

## 알코올 투여에 의한 뇌세포 사멸과 이에 대한 천연자생물질의 보호효과

이도연, 김성수, 김경용, 이원복, 김대경<sup>1</sup>, 김경환, 정희연<sup>2</sup>, 이상형<sup>3</sup>  
중앙대학교 의과대학 해부학교실, <sup>1</sup>중앙대학교 약학대학 환경위생약학교실,  
<sup>2</sup>서울대학교 의과대학 보라매병원 신경정신과학교실,  
<sup>3</sup>서울대학교 의과대학 보라매병원 신경외과학교실

**간추림** : 알코올은 학습, 기억, 인지 기능 및 사고, 판단을 관장하고 있는 뇌의 신경계 이상을 유발시켜 다양한 장애와 질병을 초래한다고 알려져 있다. 다양한 기관이나 세포 형태에서 알코올의 독성에 대해서는 보고된 바 있으나, 신경세포에 대한 자세한 기작이나 영향에 대해서는 현재까지 명확히 규명된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 사람의 콜린성 신경모세포종인 SK-N-SH에서 알코올에 의한 신경세포사멸의 여부 및 세포사멸기전을 밝히고자 하였으며, 여러 가지 세포 종류에서 항산화 효과 등의 생물학적 보호활성을 나타내는 것으로 알려져 있는 천연자생물질인 baicalein과 gramineus를 이용하여, 알코올 독성에 대한 보호효과 여부를 확인하였다. 알코올 및 두 baicalein과 gramineus등을 처리한 후 세포생존율 변화를 조사하였고, 세포사멸기전을 세포사멸조절자인 p53의 발현 변화와 사립체의 막전위차 변화를 관찰하였다. 그 결과 알코올은 세포사멸사(apoptosis) 양상의 신경세포사멸을 유발하고, p53 발현을 증가시켰으며, 사립체의 막전위차가 붕괴되었다. p53을 저해한 경우 알코올에 의한 신경세포사멸이 저해되었고, 사립체의 막전위차가 유지됨을 확인할 수 있었는데, 이는 p53이 알코올에 의한 신경세포사멸 과정을 매개하고 더불어 사립체의 막전위차를 조절하고 있음을 시사하는 결과이다. 또한 자생식물의 보호효과기전을 규명하고자 baicalein과 gramineus를 전 처리 한 후 알코올에 의한 영향을 확인한 결과, baicalein에 의해서 p53 발현 증가가 의미 있게 감소하였고, 사립체의 막전위차가 유지되었으며, 알코올에 의해 증가한 caspase 활성을 저해시킴으로서, 궁극적으로 세포생존율을 증가시켰다. 반면 gramineus는 어떠한 보호효과도 나타내지 못하였다. 본 실험의 결과는 baicalein이 알코올에 의해 증가된 p53의 발현을 효과적으로 감소시키고, 사립체의 기능을 보호하며, caspase 활성을 저해함으로써 신경세포의 보호효과를 나타낼 수 있음을 제시해주는 것이라 하겠다.

**찾아보기 낱말** : 알코올, 신경세포사멸, Baicalein, Gramineus, p53, Mitochondrial membrane potential (MMP), Caspase

### 서론

알코올 중독, 정신분열증, 다양한 신경 장애 등의 알코올성 질환의 발병률은 다른 질환에 비해서 매해 급격히 증가하고 있으며 (Charness 등 1989), 최근 국내경제상황 악화와 더불어 알코올 중독의 경우 그 정도가 더욱 심각해졌을 것으로 예측된다. 심

\*이 논문은 서울대학교병원 운영 서울특별시립 보라매병원의 2003년 공동연구비(연구번호: 03-2003-04)의 지원으로 이루어졌음.

교신저자: 이상형(서울대학교 의과대학 보라매병원 신경외과)  
전자우편: nslee@brm.co.kr

각한 알코올성 질환을 비롯한 알코올 독성은 행동, 운동장애를 비롯하여 기억 및 인지능력 상실에까지도 커다란 악영향을 끼치고 있다. 알코올로 인한 개인 및 사회적으로 심각한 문제성이 대두됨에 따라 알코올의 독성 효과와 치료책 마련에 대한 관심이 집중되어지고 다양한 시스템에서 연구보고들이 이루어져 왔으나, 알코올이 정확히 어떤 기작을 통하여 세포 독성을 유발 하는지에 대해서는 아직까지 명확하게 규명되어 있지 않다.

알코올의 독성에 관한 연구로는 알코올성 질환이 다른 질병들에 비해 특히 만성적이고 높은 재발을

을 나타냄이 보고 되었으며 (Tarter와 Edwards 1986, Annis 1991, Agosti 1994), 그러한 독성기전에 대한 연구로는 알코올에 의한 1) GABA-A 수용체의 활성화, 2) opioid 펩티드 및 도파민의 유리, 3) glutamate 수용체의 억제와 세로토닌계와의 상호작용 등을 매개하는 것으로 알려져 있다 (Koob 등 1998). 이에 따라 현재까지의 알코올 중독의 치료법으로는 도파민 D2 수용체 효현제인 bromocriptine과 길항제인 haloperidol, 세로토닌 흡수억제제인 fluoxetine과 5-HT2 수용체 길항제인 ritanserin, 그리고 opioid 수용체 길항제인 naltrexone 등만이 사용되고 있다 (Anton 1996). 더불어 알코올 중독 및 관련 질환은 그 원인과 기전이 현재까지 명확하게 규명되지 않았고 동일한 경과나 양상을 보이지 않으며, 효과적인 치료 방법이 없을 뿐 아니라 치료효과가 지속적이지 못하였다는 결과를 통해, 알코올 독성 기전을 밝혀내고 유효한 보호물질을 통해 보호기전을 규명하고자 하는 연구의 필요성과 중요성을 시사하는 연구보고도 있다 (성상경 1999). 그러므로 알코올의 독성에 대한 기작 연구와 보호물질의 검증은 새로운 치료 전략 수립을 위해 중요한 자료를 제공하게 될 것이다.

한편, 과잉반응, 집중력장애, 학습 및 기억장애, 운동 실조, IQ 저하 등의 임상증상과 관련하여 인지기능 및 사고, 판단을 관장하는 뇌의 신경세포에 대해서 알코올에 의한 신경세포의 사멸 및 신경의 퇴행성 변화 등이 동반된다는 연구보고가 있으며 (Hunt 1993, Sanna 등 1993, Jang 등 2002), in vivo 또는 in vitro에서 세포사멸사의 과정을 거친다는 결과와 (Charness 1993, Freund 1994), 세포사멸에 관여한다고 알려져 있는 세포 내의 다양한 유전자 및 단백질들이 알코올에 의해 유도된 신경 손상에 영향을 미칠 것으로 제시되고 있으나 (Wright와 Thompson 2002), 알코올의 신경독성의 원인 및 작용 기전에 대해서는 명확하게 규명되지 못하고 있다.

