

豨薟이 NMDA로 유발된 신경세포 손상에 미치는 효과

李仁#, 成洛成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 Siegesbeckiae Herba on Neurotoxicity Induced by N-methyl-D-aspartic acid(NMDA)

In Lee#, Nak-Sull Seong¹, Young-Jong Lee*

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 : Siegesbeckiae Herba's effect on the protection of nerve cells was tested, and the effects were compared between *Siegesbeckia glabrescens* Makino, the state of which is spica imported from China, and original Korean leaves of it.

Methods : After damaging nerve cells by exposing them on NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) and KA(kainic acid), Siegesbeckiae Herba's effect on cell death, inhibition rate, glutamate separation, and ROS(reactive oxygen species) production were examined.

Results : 1. Siegesbeckiae Herba inhibited the cell death exposed to NMDA.

2. Siegesbeckiae Herba inhibited the amount of glutamate separated from nerve cells exposed to NMDA.

3. Siegesbeckiae Herba inhibited the production of ROS induced by NMDA.

4. Siegesbeckiae Herba did not inhibit the cell death exposed to KA.

5. Chinese Siegesbeckiae Spica had no inhibition effect on cell death.

Conclusions : Siegesbeckiae Herba was effective in inhibiting the death of nerve cells exposed to NMDA, and in protecting nerve cells from various damages in nerve cell diseases. Because Chinese Siegesbeckiae Spica did not show such effects, it is necessary to closely examine those effects according to the used parts.

Key words : Siegesbeckiae Herba, *Siegesbeckia glabrescens* Makino, nerve cells, cell death.

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

제1저자 : 이 인, 경원대학교 한의과대학 본초학교실

· 접수 : 2005년 10월 25일 · 수정 : 2005년 12월 16일 · 채택 : 2005년 12월 20일

서 론

豨薺는 新修本草 草部¹⁾에 “豨薺, 味苦寒 有小毒. 主熱蠱煩滿, 不能食. 生搗汁, 服三四合, 多則令人吐.”라고 처음 기재된 이후 祛風濕, 通經絡, 清熱解毒의 효능이 있어서 風濕痺痛, 筋骨不利, 腰膝無力, 半身不遂, 高血壓, 瘧疾, 黃疸, 癰腫瘡毒, 風疹濕瘡, 蟲獸咬傷 등을 치료하는데 상용되고 있다²⁾.

豨薺의 기원은 대한약전의한약규격집³⁾에 국화과 (Compositae)에 속하는 털진득찰 *Siegesbeckia pubescens* Makino 또는 진득찰 *S. glabrescens* Makino의 지상부분으로 되어 있고, 중국약전⁴⁾에는 豨薺(제주진득찰) *S. orientalis* L., 腺梗豨薺(털진득찰) *S. pubescens* Makino 혹은 毛梗豨薺(진득찰) *S. glabrescens* Makino의 지상부를 건조하여 사용한다고 되어 있다.

豨薺에 관한 연구로 성분에 대해서는 Kim 등⁵⁾, 金⁶⁾, 韓 등⁷⁾이 *S. pubescens* Makino에서 diterpenoids 구조를 밝혔고, 김 등⁸⁾은 *S. pubescens* Makino에서 L₁₂₁₀ cell에 대해 세포독성이 있는 pubetalin을 분리하였고, Guo 등⁹⁾과 Xiang 등¹⁰⁾은 *S. orientalis* L.에서 diterpenoids에 대한 보고를 하였다. 이밖에도 중국에서는 傅 등¹¹⁾과 王 등¹²⁾이 *S. orientalis*에서 35종, *S. glabrescens*에서 7종, *S. pubescens*에서 17종의 성분을 분리하였다고 보고하였다. 생리활성에 대해서는 이 등¹³⁾이 *S. pubescens* Makino에서 분리된 compound B[16,17-dihydroxy-16-β(-)-kaurane-19-oic acid]가 혈압강하 및 심박수 감소효과가 있음을 보고하였고, 김 등¹⁴⁾이 酒蒸豨薺이 혈관이완효과가 있으며 그것이 혈관내피세포와 관련이 있음을 보고하였고, 신¹⁵⁾은 酒蒸豨薺의 혈관이완효과가 α-adrenalin 수용체 차단이나 전압-의존성 칼슘통로(voltage-operated Ca⁺⁺ channel)의 차단에 의한 것이 아니라 豨薺의 항산화작용이 ROS(reactive oxygen radical)의 특성이 있음을 보고하였고, 김 등¹⁶⁾과 소¹⁷⁾는 酒蒸豨薺이 실험적 高脂血症과 endotoxin으로 유발된 흰쥐의 血栓에 있어 脂質의 감소 및 血栓억제 효능이 있음을 보고하였으며, 柯 등¹⁸⁾은 家兔에 豨薺를 투여하여 眼壓이 하강되었다고 보고한 바와 같이, 주로 심혈관계 효능에 대한 보고가 주류를 이루고 있다. 이 밖에 면역계에 관한 보고¹⁹⁾, 류마티스성 관절질환에 대한 消炎 및 鎮痛작용²⁰⁾과 抗菌작용²¹⁾ 등이 보고되었다.

이와같은 豨薺에 대한 실험적 연구는 豨薺이 임상

에서 祛風濕, 通經絡, 清熱解毒의 효능으로 風濕痺痛, 半身不遂, 高血壓 등을 치료하는데 상용되고 있는 것과 연관지을 수 있는데, 중풍 및 관절염으로 인한 四肢麻痺, 頭風, 筋骨疼痛 등에도 사용할 수 있다는 것은 豨薺이 신경세포의 작용이나 손상된 세포의 회복 등에도 효능이 있을 것임을 시사하므로, 신경세포에 대한 豨薺의 유용성을 검사할 필요가 있다고 생각되었다. 신경세포의 이상은 뇌졸중, 심장질환, 종양 등에 의한 허혈성 뇌손상 등에서 알려져 있고, 이러한 질환들에서 나타나는 신경세포사멸의 일차적인 요인은 glutamate의 다량유리에 의한 독성작용이며, Alzheimer disease, Parkinson disease, Huntington disease 등 다른 퇴행성 뇌질환의 진행에도 glutamate의 다량 유리에 따른 세포손상이 수반한다고 보고된 바 있다²²⁾.

한편 최²³⁾는 국내외에 유통되는 豨薺類 한약재를 수집하여 TLC 분석 및 유전자 분석을 통하여 豨薺의 부위에 따른 TLC pattern을 분석한 결과, 국내산 털진득찰 *S. pubescens* Makino 또는 진득찰 *S. glabrescens* Makino과 주로 花穗 상태로 유통되는 중국산 豨薺이 뚜렷한 차이가 있음을 보고하였는데, 이는 豨薺의 국내산 털진득찰 또는 진득찰과 중국에서 수입되어 花穗 상태로 유통되는 豨薺는 서로 효능면에서도 차이가 있을 수 있으므로 이를 비교할 필요성이 있다.

