

## 일차 배양한 흰쥐 대뇌피질세포의 흥분성 및 산화적 신경세포손상에 대한 소전재조환의 억제효과

조 정 숙<sup>#</sup>

동국대학교 의과대학

(Received October 20, 2003; Revised November 7, 2003)

## Inhibitory Effects of Xiaoshuan Zaizao Wan on Excitotoxic and Oxidative Neuronal Damage Induced in Primary Cultured Rat Cortical Cells

Jungsook Cho<sup>#</sup>

College of Medicine, Dongguk University, Gyeongju, Gyeongbuk 780-714, Korea

**Abstract** — Xiaoshuan Zaizao Wan (XZW) has been used in China to improve hemiplegia, deviation of eye and mouth, and dysphasia due to cerebral thrombosis. To characterize pharmacological actions of XZW, we evaluated its effects on neuronal cell damage induced in primary cultured rat cortical cells by various oxidative insults, glutamate or N-methyl-D-aspartate (NMDA), and  $\beta$ -amyloid fragment ( $A_{\beta(25-35)}$ ). XZW was found to inhibit the oxidative neuronal damage induced by  $H_2O_2$ , xanthine/xanthine oxidase, or  $Fe^{2+}$ /ascorbic acid. It also attenuated the excitotoxic damage induced by glutamate or NMDA. The NMDA-induced neurotoxicity was more effectively inhibited than the glutamate-induced toxicity. In addition, we found that XZW protected neurons against the  $A_{\beta(25-35)}$ -induced toxicity. Moreover, XZW exhibited dramatic inhibition of lipid peroxidation in rat brain homogenates and mild 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. Taken together, these results demonstrate that XZW exerts neuroprotective effects against oxidative, excitotoxic, or  $A_{\beta(25-35)}$ -induced neuronal damage. These findings may provide pharmacological basis for its clinical usage treating the sequelae caused by cerebral thrombosis. Furthermore, XZW may exert beneficial effects on Alzheimer's disease and other oxidative stress-related neurodegenerative disorders.

**Keywords** □ xiaoshuan zaizao wan, neuroprotection, cortical neurons, oxidative damage, excitotoxicity,  $\beta$ -amyloid

소전재조환(消栓再造丸, Xiaoshuan Zaizao Wan)은 중국에서 판매되고 있는 갈색의 환제로서 단삼, 삼칠, 혈갈, 안식향, 소합향, 천궁, 인삼, 침향, 천마, 금전백화사 등을 주요 성분으로 함유하고 있다. 이 제제는 혈행을 개선시켜 울혈을 제거하고, 질병의 원인이 되는 풍을 제거하며, 기운을 북돋워주고 혈액의 영양을 개선시킬 뿐만 아니라, 혈전을 제거하고, 혈액중의 지방을 감소시키는 다양한 약리작용이 있어, 반신불수, 눈과 입이 편향되는 증상, 실어증 등과 같은 뇌혈전증으로 인한 후유증을 주 적응증으로 하여 사용되고 있다.

뇌혈전에 의해 산소 및 포도당의 공급이 감소하게 되면 다양한 기전에 의해 신경세포에 치명적인 손상이 유발된다. 이 때, 중추신경계에서 연결가소성, 학습 및 기억 등에 관여하는 흥분성

신경전달물질인 glutamate가 비정상적으로 다량 유리됨은 잘 알려진 사실이다.<sup>1)</sup> 과다 유리된 glutamate는 수용체를 지속적으로 자극하여 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 증가시키고, 여러 가지 효소를 활성화시킴으로서 단백질, 지질, DNA 등에 손상을 유발하여 흥분성 신경세포 독성을 초래하는 일련의 과정을 유도한다.<sup>2,3)</sup> 이 과정에서 생성되는 nitric oxide(NO)와 반응성 산소종은 자유 라디칼을 형성하여 신경세포의 손상을 가속화시킨다.<sup>4,5)</sup> 또한, 재관류에 의해 뇌로 산소가 다시 공급될 경우에도 신경세포는 반응성 산소종 및 라디칼의 증가에 따른 산화적 스트레스에 처하게 되며, 이에 의해 치명적 손상을 받게 된다고 한다.<sup>6)</sup> 이에 근거하여 많은 과학자들은 흥분성 독성 및 산화적 손상을 억제할 수 있는 약물이 뇌혈전에서 야기되는 신경세포 손상을 차단할 수 있을 것으로 믿고 효과적인 약물개발을 위해 활발한 노력을 기울이고 있다.<sup>2,3,6)</sup>

한편, Alzheimer's disease(AD)에서 발생하는 신경퇴행과정 에 있어서는  $\beta$ -amyloid( $A_{\beta}$ )가 매우 중요한 병인으로 작용하는

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 054-770-2419 (팩스) 054-770-2447  
(E-mail) jscho@dongguk.ac.kr