플라보노이드(flavonoids)는 많은 식물로부터 기원한 치료제들의 주요 성분 중 하나로 알려져 있으며, 효과적인 약물학적 활성을 가지는 물질로서 대부분의 식물에서 추출될 수 있다. 또한 플라보노이드는 항암효과, 항염증효과, 항박테리아성 및 항알러

지 효과 등을 포함한 다양한 생물학적 활성을 나타낸다고 보고가 된 바 있다 (Brown 1980, Middleton과 Kandaswami 1992, Duarte 등 1993). 최근에 그러한 플라보노이드의 신경계에 대한 보호효과에 관한 연구가 많이 진행되어지고 있으며, 보고에 의하면 산화적 스트레스에 의한 신경세포의 손상에 대해 과도하게 발생된 자유라디칼을 제거함으로써 효과적인 보호 작용을 나타낸다고 한다 (Chen 등 1999).

Baicalein은 플라보노이드를 포함하고 있는 천연 자생물질로서, 황금 (*Scutellaria baicalensis Georgi*)의 뿌리에서 추출되었으며, 이 식물은 항염증제 (anti-inflammatory drug)와 근육이완제 (smooth muscle relaxant)로 널리 사용되고 있는 물질이다. 또한 유효한 활성을 나타내는 4가지 성분으로 구성되어 있는데, baicalin, baicalein, wogonoside, wogonin 등이 그것이다. 이 중 baicalein (5, 6, 7-trihydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one)은 항산화효과가 있는 것으로 알려져 있으며 (Kimuya 등 1981, Hanasaki 등 1994, Gao 등 1995, Yoshino와 Murakami 1998), superoxide ( $O_2^-$ ),  $H_2O_2$ , hydroxyl radical과 같은 활성기산소종에 대한 포착효과를 연구한 보고도 있다 (Hamada 등 1993). 그리고 microsome과 mitochondria 내에서 iron에 의존적인 lipid peroxidation을 효과적으로 저해할 수 있다는 보고와 (Miyahara 등 1993),  $H_2O_2$ 에 의한 세포 사멸 역시 baicalein에 의해 효과적으로 저해되었으며 (Shaw 등 1995), 활성기산소종에 의한 손상에 대한 baicalein의 보호효과가 iron chelator (deferoxamine), hydroxyl radical scavenger, lipid peroxidase quenching agent ( $\alpha$ -tocopherol), xanthine oxidase inhibitor (allopurinol) 등의 물질에 비해 현저하게 뛰어난 효과가 보고 되었다 (Gao 등 1998).

Gramineus는 석창포 (*Acorus gramineus Soland*)라고 하는 천남성과에 속하는 다년생 초본에서 추출되었으며, 이는 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 아시아 등지에서 자생하고 있는 식물이다. 한방에서 주로 강장, 강정, 신경통, 중풍, 이뇨, 식욕부진, 고혈압, 피로회복제 등에 유용한 약재로서 오랫동안 이용되어 왔으며, 최근 진정 및 흥분 완화작용, 항산화 및 지질개선효과, 신경세포손상의 보호효과 등에 대

한 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다(Cho 등 2001, 2002, Koo 등 2003). 그러나 baicalein이나 gramineus와 같은 자생물질의 신경보호효과에 대해서 보고 된 연구는 아직까지 매우 미흡한 단계이며, 특히 알코올에 의한 독성 시스템에서는 보호효과에 관한 연구는 거의 진행되어 있지 않다.

본 연구에서는 사람의 콜린성 신경모세포종인 SK-N-SH 세포를 이용하여, 알코올에 의한 세포자멸사 양상의 신경세포자멸이 유발됨을 관찰하였고, 알코올에 의한 구체적인 신경독성 기전을 규명하기 위하여, 세포 내 중요한 신호전달경로를 조절하고 있는 전사인자인 p53 발현 변화, 사립체의 기능 변화, caspase 활성정도 등 여러 가지 인자들의 변화를 알아보았다. 더불어 유효한 천연자생물질인 baicalein과 gramineus의 신경보호효과 여부를 검증하고, 알코올의 독성 기전 중 어떠한 단계에서 영향을 미치는지 그들의 보호 작용 기전을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

사람 신경모세포종(neuroblastoma cell)인 SK-N-SH 세포를 PEI-coated 96칸의 배양 접시에 MTT reduction assay를 위해서는 40,000 cells/well의 밀도로 깔아준다. SK-N-SH 세포는 DMEM에 10% FBS (fetal bovine serum)를 보충한 배양액으로 배양한다. 실험하기 2시간 전에 낮은 농도의 혈청이 든 배양액(DMEM with 1% FBS)으로 바꾸어주고 알코올을 10, 20, 30, 40 mM로 처리하고, baicalein과 gramineus는 모두 12.5  $\mu$ M의 농도로 일정 시간동안 처리한다.

### 2. 세포 생존율 측정(MTT 방법)

MTT 방법은 기존에 보고 된 방법을 변형하여 시행하였다(Shearman 등 1994, Kaneko 등 1995). 배양된 세포에 알코올을 처리한 뒤 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한다. 48시간 후에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma) 용액을 최종농도가 0.5 mg/mL 농도가 되도록

각 well에 첨가한 후에 4시간 반 동안 더 배양하였다. MTT의 환원에 의해서 형성된 formazan precipitate를 용매(0.1 N HCl in absolute isopropanol)에 녹인 후에 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정한다. 각 시료의 값은 해당되는 용매만을 추가한 control값을 100%로 하고 0.9% Triton X-100에 의해 세포가 완전히 파괴되었을 때의 MTT 환원력 정도를 0%로 하여 상대적인 값으로 표시한다.

### 3. 핵 형태변화 측정 (Hoechst 33258 dye staining)

세포자멸사 과정 중의 세포 내의 핵 염색질의 형태변화는 DNA-binding fluorochrome bis-benzene (Hoechst 33258 dye)로 염색하여 관찰하였다.  $0.5 \sim 3.0 \times 10^6$  cell을 300  $\times$  g에서 10분간 원심 분리하여 모은 후 PBS로 세척하고, 세포를 50  $\mu$ L의 paraformaldehyde에 현탁한 후 상온에서 10분간 고정한다. 고정액을 제거하고 세포를 PBS로 세척한 후 16  $\mu$ g/mL의 bis-benzimide를 포함한 PBS 15  $\mu$ L를 넣음. 상온에서 15분간 방치한 후 10  $\mu$ L을 slide glass에 넣고 형광현미경 하에서 세포자멸사 과정 중의 핵 염색질의 변화를 관찰한다.

### 4. 사립체 막전위차 측정(TMRE staining)

사립체 막전위차는 형광 염색시료인 tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE, Molecular Probes)를 100 nM의 농도로 15분간 처리한다. 양성을 나타내는 TMRE는 사립체의 막전위차에 의해 사립체 막 안쪽으로 이동하고, 염색되는 형광 세기에 따라 막전위차가 정상적으로 유지가 되고 있는지 나타낸다. TMRE의 형광 세기는 Flouremetry를 이용하여 excitation 549 nm, emission 574 nm에서 측정한다. 형광 영상은 형광 현미경(Olympus IX70)을 이용하고 CCD 카메라를 이용하여 관찰한다.