그러므로 본 연구에서는 국내산 진득찰 *S. glabrescens* Makino과 중국산 豨薺를 시료로 하여, 豨薺이 신경세포 사멸(cell death)을 완화시키거나 예방할 수 있는지를 검사하고자, NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) 및 KA(kainic acid)에 노출시키는 방법으로, 신경세포사멸 억제율, glutamate 유리량 및 reactive oxygen species (ROS) 생성량 등에 대한 豨薺의 영향을 검사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 약재

실험에 사용한 豨薺(진득찰) *Siegesbeckia glabrescens* Makino는 농촌진흥청 작물과학원 약용식물원에서 보존 재배한 것을 2003년 10월에 잎을 채취하여 음건하였고, 중국산 豨薺는 중국으로부터 수입되어 花穗 상태로 유통되는 것을 경동시장에서 구

입하였다.

2) 동물

In vitro 실험에는 임신한 흰쥐(SPF급, DaeHan Biolink Co. Ltd, Eumsung, Chungbuk)를 구입하여 아크릴 케이지에서, 온도(22±2℃), 명암(12시간 light/dark)이 조절되는 동물실에서 사육하면서 물과 사료는 자유로이 공급하였다. 매일 관찰하여 출산 후 7~8일째의 어린 쥐를 실험에 사용하였다.

3) 시약 및 기기

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tertzolium 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), cytosine1-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, 95R,10S)-(+)-5,10-imine (MK-801) 및 kainic acid (KA), 6,7- dinitroquinoxaline-2-,3-dione (DNQX)는 RBI (Natick, MA, USA), 2,7-Dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF-DA)는 Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA), fetal bovine serum(FBS)은 Gibco (Logan, Utah, USA)로부터 구입하였다. 그 외에 사용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

MTT assay 에는 microplate reader (Bio-Tek EL_x808, Vermont, USA)를, apoptosis 측정에는 UV illumination using a fluorescence microscope (Olympus IX70-FL, Tokyo, Japan)를 사용하였으며 glutamate 측정에는 high performance liquid chromatograph (HPLC) with an electrochemical detector (ECD) (BAS MF series, Indiana, USA)를, ROS 측정은 confocal scanning laser microscope (Bio-rad, MRC1021ES, Maylands, England)를 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료의 製造

건조된猕獾으로 ASE(Accelerated Solvent Extrctor : 가속용매추출장치)를 이용하여 추출온도 5

0℃, 추출시간은 5 분씩 3 회, 추출압력은 1500 psi에서 1 차 추출액을 얻고, 다시 건조시료 중량의 5 배량의 100% 메탄올을 넣은 후, 환류냉각추출장치를 이용하여 50℃에서 2 시간 추출하고 여과하여 2 차 추출액을 얻은 다음, 1 차 추출액과 2 차 추출액을 혼합하여 감압농축장치를 이용하여 용매를 제거 후 추출물을 얻었다. 얻어진 추출물은 국내산 건조시료 100 g에서 10.3 g, 중국산 건조시료 100 g에서 9.7 g 이었다.

2) 신경세포의 1 차 배양

① 배양액의 조제 : 다음과 같이 3 가지의 배양액을 준비하여 신경세포를 배양하였다.

Medium I : 5.4 g의 Joklik-modified Eagle's medium을 450 mL의 멸균중류수에 녹이고, 200 mM HEPES를 50. mL 가한 후 0.1 N NaOH에 의하여 pH를 7.4로 조정한 다음, micro-membrane filter(0.2 μm)를 사용하여 여과하여서 멸균하였다.

Medium II : 6.14 g의 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)을 500 mL의 멸균중류수에 녹이고, 36 mM NaHCO₃를 가하여 pH를 7.4로 조절하였다. 이 용액에 CaCl₂ (2.3 mM), MgCl₂ (1.0 mM), KCl (5.0 mM), fetal bovine serum (10%), penicillin (40 U/mL), gentamycin (50 μg/mL) 등을 첨가한 다음, micro-membrane filter (0.2 μm)를 사용하여 여과멸균하였다.

Medium III : Medium II의 조성중 KCl의 농도를 15 mM로 조정하며, fetal bovine serum의 농도를 5%로 조절하여 조제하였으며, 나머지는 Medium II와 동일하게 준비하였다.

② 신경세포의 배양 : 임신 16일째의 흰쥐를 ethyl ether로 마취시킨 후 태아를 꺼내어 70% ethanol에 소독하였다. 태아의 뇌로부터 대뇌피질 부분만을 분리하였다. 분리된 대뇌피질을 trypsin (0.25 mg/mL)을 함유하는 medium I 에 넣고, 5 mL pipette으로 5-6 번 가볍게 pipetting하여 기계적 분산을 하였으며, 이를 37℃에서 10 분간 incubation 하였다. 세포현탁액을 1,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 얻은 세포를 함유하는 침전층에 medium II를 가하고 pipette을 하여 세포를 분산시켰으며, 세포농도를 2x10⁶ cells/mL로 조정하여 nylon mesh (35 μm)를 통과시킨 다음, 미리 poly-L-lysine으로 coating한 12 well plate (세포사멸 및 glutamate 유리량 측정), 또는 coverslips (ROS 측정)에 분주하였다. 37℃, 5% CO₂/95% air를 유지하는 조건의 CO₂ incubator에서 배양하였고, 이

를 배양후 배양용 배지는 medium III로 교환하였으며, 이후 3 일에 한 번씩 배지를 교환하며 5-6일간 배양된 신경세포를 실험에 사용하였다.

3) 신경세포의 NMDA에 대한 노출

신경세포가 배양된 배지에서 배양용 배지를 제거하고, HEPES buffer (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 8.6 mM HEPES, pH 7.4)로 3 번 세척한 다음, 동일한 buffer를 가하여 30 분간 incubation 하고, 다시 NMDA (1 mM)를 가한 후 12 시간 더 incubation하여 NMDA에 노출시켰다. 이 때, 시료(한약추출물)의 효능을 검사하기 위해서는 NMDA를 가하기 15 분전에 시료를 각 well에 첨가하였으며, NMDA receptor antagonist인 MK-801(10 µM)도 같은 방법으로 처리하였다.

세포사멸(cell death)은 MTT assay 법으로 측정하였으며, Hoechst 33342 염색법으로 apoptosis를 확인하거나 배지중으로 유리된 glutamate량을 측정하여 확인하였다.

NMDA와 MK801은 HEPES buffer로 용해하여 사용하였으며, 시료추출물은 absolute ethanol로 50 mg/mL의 농도로 용해한 후, HEPES buffer로 희석하여 사용하였고, 신경세포에 노출시키는 ethanol의 농도는 0.1% 이하를 사용하여 세포에 전혀 손상이 일어나지 않도록 하였다.

