

遠志가 NMDA로 유발된 신경세포 손상에 미치는 효과

李秀培[#], 成洛戌¹, 李暎鍾^{*}

暎園大學校 韓醫科大學 本草學教室, 1: 농촌진흥청 작물과학원

A Study on the Protective Effects of Polygalae Radix on Neurotoxicity Induced by N-methyl-D-aspartic acid(NMDA)

Lee, Soo-Bae[#], Seong, Nak Sul¹, Lee, Young-Jong^{*}

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University
Seongnam 461-701, Korea

1: National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT

Objectives : Polygalae Radix (PR) from *Polygalae tenuifolia* (Polygalaceae) has been clinically used as a sedative, anti-inflammatory, and anti-bacterial agent. To extend pharmacological effects of PR in the central nervous system (CNS) on the basis of its CNS protective effect, the present study was conducted to identify the effect of PR, whether it shows the neuroprotective action against excitatory neurotoxicity.

Methods : To identify the protective effect of PR to excitatory neuro-toxic agent, the present study was focused on the PR effect on cell death, that was caused by applying NMDA to nerve cell, elevation of $[Ca^{2+}]_i$, releasement of glutamate, and ROS generation.

Result :

1. PR methanol extract, at the concentration range of 0.05 to 5 g/ml, significantly inhibited NMDA (1 mM)-induced neuronal cell death as well as MK-801 (non competitive NMDA antagonist).
2. PR methanol extract (0.5 μ g/ml) inhibited NMDA (1 mM)-induced elevation of cytosolic calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$. NMDA application in the presence of MK-801 (10 μ M) failed to produce the increase of $[Ca^{2+}]_i$ through all the measurement time.
3. PR methanol extract (0.5 μ g/ml) inhibited the NMDA-induced elevation of glutamate release. Also, MK-801 showed similar protective effects.
4. PR methanol extract (0.5 μ g/ml) inhibited the NMDA-induced elevation of ROS generation. Also, MK-801 showed similar protective effects.

Conclusion : The present study provides the availability of PR to exert its protective effect on the neuronal cell death in various neurodegenerative pathophysiological conditions.

Key words : Polygalae Radix(*Polygala tenuifolia* Willdenow), Excitatory Neurotoxicity, Neuroprotection, Glutamate, NMDA

*교신저자: 이영중. 경원대학교 한의과대학 본초학교실 E-mail: garak@kyungwon.ac.kr Tel: 031-750-5415

[#]제1저자: 이수배. 경원대학교 한의과대학 본초학교실

· 접수 : 2005년 4월 9일 · 수정 : 2005년 6월 16일 · 채택 : 2005년 6월 20일

서론

遠志 (Polygalae Radix)는 원지과(Polygalaceae)에 속한 원지 *Polygala tenuifolia* Willdenow의 뿌리이다.¹⁾ 神農本草經²⁾ 上品에 “遠志 味苦溫 主咳逆傷中 補不足 除邪氣 利九竅 益知慧 耳目聰明 不忘 強志倍力 久服輕身不老 葉名小草 一名棘蕒 一名萋繞 一名細草 生川谷”이라고 기재된 이래로 전통적으로 鎮靜劑, 祛痰劑 및 抗炎症劑로서 임상에서 널리 사용되어 왔다.³⁾

遠志의 성분과 효능에 관련된 연구결과는 비교적 많은 편으로 金 등⁴⁾, 박 등⁵⁾, Y. Jiang 등⁶⁾, Y. Ikeya 등⁷⁾, T. Fujita 등⁸⁾에 의해 원지의 함유성분으로 Xanthone O-glycosides, Xanthones등을 보고하고 있다. 효능에 관한 연구로는 李⁹⁾, 朴 등¹⁰⁾, 황 등¹¹⁾, 이 등¹²⁾, Park 등¹³⁾, Kim 등¹⁴⁾, T. Nagai 등¹⁵⁾에 의해 안신작용, 이노효과 및 중추억제작용, 腦性狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制效果, potential antipsychotic efficacy, anti-inflammatory activity 등이 보고된 바 있다. 그러나 遠志의 寧心安神과 신경퇴행성 질환과의 관계를 다룬 실험보고는 아직 미흡한 실정이다.

Glutamate와 같은 흥분성아미노산은 포유동물의 중추신경계의 흥분성 신경전달의 대부분을 매개하는 신경전달물질로서 다른 조직에 비하여 중추신경계에 높은 농도로 존재한다.^{16,17)} Glutamate 수용체의 흥분은 학습, 기억과 같은 중추신경의 활성화에 중요한 역할을 하지만, 이 수용체의 과흥분은 세포기능을 손상시키는 강력한 생화학적 반응을 일으킨다.¹⁸⁻²¹⁾

흥분성 아미노산의 수용체 subtype은 많은 agonist 및 antagonist를 사용하여 연구된 결과, 활성화시키는 대표적인 agonist의 명칭에 의하여 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), kainic acid (KA), 그리고 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA)로 분류되는 ionotropic receptor와 metabotropic receptor로 분류하고 있다. 여러 원인에 의한 각종 퇴행성 뇌질환시에 다량으로 유리되는 glutamate는 NMDA 및 KA 수용체를 과흥분시키고, 이어 과량의 Ca^{2+} 의 세포내 유입, ROS의 대량 생성, 이차적으로 일어나는 glutamate의 다량유리에 의한 순환의 반복에 의하여 신경세포의 사멸을 야기한다.

본 연구에서는 遠志의 중추 억제작용에 근거하

여, 뇌신경세포 손상에 대한 遠志의 예방 또는 치료 효과의 유용성을 검토하고자 遠志 메탄올 추출물이 NMDA에 노출된 神經細胞死에 대한 억제효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료 및 시약

遠志는 농촌진흥청 작물과학원 특용작물과에서 동정한 기원이 확실한 종자를 2001년 봄에 파종하여 2002년 11월에 수확한 뿌리를 깨끗이 수세하여 건조한 후 추출 재료로 사용하였다. 遠志 300 g을 70% methanol (2L)로 24시간동안 reflux condense에서 3번 반복하여 추출한 후 각 추출물을 혼합하여 Whatman No. 1의 여과지에 의하여 여과하고, 회전식 진공증발건조기에 의하여 감압농축하고, 동결건조한 후 실험에 사용하였다.