### 5. Western blotting analysis

SK-N-SH 세포에서 p53의 발현 변화를 측정하

기 위해 60 mm 배양접시에서 배양한 세포 ( $2 \times 10^6$ )에 알코올을 일정 농도 처리하고 일정 시간 지난 후 RIPA buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 40 mM NaF, 5 mM EGTA, 0.2% SDS, 0.5% SDC, 0.2 mM PMSF)로 lysis한 후 Bio-Rad 단백질 정량 도구를 이용하여 bradford method로 정량하여 시료를 준비한다. 12% SDS-PAGE를 한 후 semi-transfer로 NC membrane에 옮겨 놓은 다음 5% skim milk로 전 처리 배양을 하여 비특이적인 항체 반응을 차단하였다. 1차 항체로서 anti-p53 antibody를 1 : 1,000 희석하여 사용하고, 2차 항체로서는 anti-rabbit polyclonal antibody를 이용하여 1 : 2,000 희석하여 붙인다. 이후 ECL kit로 X-ray film에 감광하여 결과를 분석한다.

## 6. Caspase의 활성 측정

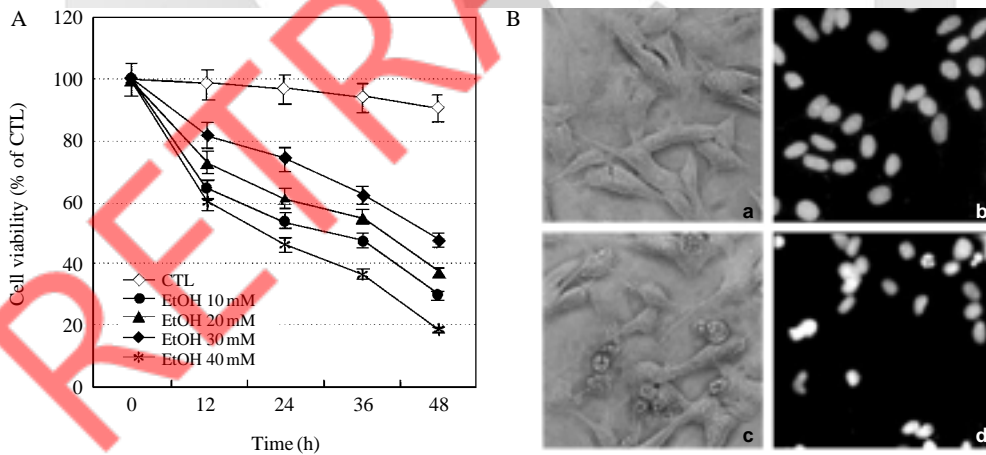
SK-N-SH 세포에서 caspase 활성을 측정하기 위해 60 mm 배양접시에서 배양한 세포 ( $2 \times 10^6$ )를 용해 완충제 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ , pH 7.4, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100,

10 mM NaF)로 용해시켜 얻은 세포 용해체 50  $\mu\text{L}$ 에 직접 pan caspase substrate인 0.25 mM zVAD-PNA를 HEPES buffer (40 mM HEPES, pH 7.5, 20% glycerol, 4 mM DTT)에서 1시간 실온 반응시킨 후 caspase에 의해 기질이 잘려서 생성되는 정도를 ELISA Reader (Molecular Devices)를 이용하여 405 nm 흡광도에서 측정하였다.

## 결 과

### 1. 알코올에 의해 유도되는 SK-N-SH 신경모세포종의 아포토시스 양상의 세포사멸유발

사람의 콜린성 신경모세포종 (Human Cholinergic neuroblastoma cell)인 SK-N-SH 세포에서 알코올에 의한 세포사멸을 관찰하기 위해서, 알코올을 처리하기 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였으며, 알코올에 의해 유발된 세포사멸은 MTT 방법을 이용하여 세포생존율을 측정하였

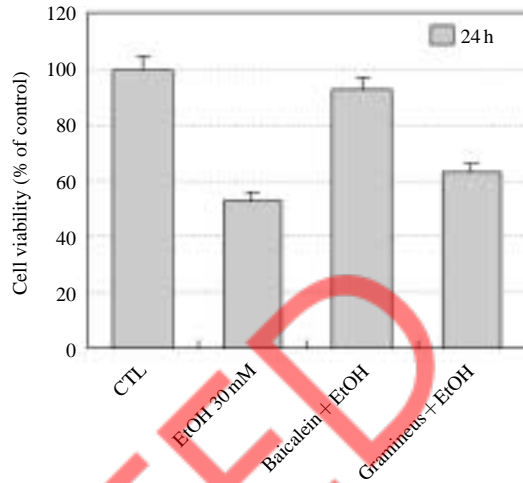


**Fig. 1.** Ethanol induces neuronal cell death in human neuroblastoma SK-N-SH cells. (A) Time- and dose-dependent change of cell viability by ethanol. SK-N-SH cells were pre-incubated in 1% FBS/DMEM for 2 hr and then treated with ethanol. Ethanol was dissolved in D.W. Cell viabilities of SK-N-SH cells were estimated using the MTT reduction assay at indicated time points (Materials and Methods). (B) Assessment of apoptosis by light microscopic morphology and Hoechst 33258 staining. Cells were visualized by phase contrast. SK-N-SH cells were either not treated (a, b) or treated (c, d) with 30 mM of ethanol for 24 hr. The figures show that light microscopic morphology (a, c) and Hoechst 33258 staining nuclear morphology (b, d). The figures are representative for three different experiments.

다. SK-N-SH 세포에다가 알코올(10, 20, 30, 40 mM)을 처리하였을 경우 시간 및 농도 의존적으로 세포사멸이 유발되었다(Fig.1A). 30 mM의 알코올 처리 후 24시간에 약 40% 이상의 세포사멸이 유도되는 것으로 나타났고, 48시간 후에는 약 75% 이상의 세포사멸이 유도되었다. 알코올에 의한 SK-N-SH 세포의 세포사멸양상을 규명하기 위해 세포의 외형적 변화와 핵 형태 변화를 Hoechst 33258염색을 통해 관찰하였다. 위상차현미경을 이용하여 세포 외형의 변화를 24시간에 관찰한 결과 30 mM ethanol을 처리한 경우 세포체의 응축, 분절, 신경돌기소실, 세포막수포현상 등의 전형적인 세포자멸사(apoptosis) 형태의 세포사멸을 나타내었다(Fig. 1B-a, c). 또한 Hoechst 33258 염색을 이용하여 SK-N-SH 세포의 핵 형태변화를 관찰한 결과 알코올 30 mM에 노출된 경우 대조군에 비해 심각한 핵 응축(condensation)과 분절(fragmentation)을 나타내었다(Fig. 1B-b, d).

## 2. Baicalein과 gramineus의 알코올에 의한 세포사멸에 대한 보호효과

한국자생물질인 baicalein과 gramineus의 알코올에 의해 유발된 세포사멸을 보호할 수 있는지 알아보기 위하여, 알코올을 처리하기 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 배지와 함께 12.5  $\mu$ M의 baicalein과 gramineus 추출물을 각각 전 처리 하였으며, 30 mM의 알코올을 24시간 처리한 후, MTT 방법을 이용하여 세포생존율의 변화를 측정하였다(Fig. 2). 30 mM의 알코올을 24시간 처리 후 약 45% 이상의 세포사멸이 유도되는 것으로 나타났으며, baicalein을 전 처리한 후 알코올을 처리한 군에서는 알코올만 단독으로 처리한 군에 비해 세포생존율이 40% 이상 높게 나타났다. 반면 baicalein와는 달리, gramineus 추출물을 전 처리한 후 알코올을 처리한 군의 세포생존율은 알코올만 단독으로 처리한 경우에 비해 약간의 세포생존율을 높이기 하였으나 의미 있는 수준의 변화는 아니었다. 또한 위상차현미경을 이용하여 세포의 형태학적 양상을 관찰한 결과, 30 mM의 알코올에 의해 유도되는 신경돌기의 손실 및 세