것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup> A $\beta$ 에 의한 신경세포손상 유발 기전은 명확히 밝혀지지는 않았으나, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 NO와 같은 반응성 산소종의 증가에 따른 산화적 스트레스와 연관이 있을 것으로 믿고 있다.<sup>8)</sup> 실제로 AD 환자의 뇌에서는 현저한 지질 과산화 및 단백질 산화 등이 관찰되어, 과도한 산화적 스트레스가 뇌졸중과 같은 급성 신경질환에서 뿐만 아니라 AD와 같은 만성 퇴행성 신경질환에서도 신경세포손상에 관여함을 뒷받침해 주고 있다.<sup>9)</sup>

본 연구에서는 소전재조환이 뇌혈전에 의한 후유증 치료에 사용되고 있는 점에 착안하여, 이 제제의 흥분성 신경독성 및 산화적 독성에 대한 작용을 일차배양한 대뇌피질 신경세포를 이용하여 연구하였다. 또한, 이 제제의 약리작용을 추가로 규명하기 위하여 배양한 세포에서 활성형  $\beta$ -amyloid 조각인 A $\beta_{(25-35)}$ 로 처리하여 유발되는 신경세포독성에 대한 영향을 연구하였으며, DPPH 라디칼 소거 및 지질과산화에 대한 작용을 측정하여 항산화작용을 평가하였다.

## 실험방법

### 실험재료

임신된 Sprague-Dawley(SD) 흰쥐와 웅성 SD 흰쥐는 대한실험동물로부터 구입하였으며, minimum essential media(MEM, with Earle's salt), fetal bovine serum(FBS) 및 horse serum(HS)은 Gibco BRL(Gaithersburg, USA)로부터, laminin, poly-L-lysine, glucose, L-glutamine, glutamate, N-methyl-D-aspartate(NMDA), cytosine arabinoside, lactate dehydrogenase(LDH) assay kit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), xanthine, xanthine oxidase 및 2-thiobarbituric acid(TBA)는 Sigma(St. Louis, USA)로부터 구입하였다.  $\beta$ -Amyloid 조각(25-35) (A $\beta_{(25-35)}$ )는 Bachem(Merseyside, UK)으로부터 구입하였고, 소전재조환은 북경동인당제약사(중국)에서 제조한 제품을 사용하였다. 세포배양 용기는 Falcon(Franklin Lakes, USA)에서 구입하였으며, 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

### 흰쥐 대뇌피질세포의 일차배양

임신 16~18일된 SD 흰쥐의 태자에서 얻은 대뇌피질세포의 배양은 Cho 등<sup>10,11)</sup>의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 대뇌를 적출하여 피질 부분만을 분리하여 뇌막을 제거하고 잘게 자른 후 5% FBS, 5% HS, 2 mM glutamine 및 25 mM glucose를 함유한 MEM(with Earle's salts)에서 알코올 램프로 미리 구멍의 크기를 순차적으로 작게 한 3개의 파스테르 피펫을 사용하여 단일 세포로 분리한 다음, 상기 배양액에 현탁시켜 poly-L-lysine과 laminin으로 미리 코팅해 놓은 24-well 배양용기에 well당 4~5×10<sup>5</sup>의 밀도로 이식하였다. 세포는 95% 공기/5% CO<sub>2</sub>를 유지

하면서 37°C 배양기에서 배양하였으며 주당 2회 배양액의 일부를 교환하였다. 배양 1주 후 10  $\mu$ M cytosine arabinoside로 24~48시간 동안 처리하여 신경세포 이외의 세포 성장을 억제시켰으며,<sup>10)</sup> 10~14일간 배양 후 실험에 사용하였다.

### 배양세포에서 신경세포손상 유발 및 손상정도 측정

배양한 대뇌피질 세포에서 산화적 손상 유발 및 손상 정도의 측정은 Jung 등<sup>12)</sup> 및 Dok-Go 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 배양한 세포를 HEPES-controlled salt solution(HCSS, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 mM glucose, 20 mM HEPES, 10 mM NaOH)으로 세척한 후, 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 5분 동안 처리하거나 0.5 mM xanthine과 10 mU/ml xanthine oxidase로 10분 동안, 또는 100  $\mu$ M Fe<sup>2+</sup>와 25  $\mu$ M ascorbic acid로 2시간 동안 처리한 후 다시 HCSS로 세척하고 나서, 25 mM glucose를 함유한 MEM 배양액으로 교환한 다음 20~24시간 동안 95% 공기/5% CO<sub>2</sub>를 유지하면서 37°C에서 배양하였다. 세포의 손상 정도는 배양액으로 유리되는 LDH의 활성을 Cho 등<sup>14)</sup>의 방법에 의해 측정하여 평가하였으며, 위상차 현미경으로 세포의 형태학적 변화를 관찰하여 확인하였다. 이 때 사용된 손상유발 실험조건은 예비실험 결과를 근거로 설정하였다. 즉, 손상을 유발한 세포의 배양액에서 측정된 LDH 활성을 손상을 유발하지 않은 대조군 세포에서의 LDH 활성과 비교하였을 때, 신경세포 보호작용을 평가할 수 있을 정도의 세포손상이 유발되는 농도와 시간을 선택하여 사용하였다.