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), o-phthaldialdehyde (OPA), glutamate, 2-mercaptoethanol (2-ME), trypsin (from bovine pancreas), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Joklik-modified Eagles medium, poly-L-lysine, amino acids (HPLC standard), cytosine 1-D-arabinofuranoside hydrochloride (cytosine arabinoside), 0.4% trypan blue solution (pH 7.4), 그리고 Fura 2-AM은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

NMDA, (5R,10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d] cyclohepten-5,10-imine (MK-801) 및 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX)는 RBI (Natick, MA, USA), 2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)는 Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA), Fetal bovine serum은 Gibco (Logan, Utah, USA)로부터 구입하였다. 그 외에 사용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

2) 실험동물

In vitro 실험에는 임신한 흰쥐를 대한바이오링크(음성, 충북)로부터 구입하여 아크릴 케이지에서, 온

도 (22±2°C), 명암 (12 시간 light/dark)이 조절되는 동물실에서 사육하면서 물과 사료는 자유로이 공급하였다. 매일 관찰하여 출산 후 7~8일째의 어린 쥐를 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 신경세포의 1차 배양

(1) 배양액의 조제

다음과 같이 3가지의 배양액을 준비하였다.

Medium I : 5.4 g의 Joklid-modified Eagle's medium을 450 ml의 멸균증류수에 녹이고, 200 mM HEPES를 50 ml 가한 후 0.1 N NaOH에 의하여 pH를 7.4로 맞추었다. membrane filter (0.2 μm)로 여과 멸균하였다.

Medium II : 6.14 g의 DMEM을 500 ml의 멸균증류수에 녹이고 36 mM NaHCO₃를 가하여 pH를 7.4로 조절하였다. CaCl₂ (8 mg), MgSO₄ (3.625 mg), KCl (17 mg), fetal bovine serum (10%), penicillin (40-80 μg/ml), gentamicin (100 μg/ml)을 첨가하고, membrane filter (0.2 μm)에 의하여 여과 멸균하였다.

Medium III : Medium II의 조성중 KCl의 농도를 25 mM로 조정하며, glial cell의 증식을 억제하기 위하여 20 μM cytosine arabinoside를 첨가하여 조제하였다.

(2) 신경세포의 배양²²⁾

7~8일령의 흰쥐 (DaeHan Biolink Co. Ltd., Eumsung, Chungbuk)의 머리를 빠르게 분리하여 70% ethanol에 담가 소독하였다. 피부를 절개하고 skull을 조심스럽게 제거하면서 소뇌부분만을 취하였다. 이를 trypsin (0.25 mg/ml)을 함유하는 medium I에 넣고, 5 ml pipette에 의하여 5~6번 가볍게 pipetting하여 기계적 분산을 하였으며, 이를 37°C에서 10분간 incubation하여 효소적 분리를 하였다. 세포현탁액을 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 세포를 함유하는 침전층에 medium II를 가하여 pipette에 의하여 분산시키고, 세포농도를 2x10⁶ cells/ml로 조정하여, nylon mesh (35 μm)를 통과한 후, 미리 poly-L-lysine으로 coating한 12 well plate (細胞死 및 glutamate 유리량 측정), 또

는 coverslips ([Ca²⁺]_i 및 ROS 측정)에 심었다. 37°C, 7% CO₂/93% air를 유지하는 조건의 CO₂ incubator에서 배양하였다. 이들이 지난 후 배양용 배지는 medium III로 교환하며, 이 후 3일에 한 번씩 배지를 교환하고, 7~10일간 배양된 신경세포를 실험에 사용하였다.

2) 신경세포의 NMDA에 대한 노출

실험을 위하여 배양세포의 배양용 배지는 제거하고, HEPES buffer (조성; 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂, 8.6 mM HEPES, pH 7.4)에 의하여 3번 세척하였다. 같은 buffer로 30분간 incubation하고, NMDA(1 mM) 또는 KA(500 μM)를 가한 후 3시간 더 incubation하였다. 遠志 추출물 및 각 분획물 또는 NMDA receptor antagonist인 MK-801(10 μM)은 NMDA를 가하기 15분전에 각 well에 첨가하였다. Incubation후 위상차 현미경에 의하여 사진을 촬영하였으며, trypan blue exclusion test나 MTT assay에 의하여 細胞死를 측정하며, 또는 배지 중으로 유리된 glutamate의 양을 측정하였다. NMDA와 MK-801은 HEPES buffer에 의하여 용해하였으며, 遠志 추출물은 absolute ethanol에 의하여 5 mg/ml의 농도로 용해한 후 HEPES buffer에 의하여 희석하여 사용하였으며, 신경세포에 노출시키는 ethanol의 농도는 0.1% 이하로서 세포에 전혀 손상을 일으키지 않았다.

3) 細胞死의 측정

(1) Trypan blue exclusion test

NMDA를 처치한 후 incubation이 끝난 신경세포에서 배양용배지를 제거하고 0.4% trypan blue액을 가하여 10분간 실온에 방치하여 염색하며, 등장성의 formaldehyde (pH 7.0)를 가하여 2-4°C에 방치하여 고정하였다. 살아서 세포막의 기능을 유지하는 세포는 trypan blue가 세포막을 통과하지 못하므로 세포체가 백색을 유지하고, 세포막의 손상과 더불어 細胞死를 유발한 세포는 trypan blue의 침투로 푸르게 염색되었다. 각 well당 무작위로 5 구역을 선택하고 위상차 현미경하에서 관찰하면서 적어도 1,000 cells에 대한 trypan blue 침투 여부의 수를 세었다.