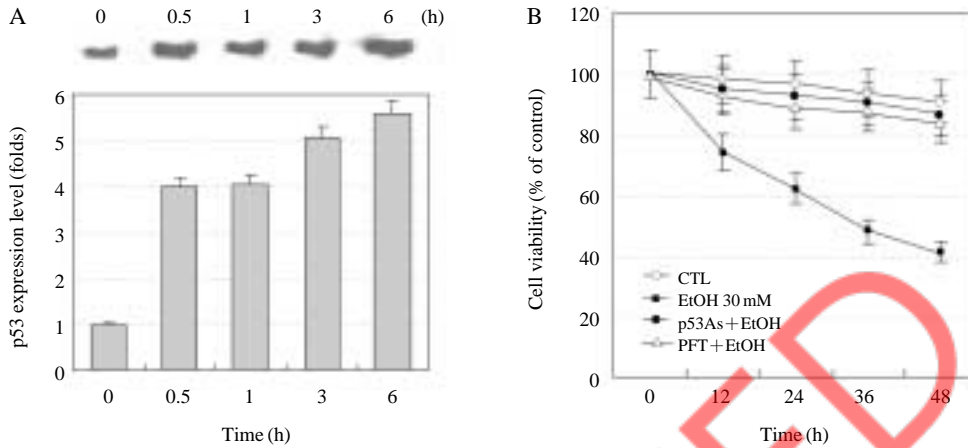


**Fig. 2.** The effects of baicalein or gramineus on ethanol-induced neuronal cell death. SK-N-SH cells were pre-treated with 12.5  $\mu$ M of baicalein, gramineus for 2 hr and then treated with 30 mM of EtOH. Cell viabilities were determined by MTT reduction assay at 24 hr after 30 mM of EtOH treatment. SK-N-SH cells were untreated (CTL) or treated with 30 mM of EtOH for 24 hr (EtOH 30 mM). Pretreatment of SK-N-SH cells with 12.5  $\mu$ M of baicalein (baicalein + EtOH 30 mM) or gramineus (gramineus + EtOH 30 mM) was treated with 30 mM of EtOH for 24 hr.

포막의 수포화와 같은 세포자멸사의 형태적 변화가 baicalein을 전 처리한 경우에는 효과적으로 감소하였으며, 반면 gramineus를 전 처리한 경우에는 세포자멸사 양상의 세포사멸에 대한 저해효과는 관찰하지 못하였다.

## 3. 알코올에 의한 신경세포사멸 과정에서 p53의 관련성

P53은 DNA 손상과 저산소증 그리고 핵산 결핍 등을 포함한 세포내 스트레스에 의해 일어나는 신호경로 과정 중에 나타나는 단백질로 먼저 알려졌으며 또한 세포 자가 사멸 과정에서 세포사멸을 유도하는 물질로 중요한 작용을 한다고 알려지고 있다(Cregon 등 1999). 따라서 알코올에 의해 유발된 세포사멸경로에서 그러한 p53이 관여하는지 확인하



**Fig. 3.** Involvement of p53 in ethanol-induced neuronal cell death. (A) Western blot analysis of p53 proteins in EtOH-treated SK-N-SH cells. SK-N-SH cells were untreated (vehicle; lane1) or treated with 30 mM of EtOH for 0.5 h (lane2), 1 h (lane3), 3 h (lane4) and 6 h (lane5). The levels of p53 protein are expressed as folds of relative value. The difference from the cells incubated with vehicle was statistically significant ( $P < 0.05$ ). (B) 30 mM of EtOH treatment for 24 hr induced 40% cell death. Pretreatment with p53 antisense oligonucleotides (p53As), PFT (inhibitor of p53) showed protective effects upon EtOH-induced neurotoxicity. The bars represent standard deviation.

기 위하여 p53 발현수준을 실험하였다. SK-N-SH 세포에 30 mM의 알코올을 처리한 후 p53 발현수준이 시간 의존적으로 현저하게 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig.3A). 또한 10  $\mu$ M의 p53 antisense oligonucleotides와 기능적인 저해제인 PFT- $\alpha$  (Pifithrin- $\alpha$ )를 1  $\mu$ M 전 처리한 경우 알코올에 의한 세포생존율을 25% 이상으로 높이는 효과적인 보호효과를 보였다. 이로서, 알코올로 인한 세포사멸과정에 p53의 중요하게 관여하는 것을 확인할 수 있었으며, p53 antisense oligonucleotides와 기능적인 저해제인 PFT- $\alpha$  (Pifithrin- $\alpha$ )으로 p53을 발현수준과 기능적으로 차단하였을 경우에 알코올에 의한 신경세포독성을 차단할 수 있었다.

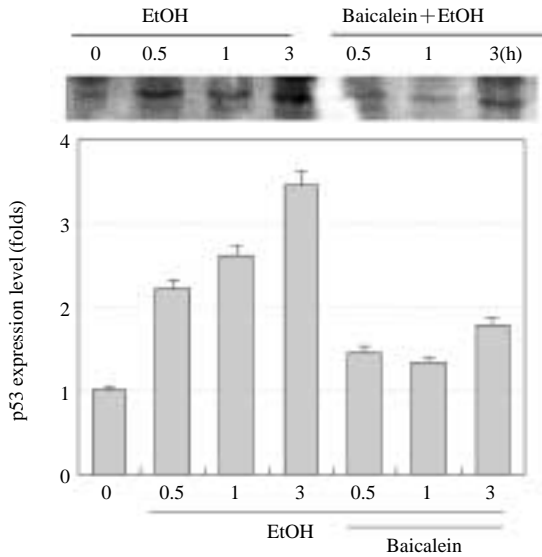
#### 4. 알코올에 의한 p53의 발현 증가에 대한 baicalein의 보호효과

이전 결과에서 알코올로 인한 세포사멸과정에 p53이 중요하게 관여하는 것을 확인하였으며, baicalein의 알코올의 독성에 대한 보호효과가 p53과 관련하는 것인지를 확인하기 위하여 앞선 실험과 마

찬가지로, SK-N-SH 세포에 30 mM의 알코올을 처리하기 2시간 전에 12.5  $\mu$ M의 baicalein을 처리한 후 시간대 별로 p53 발현수준의 변화를 관찰하였다(Fig. 4). 그 결과 알코올에 의해 현저하게 증가되었던 p53 단백질 발현 수준이 baicalein에 의해서 대조군 수준으로 감소됨을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험 결과로 baicalein의 알코올에 의한 신경세포독성에 대한 보호효과가 p53 단백질 발현을 조절함으로써, 그 하위 세포사멸경로를 차단하여 효과적으로 세포보호효과를 나타내는 것임을 알 수 있다.