흥분성 신경세포손상은 논문에서 보고된 방법에 준하여 유발하였다.<sup>14,15)</sup> 즉, 배양한 대뇌피질세포를 HCSS로 세척한 다음, 100  $\mu$ M의 glutamate 또는 NMDA를 함유하는 Mg<sup>2+</sup>-free HCSS로 15분간 처리한 후, 25 mM glucose를 함유하는 MEM 배양액으로 교환하여 20~24시간 동안 95% 공기/5% CO<sub>2</sub>를 유지하면서 37°C에서 배양하였다. 세포손상 정도는 위에 기술한 바와 같이 배양액으로 유리되는 LDH 활성을 측정하여 평가하였으며, 위상차 현미경으로 관찰하여 확인하였다.<sup>14)</sup>

A $\beta$ 에 의한 신경세포손상은 40  $\mu$ M A $\beta_{(25-35)}$ 를 용해시킨 25 mM glucose를 함유하는 MEM 배양액으로 배양한 대뇌피질세포를 처리하고 37°C 배양기에서 95% 공기/5% CO<sub>2</sub>를 유지하면서 24시간 동안 배양하여 유발하였다. 세포손상 정도는 배양액으로 유리되는 LDH 활성을 측정하여 평가하였으며, 위상차 현미경으로 관찰하여 확인하였다.<sup>14)</sup>

각각의 실험조건으로 유발된 손상에 대한 소전재조환의 영향을 연구하기 위해서는 각 손상 유발시에 적정 농도의 약물을 동시에 적용하였다. 실험결과를 세포에 손상을 유발하였을 때의 LDH 활성을 기준으로 하여 시험약물로 처리하였을 때의 LDH 활성을 백분율로 계산하여 나타내었다. 시험약물은 소전재조환

을 유발에서 분쇄한 다음 일정량을 취하여 100 mg/ml의 농도로 DMSO에 용해시킨 다음, 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 대조군 세포는 생존율에 영향을 미치지 않음이 확인된 1% DMSO 용액으로 처리하였다.<sup>10)</sup>

**지질 과산화에 대한 작용**

용성 SD 흰쥐로부터 얻은 뇌 균질액에서 유발한 지질 과산화에 대한 작용은 Dok-Go 등<sup>13)</sup>의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 일정양의 뇌 균질액과 10 µM Fe<sup>2+</sup>, 100 µM ascorbic acid 및 적정농도의 시험약물을 함유하는 반응액을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, trichloroacetic acid와 TBA를 차례로 가하여 혼합하고 100°C에서 15분 동안 가열한 후, 원심분리하여 얻은 상등액의 흡광도를 VERSA<sub>max</sub> microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 532 nm에서 측정하였다. 시험약물에 의한 지질 과산화 억제율은 다음 식을 이용하여 계산하였다. 이 때 대조군은 약물을 용해시킨 용매만으로 처리한 경우이다. 실험결과는 1회 2군씩 3회 이상 반복하여 얻은 값으로부터 계산한 평균값±S.E.M.으로 나타내었다.

$$\text{억제율(\%)} = 100 \times (\text{대조군의 흡광도} - \text{약물 처리군의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도}$$

**DPPH 라디칼에 대한 작용**

DPPH 라디칼에 대한 작용은 Dok-Go 등<sup>13)</sup>의 방법을 약간 변형하여 시행하였다. 즉, 메탄올에 용해시킨 150 µM의 DPPH와 적정농도의 시험약물을 함유하는 반응액을 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 VERSA<sub>max</sub> microplate reader를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거율은 위의 식을 이용하여 계산하였다.

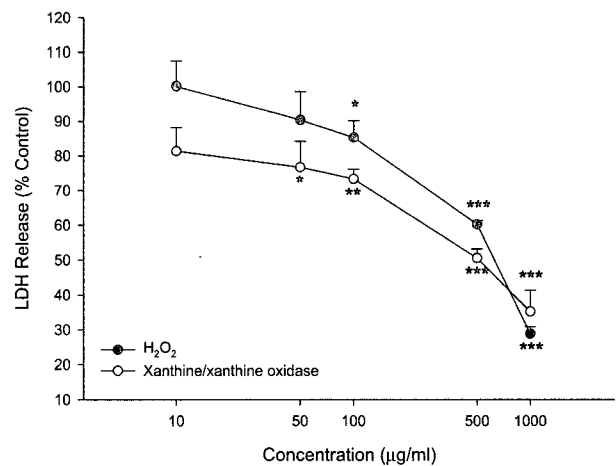
**통계 처리**

각 실험결과는 1회 2군씩 3회 이상 반복하여 측정된 값으로부터 계산한 평균값±S.E.M.으로 나타내었으며, two-tailed Student's t-test를 사용하여 대조군과의 유의성을 검정하였다.