4) 세포사멸(cell death)의 측정

① MTT assay : MTT assay는 살아 있는 세포내에서 노란색의 수용성 기질인 MTT를 청색의 formazan으로 전환시키는 mitochondrial dehydrogenase의 활성 능력을 근거로 하며²⁴⁾, 생성되는 formazan의 양은 살아있는 세포의 수와 비례한다. MTT를 PBS (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free phosphate buffered saline)에 5 mg/mL의 농도로 녹여 stock solution으로 준비하였으며, 사용시에 serum-free DMEM으로 10 배 희석하여 사용하였다. 배양세포의 배양용 배지를 제거하고, HEPES buffer (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂, glucose mM, 8.6 mM HEPES, pH 7.4)로 3 번 세척하였다. 다시 동일한 buffer로 30 분간 incubation하고, NMDA (1 mM)를 가한 후 12 시간 더 incubation하였다. 시료추출물 및 NMDA receptor antagonist인 MK-801(10 µM)은 NMDA를 가하기 15 분전에 각 well에 첨가하였다. 이와 같이 신경세포를 NMDA와 함께 incubation한 후, NMDA

를 함유하는 HEPES buffer를 제거하고, MTT용액 200 µl를 가하여 4 시간동안 37°C에서 배양하였다. 배양후에 MTT용액을 제거하고 200 µL의 acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)을 모든 well에 가하고 부드럽게 혼화하면서 형성된 진한 푸른색의 formazan결정을 용해시켰다. Well내의 모든 용액을 96 well plate의 각 well에 옮기고, ELISA Reader를 사용하여 파장 570 nm(참조파장 630 nm)에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 isopropanol을 첨가한 후 1 시간 이내에 실시하였고, 흡광도는 NMDA등을 처리하지 않은 well의 흡광도를 100%로 기준하여 측정하였다.

② Hoechst 33342 staining : 세포막의 투과성의 변화를 일으키지 않고, 세포막내로 침투하여 DNA를 염색하는 bis-benzimidazole dye인 Hoechst 33342를 이용하였다. 정상세포와는 달리, apoptosis를 일으킨 세포의 핵은 chromatin이 응축되면서 Hoechst 33342에 의하여 밝게 염색되며, 이 형태학적 변화를 형광현미경으로 관찰하였다. Coverslips에서 자란 세포배양조에서 배지를 제거하고, HEPES buffer로 3 번 세척한 다음, 같은 buffer를 가하여 30 분간 incubation하였으며, incubation 후 NMDA (1 mM)를 가하여 12 시간 더 incubation하였다. 시료추출물 및 NMDA receptor antagonist인 MK-801(10 µM)은 NMDA를 가하기 15 분전에 각 well에 첨가하였다. 이와 같이 신경세포를 NMDA와 함께 incubation한 후, 4% paraformaldehyde를 사용하여 실온에서 20 분 동안 고정하였으며, HEPES buffer에 1 µg/ml의 농도로 녹인 Hoechst 33342를 가하여 15 분 동안 염색하였다. 형태학적 변화는 형광현미경의 UV illumination에 의하여 excitation 340 nm, emission 510 nm의 barrier filter로 검경하였다. 사진을 촬영함과 동시에 정상 DNA를 가진 세포와 fragmented 또는 condensed DNA를 가진 세포의 수를 측정하고, 전체 세포에 대한 apoptosis성 세포의 비율을 계산하였다.

5) Glutamate 유리량의 측정

배양된 세포용액에서 배양용 배지를 제거하고, HEPES buffer로 3 번 세척한 다음, 동일한 buffer로 30 분간 incubation 하였으며, NMDA (1 mM)를 가한 후 6 시간 더 incubation 하였다. 시료추출물 및 NMDA receptor antagonist인 MK-801(10 µM)은 NMDA를 가하기 15 분전에 각 well에 첨가하였다. 이와 같이 신경세포를 NMDA와 함께 incubation한 후, 배지를 포집하여 배지 중으로 유리되어 나온

glutamate의 양을 electrochemical detector (ECD)가 장착된 HPLC에 의하여 측정하였다. 포집 sample용액 60 μ L에 20 μ L의 OPA/2-ME용액을 가하여 혼화하여 precolumn derivatization을 형성시킨후 이를 HPLC에 injection하였으며, HPLC의 분석조건은 다음과 같았다.

Liquid chromatography : BAS model 200

Mobile phase : 37% methanol, 0.1 M sodium phosphate, pH 5.15

Stationary phase : WATERS Spherisorb[®] column (particle size, 5 μ m : 4.6 x 100 nm)

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 기 농도(0, 2.5, 5, 10 μ M)의 표준액을 동일조건인 HPLC로 분석하여 그 retention time을 측정하고, 각 농도에 따른 peak area를 기준으로 하여 sample중의 아미노산의 농도를 계산하였다.

6) ROS생성량의 측정

H₂DCF-DA의 형광 생성물인 2'7'-dichlorofluorescein (DCF)의 미세 형광분석법을 이용하여 ROS생성량을 측정하였다. Coverslips에 자란 신경세포를 serum-free DMEM으로 3 번 세척하고, 같은 배지를 가하여 30 분간 적용시킨 다음, NMDA (1 mM)를 가하여 3 시간 더 incubation하였다. 시료추출물 및 NMDA receptor antagonist인 MK-801(10 μ M)은 NMDA를 가하기 15분전에 각 well에 첨가하였다. 이와 같이 신경세포를 NMDA와 함께 incubation 할 때 incubation의 마지막 10 분 동안 5 μ M H₂DCFDA (in DMSO)를 첨가하여 발색시켰다. 세포를 HEPES buffer로 세척한 후에, coverslip을 confocal microscope stage에 장착하고, 488 nm의 excitation, 510 nm의 emission filter를 사용하는 confocal scanning laser microscope (Bio-rad, MRC1021ES, Maylands, UK)를 사용하여 세포를 이미지화하였다. 한 coverslip당 5-6 개소의 이미지를 포착한 다음, 각 field의 세포내에서 측정되는 평균 pixel 형광강도를 DCF 형광의 상대적 단위로서 표시하였다. 각 세포당 평균 형광강도의 값은 image 분석 software를 사용하여 계산하였다.

7) 통계분석

실험군별 상호비교를 위한 평균치는 평균 \pm 표준

오차(Mean \pm Standard Error)로 산출하였다. 실험군 간의 유의성 검증은 Student's *t*-test 분석방법을 이용하여 결정하였으며 *p*<0.05 인 경우에 그 有意성을 인정하였다.