(2) MTT assay

이 방법은 세포의 생존, 증식을 양적으로 측정하는 매우 민감하고 안정된 방법으로서, 살아 있는 세포 내에서 노란색의 수용성 기질 MTT를 진한 파란색의 formazan으로 전환시키는 mitochondrial dehydrogenase의 활성 능력을 근거로 하고 있다.²³⁾ 따라서 생성되는 formazan의 양은 살아있는 세포의 수와 비례한다. MTT는 PBS (Ca^{2+} -, Mg^{2+} -free phosphate buffered saline)에 5 mg/ml의 농도로 녹여 stock solution으로 하며, 사용 시에 serum-free DMEM에 의하여 10배 희석하여 사용하였다. 신경세포를 NMDA와 함께 incubation한 후, NMDA를 함유하는 HEPES buffer를 제거하고, MTT 용액을 200 μ l를 가하고 4시간동안 37°C에서 배양하였다. MTT 용액을 제거하고 200 μ l의 acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)을 모든 well에 가하고 부드럽게 혼화하면서 형성된 진한 푸른색의 formazan 결정을 용해시켰다. Well 내의 모든 용액을 96 well plate의 각 well에 옮기고, microelisa reader에 의하여 파장 570 nm (참조파장 630 nm)에 의하여 흡광도를 측정하였다. 이는 isopropanol을 첨가한 후 1시간 이내에 실시되며, data는 NMDA를 처치하지 않은 well의 흡광도를 100%로 하여 나타냈다.

(3) $[Ca^{2+}]_i$ 의 측정

$[Ca^{2+}]_i$ 은 ratio fluorometry에 의하여 측정하였다.²⁴⁾ Culture dish 내의 glass cover slide에서 자란 신경세포를 serum-free DMEM으로 3번 세척하고, 5 μ M fura-2 AM (dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해)을 함유하는 같은 배지를 가하여 40분간 incubation함으로써 fura-2 AM을 세포내로 uptake시켰다. HEPES buffer에 의하여 세척한 후 부착된 세포를 함유하는 glass slide를 3 ml의 HEPES buffer를 함유하는 spectrophotometer용 cuvette에 세로로 mounting한 후, cuvette를 ratio fluorometry (Photon Technology International, RatioMaster™, NJ, USA)에 장착한 후, 510 nm의 light emission 하에서 340 nm 및 380 nm에서 흥분하는 세포의 각 파장에서 나타내는 형광광도의 비의 변화를 $[Ca^{2+}]_i$ 농도의 변화의 척도로서 측정하였다. 즉, 그 비가 증가하면 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가하는 것이다. 약 3분 동안 base line을 안정화시키고 1 mM NMDA를 가

하고 시간의 경과에 따라 일어나는 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가를 측정하였다. 遠志 추출물 및 MK-801 또는 DNQX는 fura-2 AM을 uptake시키고 세척한 후 HEPES buffer중에서 $[Ca^{2+}]_i$ 의 측정 전 15분간 전처리하고, 1 mM NMDA를 가하고 $[Ca^{2+}]_i$ 의 측정 중에도 계속 공존시켰다. 결과는 각 파장에서의 형광광도 비의 변화로서 F340/F380으로 표시하였다.

(4) Glutamate 유리량의 측정

2-2)에서 설명된 대로 세포를 처치한 후에 배지를 포집하여 배지 중으로 유리되어 나온 glutamate의 양을 electrochemical detector (ECD)가 장착된 HPLC에 의하여 측정하였다.²⁵⁾ 포집 sample용액 60 μ l에 20 μ l의 OPA/2-ME용액을 가하여 혼화하여, 용액의 precolumn derivatization을 형성시킨 후 이를 HPLC에 injection하였다.

HPLC의 분석조건은 다음과 같았다.

Liquid chromatography : BAS model 200

Mobile phase : 37% (v/v) HPLC-grade methanol을

포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5.15)

Stationary phase : Waters Spherisorb® column (particle size, 5 μ m; 4.6 x 100 nm, reverse-phase)

Detector : Glass carbon workin electrode (Ag/AgCl)

Gain : 10 μ A

Flow rate : 0.5 ml/min

각 아미노산 (Asp, Gln, Glu, Gly, Tau)에 대한 기지농도(0, 2.5, 5, 10 μ M)의 표준액을 동일조건인 HPLC에 의하여 분석하여 그 retention time을 측정하고 각 농도에 의한 peak area를 구하여 비례적으로 sample 중의 아미노산의 농도를 계산하였다.

(5) ROS 생성량의 측정

H₂DCF-DA의 형광 생성물인 2'7'-dichlorofluorescein(DCF)의 미세 형광분석법을 이용하여 ROS 생성량을 측정하였다.²⁶⁾ Coverslips에 자란 신경세포를 serum-free DMEM으로 3번 세척하고, 같은 배지로 30분간 적응시킨다. 이어서 1 mM NMDA를 가하고 1시간동안 더 배양하였다. 遠志 추출물 및 MK-801 또는 DNQX는 NMDA를 가하

기 15분전에 가하여 NMDA에 노출 시에도 공존시켰다. Incubation의 마지막 10분간에 5 μ M H₂DCFDA (DMSO에 용해)를 세포에 적용하여 uptake시켰다. 세포를 HEPES buffer로 세척하고 coverslip을 confocal microscope stage에 장착하고, 488 nm의 excitation, 510 nm의 emission filter를 사용하는 confocal scanning laser microscope (Bio-rad, MRC1021ES, Maylands, UK)에 의하여 세포를 이미지화하였다. 한 coverslip당 5~6 개소의 이미지를 잡고 각 field의 각 세포 내에서 측정되는 평균 pixel 형광광도는 DCF 형광의 상대적 단위로써 표시되었다. 각 세포 당 평균 형광광도의 값은 이 회사에서 공급되는 image 분석 software에 의하여 계산되었다.

4) 통계분석

데이터는 평균 \pm SEM으로 나타내었고, 통계적 유의성은 unpaired student t-test에 의하여 검정하였으며, p값이 0.05 미만일 때를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 형태학적 손상 억제효과

Fig.1은 NMDA에 의한 세포손상에 의한 형태학적 변화 및 遠志 추출물 및 MK-801의 억제효과를 나타낸 것이다. HEPES buffer에만 노출된 대조세포는 둥근 세포체와 복잡하게 교차하는 축삭의 선명한 모양을 나타내고 있다 (A). 그에 비하여 1 mM NMDA를 가하고 3시간동안 배양한 세포의 경우는 세포체의 모양이 일그러지고, 축삭의 선명함이 사라져 현저한 세포손상을 일으켰음을 나타내고 있다 (B). 그러나, 0.5 μ g/ml 遠志 추출물의 전처치에 의하여 NMDA에 의한 세포손상을 억제하여 대조세포와 같은 뚜렷한 세포체 및 축삭의 모양을 나타내고 있다 (C). 한편, NMDA receptor antagonist 인 10 μ M MK-801의 전처치에 의하여도 NMDA에 의한 세포손상이 현저히 억제되었음을 관찰할 수 있었다 (D).

