

수종 생약이 일차배양한 계배의 뇌세포에 미치는 영향

박 미 정 · 송 진 호 · 김 영 중

서울대학교 약학대학

Studies on the Effect of Several Crude Drugs on Cultured Chicken Brain Cells

Mi Jung Park, Jin Ho Song and Young Choong Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

Abstract—Effects of *Lycium chinensis*, *Epimedium koreanum* and tuguaconitine which is isolated from *Aconitum sibiricum* on primary cultured chicken embryonic brain cells were studied by microscopic observation and determination of the activity of pyruvate dehydrogenase complex(PDHC). Brain cells were prepared from the brain of 10-day-old chicken embryo and cultured with a medium consisted of 90% Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) and 10% horse serum. It was observed that all substances studied seemed to show the tendency to stimulate the neurite outgrowth of brain cells which were cultured with a deficient medium under microscopic observation. The activity of PDHC in brain cells cultured with a deficient medium was increased by *Lycium chinensis* and *Epimedium koreanum*. However, tuguaconitine had not influence on the activity of PDHC.

Keywords—*Lycium chinensis* • *Epimedium koreanum* • *Aconitum sibiricum* • tuguaconitine • chicken embryo • brain cell culture • pyruvate dehydrogenase complex

천연물로부터 신약을 개발하려는 최근의 움직임과 더불어 한약이 새롭게 조명되고 있다. 한약은 수천년 동안 축적된 임상적인 경험을 토대로 질병의 예방이나 치료수단으로 동양에서 사용되어 왔다. 이에 대한 현대 과학적 수단을 이용한 체계적인 연구가 요청되고 있다. 한약의 과학화는 실제로 여러가지 어려움이 수반되는데 무엇보다도 한약은 생약제 전체를 사용하기 때문에 그 속에 수 많은 성분을 함유하고 있으며, 또한 이러한 많은 성분들의 상호작용까지 고려한다면 어느 성분이 실제 약효 성분인지를 규명하기가 대단히 어렵기 때문이다. 기존의 생약연구는 최근에 고도로 발달된 분석기기등의 출현으로 생약으로부터 새로운 물질의 추출, 분리, 구조 결정 등의 일련의 화학적 분석에 치중된

경향이 있다. 이는 우선 생약의 약효 규명에 이용할 적절한 실험방법의 선택이 어렵고, 또한 생약에서 분리한 순수 성분의 양이 미량이어서 실험동물을 사용하여서는 그 약리작용의 규명이 어렵기 때문인 것이다.

이에 본 연구에서는 생약의 약리작용 규명에 세포 수준에서 짧은 시간내에 다른 장기나 기관의 영향을 배제한 상태에서 미량으로 생리활성 물질의 작용을 규명할 수 있는 일차세포배양법(Primary cell culture method)을 도입하여 보았다. 이 방법을 이용한 생약의 약효검색을 위한 연구의 일환으로 강장제로 쓰이는 생약 중에서 구기자(*Lycium chinensis* Miller) 및 음양곽(*Epimedium koreanum* Nakai)의 메탄올추출물, 그리고 노랑투구꽃(*Aconitum sibiricum* Poiret)에

서 분리한 diterpene alkaloid인 tuguaconitine이 뇌세포에 미치는 영향을 알아보았다. 즉, 계배의 뇌로부터 직접 뇌세포를 분리하여 배양하면서 강장제로 쓰이는 생약 및 성분이 미치는 영향을 현미경 관찰과 동시에 신경세포의 성장에 밀접한 관계가 있는 PDHC(Pyruvate dehydrogenase complex)의 활성을 측정 관찰하였다.

실험재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에서 사용한 구기자와 음양곽은 한약 재료상에서 약용으로 시판하는 것을 구입하였고 tuguaconitine은 한국과학기술연구소의 이형규 박사로부터 기증받았다. 계배(chicken embryo)는 일령 10일 된 것을 초원농장(서울, 내곡동)에서 구입하였다. 조직배양에 필요한 시약은 Grand Island Biological Company (GIBCO, U.S.A.) 제품을, 기타 시약은 Sigma Chemical Company와 일본의 Kanto, Shiny의 특급시약을 사용하였다.

구기자 및 음양곽의 총 메탄올 추출물 제조—구기자와 음양곽을 각각 메탄올로 추출하고 그 추출물을 감압농축 후, 동결건조하여 분말을 얻었다.