결 과

1. NMDA유도 신경 세포사멸에 대한 효과

1) MTT assay 법에 의한 효과

NMDA에 의한 신경 세포사멸을 검사하기 위한 방법으로 MTT assay를 이용하여 측정하였으며, 동일한 반응을 4 회 이상 측정하여 통계처리하였다. 준비된 신경세포를 1 mM NMDA에 12시간 노출시킨 대조군(Control) 세포의 MTT 환원율은 정상군(Normal)에 비하여 81.4 \pm 1.7%로 현저하게 감소하였다 (*p*<0.01). 獐蕨 추출물 1 μ g/mL를 NMDA와 함께 첨가하였을 때(SG 1 μ g)의 MTT 환원율은 85.8 \pm 4.8%, 獐蕨 추출물 10 μ g/mL 을 NMDA와 함께 첨가하였을 때(SG 10 μ g)의 MTT 환원율은 95.1 \pm 2.7%, NMDA receptor의 길항제(antagonist)인 MK-801을 10 μ M 농도로 첨가하여 NMDA의 작용을 억제한 (MK 10 μ M) 경우의 MTT 환원율은 99.9 \pm 2.5% 였다. 대조군과 비교하였을 때, 獐蕨 추출물 10 μ g을 첨가한 경우에는 MTT 환원율이 현저하게 증가하여 (*p*<0.01) 獐蕨 추출물은 신경세포사멸을 억제하였다 (Fig. 1).

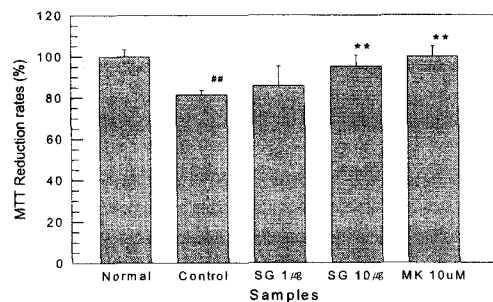


Fig. 1 Inhibitory effect of *S. glabrescens*(SG) on NMDA-induced cell death in cultured neuronal cells. Normal group was not treated with NMDA, and the other groups were treated with NMDA(1 mM) for 12 hrs. The rates of neuronal cell death were determined by the method of MTT assay. The absorbance of non-treated cells was regarded as 100%. Results are expressed as Mean \pm SE values of the data obtained from four independent experiments.

Control : treated with NMDA(1 mM) for 12 hrs
 SG : treated with NMDA, and the SG-extracts was also added
 MK 10uM : MK-801 was added with NMDA-treatment
 ** $p < 0.01$ significantly different from control group.
 # $p < 0.05$ significantly different from normal group.

한편, 중국산 豨薟 추출물(cSS)을 동일한 방법으로 검사한 결과, 정상군의 MTT환원률은 $100.3 \pm 2.0\%$, 대조군은 MTT환원률이 $79.1 \pm 2.6\%$, 중국산 豨薟 추출물 1 μg 투여군(cSS 1 μg)은 $84.5 \pm 1.5\%$, 중국산 豨薟 추출물 10 μg 투여군(cSS 10 μg)은 $85.8 \pm 2.3\%$, 그리고 MK-801 (10 μM)을 함께 첨가한 경우 MTT 환원률은 $99.9 \pm 2.5\%$ 였다. 중국산 豨薟 추출물을 투여한 경우에는 대조군과 비교하여 MTT 환원률이 다소 증가하는 경향성은 보였으나, 유의한 정도는 아니었으며, 이는 중국산 豨薟 추출물이 NMDA로 유발되는 신경 세포사멸을 억제하는 활성이 거의 없음을 의미하였다(Fig. 2).

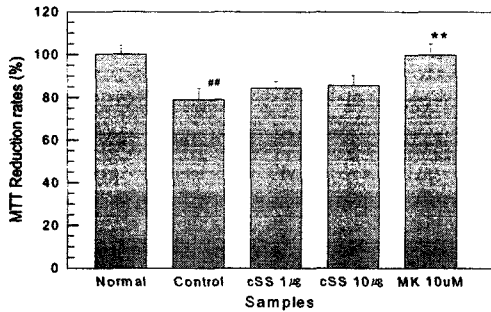


Fig. 2 The effect of cSS(Siegesbeckiae Spica from China) on NMDA- induced cell death in cultured neuronal cells. Normal group was not treated with NMDA, and the other groups were treated with NMDA(1 mM) for 12 hrs. The rates of neuronal cell death were determined by the method of MTT assay. Results are expressed as Mean±SE values of the data obtained from four independent experiments. Control : treated with NMDA(1 mM) for 12 hrs
 cSS : treated with NMDA, and the cSS-extract was also added
 MK 10uM : MK-801 was added with NMDA-treatment
 ** $p < 0.01$ significantly different from control group.
 # $p < 0.01$ significantly different from normal group.

2) Hoechst 33342 염색법에 의한 효과

NMDA유도 신경 세포사멸에 대한 豨薟 추출물의 억제효과를 보다 확실하게 확인하기 위하여, Hoechst 33342 염색법을 이용하여 신경 세포가 죽는 정도를 현미경으로 관찰한 결과, NMDA를 처리하지 않은 정상군(Control)에서는 배양된 신경세포가 Hoechst

33342 염색 후에 어두운 정상핵의 모습을 보인데 비하여, NMDA를 처리한 경우에는 염색체가 응축된 모습(chromatin condensation)과 핵물질이 분해된 파편(nuclear fragmentation)들이 Hoechst 33342으로 염색되어 밝게 빛나는 형태로 관찰되었다. 또한 정상군의 신경세포들이 둥근 형태를 온전하게 유지하는데 비하여, NMDA가 처리된 경우에는 세포의 형태가 찌그러져 있었으며 그 크기도 정상군에 비하여 작은 편이었다. NMDA와 함께 豨薟 추출물 또는 MK801 (NMDA receptor antagonist)을 첨가한 경우에는 첨가되는 豨薟 추출물의 양이 증가함에 따라 손상되는 신경세포의 개수 및 형광의 밝기가 감소되었다(Fig. 3).

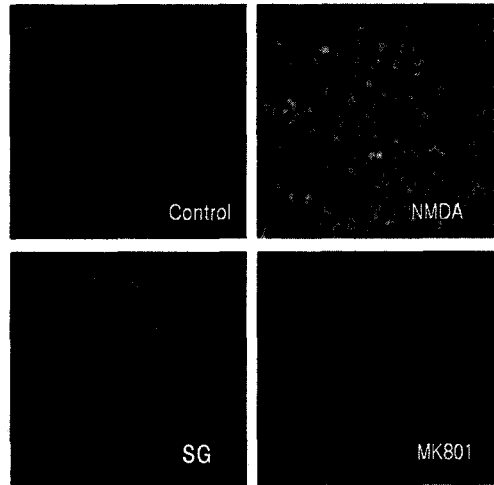


Fig. 3 Morphological evaluation of nuclear chromatin in cultured neuronal cells with the DNA-binding fluorochrom Hoechst 33342.