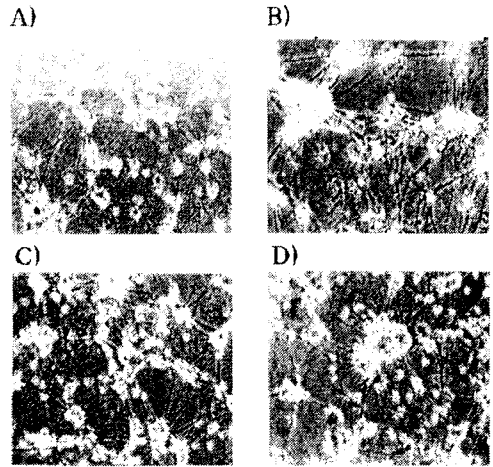


Fig. 1. Protective effect of PR on NMDA-induced cerebellar granule cell death in cultured cerebellar granule neurons. Phase-contrast photomicrographs of cultured cells exposed to : (A) HEPES buffer only, (B) NMDA (1 mM) only, (C) NMDA in the presence of PR (0.5 μ g/ml) and (D) NMDA in the presence of MK-801 (10 μ M). The incubation was carried out for 3 hr at 37 $^{\circ}$ C. (PR: Polygalae Radix)

2. 세포막 손상에 대한 억제효과

신경세포의 세포막 손상과 더불어 유발되는 細胞死는 신경세포의 trypan blue 흡수정도에 의하여 측정하였다. Apoptosis와 necrosis를 포함하는 다양한 형태의 細胞死를 측정하는 trypan blue assay는 초창기 細胞死를 연구하기 위하여 일반적으로 이용되어 왔다. 원형질막의 파괴로 trypan blue로 염색된 세포의 수는 NMDA의 노출과 함께 현저하게 증가하였다. 대조세포는 trypan blue negative cell (정상 세포)이 95.9 \pm 0.5%인데 비하여 1 mM NMDA 처리 세포는 34.9 \pm 3.0%로 감소하였다. 遠志 추출물은 0.05 - 5 μ g/ml의 농도범위에서 NMDA에 의하여 유도된 神經細胞死의 증가를 유의성있게 억제하였으며, 5 μ g/ml의 농도에 의하여 88.7 \pm 2.1%의 억제효과를 나타내었다. 또한 NMDA receptor antagonist 인 MK-801 (10 μ M)을 처리한 경우도 NMDA에 의하여 유도된 神經細胞死를 현저히 억제하였다. 이는

NMDA에 의한 神經細胞死가 NMDA receptor의 활성화에 의한 것임을 증명하는 것이다. 이후의 실험 과정에는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 사용하였다 (Fig. 2).

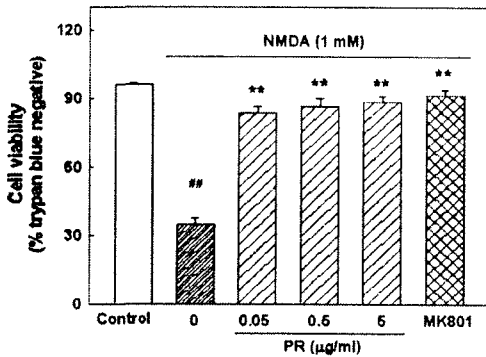


Fig. 2. Protective effect of PR on NMDA-induced cell death in cultured cerebellar granule neurons. Neuronal death was measured by the trypan blue exclusion test. Results are expressed as mean \pm SEM values of the data obtained from four independent experiments performed in 2 or 3 wells. ## p<0.01 compared to control. ** p<0.01 compared to 1 mM NMDA.

3. 세포 생존율 측정

NMDA에 의한 神經細胞死를 규명하기 위한 또 다른 방법으로서 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 생존하는 세포의 mitochondria는 MTT tetrazolium염을 formazan염으로 환원시키는 능력을 가지고 있어, MTT assay는 세포의 생존을 양적으로 안정적으로 측정하는 비교적 민감한 방법으로서 널리 이용되고 있다. rat 신경세포를 1 mM NMDA에 3시간 노출시켰을 때, 세포의 MTT 환원율은 대조군에 비하여 56.6 \pm 4.6%로 감소하였다. 이에 대하여 遠志 추출물 (0.5 $\mu\text{g/ml}$)을 NMDA와 공존시키면 세포생존율은 84.5 \pm 3.9%까지 회복되었다. 이와 유사하게 MK-801 (10 μM)도 NMDA에 의한 神經細胞死를 현저히 억제하였다 (Fig. 3).

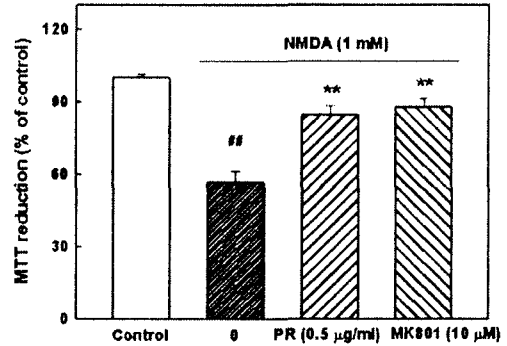


Fig. 3. Protective effect of PR on NMDA-induced cell death in cultured cerebellar granule neurons. Neuronal death was measured by the MTT assay. The absorbance of non-treated cells was regarded as 100%. Results are expressed as mean \pm SEM values of the data obtained from four independent experiments performed in 3 or 4 wells. ## p<0.01 compared to control. **p<0.01 compared to 1 mM NMDA.

4. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 증가에 대한 억제효과

많은 연구에 의하여 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 증가가 흥분성 아미노산에 의한 細胞死와 연관됨이 널리 알려져 있다. 즉, 흥분성 아미노산에 의하여 양 이온 채널과 공역된 NMDA 및 non-NMDA 수용체가 활성화되면 탈분극과 더불어 다량의 Ca^{2+} 의 유입이 일어나고, 이에 의하여 각종효소의 활성화 등 Ca^{2+} paradox에 의하여 세포는 細胞死를 일으키게 된다. 본 실험에서 NMDA에 의한 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 증가에 대한 遠志 추출물의 효과를 검토하였다. Fura-2 AM을 흡수시킨 신경세포의 340 nm 및 380 nm의 흡수광도로부터 발생하는 형광광도의 비(F340/F380)는 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 와 비례한다. Fig. 4에 의하면, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 는 1 mM NMDA를 첨가한 즉시 증가하기 시작하여 3~4분에 평형에 도달하여 최대 형광광도를 나타내었다. 반면 遠志 추출물 (0.5 $\mu\text{g/ml}$)을 처치한 세포에서는 1 mM NMDA에 의한 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 증가가 억제되었다. 다만 遠志 추출물을 처치한 세포에서 약 6분 후에 NMDA의 효과가 약간 회복되었으나, 지속적인 억제를 나타내었다. 또 MK-801 (10 μM)에 의해서는 1 mM NMDA에 의한 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 증가가 완전히 억제되었다. 遠志 추출물 및 MK-801은 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 basal 농도에 영향을 미치지 않았다(Fig. 4)

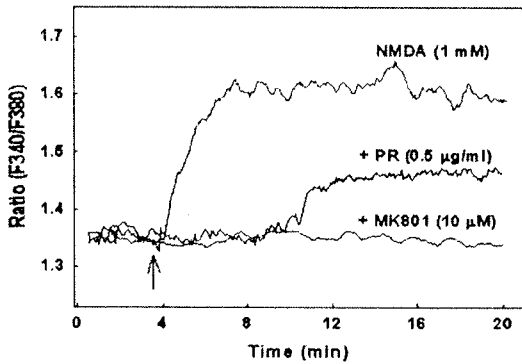


Fig. 4. Change of $[Ca^{2+}]_i$ in response to NMDA in the presence or absence of PR and MK-801 in cultured cerebellar granule neurons. $[Ca^{2+}]_i$ was monitored using a ratio fluorescence system. In the plots shown, each line represents F340/F380 ratio from a representative cell population.

5. glutamate 유리 증가작용에 대한 억제효과

흥분성 아미노산에 의한 각 수용체의 활성화는 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가와 더불어 2차적으로 다량의 glutamate를 세포외로 유리함으로써 2차적인 세포 손상을 일으키게 된다. Fig. 5에 나타냈듯이, 1 mM NMDA를 처리하고 3시간 배양 후 배지 중으로 유리된 glutamate의 양을 측정된 결과, basal glutamate의 양이 $0.49 \pm 0.04 \mu M$ 인 데 비하여 NMDA 처리에 의하여 $1.19 \pm 0.11 \mu M$ 로 유의성있는 증가를 나타내었다. 遠志 추출물 ($0.5 \mu g/ml$)은 이러한 NMDA에 의한 glutamate 유리량을 현저히 억제하여, $0.67 \pm 0.05 \mu M$ 의 유리량을 나타내었다. MK-801 ($10 \mu M$)도 역시 NMDA에 의한 glutamate의 유리 증가를 현저히 억제하였다.

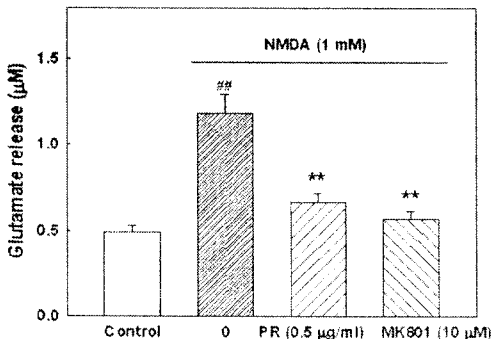


Fig. 5. Protective effect of PR on NMDA-induced glutamate release in cultured cerebellar granule neurons. The amount of released glutamate was measured by HPLC with ECD. Results are expressed as mean \pm SEM values of the data obtained in four independent experiments performed in 2 or 3 wells. ## $p < 0.01$ compared to control. ** $p < 0.01$ compared to 1 mM NMDA.

6. ROS 생성 억제효과

NMDA는 $[Ca^{2+}]_i$ 를 증가시켰을 뿐 아니라, glutamate의 유리를 현저히 증가시켰다. 이러한 결과로서 나타나는 흥분성 아미노산에 의한 병적 상황은 또한 ROS 및 nitric oxide 등의 생성촉진작용과 연관된다. 본 연구에서 NMDA에 의한 ROS의 생성을 형광 염색제인 $H_2DCF-DA$ 를 이용하여 측정하였다. Fig. 6에 laser scanning confocal microscope에 의하여 ROS의 생성에 의한 형광발현의 정도를 이미지화한 사진을 나타냈다: NMDA (1 mM)를 처리한 신경세포(B)에서 전혀 약물을 처리하지 않은 대조 세포군(A)에 비하여 밝은 세포체, 즉 강한 형광을 유발함을 관찰할 수 있다. 즉 NMDA에 의하여 ROS의 생성이 증가하였음을 나타낸다. 그러나, 遠志 추출물 ($0.5 \mu g/ml$) 및 MK-801 ($10 \mu M$)을 전처리하여 배지 중에 포함시킨 신경세포에서는 NMDA에 의한 형광발현이 완전히 억제되었다 (Fig. 6; C 와 D).

Fig. 7에는 Fig. 6의 결과로부터 그 형광광도를 직접 나타낸 것이다. 대조세포군의 형광광도가 21.6 ± 3.3 인데 비하여 1 mM NMDA에 의하여 121.5 ± 3.8 로서 약 5배 가량의 형광광도, 즉 ROS의 생성이 증가하였음을 나타내었다. 반면에 遠志 추출물 ($0.5 \mu g/ml$) 및 MK-801 ($10 \mu M$)에 의하여 NMDA에 의한 형광광도의 증가를 현저히 억제하였음을 알 수 있다. 遠志 추출물 및 MK-801은 $H_2DCF-DA$ 와 직접적인 작용을 나타내지 않았다.

