽湯이 白鼠의 抗痙攣, 解熱 鎭痛, 鎭痙 및 GABA-nergic system에 미치는 影響, 東醫神經精神科學會誌, 8(1), pp.95-109, 1997.
7. 朴快煥 : 天麻水鍼이 抗痙攣效果에 미치는 影響, 慶熙大韓醫大論文集, 11(1), pp.15-35, 1988.
8. 徐美榮 : 葛根水鍼의 抗痙攣, 鎭痛作用에 미치는 影響, 大韓針灸學會誌, 10(1), pp.315-338, 1992.
9. 申明燮 : 釣鉤藤水鍼이 鎭痛, 抗痙攣 및 鎭靜作用에 미치는 영향, 大田大學校 大學院, 1995.
10. 康秉秀 외 : 本草學, 서울, 永林社, pp.302-303, 496-497, 523-524, 531-533, 1995.
11. 辛民敎 : 原色臨床本草學, 서울, 永林社, pp.166-167, 250-251, 370-371, 374-375, 1991.
12. 李商仁 외 : 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.151-153, 308-313, 419-420, 426-428, 1990.
13. 黃始榮 : 遠志에 의한 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制效果에 관한 연구, 圓光大學校 大學院, 1998.
14. 朴大圭 : 遠志 Saponin의 利尿效果 및 中樞抑制 작용에 관한 연구, 成均館大學校 大學院, 1982.
15. Junn E, Mouradian MM. Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and

caspases. J Neurochem ;78(2):374-383, 2001 Jul.

16. Junn E, Mouradian MM. Human alpha-synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. Neurosci Lett ;8;320(3):146-150, 2002 Mar.
17. Lazebnik YA. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature, 371:346-347, 1994.
18. Wang ZQ. Mice lacking ADPRT and poly ADP-ribosylation develop normally but are susceptable to skin disease. Genes Dev 9:509-520, 1995.
19. Yamaguchi H, Wang HG. Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome c release independent of interacting with Bax or BimEL. J Biol Chem;26; [epub ahead of print], 2002.
20. Degenhardt K, Chen G, Lindsten T, White E. BAX and BAK mediate p53-independent suppression of tumorigenesis. Cancer Cell ;2(3):193, 2002.
21. Kitamura Y, Kosaka T, Kakimura JI, Matsuoka Y, Kohno Y, Nomura Y, Taniguchi T. Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Mol Pharmacol ;54(6):1046-1054, 1998.
22. Madigan JP, Chotkowski HL, Glaser RL. DNA double-strand break-induced phosphorylation of Drosophila histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis. Nucleic Acids Res ;1;30(17):3698-3705, 2002.
23. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. J Biol Chem ;31;275(13):9390-9395, 2000.
24. 黃文東 : 實用中醫內科學, 上海科技, pp.424-425, 1985.
25. 黃義完 外 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp.77-78, 288-291, 1992.
26. 有賀槐三 : 內科診斷學, 高文社, pp.373-376, 1980.
27. 송창원 外 : Hemiballism 1예, 대한신경과학회지, 9(1), pp.114, 1991.
28. 王肯堂 : 六科證治準繩, 서울, 大星文化社, pp.276, 280, 281, 282, 519, 1982.
29. 許俊 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.299, 1981.
30. 金定濟 : 診療要鑑, 서울, 東洋醫學研究院, pp.422, 1983.
31. 樓英 : 醫學綱目, 人民衛生出版社, pp.345, 351, 354, 357, pp.392-393, 1987.
32. 傅靑主.葉天士 : 傅靑主男女科.葉天士女科, 大星文化出版社, pp.133, 65, 1984.
33. 劑東垠 : 內科難治病的中醫治療, 人民軍醫出版社, 1994, pp.306-309, 1994.
34. 張介賓 : 景岳全書, 大星文化社, pp.196-198, 204, 242-243, 1988.
35. 巢元方 : 諸病源候論, 서울, 大星文化社, pp.221, 1992.
36. 劑當芳 : 中醫臨證手冊, 四川辭書, pp.197, 1988.
37. 康永祿 : 遠志와 石菖蒲의 單獨 및 混合投與가 白鼠의 腦損傷에 미치는 영향, 大田大學校 大學院, 1997.
38. 金鍾哲 : Hep G2 細胞에서 에탄올 細胞毒性의 IL-1α 分泌에 있어 遠志의 抑制效果, 圓光大學校 大學院, 1999