Control : normal cells : not-treated with NMDA
 NMDA : cells treated with NMDA(1 mM) for 12 hrs.
 SG : treated with NMDA, and the SG-extracts were also added
 MK801 : MK-801 was added by 10 μM with NMDA-treatment

Hoechst 33342 염색법으로 豨薟 추출물이 NMDA에 유발되는 신경 세포사멸을 억제하는 비율은 하나의 배양 well에서 5 부위씩 살아있는 세포와 죽은 세포를 검경하여 죽은 세포의 빈도(%)를 측정하였으며, 한 실험군당 4 well 씩을 측정하여 통계처리한 결과, 죽은 신경세포의 비율은 정상군이 $4.8 \pm 0.8\%$, NMDA를 처리한 대조군이 $20.0 \pm 1.3\%$, 豨薟 추출물 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 $14.1 \pm 0.9\%$, 豨薟 추출물 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은

7.3±0.8%, 그리고 NMDA receptor antagonist인 MK-801(10 μM)을 처리한 실험군의 죽은 세포비율은 7.3±1.1% 였다. 정상군과 비교하였을 때 NMDA가 처리된 대조군의 죽은 세포수는 현저하게 증가하였다 ($p<0.01$). NMDA가 처리와 함께 獐蕪 추출물을 1 μg/mL 또는 10 μg/mL의 농도로 첨가한 경우에는 두 경우 모두 대조군에 비하여 죽은 신경세포의 수가 현저하게 감소하였으며($p<0.01$), 獐蕪 10 μg/mL 첨가의 경우에는 NMDA 길항제인 MK801을 첨가한 경우와 그 효과가 비슷하였다(Fig. 4).

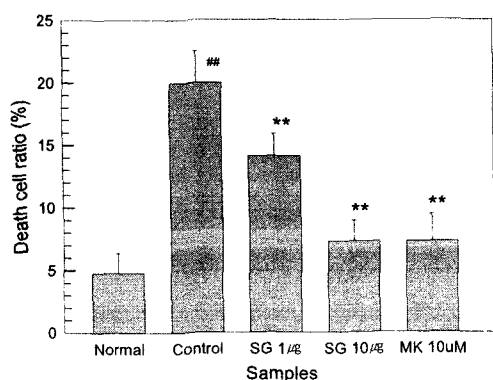


Fig. 4 Effects of *S. glabrescens*(SG) on NMDA-induced cell death in cultured neuronal cells. Normal group was not treated with NMDA, and the other groups were treated with NMDA(1 mM) for 12 hrs. The neuronal cell death was examined by the method of Hoechst 33342 staining, and the death rates was calculated based on four independent experiments.

Control : treated with NMDA(1 mM) for 12 hrs

SG : treated with NMDA, and the SG-extracts was also added

MK 10uM : MK-801 was added with NMDA-treatment

** $p<0.01$ significantly different from control group.

$p<0.01$ significantly different from normal group.

2. NMDA 유도 glutamate유리 증가에 대한 억제 효과

NMDA는 신경세포의 표면에 있는 NMDA 수용체에 결합함으로써 세포막에서 진행되는 Ca^{2+} 이온 등의 물질이동에 이상을 유발하고, 그 여파로 다량의 glutamate가 세포외로 유리되어 세포손상을 일으키게 된다. 이 과정에 獐蕪 추출물이 작용하는지를 검증하기 위하여, NMDA와 獐蕪 추출물을 동시에 첨가하여 유리되는 glutamate의 양을 측정할 결과, 6 시간 배

양후 배지중으로 유리된 glutamate의 양은 정상군이 0.39 ± 0.09 μM이었으며, NMDA를 처리한 대조군은 1.26 ± 0.18 μM로 현저하게 증가하였다($p<0.01$). NMDA를 처리하면서 獐蕪 추출물 1 μg/mL을 처리한 경우 유리된 glutamate 양은 0.60 ± 0.12 μM로 대조군에 비하여 유의하게 감소되었으며($p<0.05$), 獐蕪 추출물 10 μg/mL을 처리한 경우 유리된 glutamate 양은 0.49 ± 0.14 μM로 역시 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다($p<0.05$). 獐蕪 추출물과 NADM 길항제인 MK801(10 μM)을 함께 처리한 경우 0.33 ± 0.03 μM로 NMDA에 의한 glutamate의 유리증가량은 현저히 억제되었다($p<0.01$)(Fig.5).

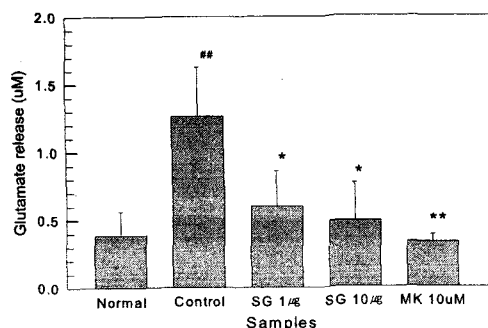


Fig. 5 Inhibitory effects of *S. glabrescens*(SG) on glutamate releasing in the neuronal cells. The glutamate was determined by HPLC with ECD. Normal group was not treated with NMDA, and the other groups were treated with NMDA(1 mM) for 6 hrs.

Control : treated with NMDA(1 mM)

SG : treated with NMDA, and the SG-extracts was also added

MK 10uM : MK-801 was added with NMDA-treatment

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ significantly different from control group.

$p<0.01$ significantly different from normal group.

3. NMDA 유도 ROS의 증가에 대한 억제 효과

세포가 NMDA에 노출되면 세포로부터 glutamate가 유리되며, 유리된 glutamate와 같은 흥분성 아미노산은 그 수용체와 반응하여 흥분시키며, 이에 따라 미토콘드리아의 전자전달계로부터 반응성 산소종(Reactive oxygen species: ROS) 및 nitric oxide(NO) 등의 생성이 촉발된다. 본 연구에서 獐蕪 추출물을 첨가함으로써 NMDA에 의하여 촉발되어 생성되는 ROS의 양이 감소하는지를 알기 위해, 생성된 ROS를 형광염색제인 $H_2DCF-DA$ 을 이용하여 염색하

였으며, laser scanning confocal microscope를 사용하여 형광으로 발현된 ROS를 이미지화하였다. 그 결과 NMDA에 노출되지 않은 정상세포군에 비하여 NMDA (1 mM)에 노출시킨 신경세포는 강한 형광을 발하여, NMDA에 노출됨으로서 ROS 생성이 촉발되었음을 알 수 있었다. 이와는 달리, 신경세포를 NMDA에 노출시킬 때 獐蕪 추출물(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 또는 NMDA receptor의 길항제인 MK-801 (10 μM)을 함께 첨가한 경우에는 배지중에 포함시킨 신경세포에서는 형광발현이 완전히 억제되었다(Fig. 6).