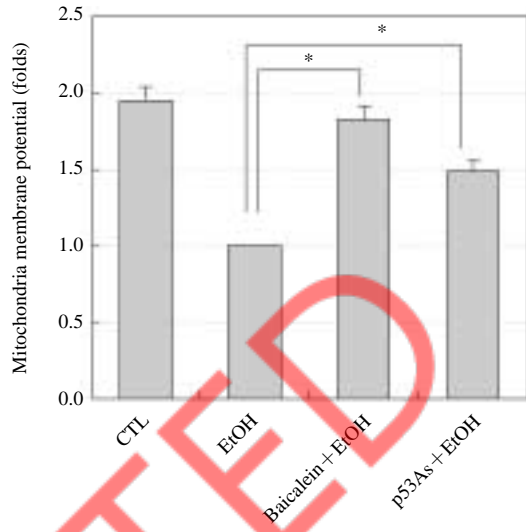
#### 5. 알코올에 의한 사립체의 막전위차 (mitochondrial membrane potential)의 변화와 이에 대한 baicalein의 영향

알코올에 의해서 사립체의 기능과 관련하여 막전위차의 변화가 있는지를 알아보기 위하여, 사립체에 특이적인 반응을 하는 형광염색시료인 TMRE를 이용하여 형광현미경으로 관찰하고, 형광의 발색정도를 Flouremetry를 이용하여 측정하였다. 그 결과 대조군에서는 사립체 막전위차가 정상적으로 유지



**Fig. 4.** The effects of baicalein on p53 expression level by ethanol. Western blot analysis of p53 proteins in EtOH or Baicalein-treated SK-N-SH cells. SK-N-SH cells were untreated (vehicle; lane1) or treated with 30 mM of EtOH for 0.5 h (lane2), 1 h (lane3), 3 h (lane4). Baicalein was pre-treated for 2 hr and 30 mM of EtOH was incubated with cell for 0.5 h (lane5), 1 h (lane6), 3 h (lane7). The levels of p53 protein are expressed as folds of relative value. The difference from the cells incubated with vehicle was statistically significant ( $P < 0.05$ ).

되고 있는 것을 관찰할 수 있었던 반면 SK-N-SH 세포에 30 mM의 알코올을 처리한 후 6시간의 경우 막전위차가 정상적으로 유지되지 못해 형광이 감소한 것으로 측정되었다 (Fig. 5). 그리고 p53 antisense oligonucleotides, 10  $\mu$ M과 기능적인 저해제인 PFT- $\alpha$  (Pifithrin- $\alpha$ ), 1  $\mu$ M을 2시간 전 처리한 경우 세포의 외형이나 사립체의 형체가 대부분 정상적이어서 알코올에 의해 무너진 막전위차가 거의 대조군과 가깝게 보호되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 알코올에 의한 세포 사멸 과정이 p53 단백질 발현 증가와 더불어 사립체의 막전위차가 붕괴되는 등의 기능저하를 통한 과정임을 확인하였으며, baicalein이 p53 단백질의 발현 조절을 거쳐 그 하위 기전인 사립체 막전위차 붕괴를 효과적으로 차단함으로써 알코올에 의한 신경세포의 손상을 보호하고 있는

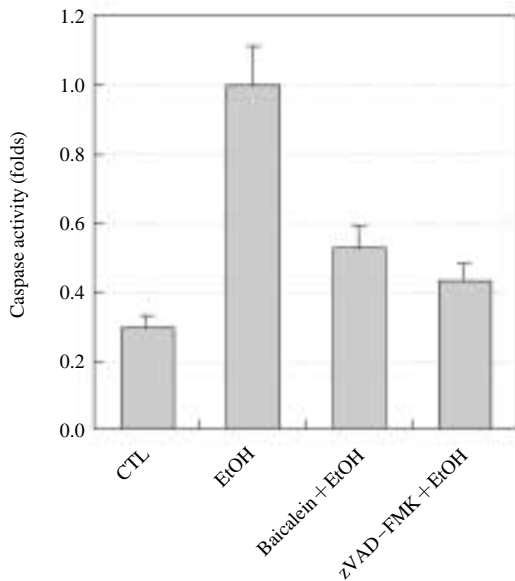


**Fig. 5.** The effects of mitochondrial membrane potential by pre-treated baicalein in ethanol treated SK-N-SH cells. SK-N-SH cells plated on glass coverslips were maintained for 6 hr at 37°C in either culture medium (CTL), medium containing 30 mM of EtOH (EtOH), or 30 mM of EtOH + 12.5  $\mu$ M baicalein (baicalein + EtOH) or 10  $\mu$ M p53 antisense oligonucleotides (p53AS + EtOH). Cells were then loaded with 100 nM TMRE to measure mitochondrial membrane potential (Materials and Methods).  $\Delta\Psi_m$  as TMRE fluorescence, was evaluated in SK-N-SH by fluorescence microscopy. Intensity of TMRE fluorescence was quantified with the NIH image program (ver. 1.56). Values are the mean and SD of three captured image in random fields. Fluorescent levels are expressed as folds of relative value.

것을 확인하였다.

## 6. 알코올에 의한 세포사멸에서 caspase와의 관련성 및 baicalein의 보호효과

세포사멸사의 하위 단계에서 사립체의 기능과 관련하여 활성화된다고 알려져 있으며, 더불어 세포사멸에 관여하는 중요한 인자인 caspase 활성화가 알코올에 의한 신경세포사멸과정에 관련되어 있는지를 알아보기 위하여, broad caspase substrate인 0.25 mM zVAD-PNA를 처리한 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 caspase에 의해 기질이 잘려서 생성되는 정도를 ELISA Reader를 이용하여 측정하였다. 30



**Fig. 6.** The effects of baicalein on ethanol induced caspase activation. Relative caspase activity levels was representative for bar. Pretreatment either baicalein or zVAD-FMK (broad caspase inhibitor) was treated with 30 mM of EtOH for 9 hr. 20  $\mu$ g of cellular extracts incubated with 500  $\mu$ M Ac-zVAD-PNA, a substrate of broad caspase, in 100  $\mu$ L of total volume at 37°C for 1 hr. Caspase activity was measured with 405 nm using ELISA Reader. Enzymatic activity is expressed as folds of relative value. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. of three separate experiments. The difference from the cells incubated with vehicle was statistically significant ( $P < 0.05$ ).

mM의 알코올을 9시간 처리하였을 때, 활성화된 caspase가 대조군에 비하여 3.5배 이상 현저한 증가를 보였으며, broad caspase inhibitor인 zVAD-FMK를 10  $\mu$ M 농도로 전 처리 한 후 알코올을 처리한 경우에는 대조군 수준으로 caspase 활성도가 확연하게 저해되었다. 한편, baicalein이 이러한 단계에 영향을 미치는가를 확인하기 위하여, 알코올을 처리하기 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 배지와 함께 12.5  $\mu$ M의 baicalein을 전 처리 하였다. 그 결과 증가된 caspase의 활성화 정도가 50% 정도의 감소현상이 나타났다. 따라서 본 실험 결과는 알코올에 의해 유발되는 세포자멸사 과정에서 p53의 발현의 증가, 사립체 막전위차의 감소와 더불어 caspase의 활

성이 증가하고, baicalein이 그러한 p53 및 그 하위 단계의 세포자멸사 경로를 효과적으로 저해시킴으로서 신경세포보호효과를 나타낼 수 있음을 보여주는 결과라 하겠다.

## 고 찰

본 연구에서는 현재까지 명확하게 규명되어 있지 않은 알코올의 독성 기전을 밝히고, 그러한 독성 경로를 차단하여 보호효과를 나타낼 수 있는 물질에 대한 연구를 하고자 하였다.