**실험결과**

**배양한 대뇌피질세포에서 유발한 산화적 손상에 대한 작용**

배양한 흰쥐의 대뇌피질세포를 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 5분 동안 처리하고 20시간 동안 배양한 후 유발되는 손상을 배양액 중의 LDH 활성으로 측정된 결과, 용매인 1% DMSO로 처리한 세포에서의 LDH 활성보다 80% 정도 증가하여 현저한 세포손상이 유발되었음을 알 수 있었다. 마찬가지로, 배양한 세포를 0.5mM xanthine과 10 mU/ml xanthine oxidase로 10분 동안 처리하고

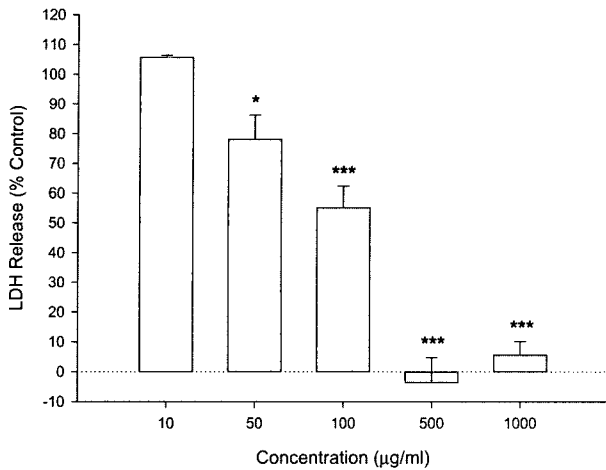


**Fig. 1** – Effects of Xiaoshuan Zaizao Wan on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- or xanthine/xanthine oxidase-induced oxidative damage in primary cultured rat cortical cells. Cultures were exposed to 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min, or 0.5 mM xanthine and 10 mU/ml xanthine oxidase for 10 min in the absence or presence of the indicated concentrations of Xiaoshuan Zaizao Wan, and maintained at 37°C in MEM supplemented with glucose. LDH activities released into the culture media were measured at 20~24 h after the exposure. Data are expressed as percentage of control LDH activity measured in the culture exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or xanthine/xanthine oxidase in the absence of the test sample. Each point represents the mean±S.E.M. from 6 measurements. (\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001 vs control).

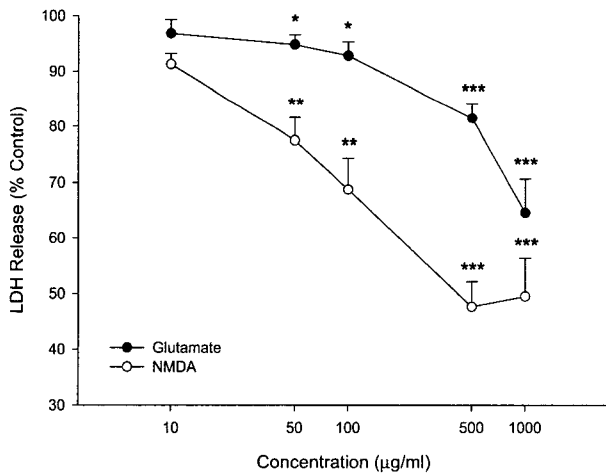
20시간 경과 후 측정된 LDH 활성도 대조군에 비해 70~80% 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같이 유발되는 산화적 손상을 위상차 현미경으로 관찰한 결과, 초기에는 신경세포가 서서히 팽창하였으며 시간이 경과함에 따라 세포손상이 진행되어 20시간 후에는 대부분의 세포가 파괴되는 현저한 세포사멸이 관찰되었다. Fig. 1은 산화적 손상시 유리되는 LDH 활성을 기준으로 하여, 여러 농도의 소전재조환으로 처리한 세포의 배양액에서 측정된 LDH 활성을 백분율로 계산한 결과이다. Fig. 1에서 알 수 있는 바와 같이 소전재조환은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발한 손상과 xanthine/xanthine oxidase로 유발한 손상을 농도 의존적으로 억제하였으며, 최대 65~70% 정도의 억제효과를 발현하였다.

이번에는 배양한 세포를 100 µM Fe<sup>2+</sup>와 25 µM ascorbic acid로 2시간 동안 처리한 다음 20~24시간 배양한 후 LDH 활성을 측정된 결과, 대조군에 비해 50~60% 정도의 세포가 손상되었다. Fig. 2에 나타나 있듯이, 소전재조환은 Fe<sup>2+</sup>와 ascorbic acid로 유발되는 산화적 손상도 현저하게 억제하였으며, 100 µg/ml에서 약 50%를 억제하였고, 500 µg/ml 이상에서는 완전한 억제효과를 나타내었다.

소전재조환이 산화적 스트레스로 유발되는 신경세포손상을 억제한다는 위의 연구결과는 위상차 현미경을 이용한 세포의 형태학적 관찰을 통하여 확인되었다(data not shown).