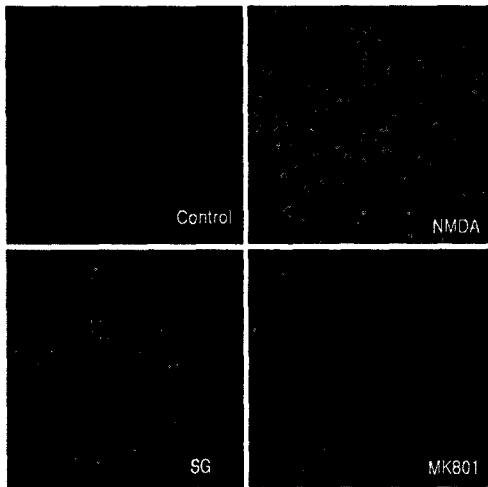


Fig. 6 The neuronal cells were examined by laser scanning confocal microscope. The fluorescence expression of cells was developed by $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ stain.
 Control : normal cells : not-treated with NMDA
 NMDA : cells treated with NMDA(1 mM) for 3 hrs
 SG : SG-extracts was added before NMDA-treatment
 MK801 : MK-801 was added by 10 μM before NMDA-treatment

NMDA에 의하여 생성이 촉발된 신경세포의 반응성 산소종(ROS)을 $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 염색법으로 발현한 형광강도를 측정하는 방법으로, NMDA에 의한 세포독성에 대한 獐蕪 추출물의 영향을 검사하였으며, 하나의 배양 well에서 5 부위씩 살아있는 세포와 죽은 세포를 검경하여 죽은 세포의 빈도(%)를 측정하고, 한 실험군당 4 well 씩을 측정하여 통계처리한 결과, 형광강도는 정상군이 71.4 ± 6.5 였으며, NMDA를 처리한 대조군의 형광강도는 236.0 ± 3.3 으로 정상군에 비하여 현저하게 상승하여($p < 0.01$) 신경세포가 NMDA에 노출됨으로서 약 3 배의 ROS가 생성되었음을 알 수 있었다. 이와는 달리, 신경세포를 NMDA에 노출하기

전에 獐蕪 추출물 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 반응시킨 경우에는 형광강도가 128.5 ± 13.2 , 獐蕪 추출물 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 반응시킨 경우에는 형광강도가 69.1 ± 6.1 , 그리고 NMDA receptor의 길항제(antagonist)인 MK-801(10 μM)과 미리 반응시킨 실험군의 형광강도는 51.5 ± 8.5 였다. 대조군과 비교하였을 때, 전처리된 3 경우는 모두 형광강도가 현저하게 감소되어($p < 0.01$) ROS의 생성이 그만큼 억제되었으며, 또한 전처리된 獐蕪의 양이 증가함에 따라 ROS가 생성되는 양이 상대적으로 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 7).

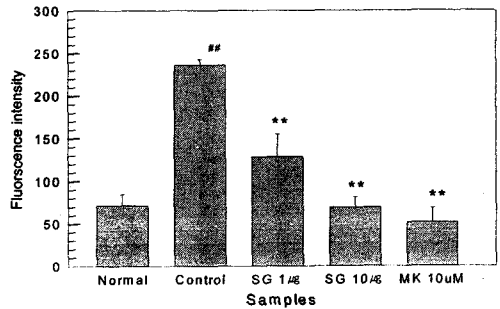


Fig. 7 Inhibitory effects of *S. glabrescens*(SG) on ROS generation induced by NMDA in the neuronal cells. Relative fluorescence intensities was examined, and the intensities represented the amount of ROS produced by the cells.

Normal : not treated with NMDA

Control : treated with NMDA(1 mM)

SG : SG-ext. was added before NMDA-treatment

MK 10 μM : MK-801 was added before NMDA-treatment

** $p < 0.01$ significantly different from control group.

$p < 0.01$ significantly different from normal group.

4. Kainic acid 유도 신경 세포사멸에 대한 효과

신경세포에 존재하는 non-NMDA 수용체에도 獐蕪 추출물 성분이 작용하는지를 검사하기 위하여, 신경세포를 kainic acid(KA ; kinate)에 노출시키는 방법 및 MTT assay를 이용하였고, 동일한 반응을 4 회 측정하여 통계처리한 결과, 신경세포를 KA(500 μM)에 6 시간 노출시켰을 때 대조군(Control) 세포의 MTT 환원율은 정상군(Normal)에 비하여 $60.5 \pm 3.5\%$ 로 현저하게 감소하였다($p < 0.01$). 獐蕪 1 μg 을 KA와 함께 첨가하였을 때(SG 1 μg)의 MTT 환원율은 $59.3 \pm 3.5\%$, 獐蕪 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 KA와 함께 첨가하였을 때(SG 10 μg)의 MTT 환원율은 $60.5 \pm 2.5\%$ 였으며, 두 경우 모두 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다

(Fig. 8).

한편 중국산 稀薺 추출물이 kainic acid(KA) 수용체에 작용하는지를 검사한 결과, 신경세포를 KA(500 μM)에 6시간 노출시켰을 때 대조군(Control)의 세포 MTT 환원율은 정상군(Normal)에 비하여 66.5±3.4%로 현저하게 감소하였다($p < 0.01$). 중국산 稀薺 추출물 1 μg을 KA와 함께 첨가하였을 때(cSS 1 μg)의 MTT 환원율은 65.5±3.2%, 중국산 稀薺 추출물 10 μg/mL을 KA와 함께 첨가하였을 때(cSS 10 μg)의 MTT 환원율은 64.3±1.8%였으며, 두 경우 모두 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 8).

상기한 바와 같이, 稀薺은 non-NMDA 수용체 중의 하나인 kainate 수용체 흥분에 의한 신경세포 독성에는 보호효과를 나타내지 못한다는 것을 확인하였다.

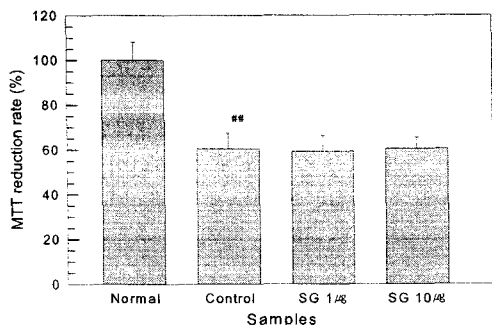


Fig. 8 The effect of SG(*S. glabrescens*) on KA-induced cell death in cultured neuronal cells. Normal group was not treated with KA, and the other groups were treated with KA(0.5 mM) for 6 hrs. The rates of neuronal cell death was determined by the method of MTT assay. Control : treated with KA(0.5 mM) for 6 hrs. SG : SG-extract was added before KA-treatment # $p < 0.01$ significantly different from normal group.

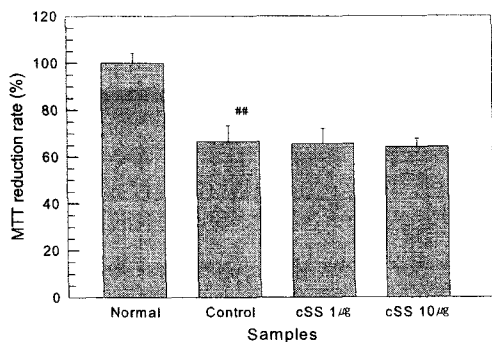


Fig. 9 The effect of cSS(*Siegesbeckiae Spica* from China) on KA-induced cell death in cultured neuronal cells.

Normal group was not treated with KA, and the other groups were treated with KA(0.5 mM) for 6 hrs. The rates of neuronal cell death was determined by the method of MTT assay.