한편, 신경세포사멸경로에 관여하는 여러 가지 요인 중에서도 p53은 DNA 손상과 저산소증 그리고 핵산 결핍 등을 포함한 세포 내 스트레스에 의해 일어나는 신호경로 과정 중에 나타나는 단백질로 먼저 알려져 왔으며 (Morrison 등 1996, Sakhi 등 1997, Cregon 등 1999), 세포 자가 사멸 과정에서 세포사멸을 유도하는 물질로 작용할 뿐 아니라, 다양한 기전에서 그 역할의 중요성이 부각되어져 왔다. 또한 최근에는 p53이 결핍된 쥐에서 허혈이나 흥분 독소로 인해 유도되는 신경세포 사멸이 억제 되었다고 보고 된 바 있으나 (Crumrine 등 1994, Morrison 등 1996, Wenzhen 등 2002), 이러한 것이 분자세포수준에서 연구된 바는 아직 미흡한 상황이며, 더욱이 알코올 독성과 관련하여 p53의 관련성 유무 및 발병 기작에 대해서는 알려진 바가 없다.

본 실험에서는 그러한 알코올의 여러 독성 가운데 알코올에 의한 기억, 학습, 인지 능력 장애와 관련하여, 사람의 콜린성 신경모세포종인 SK-N-SH 세포를 이용하여 알코올에 의한 독성기전과 그 경로를 알아보려고 하였으며, 이 과정에 있어서 타 연구에서 유효한 생물학적 활성이 검증된 바 있는 천연자생식물로부터 얻은 플라보노이드(flavonoids)계 추출물들인 baicalein과 genistein가 과연 보호효과를 나타낼 수 있는지도 확인해 보고자 하였다. 실험 결과, 알코올에 의해 콜린성 신경세포사멸이 유도되는 것을 확인하였으며, 그러한 세포사멸은 세포체의 응축(cell body shrinkage)과 핵 분절(nuclear fragmentation) 및 신경돌기 소실, 세포막수포현상

(membrane blebbing) 등의 전형적인 세포사멸사 양상을 나타내었다. 또한 알코올에 의해 유발되었던 신경세포사멸 과정에서 중요한 자가 사멸 조절인자인 p53의 관련성 및 역할을 규명하기 위하여, p53의 antisense oligonucleotide와 p53 단백질의 기능적인 억제제인 pifithrin을 처리함으로써 이러한 세포사멸에 영향을 미치는지, 그리고 그 이후 어떤 메커니즘을 통하여 궁극적으로 세포사멸로까지 진행되는지 알아보았다.

알코올에 의한 신경세포사멸이 유발되는 과정 중 비교적 초반 시간대에 p53 발현 수준이 대조군에 비해서 5배 이상 현저한 증가 양상을 관찰할 수 있었으며, 이로서 알코올 독성과정에서 p53의 관련성을 미루어 짐작할 수 있었다. 더불어 더욱 확실한 증거로서, p53 antisense oligonucleotide와 기능적인 합성물 억제제인 pifithrin을 전 처리한 후 알코올에 노출시켜 세포생존율을 관찰한 실험 결과, 알코올에 의한 세포사멸이 효과적으로 저해되었다. 이 두 가지 실험을 통하여 알코올 독성 기전 경로에 p53 단백질의 발현이 의미 있게 증가하고, 세포사멸의 중요한 매개자로서의 역할을 하고 있음을 알아낼 수 있었다. 이와 같이 p53이 아포토시스 양상의 세포사멸에서 의미 있는 역할을 한다는 것은 다른 팀의 연구 결과와도 일맥상통하는 결과이다 (Sakhi 등 1994, 1997, Wood와 Youle 1995). 따라서 본 알코올 독성 시스템에서 p53을 비가역적인 신경세포 손상의 지표로 삼을 수 있을 뿐 아니라, p53의 발현을 차단하거나 기능을 억제함으로써, 신경세포 보호 및 치료 전략의 목표가 될 수 있는 가능성을 제시하였다.

사립체의 막전위차 (mitochondrial membrane potential)는 산화적 인산화 과정을 통해 ATP를 형성하여 세포 내 에너지 대사를 담당하고 있는 사립체의 기능 유지에 필수적인 요인이다 (Waterhouse 등 2001). 만일 사립체 막전위차가 정상적으로 유지되지 않는다면, ATP 합성이 멈추게 되고, 이것은 곧 세포 사멸로 이어진다. 최근에 사립체 막전위차 붕괴에 의한 ATP 결핍은 세포 사멸로 이어진다는 연구 결과가 알려져 있다. 즉 사립체의 막전위차를 비롯한 사립체의 기능이 붕괴되게 되면, 사립체 내에 존재하고 있던 cytochrome c가 세포질로 방출이 되고, 방

출된 cytochrome c는 Apaf-1과 결합하여 caspase-9 및 caspase-3의 활성화를 유발함으로써, 일련의 세포사멸사 경로를 개시하게 되고, caspase cascade 등을 통해 세포사멸은 더욱 가속화하게 된다 (Li 등 1997, Deveraux 등 1998, Zou 등 1999, Cain 등 2000).

본 연구에서는 알코올에 의한 사립체의 기능 저하 여부를 규명하기 위하여, 사립체 막전위차의 변화를 확인하였으며, 더불어 알코올에 의한 p53의 하위 조절 경로로서 사립체의 막전위차가 관련성이 있는지에 대해서도 알아보았다. 그 결과, 알코올에 의해 세포의 주요한 에너지대사를 관장하는 사립체의 막전위차 감소에 따른 붕괴 현상 및 사립체의 하위단계 메커니즘으로 알려져 있는 caspase 활성이 크게 증가되는 것을 확인하였다. 또한 알코올에 의한 신경세포사멸 기전 중 p53과 막전위차의 관련성에 대해서는 p53의 발현 및 기능 저해를 하였을 때, 사립체의 막전위차의 붕괴 현상이 차단되는 결과를 관찰함으로써, p53에 의해 사립체의 기능이 조절 받고 있음을 제시해 주는 결과를 얻을 수 있었다.

한편, 알코올 독성에 대해 자생식물의 보호효과를 확인해보기 위하여 전 처리한 baicalein의 경우, 알코올에 의한 감소된 세포생존율을 큰 차이로 증가시켰다. 반면, gramineus에 의한 보호효과는 유효하지 못함을 확인할 수 있었다. 따라서 알코올 독성에 관련하여 baicalein만이 고유한 보호효과를 나타내는 독자적인 잠재력을 가지고 있음을 발견할 수 있었으며, 그러한 보호기전을 규명하기 위하여, 알코올 독성에 의해 개시되었던 p53의 발현과 사립체의 기능 저하, caspase의 활성화 단계에서 baicalein에 의한 영향을 살펴보았다. 그 결과 baicalein은 p53의 발현 수준을 현저하게 낮춤으로서, 그로 인해 감소되었던 사립체의 막전위차를 정상상태와 비슷한 수준으로 회복시켰으며, 더불어 caspase의 활성화를 효과적으로 낮추는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통하여 알코올에 의한 p53 발현에 따른 사립체 기능 저하를 baicalein이 효과적으로 조절하여 기능 보호를 할 수 있음을 제시하며, 나아가 콜린성 신경세포의 손상을 억제하며, 신경세포를 보호하고 있음을 알 수 있었다.