**Fig. 2** – Effects of Xiaoshuan Zaizao Wan on the  $Fe^{2+}$ /ascorbic acid-induced oxidative damage in primary cultured rat cortical cells. Cultures were exposed to 100  $\mu M$   $Fe^{2+}$  and 25  $\mu M$  ascorbic acid for 2 h in the absence or presence of the indicated concentrations of Xiaoshuan Zaizao Wan, and maintained at 37°C in MEM supplemented with glucose. LDH activities released into the culture media were measured at 24 h after the exposure. Data are expressed as percentage of control LDH activity measured in the culture exposed to  $Fe^{2+}$ /ascorbic acid in the absence of the test sample. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 measurements. (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs control).



**Fig. 3** – Effects of Xiaoshuan Zaizao Wan on the glutamate- or NMDA-induced excitotoxic damage in primary cultured rat cortical cells. Cultures were exposed for 15 min to 100  $\mu M$  glutamate or NMDA in  $Mg^{2+}$ -free HCSS in the absence or presence of the indicated concentrations of Xiaoshuan Zaizao Wan, and maintained at 37°C in MEM supplemented with glucose. LDH activities released into the culture media were measured at 20 h after the exposure. Data are expressed as percentage of control LDH activity measured in the culture exposed to glutamate or NMDA in the absence of the test sample. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. from 4–6 measurements. (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs control).

**배양한 대뇌피질세포에서 유발한 흥분성 신경세포독성에 대한 작용**

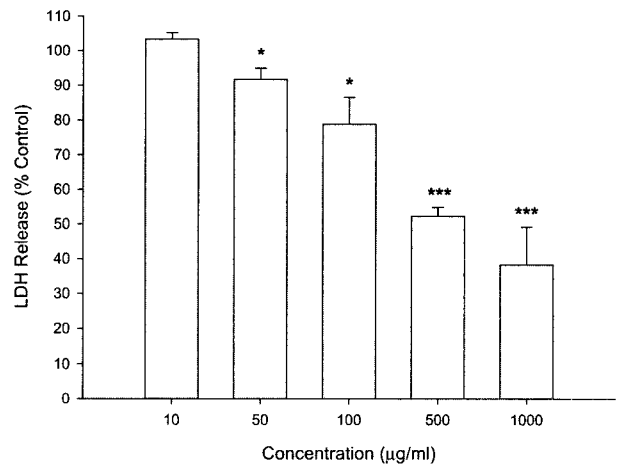
배양한 대뇌피질세포를 100  $\mu M$  glutamate 또는 NMDA로 15 분 동안 처리하고 20시간 동안 배양한 후 측정된 LDH 활성에 따르면, 70~80% 정도의 세포손상이 나타났다. Fig. 3에서 볼 수 있는 바와 같이 소전제조환은 glutamate나 NMDA에 의해 유발되는 흥분성 신경세포독성도 억제하였다. 소전제조환의 농도를 500  $\mu g/ml$ 로 적용하였을 때 glutamate-유발 독성은 20% 정도가 억제되는 미약한 작용을 나타내었으나, NMDA-유발 독성은 50% 정도 억제되었다. 따라서, 소전제조환은 glutamate로 유발한 독성보다 NMDA로 유발한 독성을 더 강력하게 억제함을 알 수 있었다.

**배양한 대뇌피질세포에서  $A_{\beta(25-35)}$ 로 유발한 손상에 대한 작용**

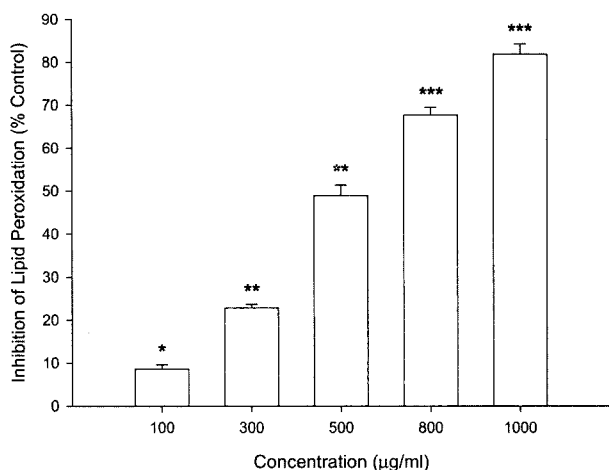
배양한 대뇌피질세포를 40  $\mu M$   $A_{\beta(25-35)}$ 로 24시간동안 처리하였을 때 유발되는 손상은 40~50% 정도로 측정되었다. 소전제조환은  $A_{\beta(25-35)}$ 로 유발되는 신경세포독성을 농도 의존적으로 억제하였으며,  $A_{\beta(25-35)}$ 로 처리된 세포군과 비교시 최대 60% 정도의 손상이 억제되었다(Fig. 4).