계배추출물(chicken embryo extract)의 제조¹⁾ 일령이 10일된 계배를 적출하여 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 세척한 후, 주사기를 이용하여 원심분리관 속에 압출하고, 동량의 HBSS로 희석하였다. 실온에서 30분간 방치한 후, 4°C에서 18,000 rpm으로 25분간 원심분리하여서 그 상등액을 취하여 사용하였다.

일차세포배양법에 의한 계배의 뇌세포 및 척수세포의 배양—일령이 10일된 계배에서 뇌를 적출한 후 결합조직을 제거하고 0.15% trypsin으로 조직을 연화시켰다. 이것을 collagen을 입힌(5 µg/cm²) 배양용기(Linbro dish, 35×10 mm: Green T.C., 녹십자, 100×20 mm)에 뇌세포가 7×10⁵ cell/ml 배양액이 되도록 이식하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 90%, 말혈청 10%, penicillin 10,000 IU/100ml, streptomycin 1,000µg/100 ml과 Am-

photericin B 500µg/100 ml으로 구성된 배양액을 사용하였다. 세포의 배양은 일정한 습도를 유지하는 37° 배양기에서 산소(95%)와 CO₂(5%)의 혼합기체를 계속 공급시키면서 수행하였다.

생약의 투여

구기자 추출물, 음양곽 추출물, tuguaconitine은 각각 증류수에 녹여서 (1 mg/ml) millipore membrane (0.22 µm, Millex-GV, U.S.A)를 사용하여 멸균하였다.

단백질의 정량²⁾

배양한 세포의 단백질 함량은 Lowry 방법에 의하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

PDHC의 정량³⁾

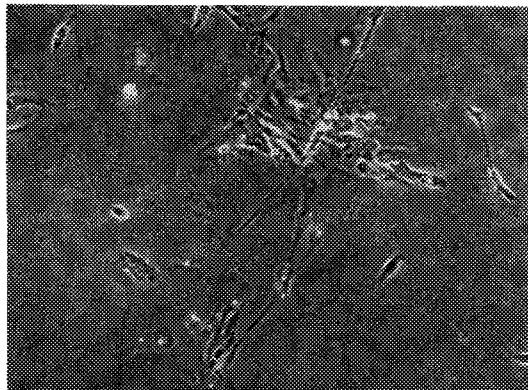
PDHC의 활성은 PDHC가 환원시킨 NADH의 양을 측정하여 정량하였다. 균질화된 세포에 2.5 mM NAD, 0.2 mM thiamin pyrophosphate, 0.1 mM coenzyme A, 0.3 mM dithiothreitol, 5 mM pyruvate, 1 mM magnesium chloride, 1 mg/ml의 bovine serum albumin, 0.6 mM p-iodonitrotetrazolium, 0.1 mg/ml lipoamide dehydrogenase, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100이 함유된 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.8) 용액의 반응시약을 1분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험결과 및 고찰

생체에 미치는 생리활성 물질의 영향은 정상 상태보다는 비정상 상태에서 효과가 더 뚜렷이 나타날 것이므로 계배의 뇌세포를 비정상 상태로 배양하면서 강장, 강정제로 쓰이는 구기자의 효과를 알아보았다(Fig. 1). 구기자는 PDHC 활성을 증가시켰으며(Table I) 뇌세포의 신경축색 돌기 생성을 촉진시켰다(Table II). 이는 구기자가 혈당 감소작용이 있다는 보고⁴⁾와 일치하는 결과로 볼 수 있으며 PDHC 활성을 증가시켜 뇌의 당이용율을 높여준다고 할 수 있겠다. 특히, PDHC는 insulin에 의하여 활성화되는 효소로써⁵⁻⁷⁾ 당뇨병과도 밀접한 관계를 가지고 있으므로 구기자에 의한 PDHC 활성증가는 주목



a. Brain cells cultured in the absence of substance.



b. Brain cells cultured in the presence of 30 µg/ml methanol extract of *Lycium chinensis*.

Fig. 1. The effect of *Lycium chinensis* on the growth of chicken embryonic brain cells with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 4 days ($\times 200$).