그러나, *gramineus*의 경우에 있어서는 *baicalein*과 다르게, 알코올 독성에 대해서 유효한 보호효과를 확인하지 못하였는데, 몇 가지 그 원인을 고려해 볼 수 있겠다. 먼저, *gramineus*의 효능이 신경세포 시스템에서는 제대로 발휘되지 못하였을 것이라 생각할 수 있겠다. 항염증제, 항암제 등의 효과가 알려진 것을 볼 때 (Cho 등 2001, 2002, Koo 등 2003), 혈구세포나 심장 등 기타 조직 및 세포에 대해서는 그 효과가 충분히 나타낼 수도 있을 것으로 생각된다. 둘째, *gramineus*의 효능을 나타내기 위해 농도가 적합하지 않았거나, 알코올에 의한 세포사멸에 대해서는 무효한 물질임을 생각해 볼 수 있겠다.

이상의 결과로 다양한 알코올성 질환과 관련하여, 알코올 독성에 의한 신경세포사멸 기작의 중요한 지표로서, p53 및 사립체 막전위차와 하위의 caspase와의 관련성을 제시할 수 있었으며, 나아가 알코올성 질환의 예방과 치료제로서, *baicalein*이라는 천연 자생식물의 신경보호측면의 탁월한 효능에 대해서도 제시하였다. 구체적으로 *baicalein*의 어떠한 성분과 구조 등이 p53, 사립체, caspase 등의 조절인자들의 작용기전에 대하여 보호효과를 나타내는지 등에 관하여서는 본 실험만으로는 미흡하며, 앞으로 유용한 첨단 장비와 실험 방법을 이용하여 *baicalein*의 여러 가지 성분조사 및 관련 물질 조사 등을 통한 정확한 분자적 기작을 밝히는 심도 있는 연구가 필요할 것이라고 생각된다. 또한 앞으로 *baicalein*의 구체적인 보호기전 경로를 규명하기 위해서 *bcl-2*나 *bcl-x1*와의 관련성을 확인해 볼 예정이며, 세포의 생존과 사멸을 조절하는 다양한 전사인자나 MAPK 등의 세포생존의 측면에서 연구할 계획이다. 일반적으로 사립체는 *bcl-2* family와 밀접한 연관성에 의해 기능이 조절 되는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 *bax*나 *bak*와 같은 세포사멸사 촉진 단백질은 사립체 외막에 큰 구멍을 만들고, cytochrome c와 같은 세포사멸사와 관련된 인자들을 세포질로 방출되도록 하며 (Green과 Reed 1998, Antonsson 등 2000, Desagher와 Martinou 2000, Saito 등 2000). 반면 *bcl-x1*은 cytochrome c와 복합체를 형성함으로써 cytochrome c가 사립체 내막에 붙어있는 능력을 높여준다고 보고 된 바 있다 (Kharbanda 1997, Skula-

chev 1998)다.

아마도, 본 시스템에서도 알코올에 의해 p53의 발현 증가가 유발되고, 그 이후에 사립체의 기능을 조절하는 것으로 알려진 *bax*나 *bak*의 발현을 증가시켜 사립체의 막전위차의 감소와 같은 사립체 붕괴 현상을 유도하는 것으로 예상된다. 이전 보고에서도 p53이 *bax*의 발현을 높이고, 반대로 *bcl-2*의 발현을 감소시켰다는 결과가 알려져 있으며 (Haldar 등 1994, Miyashita 등 1994), p53은 세포사멸을 유발하는 단백질로 알려져 있는 *bax* 유전자의 발현을 조절하며 (Miyashita 등 1994, 1995, Zhan 등 1994), 세포사멸이 유발된 PC12 세포에서는 p53과 *bax*의 발현이 지속적으로 증가하였다는 결과가 발표된 바 있다 (Blum 1997). 그리고 *baicalein*의 사립체 막전위차의 감소나 caspase의 활성화를 차단하는 세포보호기전도 *bcl-2*, *bcl-x1*의 작용을 증가시킴으로서, p53과 사립체 기능을 조절을 통해 나타난 것으로 생각된다.

이상으로 *baicalein*은 알코올 독성에 관련하는 여러 알코올성 질환을 비롯한 다양한 신경독성에 대해서 효과적인 세포보호효과를 나타낼 수 있는 훌륭한 물질로 개발될 수 있으리라 사료되며, 나아가 세포사멸경로라는 기초적인 정보제공 뿐 아니라 *baicalein*의 방어 기전을 연구, 응용한다면, 알코올성 질환의 발병이나 증상을 지연시키거나 차단하는 치료 전략 구축에도 커다란 기여를 할 수 있을 것으로 기대되는 바이다.

## 참 고 문 헌

- 성상경 : 알코올중독의 약물치료. 생물정신의학 6 : 41-48, 1999.
- Agosti V : The efficacy of controlled trials of alcohol misuse treatments in maintaining abstinence : a meta-analysis. Int J Addict 29 : 759-769, 1994.
- Annis HM : A cognitive-social learning approach to relapse : pharmacotherapy and relapse prevention counselling. Alcohol 1 : 527-530, 1991.
- Anton RF : Neurobehavioural basis for the pharmacotherapy of alcoholism: current and future directions. Alcohol 1 :

- 43-53, 1996.
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC : Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 15 : 271-278, 2000.
- Brown JP : A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthroquinones and related compounds. *Mutat Res* 75 : 243-277, 1980.
- Blum D, Wu Y, Nissou MF, Arnaud S, Alim-Louis-Benabid, Verna JM : p53 and Bax activation in 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Res* 751 : 139-142, 1997.
- Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM : Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 275 : 6067-6070, 2000.
- Charness ME, Simon RP, DA Greenberg : Ethanol and the nervous system, *N Engl J Med* 321 : 442-454, 1989.
- Charness ME : Brain lesions in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 17 : 2-11, 1993.
- Chen C, Wei T, Gao Z, Zhao B, Hou J, Xu H, Xin W, Packer L : Different effects of the constituents of EGb761 on apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals. *Biochem Mol Biol Int* 47 : 397-405, 1999.
- Cho J, Kong JY, Jeong DY, Lee KD, Lee DU, Kang BS : NMDA receptor-mediated neuroprotection by essential oils from the rhizomes of *Acorus gramineus*. *Life Sci* 68 : 1567-1573, 2001.
- Cho J, Kim YH, Kong JY, Yang CH, Park CG : Protection of cultured rat cortical neurons from excitotoxicity by asarone, a major essential oil component in the rhizomes of *Acorus gramineus*. *Life Sci* 71 : 591-599, 2002.
- Cregon SP, MacLaurin JG, Graig CG : Bax-dependent caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19 : 7860-7869, 1999.
- Crumrine RC, Thomas AL, Morgan PF : Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Meta* 14 : 887-891, 1994.
- Desagher S, Martinou JC : Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10 : 369-377, 2000.
- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC : IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17 : 2215-2223, 1998.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jimenez J, Tanargo J : Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 239 : 1-7, 1993.
- Freund G : Apoptosis and gene expression : perspectives on alcohol-induced brain damage. *Alcohol* 11 : 385-387, 1994.
- Gao D, Sakurai K, Chen J, Ogiso T : Protection by baicalein against ascorbic acid-induced lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 90 : 103-115, 1995.
- Gao D, Tawa R, Masaki H, Okano Y, Sakurai H : Protective effects of baicalein against reactive oxygen species. *Chem Pharm Bull* 46 : 1383-1387, 1998.
- Green DR, Reed JC : Mitochondria and apoptosis. *Science* 281 : 1309-1312, 1998.
- Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM : Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 54 : 2095-2097, 1994.
- Hamada H, Hiramatsu M, Edamatsu R, Mori A : Free radical scavenging action of baicalein. *Arch Biochem Biophys* 306 : 261-266, 1993.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S : The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 16 : 845-850, 1994.
- Hunt WA : Are binge drinkers more at risk of developing brain damage? *Alcohol* 10 : 559-561, 1993.
- Jang MH, Shin MC, Jung SB, Lee TH, Bahn GH, Kwon YK, Kim EH, Kim CJ : Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport* 27 : 1509-1513, 2002.
- Kaneko I, Yamada N, Sakuraba Y, Kamenosono M, Tutumi S : Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of beta-amyloid, and its derivative racemized at Ser residue. *J Neurochem* 65 : 2585-2593, 1995.
- Kharbanda S, Pandey P, Schofield L, Israels S, Roncinske R, Yoshida K, Bharti A, Yuan ZM, Saxena S, Weichselbaum R, Nalin C, Kufe D : Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 24 : 6939-6942, 1997.
- Kimuya Y, Kubo M, Tani T, Arichi S, Okuda H : Studies on