**지질과산화 및 DPPH 라디칼에 대한 작용**

소전제조환은 흰쥐의 뇌 균질액을 지질원으로 사용하여  $Fe^{2+}$ 와 ascorbic acid로 유발한 지질 과산화에 대하여 현저한 억제작용을 나타내었다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 500  $\mu g/ml$ 에서 약



**Fig. 4** – Effects of Xiaoshuan Zaizao Wan on the  $A_{\beta(25-35)}$ -induced neurotoxicity in primary cultured rat cortical cells. Cultures were exposed to 40  $\mu M$   $A_{\beta(25-35)}$  in the absence or presence of the indicated concentrations of Xiaoshuan Zaizao Wan, and maintained at 37°C in MEM supplemented with glucose. LDH activities released into the culture media were measured after 24 h of exposure. Data are expressed as percentage of control LDH activity measured in the culture exposed to  $A_{\beta(25-35)}$  in the absence of the test sample. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 measurements. (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs control).



**Fig. 5** - Inhibition of lipid peroxidation by Xiaoshuan Zaizao Wan. Lipid peroxidation initiated by Fe<sup>2+</sup> and ascorbic acid in rat brain homogenates were measured as described in the Materials and methods in the absence or presence of the indicated concentrations of Xiaoshuan Zaizao Wan. Each bar represents the mean±S.E.M. from 3 experiments performed in duplicates. (\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001 vs control).

50%의 억제율을 나타내었으며, 1000 µg/ml에서 80% 이상의 억제율이 확인되었다. 한편, 소전제조환의 DPPH 라디칼 소거작용은 500 µg/ml에서 28.5%, 1000 µg/ml에서 39.2%로 측정되었다.

### 고 찰

소전제조환은 중국에서 제조 및 판매되고 있는 환제로서, 중화인민공화국약전<sup>16)</sup>에 수록되어있는 단삼을 비롯한 총 10종의 생약을 주요성분으로 하고 있다. 이 제제는 혈행을 개선시켜 울혈 및 혈전을 제거한다고 하여 중국에서 뇌혈전증으로 인한 후유증에 사용되고 있으나, 그 약리작용이 과학적으로 입증되거나 보고된 바는 아직 없다. 본 연구에서는 배양한 대뇌피질세포와 시험관내 실험을 이용하여 이 제제의 신경세포 보호작용 및 항산화 작용을 연구하였다.

뇌는 불포화 지방을 많이 함유하고 있고 산소를 이용한 산화적 대사활동이 활발하여 반응성 산소 대사물을 과다하게 형성하는 반면, 자체의 항산화 능력은 낮기 때문에 산화적 스트레스에 특히 민감하다.<sup>17)</sup> 뇌가 허혈 상태가 되면 과다 유리된 glutamate에 의한 흥분성 신경세포독성과 과다 생성된 자유라디칼에 의한 독성, 염증 반응 및 신경세포의 고사 등이 진행되어 뇌에 손상을 야기하게 된다는 사실은 이미 잘 알려져 있다.<sup>2,6)</sup> 또한, 혈전이 용해되고 산소공급이 재개될 경우에도 산화적 스트레스하에서 superoxide 라디칼과 같은 자유라디칼을 포함하는 각종 반응성 산소종이 발생하여 세포에 치명적 손상을 유발한다고 한다.<sup>6)</sup> 그러므로, 산화적 스트레스는 뇌허혈 및 재관류시 매우 중요한 뇌

손상 유발기전으로 작용한다고 할 수 있다.

먼저, 본 연구에서는 소전제조환이 배양한 대뇌피질세포에서 다양한 산화적 스트레스로 유발한 손상에 대하여 어떠한 작용을 나타내는지 시험하였다. 그 결과, 소전제조환은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유발되는 산화적 신경세포손상과 xanthine oxidase의 작용으로 xanthine으로부터 생성되는 superoxide 라디칼에 의해 유발되는 손상 및 Fe<sup>2+</sup>와 ascorbic acid로 처리하여 생성되는 hydroxyl 라디칼에 의해 유발되는 손상을 현저하게 억제함을 발견하였다 (Fig. 1과 2). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 superoxide 라디칼 및 hydroxyl 라디칼은 지질을 과산화시킬 뿐만 아니라, 단백질과 DNA 등 세포내 거대 분자를 손상시킴으로써 결과적으로 세포에 치명적 손상을 유발하는 물질이다.<sup>17,18)</sup> 본 연구를 통하여 소전제조환은 배양한 신경세포에서 다양하게 유발한 산화적 손상을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다.

다음으로, 위의 연구결과에서 소전제조환이 배양한 세포에서 산화적 스트레스로 인해 유발되는 신경세포손상을 효과적으로 억제하는 것으로 보아 항산화작용을 나타낼 수 있다는 가설에 의해 지질과산화 및 DPPH 라디칼에 대한 영향을 시험하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 소전제조환은 뇌균질액에서 Fe<sup>2+</sup>와 ascorbic acid로 유발한 지질 과산화를 효과적으로 억제하였다. 한편, 소전제조환은 최대 40% 정도의 약한 DPPH 라디칼 소거작용을 나타냈다. 그러나, 소전제조환이 DPPH 라디칼 이외의 라디칼에 대하여 민감한 소거작용을 나타낼 수도 있으므로 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다. 이상의 연구결과로부터 소전제조환은 산화적 신경세포독성을 억제하여 신경세포 보호작용을 나타내며, 지질 과산화를 억제하는 항산화작용이 있음을 알 수 있다.