Control : treated with KA(0.5 mM) for 6 hrs

cSS : cSS-extract was added before KA-treatment

8. # $p < 0.01$ significantly different from normal group.

고찰

稀薺은 新修本草 草部¹⁾에 “稀薺, 味苦寒 有小毒. 主熱癰煩滿, 不能食. 生搗汁, 服三四合, 多則令人吐.”라고 처음 기재된 이후 圖經本草²⁵⁾에 “治肝腎風氣, 四肢麻痺, 骨蒸疼, 腰膝無力者, 亦能行大腸氣…… 服之補虛, 安五臟, 生毛髮, 兼主風濕瘡, 肌肉頑痺. 婦人久冷尤宜服用之.”이라 하였고, 陳藏器²⁶⁾는 “主久瘡癢飲, 搗汁服取吐, 搗傅虎傷, 狗咬, 蜘蛛咬”라 하였으며, 현재 임상에서는 肝腎을 補하고 筋骨을 강하게 하는 효능이 있어 四肢麻痺, 腰膝酸軟, 口眼喎斜, 半身不隨 등 증에 적용하고 있고, 아울러 혈압을 降下하고 脂質의 흡수를 阻害하여 고혈압과 冠狀動脈 硬化로 인한 심장질환 치료에 사용되고 있다²⁷⁾.

稀薺의 기원은 韓藥규격집³⁾에 국화과(Compositae)에 속하는 털진득찰 *Siegesbeckia pubescens* Makino 또는 진득찰 *S. glabrescens* Makino 의 지상부분으로 되어 있고, 중국약전¹¹⁾에는 稀薺(제주진득찰) *S. orientalis* L., 腺梗稀薺(털진득찰) *S. pubescens* Makino 혹은 毛梗稀薺(진득찰) *S. glabrescens* Makino의 지상부를 건조하여 사용한다고 되어 있으며, 대만약전²⁸⁾에는 腺梗稀薺(털진득찰) *S. orientalis* L. var. *pubescens* Makino의 말린 전초로 되어 있어 약용부위를 지상부 혹은 전초로 규정하고 있다.

稀薺의 채취시기를 살펴보면 開寶本草²⁹⁾에 “三月四月 採苗葉, 曝乾”이라 하였고, 圖經本草²⁵⁾에 “五月五日, 六月六日, 九月九日 採其葉, 去根, 莖, 花, 實, 淨洗曝乾”이라 하였는데, 이로 미루어 보아 稀薺의 약용부위는 뿌리, 줄기, 꽃, 열매를 제거하고 잎만을 사용하여야 하는 것임을 알 수 있다. 그러나 현재 국내에 유통되고 있는 稀薺은 대부분 중국으로부터 수입되고 있으며, 중국산 수입품 稀薺은 대부분 花穗로 되어 있으므로 韓藥재 품질규격에 대한 검토가 필요한 실정이다. 최²³⁾는 국내외에 유통되는 稀薺類 韓藥재를 수집하여 TLC 분석 및 유전자 분석을 통하여 稀薺의 부위에 따른 TLC pattern을 분석한 결과, 국내산 털진득찰 *S. pubescens* Makino 또는 진득찰 *S. glabrescens* Makino과 주로 花穗 상태로 유통되는

중국산 豨薟이 뚜렷한 차이가 있음을 보고하였는데, 이 역시 豨薟의 국내산 털진득찰 또는 진득찰과 중국에서 수입되어 花穗 상태로 유통되는 豨薟은 서로 효능에서도 차이가 있을 수 있음을 암시하므로 이에 대한 효능을 비교할 필요가 있다.

豨薟의 생리활성에 대해서는 혈압강하¹³⁾, 심박수 감소¹³⁾, 혈관이완¹⁴⁾, 혈중 脂質 감소¹⁶⁾ 및 血栓 억제¹⁷⁾ 등 주로 심혈관계 효능에 대해 보고 되었으며, 이 밖에 면역계에 관한 보고¹⁹⁾, 류마티스성 관절질환에 대한 消炎 및 鎮痛작용²⁰⁾과 抗菌작용²¹⁾ 등이 보고되었다.

이와같이 이미 보고된 豨薟에 대한 실험적 연구를 바탕으로 豨薟이 중풍 및 관절염으로 인한 四肢痲痺, 頭風, 筋骨疼痛 등에 사용할 수 있다는 것은 豨薟이 신경세포의 작용이나 손상된 세포의 회복 등에도 효능이 있을 것임을 시사하므로, 본 연구에서는 신경세포에 대한 豨薟의 유용성을 검사할 필요가 있다고 생각하여 흰쥐 대뇌의 신경세포가 흥분성 아미노산에 의하여 유발되는 신경독성에 豨薟(진득찰) *S. glabrescenes* Makino 메탄을 추출물이 효능이 있는지를 검토하였다.

신경세포의 표면에는 glutamate 등의 흥분성 아미노산의 수용체가 있으며, NMDA 및 KA는 이들 흥분성아미노산의 수용체에 결합하는 agonist 들이다. 신경세포가 NMDA(N-methyl-D-aspartic acid) 및 KA(kainic acid)에 노출되면 NMDA 또는 KA의 수용체는 정상적인 작용에 문제가 유발된다. 즉, 세포막의 Ca^{++} channel이 opening되어 세포내의 Ca^{++} 이온 농도는 높아지며, 높아진 세포내 Ca에 의하여 glutamate 등 흥분성 아미노산 등이 유리된다. 흥분성아미노산이 과도하게 되면 그로 인하여 세포막의 glutamate receptor가 흥분되며, 이는 다시 세포내 Ca^{++} 농도를 더욱 높게 하는 부작용을 야기함으로써 미토콘드리아의 전자전달계로부터 반응성 산소종(ROS)의 생성을 유발하는 동시에 각종 효소의 활성을 촉발하여 미토콘드리아의 손상을 촉발하며, 나아가서 신경 세포사멸(cell death)을 유발한다²⁰⁾. Choi 등²²⁾이 보고한 바와 같이 본 연구에서도 NMDA 및 KA는 신경 세포사멸에 이르게 하는 세포독성을 유발하였으며, NMDA에 의한 세포사멸은 수용체 antagonist인 MK-801에 의하여 유의성있게 감소하였다(Fig. 1 and 8). 이는 NMDA 또는 KA가 NMDA 수용체 또는 KA 수용체를 활성화시킴으로서 신경 세포사멸이 유발될 수 있음을 보여 주었다.

豨薟 메탄추출물(SG)은 NMDA에 의한 신경 세

포사멸을 억제하는 효과를 보였다. MTT 환원율(Fig. 1), Hoechst 33342 염색을 이용한 세포형태관찰(Fig. 4), glutamate 유리량의 억제(Fig. 5), 반응성 산소종(ROS)의 생성억제(Fig. 7) 등의 검사를 통하여 豨薟 메탄추출물은 10 μ g/mL의 농도에서 신경 세포사멸을 억제하는 유의한 효과를 보였다. 이러한 결과로 미루어보아 豨薟은 NMDA에 의한 신경 세포사멸을 억제하는 효능이 있다고 생각된다.