- Scutellariae Radix. IV. Effects on lipid peroxidation in rat liver. *Chem Pharm Bull* 29 : 2610–2617, 1981.
- Koo BS, Park KS, Ha JH, Park JH, Lim JC, Lee DU : Inhibitory effects of the fragrance inhalation of essential oil from *Acorus gramineus* on central nervous system. *Biol Pharm Bull* 26 : 978–982, 2003.
- Koob GF, Roberts AJ, Schulteis G, Parsons LH, Heyser CJ, Hyytia P, Merlo-Pich E, Weiss F : Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 22 : 3–9, 1998.
- Li F, Srinivasan A, Wang Y, Armstrong RC, Tomaselli KJ, Fritz LC : Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J Biol Chem* 272 : 30299–30305, 1997.
- Middleton E, Kandaswami C : Effects of flavonoids on immune and inflammatory function. *Biochem Pharmacol* 43 : 1167–1179, 1992.
- Miyahara M, Ohtaka H, Katayama H, Tatsumi Y, Miyaichi Y, Tomimori T : Structure-activity relationship of flavonoids in suppressing rat liver lipid peroxidation. *Yakugaku Zasshi* 113 : 133–154, 1993.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC : Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9 : 1799–1805, 1994.
- Miyashita T, Reed JC : Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80 : 293–299, 1995.
- Morrison, RS, Wenzel HJ, Kinoshita Y : Loss of the p53 tumor suppressor gene protects neurons from kainate-induced cell death. *J Neurosci* 16 : 1337–1345, 1996.
- Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH : BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2 : 553–555, 2000.
- Sakhi S, Bruce A, Sun N, Tocco G, Baudry M, Schreiber SS : p53 induction is associated with neuronal damage in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 91 : 7525–7529, 1994.
- Sakhi S, Bruce A, Sun N : Induction of tumor suppressor p53 and DNA fragmentation in organotypic hippocampal cultures following excitotoxin treatment. *Exp Neurol* 145 : 81–88, 1997.
- Sanna E, Serra M, Cossu A, Colombo G, Follesa P, Cuccheddu T, Concas A, Biggio G : Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABA<sub>A</sub> and NMDA receptor function in the rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 17 : 115–123, 1993.
- Shaw S, Naegeli P, Etter JD, Weidmann P : Role of intracellular signalling pathways in hydrogen peroxide-induced injury to rat glomerular mesangial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22 : 924–933, 1995.
- Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL : Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci* 15 : 1470–1474, 1994.
- Skulachev VP : Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* 27 : 275–280, 1998.
- Tarter RE, Edwards KL : Multifactorial etiology of neuropsychological impairment in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 10 : 128–135, 1986.
- Waterhouse NJ, Goldstein JC, von Ahnen O, Schuler M, Newmeyer DD, Green DR : Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol* 153 : 319–328, 2001.
- Wenzhen Duan, Xiaoxiang Zhu, Bruce Ladenheim, Qian-sheng Yu, Zhihong Guo, Jon Oyler, Roy G Cutler, Jean Lud Cadet, Nigel H Greig, Mark P Mattson : p53 inhibitors Preserve Dopamine Neurons and Motor Function in Experimental Parkinsonism. *Ann Neurol* 52 : 597–606, 2002.
- Wright NR, Thompson C : Withdrawal from alcohol using monitored alcohol consumption : a case report. *Alcohol* 37 : 344–346, 2002.
- Wood KA, Youle RJ : The role of free radicals and p53 in neuron apoptosis in vivo. *J Neurosci* 15 : 5851–5857, 1995.
- Yoshino M, Murakami K : Interaction of iron with polyphenolic compounds : application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 257 : 40–44, 1998.
- Zhan Q, Fan S, Bae I, Guillouf C, Liebermann DA, O'Connor PM, Fornace AJ : Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 9 : 3743–3751, 1994.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X : An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274 : 11549–11556, 1999.

Abstract

## Studies on Signal Transduction Mechanism of Alcohol-induced Neuronal Cell Death and Protective Effect

Do-Yeon Lee, Sung-Su Kim, Kyung-Yong Kim, Won-Bok Lee, Dae-Kyong Kim<sup>1</sup>,  
Kyung-Hwan Kim, Hee-Youn Jung<sup>2</sup>, Sang-Hyung Lee<sup>3</sup>

*Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University,*

<sup>1</sup>*Department of Environmental and Health Chemistry, College of Pharmacy,  
Chung-Ang University,*

<sup>2</sup>*Department of Neuropsychiatry, College of Medicine, Seoul National University,  
Seoul Municipal Boramae Hospital*

<sup>3</sup>*Department of Neurosurgery, College of Medicine, Seoul National University,  
Seoul Municipal Boramae Hospital*

Excessive use of alcohol is a serious problem in our society and induces various, severe alcohol related diseases. The cytotoxicities of ethanol are still largely unknown. We studied the molecular mechanisms of EtOH-induced SK-N-SH neuronal cell death and protective effects of baicalein and gramineus against EtOH-induced cytotoxicities. In our results, the cell death by EtOH showed morphologic features of apoptosis like as membrane blebbing, nuclear condensation and fragmentation. Furthermore, pretreated baicalein attenuated EtOH-induced neuronal cell death effectively. EtOH increased expression levels of p53 and both p53 antisense oligonucleotide and Pifithrin protected the cell death against EtOH. Also, EtOH induced mitochondrial event, collapse of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and caspase cascade as a downstream of mitochondria. Interestingly, baicalein decreased expression levels of p53 and inhibited collapse of mitochondrial membrane potential. These results suggest that baicalein reduces mitochondrial dysfunction induced by EtOH through down-regulation of p53 expression levels. Also, baicalein attenuated activation of caspase, which was triggered by mitochondrial malfunction. But gramineus didn't have any protective effect. These results imply that baicalein significantly protects EtOH-induced neuronal cell death through regulating p53, mitochondrial dysfunction and caspase activation.

**Key words :** Ethanol, Neuronal cell death, Baicalein, Gramineus, p53, Mitochondrial membrane potential (MMP), Caspase