위에 기술한 바와 같이 뇌허혈 상태에서는 산화적 스트레스에 의해서 뿐만 아니라 과다 유리된 glutamate에 의해 흥분성 신경세포독성이 유발된다.<sup>2,5)</sup> 이 과정에 관여하는 수용체 중에서 특히 NMDA 수용체는 Ca<sup>2+</sup>을 통과시킬 수 있는 이온 채널 형태로서 세포의 손상과정에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 이에 본 연구에서는 소전제조환이 배양한 세포에서 glutamate 또는 NMDA로 유발한 흥분성 독성에 대하여 어떠한 영향을 미치는지를 시험하였다. 그 결과, 소전제조환은 glutamate로 유발한 독성과 NMDA로 유발한 독성을 억제하였으며, glutamate에 의한 독성보다 NMDA에 의한 독성을 더 강력하게 억제함을 확인하였다(Fig. 3). 이 연구결과는 소전제조환이 NMDA 수용체를 경유하는 신호전달체계에 선택적으로 작용하여 NMDA로 인해 유발되는 독성을 차단하며, 이 제제에 그와 같은 작용을 하는 물질이 함유되어 있음을 시사한다. 본 연구자는 뇌졸중 치료에 사용되고 있는 40여종 생약 추출물을 대상으로 배양한 신경세포에서 유발한 흥분성 신경독성 억제효과를 측정할 결과, 당귀, 석창포, 조구동, 천궁 등이 glutamate로 유발한 독성을 현저하게 억제함을 발견하여 논문을 발표한 바 있다.<sup>10,11,14,15)</sup> 흥분성 신경독성

억제작용을 나타내는 추출물 중에서 소전재조환에는 천궁이 함유되어 있으며, 그 외에도 15~30% 정도로 미약하기는 하지만 흥분성 독성 억제작용을 나타내는 것으로 보고된<sup>15)</sup> 삼칠과 백작약이 함유되어 있어 이 제제의 흥분성 독성 억제효과(Fig. 3)에 기여했을 것으로 사료된다. 그러나, 보고된 논문<sup>15)</sup>에는 이들 생약 추출물의 NMDA-유발 독성에 대한 연구결과는 포함되지 않았기 때문에, 현재로서는 소전재조환 구성생약 중에서 NMDA-유발독성 억제작용에 기여하는 생약을 구분하기는 어렵다.

이상의 연구결과는, 소전재조환이 뇌혈전 및 재관류시에 노출될 수 있는 다양한 산화적 스트레스에 의한 산화적 손상 및 파다 유리되는 흥분성 아미노산에 의해 유발되는 흥분성 신경세포 독성을 억제함으로써 신경세포를 보호하며, 지질 과산화 억제작용은 이 제제가 신경세포 보호효과를 발현하는 데 어느 정도 기여할 수 있음을 시사하는 결과이다.

끝으로 본 연구에서는 소전재조환의 추가 약리작용을 연구하기 위하여, 배양한 세포에서 A $\beta$ 로 유발한 신경세포독성에 대한 영향을 시험하였다. A $\beta$ 는 AD에서 발생하는 신경퇴행과정에서 매우 중요한 병인으로 알려져 있으며, 배양한 신경세포를 A $\beta$  또는 활성부분으로 알려진 25-35 위치의 아미노산으로 구성된 A $\beta_{(25-35)}$ 로 처리하면 세포고사 형태의 신경세포 손상이 유발된다.<sup>19)</sup> 본 연구에서는 배양한 대뇌피질세포를 A $\beta_{(25-35)}$ 로 처리하여 유발한 독성이 소전재조환에 의해 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다(Fig. 4). AD 환자의 뇌는 과도한 산화적 스트레스에 처해 있으며, A $\beta$ 에 의한 신경세포손상 기전에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 NO와 같은 반응성 산소종의 증가가 연관되어 있다고 한다.<sup>8,9,19)</sup> 또한, A $\beta$ 는 자체에 의한 신경독성 외에도 신경세포와 교세포 간의 신호전달을 방해하고, 교세포로의 glutamate 재흡수를 억제함으로써 흥분성 신호전달을 가속화시키며, 이 과정에서 특히 NMDA 수용체가 중요한 역할을 한다고 제기되었다.<sup>20)</sup> 따라서, 소전재조환이 산화적 손상 및 흥분성 신경독성을 억제하며, A $\beta$ -유발 신경독성을 억제할 수 있음을 최초로 확인한 본 연구결과는 이 제제가 뇌혈전으로 인한 증상의 개선뿐만 아니라, AD 및 산화적 스트레스와 관련된 퇴행성 신경질환에도 도움이 될 수 있음을 강력히 시사한다.