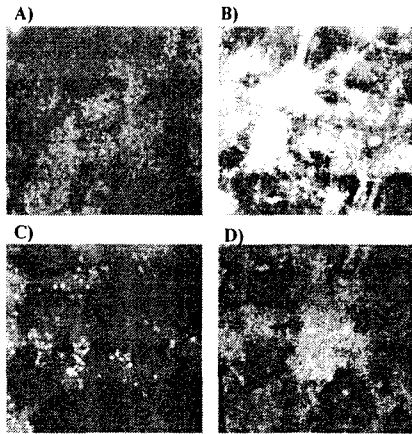


Fig. 6. Protective effect of PR on the increase of fluorescent intensity followed by generation of ROS by NMDA. Representative photographs of fluorescence expression in H₂DCF-DA loaded cerebellar granule neurons, imagined by confocal microscopy. Cells were incubated for 1 h with HEPES buffer containing 1 mM NMDA. PR (0.5 μg/ml) and MK-801 (10 μM) were applied 15 min prior to NMDA treatment. H₂DCF-DA was loaded for the last 10 min of NMDA incubation. After washing, the photographs were taken. : (A) HEPES buffer only (B) NMDA only (C) NMDA in the presence of PR (D) NMDA in the presence of MK-801.

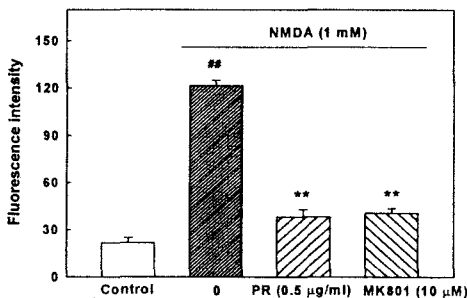


Fig. 7. Protective effect of PR on NMDA-induced ROS generation in cultured cerebellar granule neurons. Values represent mean±SEM of relative fluorescence intensity obtained from four independent experiments performed in duplicate. ## p<0.01 compared to control. ** p<0.01 compared to 1 mM NMDA.

고찰

遠志(Polygalae Radix)의 기원은 대한약전¹⁾에 “원지 *Polygala tenuifolia* Willdenow(원지과 : Polygalaceae)의 뿌리이다”라고 기재되어 있으며, 산지에 따라 圖經本草²⁷⁾에서는 泗川遠志, 威勝軍遠志, 齊州遠志, 解州遠志, 商州遠志 등으로 분류를 하였으며, 葉의 크기에 따라 本草綱目²⁸⁾에서는 “遠志 有大葉 小葉 二種”으로 분류를 하였다.

藥效는 安神開竅, 寧心安神, 安神鎮心, 安神養心, 祛痰利竅, 化痰止咳, 消散癰腫, 消腫解毒, 交通心腎, 強志益精, 強志益智, 聰耳明目 등^{3,29)}으로 분류되어 있으며, 主治는 心神不安, 失眠多夢, 迷惑健忘, 驚悸不寐, 神志恍惚, 咳痰不爽, 瘡瘍腫毒, 乳房腫痛 등^{3,29)}으로 역대 본초서에 기재되어 있다. 또한 효능에 관한 연구로 安眠作用, 이노효과 및 中추억제作用, 腦性狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果, potential antipsychotic efficacy, anti-inflammatory activity 등⁹⁻¹⁵⁾이 보고된 바 있다.

이와 같이 원지는 진정 및 신경안정 등 중추신경 억제 작용이 있어서 임상에서 널리 사용되고 있는데 이러한 원지의 효능에 근거해서 흥분성 신경독성에 대한 신경보호효과를 연구함으로써 신경퇴행성 질환에 있어서의 유용성을 검토하고자 하였다. 신경퇴행성 질환을 다루는 이전의 대부분 가설들은 독성 자극성 과정에 주요한 역할을 하는 흥분성 아미노산 물질인 glutamate의 비정상적인 증가 또는 감소에 연관되어져 연구가 진행되어져 왔다.

뇌졸중, 심장질환, 중양 등에 의한 虛血性 뇌손상 시, 또는 Alzheimer disease, Parkinson disease, Huntington disease 등의 다른 퇴행성 뇌질환의 진행에 glutamate 수용체의 활성화가 필수라는 보고는 수없이 많다.^{30,31)} 배양 신경세포 및 뇌조직 세절편을 이용한 *in vitro* 실험에서 높은 농도의 glutamate를 가하면 glutamate 수용체를 통하여 細胞死를 유발함이 보고되어 왔다. 따라서 NMDA receptor antagonists인 AP-5, MK-801, 또는 KA receptor antagonist인 DNQX의 각 흥분성 아미노산에 의한 細胞死의 억제작용도 확인되었다. 본 실험에 사용한 배양 소뇌신경세포는 위에 언급한 여러 질환의 예방 및 치료가능성이 있는 물질의 작용 및 기전을 screening하는 데 유용한 모델로서 이용되고 있다.

배양 신경세포를 흥분성 아미노산에 노출시키면 급속한 신경독성을 유발한다는 Choi 등의 보고³⁰⁾를

본 연구에서도 확실히 하였다. 더구나 흥분성 아미노산은 Mg^{2+} -free, glucose-free 상태에서 적용하고 배양했을 때 더욱 심한 細胞死를 유발한다.³²⁾ 그러므로 본 실험에서도 NMDA의 흥분독성을 검토하기 위하여 같은 종류의 배양액을 사용하였다. NMDA (1 mM)는 현저한 神經細胞死를 유발하였으며, 이 細胞死는 각각의 수용체 antagonist인 MK-801에 의하여 유의성 있게 감소하였다. 이는 NMDA가 NMDA 수용체를 활성화시키면서 細胞死를 일으켰음을 나타내주는 결과이다. NMDA에 의한 細胞死에 대하여 遠志 추출물은 0.5-5 $\mu g/ml$ 의 농도범위에서 현저한 억제효과를 나타내었다. 이 결과는 遠志가 흥분성 아미노산에 의한 신경독성을 보호할 가능성을 시사하는 것이다.