Table I. The effect of methanol extract of *Lycium chinensis* on the activity of PDHC in chicken embryonic brain cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 4 days

Concentration of methanol extract	Activity of PDHC	
	Specific activity (nmol/min/mg protein)	Relative activity (%)
0	40.53 \pm 2.83	100
10	48.86 \pm 2.77	121
20	61.59 \pm 4.23	152
30	71.72 \pm 5.42	177
50	52.42 \pm 3.09	129
70	51.45 \pm 1.34	127
100	53.20 \pm 6.30	132

Table II. The effect of methanol extract of *Lycium chinensis* on the number of chicken embryonic brain cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 24 hours

Concentration of methanol extract of (μ g/ml)	Number of brain cells with neurite outgrowth
0	20.33 \pm 4.51
10	25.44 \pm 5.83
20	33.43 \pm 7.63
30	108.06 \pm 2.21
50	87.40 \pm 7.93
70	77.54 \pm 9.61
100	89.17 \pm 7.63

Table III. The effect of methanol extract of *Epimedium koreanum* on the activity of PDHC in chicken embryonic brain cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 4 days

Concentration of methanol extract (μ g/ml)	Activity of PDHC	
	Specific activity (nmol/min/mg protein)	Relative activity (%)
0	40.53 \pm 2.83	100
10	53.87 \pm 3.22	133
20	70.54 \pm 4.10	174
30	63.65 \pm 5.50	157
50	46.75 \pm 4.44	115
70	49.02 \pm 4.15	121
100	31.70 \pm 5.03	78

Table IV. The effect of methanol extract of *Epimedium koreanum* on the number of chicken embryonic brain cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 24 hours

Concentration of methanol extract of (μ g/ml)	Number of brain cells with neurite outgrowth
0	20.33 \pm 4.51
10	31.77 \pm 9.61
20	36.88 \pm 4.39
30	43.22 \pm 2.21
50	39.40 \pm 9.61
70	22.70 \pm 5.84
100	6.37 \pm 2.21

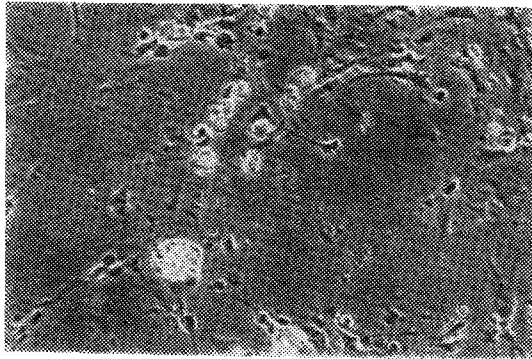


Fig. 2. The effect of *Epimedium koreanum* on the growth of chicken embryonic brain cells with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 4 days ($\times 200$).

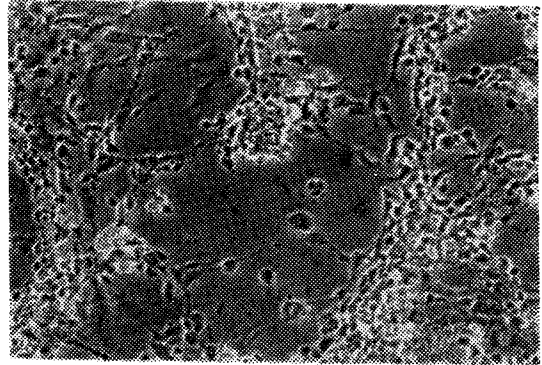


Fig. 3. The effect of tuguaconitine on the growth of chicken embryonic brain cells with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 4 days ($\times 200$).

Table V. The effect of tuguaconitine on the number of chicken embryonic brain cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 24 hours

Concentration of tuguaconitine ($\mu\text{g/ml}$)	Number of brain cells with neurite out-growth
0	20.33 \pm 4.51
0.1	34.33 \pm 10.11
1.0	118.24 \pm 17.50
5.0	132.24 \pm 5.84
10.0	126.80 \pm 13.80
50.0	289.88 \pm 30.46

Table VI. The effect of tuguaconitine on the activity of PDHC in chicken embryonic brain cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 4 days

Concentration of tuguaconitine ($\mu\text{g/ml}$)	Activity of PDHC	
	Specific activity (nmol/min/mg protein)	Relative activity (%)
0	40.53 \pm 2.83	100
0.1	39.02 \pm 4.48	96
1.0	37.39 \pm 2.10	92
5.0	34.60 \pm 6.40	85
10.0	37.66 \pm 6.30	92
50.0	36.08 \pm 4.79	89

할만한 결과라 하겠다.

신경성 강장제로 사용되는 음양곽의 생리활성

을 규명하기 위하여 음양곽의 총메탄올 추출물이 제배의 뇌세포에 미치는 효과를 현미경 관찰과 함께 PDHC 활성을 측정하여 알아보았다(Fig. 2). 음양곽의 경우 구기자와는 달리 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지는 PDHC 활성을 증가시키는 경향을 보였으나 그 이상의 농도에서는 활성이 점차 감소하다가 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 오히려 활성을 저해하였다(Table III). 이러한 결과는 현미경 관찰에서도 확인되었다(Table IV).