## 결 론

본 연구에서는 소전재조환의 약리작용을 규명하여 이 제제의 임상적 활용에 대한 과학적 근거를 제시하고자 하였다. 그 결과, 소전재조환은 일차배양한 대뇌피질 신경세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, xanthine/xanthine oxidase, 또는 Fe<sup>2+</sup>/ascorbic acid로 처리하여 유발되는 산화적 스트레스에 의한 손상 및 glutamate 또는 NMDA로 유발되는 흥분성 신경세포독성을 억제하며, 과산화지질의 형성을 억제함을 발견하였다. 본 연구에서 발견한 소전재조환의 신경세

포 보호 및 항산화 작용은 뇌혈전으로 인한 증상의 개선뿐만 아니라, 산화적 스트레스가 관련된 여러 가지 퇴행성 신경질환에도 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 이 제제가 배양한 세포에서 A $\beta_{(25-35)}$ 로 유발한 신경세포손상을 억제하는 것으로 보아 AD의 예방 및 치료에도 기여할 수 있을 것으로 추정된다. 본 연구에 사용된 소전재조환은 10종 생약의 조추출물을 함유하고 있어 향후 구성생약별 연구를 진행한다면 이 제제에서 항산화 및 신경세포 보호작용을 나타내는 유효활성성분을 규명할 수 있을 것으로 기대되며, 현재 구성생약별 연구가 부분적으로 진행 중이다.

## 감사의 말씀

본 연구는 동국대학교 논문게재연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Choi, D. W. : Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **23**, 1261 (1992).
- 2) Sauer, D. and Fagg, G. E. : Excitatory amino acids, excitotoxicity and neurodegenerative disorders. In Excitatory amino acid receptors. Krogsgaard-Larsen, P. and Hansen, J. J. eds, Ellis Horwood, London, 13 (1992).
- 3) Bigge, C. F. and Malone, T. C. : Agonists, antagonists and modulators of the N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) subtypes of glutamate receptors. *Current Opinion in Therapeutic Patents* July, 951 (1993).
- 4) Whetsell, W. O. Jr. : Current concepts of excitotoxicity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 1 (1996).
- 5) Lynch, D. R. and Guttman, R. P. : Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 717 (2002).
- 6) Leker, R. R. and Shohami, E. : Cerebral ischemia and trauma - different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res. Rev.* **39**, 55 (2002).
- 7) Katzman, R. and Saitoh, T. : Advances in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **5**, 278 (1991).
- 8) Law, A., Gauthier, S. and Quirion, R. : Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res. Rev.* **35**, 73 (2001).
- 9) Behl, C. and Moosmann, B. : Causes and consequences of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Free Rad. Biol. Med.* **33**, 182 (2002).
- 10) Cho, J., Joo, N. E., Kong, J.-Y., Jeong, D.-Y., Lee, K. D. and Kang, B.-S. : Inhibition of excitotoxic neuronal death by methanol extract of *Acori graminei rhizoma* in cultured rat cortical neurons. *J. Ethnopharmacol.* **73**, 31 (2000).

- 11) Cho, J., Kong, J.-Y., Jeong, D.-Y., Lee, K. D., Lee, D. U. and Kang, B.-S. : NMDA receptor-mediated neuroprotection by essential oils from rhizomes of *Acorus gramineus*. *Life Sci.* **68**, 1567 (2001).
- 12) Jung, Y.-S., Kang, T.-S., Yoon, J.-H., Joe, B.-Y., Lim, H.-J., Seong, C.-M., Park, W. K., Kong, J. Y., Cho, J. and Park, N. S. : Synthesis and evaluation of 4-hydroxyphenylacetic acid amides and 4-hydroxycinnamamides as antioxidants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 2599 (2002).
- 13) Dok-Go, H., Lee, K. H., Kim, H. J., Lee, E. H., Lee, J., Song, Y. S., Lee, Y. H., Jin, C., Lee, Y. S. and Cho, J. : Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res.* **965**, 130 (2003).
- 14) Cho, J., Kim, Y. H., Kong, J.-Y., Yang, C.-H. and Park, C.-G. : 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 (2002).
- 15) 조정숙, 양재하, 박창국, 이희순, 김영호 : 뇌졸중 치료 생약 추출물의 흥분성 신경독성 억제효과. *약학회지* **44**, 29 (2000).
- 16) 중화인민공화국약전. 제1부. 중화인민공화국약전위원회편 (1990).
- 17) Reiter, R. J. : Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J.* **9**, 526 (1995).
- 18) Halliwell, B. : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**, 1609 (1992).
- 19) Hensley, K., Carney, J. M., Mattson, M. P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J. F., Floyd, R. A. and Butterfield, D. A. : A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3270 (1994).
- 20) Harkany, T., Hortobagyi, T., Sasvari, M., Konya, C., Penke, B., Luiten, P. G. M. and Nyakas, C. : Neuroprotective approaches in experimental models of  $\beta$ -amyloid neurotoxicity: relevance to Alzheimer's disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* **23**, 963 (1999).