흥분성 아미노산에 의한 신경독성은 glutamate 수용체의 활성화에 의한 것으로, NMDA 수용체는 Ca^{2+} 의 세포내 유입을 증가시키고, non-NMDA 수용체가 활성화되면 Na^+ 의 유입에 따른 세포막의 탈분극이 일어나고, 이 탈분극에 의하여 세포막의 voltage-dependent Ca^{2+} channel의 개방과 더불어 또한 Ca^{2+} 의 대량 유입을 야기한다. 본 연구에서도 배양 신경세포에 1 mM의 NMDA와 50 μM 의 KA를 가하였을 때 $[Ca^{2+}]_i$ 는 급격히 증가하였으며, 이는 각각 MK-801 및 DNQX에 의하여 완전히 억제되었다. 또한 NMDA에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 遠志 추출물에 의하여도 유의성 있게 억제되었다. 이 결과는 NMDA의 수용체 자극 후에 일어나는 세포막의 탈분극에 의하여 활성화되는 voltage-dependent Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+} 의 유입을 遠志 추출물이 억제할 가능성을 제시하는 결과이다. Glutamate에 의하여 유발되는 신경독성을 다루는 많은 보고에 의하면, 과량으로 유리되거나 또는 uptake기전의 손상에 의하여 세포외액 중에 과량으로 축적하는 glutamate가 흥분독성의 진행에 필수임을 강조하였다. 예를 들어 虛血症이나 insulin-induced 저혈당증에서 glutamate의 유리는 증가하고 이에 의한 신경독성을 야기한다고 한다.³³⁾ 뿐만 아니라, 포유동물을 이용한 많은 약리학적 실험, 사람에게 있어서의 임상 연구에 의하면, 虛血症 상황에서는 glutamate가 독작용을 나타내는 농도까지 상승한다는 것이다.³⁴⁾ 따라서 신경질환에 있어서의 신경손상의 기전으로서 glutamate- $[Ca^{2+}]_i$ 상승의 개념이 널리 통용되고 있다.³⁵⁾ 본 연구에서도 NMDA 및 KA에 의하여 신경세포로부터 배양액 중으로 glutamate의 유리가 현저히 증가하였으며, 이는 각 수용체 antagonist에

의하여 억제되어, 이는 각 흥분성 아미노산이 각 수용체의 활성화를 통하여 glutamate의 유리를 상승시킨다는 것을 알 수 있다. 즉, 수용체의 활성화는 $[Ca^{2+}]_i$ 의 상승을 일으키고 2차적으로 glutamate의 유리를 증가시킨다는 것이다. 遠志 추출물은 또한 NMDA 및 KA에 의한 glutamate의 유리도 현저하게 억제하였다. $[Ca^{2+}]_i$ 의 과잉 증가에 따른 細胞死를 유발하기까지의 세포내 일련의 생화학적 분자적 반응 중에는 ROS의 생성이 필수적으로 수반된다.³⁶⁾ 흰쥐의 대뇌피질로부터 배양된 신경세포를 이용한 실험에 의하면, ionotropic glutamate 수용체가 활성화되면 세포내 ROS의 농도가 증가함이 보고되었다.³⁷⁾ 신경세포가 glutamate에 노출되면 일차적으로 xanthine oxidase 활성화에 의한 초기 ROS의 증가가 나타나고, 좀 지연된 반응으로 생성되는 ROS는 대부분 미토콘드리아에 의함이 알려져 있다. Glutamate에 오랫동안 노출되면 미토콘드리아의 비가역적 손상과 더불어 산화적 인산화계의 파괴와 동시에 많은 양의 ROS가 생성된다. ROS의 생성과 더불어 세포막의 투과성이 증가하고 이어 또 $[Ca^{2+}]_i$ 의 조절기능이 파괴된다고 한다.³⁸⁾ 즉, 일반적으로, $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가하게 되면 이는 ROS의 생성을 유발하는 여러 효소계, 예를 들면 xanthine oxidase, nitric oxide synthase, phospholipase A₂ 등을 활성화하여 세포막의 구성성분인 지질의 과산화와 더불어 신경세포손상을 유발하거나, 역으로 ROS의 생성이 $[Ca^{2+}]_i$ 에 대한 조절기능의 파괴를 일으키게 되어³⁹⁾, ROS의 생성과 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 상호 의존적임이 알려져 있다. 본 연구에서도 배양 신경세포를 NMDA에 1시간동안 노출시켰을 때 ROS의 생성이 현저하게 증가하였다. 이는 각 antagonist에 의하여 뿐만 아니라, 遠志 추출물 (0.5 $\mu g/ml$)에 의하여 완전히 억제되었다. Data에는 나타나지 않았으나, 흥분성 아미노산에 의한 ROS 생성 작용은 적어도 30분 이상의 처치시간을 필요로 하였다. 이러한 사실은 흥분성 아미노산에 의한 세포 독성은 일차적으로 증가하는 $[Ca^{2+}]_i$ 와 함께 ROS의 생성이 증가하여 이어서 대량으로 유리되는 glutamate에 의하여 그 독성은 더욱 증가하는 것으로 생각된다. 한편, 遠志 추출물에 의하여 각 흥분성 아미노산에 의한 세포독성이 억제되는 것은 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가가 일차적으로 억제되기 때문으로 생각된다.

이상의 결과로부터 遠志 추출물은 NMDA의 흥분성 아미노산에 의한 신경세포손상을 효과적으로 억제하며, 이러한 억제작용은 각 수용체와 공역된

양이온 채널의 활성을 억제함으로써 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가를 일차적으로 억제하고, 이어서 ROS의 생성, 그리고 glutamate의 유리를 억제함으로써 나타나는 것으로 생각된다. 이러한 본 연구의 결과는 여러 가지의 신경퇴행성 질환의 병태생리학적 상황에서 나타나는 신경세포파괴에 遠志가 효과적인 보호효과를 나타낼 가능성을 시사하는 것이다.

결론

遠志 메탄올 추출물이 배양된 흰쥐 신경세포 내에 NMDA에 의한 神經細胞死에 대한 보호효과를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 遠志 추출물은 0.05-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 범위에서 NMDA에 의해 유도된 神經細胞死의 증가를 유의적으로 억제하였으며, NMDA 수용체 길항물질인 MK-801를 처리한 경우 NMDA에 의해 유도된 神經細胞死에 대하여 억제 효과가 있었다.
2. NMDA에 의해 유도된 칼슘 증가에 대하여 遠志 추출물 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리 시에는 $[Ca^{2+}]_i$ 증가에 대하여 지속적이고 유의성있는 억제를 나타내었다. MK-801 (10 μM) 처리 시에는 모든 관찰 시간에서 $[Ca^{2+}]_i$ 가 증가하지 않았다.
3. 遠志 추출물은 NMDA에 의해 유도된 glutamate의 방출량을 유의성 있게 억제하였다. MK-801도 역시 NMDA에 의해 유도된 glutamate의 증가를 억제하였다.
4. 遠志 추출물은 NMDA에 의해 유도된 ROS 생성의 증가를 유의성 있게 억제하였다. MK-801도 역시 NMDA에 의해 유도된 ROS 생성의 증가를 억제하였다.