Tuguaconitine은 최근 노랑투구꽃에서 분리된 신물질⁸⁾로 그 약리 작용에 대한 연구보고는 없으나 diterpene alkaloid로써 골격이 유사한 aconitine은 sodium channel에 작용한다는 보고가 있으며 lycoctonine은 choline성 신경전달에 관여한다는 보고가 있다.⁹⁾ 본 연구에서 비정상상태로 유도배양한 뇌세포에 대하여 tuguaconitine 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 결과 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 신경축색돌기를 생성하는 신경세포의 수가 크게 증가하였다(Fig. 3, Table V). 그러나 PDHC의 활성에는 별다른 영향을 미치지 않았다(Table VI). 따라서 tuguaconitine의 중추신경세포 성장촉진 작용은 PDHC의 활성 증가와는 직접적인 관련이 없다고 하겠다.

최근 연구에서 신경질환인 Leigh disease¹⁰⁻¹¹⁾, Huntington disease¹²⁾ Alzheimer's disease¹²⁻¹³⁾, Friedreich ataxia¹⁴⁻¹⁵⁾등에서 PDHC 활성이 감소된다는 보고가 있다. 본 연구 결과 비정상상

태로 유도배양된 뇌세포에 대한 구기자, 음양곽의 PDHC활성증가 효과는 이러한 신경질환의 예방이나 치료에 이들 생약의 사용 가능성을 부여한다 하겠다.

결 론

1. 구기자 총 메탄올 추출물은 비정상상태로 유도배양된 뇌세포의 PDHC 활성을 증가시켰으며 신경축색돌기 생성을 촉진시켰다.

2. 음양곽 총 메탄올 추출물은 비정상상태로 유도배양된 뇌세포에서 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 PDHC 활성을 증가시키는 경향을 보였으나 그 이상의 농도에서는 점차 활성을 감소시켰으며 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 오히려 활성을 저해하였다.

3. Tuguaconitine은 비정상상태로 유도배양된 뇌세포의 신경축색돌기 생성을 촉진시켰으나 PDHC활성에는 별다른 영향을 미치지 않았다.

감사의 말씀—본 연구에 소요된 경비의 일부는 한국과학재단의 연구비로 충당되었으며 이 연구비 지원에 대하여 깊이 감사하는 바이다.

<1988년 12월 30일 접수 : 1989년 2월 28일 수리>

문 헌

- White, P.R., The Cultivation of Animal and Plant Cells, The Ronald Press Company, New York, p.66 (1963).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Rondall, R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265i (1964).
- Hinman, L.M. and Blass, J.P.: *J. Biol. Chem.* **256**, 13, 6583 (1981).
- King, L.P., Shih, Y.K. and Li, T.P.: *Compt. Rend. Soc. Biol.* **123**, 1155 (1936).
- Macaulay, S.L. and Jarett, L.: *Arch. Biochem. Biophys.* **237**, 1, 142 (1985).
- Seals, J.R. and Jarett, L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **77**, 77 (1980).
- Kiechle, F.L., Jarett, L. Kotagal, N. and Popp, D.A.: *J. Biol. Chem.* **256**, 2945 (1981).
- Chung, B.S. and Lee, H.K.: *J. Nat. Prod.* **49**, 6, 1074 (1986).
- PellecTier, S.W.: Alkaloids; Chemical and Biological Perspectives, John Wiley & Sons. Inc., Vol. 1, 153 (1983).
- Sandro, S. and John, P.B.: *Neurology* **32**, 555 (1982).
- Hans, A.K., Stephen, J.D., Thomas, K.K., Mulchand, S.P., Christopher, J.L.N., Kathleen, A.S. and Seymour, P.: *Pediatrics* **79**, 370 (1987).
- Sandro, S., Edward, D.B. and John, P.B., *Ann. Neurol.* **13**, 72 (1983).
- Kwan, F.R.S., Young, T.K., John, P.B. and Marc, E.W., *Ann. Neurol.* **17**, 444 (1985).
- Kark, R.A.P. and Rodriguez-Budelli, *Neurol.* **29**, 126 (1979).
- Kar, R.A.P., Blass, J.P. and Engel, W.K.: *Neurol.* **24**, 964 (1974).