이상의 결과에서 遠志는 신경퇴행성질환의 병태생리학적 상황에서 나타나는 神經細胞死에 효과적인 보호효과를 나타낼 가능성을 시사하고 있다.

참고문헌

1. 지형준, 이상인, 안덕균, 이경순, 이숙연, 이영중. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해 제2개정.

- 서울:한국메디칼인텍스사. 1998:473-4.
2. 吳普. 神農本草經. 서울:翰林社. 1976:19.
 3. 김호철. 한약약리학. 서울: 집문당. 2001:379-81.
 4. 김진숙, 박진서, 김기영, 도상학. 원지뿌리의 성분 연구. 생약학회지. 1999;30(4):417-9.
 5. 박만기, 박정일, 김보연, 김종문, 임경진, 한병훈. HPLC에 의한 遠志 중 알칼로이드 성분의 정량. Analytical Science & Technology. 1993;6(3):255-9.
 6. Jiang Y, Tu PF. Xanthone O-glycosides from *Polygala tenuifolia*. Phytochemistry. 2002;60:813-6.
 7. Ikeya Y, Sugama K, Okada M, Mitsuhashi H. Two Xanthones From *Polygala tenuifolia*. Phytochemistry. 1991;30(6):2061-5.
 8. Fujita T, Liu DY, Ueda S, Takeda Y. Xanthones From *Polygala tenuifolia*. Phytochemistry. 1992;31(11):3997-4000.
 9. 李棟熙. 遠志의 安神作用에 對한 藥理的 分析의 研究. 大韓本草學會誌. 1997;12(1):1-6.
 10. 朴大圭, 二琬夏. 遠志 Saponin의 利尿效果 및 中樞抑制作用. 생약학회지. 1983;14(4):178-92.
 11. 황시영, 강형원, 류영수. 遠志에 의한 腦 性狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果. 동의신경정신과 학회지. 1999;10(1):95-108.
 12. 이선희, 우순자, 구영조, 신현경. 遠志, 양파 및 遠志가 흰쥐의 장내환경에 미치는 영향. Korean J Food Sci Technol. 1995;37(4):598-604.
 13. Chung IW, Moore NA, Oh WK, O'neill MF, Ahn JS, Park JB, Kang UG, Kim YS. Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 2002;71:191-5.
 14. Kim HM, Lee EH, Na HJ, Lee SB, Shin TY, Lyu YS, Kim NS, Nomura S. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on the tumor necrosis factor- α secretion from mouse astrocytes. Journal of Ethnopharmacology. 1998;61:201-8.
 15. Takayuki N, Yujiro S, Hiroaki K, Eizaburo S, Toshio K, Takashi N, Yukari H, Shin-ichi T, Takeshi Y, Chikara A, Haruki Y. Onjisaponins, from the root of *Polygala tenuifolia* Willdenow, as effective adjuvants for nasal influenza and

- diphtheria-pertussis-tetanus vaccines. *Vaccine*. 2001;19:4824-34.
16. Di Chiara GD, Gossa GL. Glutamate as a neurotransmitter. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1981;27:1-445.
 17. Olverman HJ, Jones AW, Watkins JC. [³H]D-2-Amino-5-phosphonopentaoate as a ligand for N-methyl-D-aspartate receptors in the mammalian central nervous system. *Neuroscience*. 1988;26:1-15.
 18. Bresnick GH. Excitotoxins: a possible new mechanism for the pathogenesis of ischemic retinal damage. *Arch Ophthalmol.*, 1989;107: 339-41.
 19. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Engl J Med*. 1994; 330:613-22.
 20. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron*. 1988;1:623-34.
 21. Choi DW. Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J Neurosci*. 1990;10:2493-501.
 22. Patrick PM, Ho IK. Cell culture in neurotoxicology in : Principle Methods of Toxicology 3rd edition (A Wallace Hayes, ed). New York, Raven Press Ltd. 1316-24.
 23. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55.
 24. Tsien RY. *Methods in Cell Biology*. Academic Press, San Diego. 1989:127.
 25. Ellison DW, Beal MF, Martin JB. Amino acid neurotransmitters in postmortem human brain analyzed by high performance liquid chromatography with electro-chemical detection. *J Neurosci*. 1987;19:305-315.
 26. Gunasekar PG, Sun PW, Kanthasamy AG, Borowitz JL, Isom GE. Cyanide-induced neurotoxicity involves nitric oxide and reactive oxygen species generation after N-Methyl-D-aspartate receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;277:150-5.
 27. 蘇頌 撰. 圖經本草. 福建:龍源出版公司. 1988: 79-81.
 28. 李時珍. 本草綱目. 서울:高文社. 1975:435-6.
 29. 全國韓醫科大學 本草學教授共編. 本草學. 서울: 永林社. 1991:496-7.
 30. Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*. 1987;7:357-68.
 31. Coyle JT, Schwarcz R. Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature(Lond.)*. 1976;263: 244-6.
 32. Kashii S, Takashi M, Mandai M, Shimizu H, Honda Y, Sasa M, Ujihara H, Tamura Y, Yokota T, Akaike A. Protective action of dopamine against glutamate neurotoxicity in the retina. *Invest. Ophth Vis Sci*. 1994;35: 685-95.
 33. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993;262:689-94.
 34. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem*. 1984;43:1369-74.
 35. McCaslin PP, Smith TG. Quisqualate, high calcium concentration and zero-chloride prevent kainate-induced toxicity of cerebellar granule cells. *Eur J Pharmacol*. 1988;152:341-6.
 36. Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*. 2000;80:315-60.
 37. Bondy SC, Lee DK. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Res*. 1993;610:229-33.
 38. Giusti P, Franceschini D, Petrone D, Manev H, Floreani M. *In vitro* and *in vivo* protection against kainate-induced excitotoxicity by melatonin. *J Pineal Res*. 1996;20:226-31.
 39. Duffy S, MacViar BA. *In vitro* ischemia promotes calcium influx and intracellular calcium release in hippocampal astrocytes. *J Neurosci*. 1996;16:71-81.