한편, 주로 花穗로 이루어진 중국산 豨薟(cSS) 메탄을 추출물은 NMDA에 의한 신경 세포사멸을 억제하는 효과를 보이지 않았다(Fig. 2).

豨薟은 히스타민 분비억제, IgE 생성저해 등 면역기전에 대한 효능도 있다고 알려져 있고, 이러한 면역기능 조절작용은 豨薟類에 속하는 상기 3種 모두에서 보고된 바 있다¹⁹⁾. 그러므로, NMDA에 의한 신경세포사멸을 억제하는 성분이 豨薟에만 함유되어 있다고 보기는 다소 무리한 점이 있으며, 중국산 豨薟에 효과가 없는 것은 약용부위가 花穗 상태인 까닭으로 추정할 수 있다.

豨薟이 NMDA에 의한 신경세포사멸을 억제하는 효능이 있다는 것은 豨薟에 함유되어 있는 성분이 NMDA에 작용하여 NMDA를 불활성화 시키거나 또는 신경세포에 존재하는 NMDA 수용체에 작용하는 경우를 상정할 수 있다. 본 연구에서 豨薟 메탄을 추출물은 10 μ g/mL의 농도에서도 KA에 의한 신경 세포사멸을 억제하지는 못하였다(Fig. 8 and 9). 이는 豨薟에 함유되어 있는 성분이 신경세포의 표면에 있는 흥분성 아미노산의 NMDA 수용체에 대한 특이적 상호작용을 시사하는 결과라고 생각되나 이에 대하여는 보다 심층적인 연구가 이루어져야 하리라고 생각된다.

신경세포의 이상은 뇌졸중, 심장질환, 중양 등에 의한 허혈성 뇌손상 등에서 알려져 있고, 이러한 질환들에서 나타나는 신경 세포사멸의 일차적인 요인은 glutamate의 다량유리에 의한 독성작용이며, Alzheimer disease, Parkinson disease, Huntington disease 등 다른 퇴행성 뇌질환의 진행에도 glutamate의 다량 유리에 따른 세포손상이 수반된다고 보고된 바 있다²²⁾. Glutamate의 다량 유리에 따른 세포손상은 허혈증이나 인슐린에 의한 저혈당증에서도 알려져 있고³¹⁾, 허혈증 상황에서는 glutamate가 독작용을 나타내는 농도까지 상승한다고 알려져 있다³²⁾. 본 연구에서 NMDA는 신경세포로부터 배양액 중으로 glutamate유리를 현저하게 증가시켰으나, 豨薟은 NMDA에 의한 glutamate의 유리를 현저하게 억제하였다(Fig. 5).

이상과 같이 豨薺 추출물은 NMDA에 의한 신경 세포사멸을 억제하는 효과를 보였으며, MTT 환원율의 상승효과, glutamate 유리량의 억제, 반응성 산소종(ROS)의 생성억제 등 신경 세포사멸을 제어하는 유의한 효과를 보였다. 이로 미루어보아 豨薺 *S. glabrescens* 은 NMDA에 의한 신경 세포사멸을 억제하는 효능이 있다고 생각되며, 여러 가지의 신경퇴행성 질환의 병태생리학적 상황에서 나타나는 뇌졸중, 심장질환, 종양 등에 의한 신경세포 손상에 보호 효과를 나타낼 수 있다고 사료된다. 또한 花穗 상태로 유통되는 중국산 豨薺은 신경 세포사멸 억제효과가 없었으므로 豨薺의 품질관리에 약용부위를 정확히 할 필요가 있다고 사료된다.

결론

豨薺(진득찰) *Siegesbeckia glabrescens* Makino의 신경세포 보호효능을 검증하고자, 배양중인 신경세포를 NMDA 및 KA 등에 노출시켜 細胞死滅을 유도한 후, 신경 세포사멸 억제율, glutamate 유리량 및 ROS 생성량 등을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 豨薺은 NMDA에 노출된 신경 세포사멸을 억제시켰다.
2. 豨薺은 NMDA에 노출된 신경세포에서 유리되는 glutamate량을 억제시켰다.
3. 豨薺은 NMDA로 유도된 ROS의 생성을 억제하였다.
4. 豨薺은 KA에 노출된 신경 세포사멸을 억제하지는 못하였다.
5. 중국산 豨薺(*Siegesbeckia Spica*)은 신경 세포사멸 억제효과가 없었다.

위와 같은 결과로 미루어 보아, 豨薺(진득찰)은 NMDA에 의한 신경 세포사멸을 억제하는 효능이 있으며, 여러 가지의 신경퇴행성 질환의 병리학적 상황에서 나타나는 신경세포손상에 보호효과를 갖고 있으며, 또한 국내에 대부분 花穗 상태로 유통되는 중국산 수입품 豨薺은 신경 세포사멸 억제 효과가 나타나지 않았으므로 약용부위에 대한 품질관리를 할 필요가 있다고 사료된다.

참고문헌

1. 蘇敬 等撰 尙志鈞 輯校. 新修本草(輯復本). 合肥: 安徽科學技術出版社. 1981: 290.
2. 國家中醫藥管理局 《中華本草》編委會. 中華本草. 上海: 上海科學技術出版社. 1999: 7권956-961.
3. 지형준 外 編. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해 제2개정. 서울: 한국메디칼인덱스사. 1998: 707.
4. 國家藥典委員會編. 中華人民共和國藥典. 北京: 化學工業出版社. 2000: 301-301.
5. Kim JH, Han KD, Yamasaki K, Tanaka O. Darutoside, A Diterpenoid from *Siegesbeckia pubescens* and It's structure revision. *Phytochemistry*. 1979: 18: 894-895.
6. 金濟勳. 豨薺의 새로운 Diterpene 배당체에 관하여. *생약학회지*. 1972: 3(1): 21-22.
7. 韓龜東, 金濟勳, 吳世宗. 豨薺의 Diterpene에 관한 연구(IV)-Kaurane skeleton을 가진 Diterpene의 화학구조. *생약학회지*. 1973: 4(2): 63-65.
8. 김선희, 안병준. 털진득찰의 L₁₂₁₀ 세포독성물질 Pubetalin의 분리. *생약학회지*. 1988: 19(4): 251-255.
9. Guo DA, Zhang ZG, Ye GQ, Lou ZC. Studies on liposoluble constituents from the aerial parts of *Siegesbeckia orientalis* L. *Yao Xue Xue Bao*. 1997: 32(4): 282-5.
10. Xiang Y, Zhang H, Fan CQ, Yue JM. Novel diterpenoids and diterpenoid glycosides from *Siegesbeckia orientalis*. *J Nat Prod*. 2004: 67(9): 1517-21.
11. 傅宏征, 樓之峇, 楊秀偉, 蔡少青, 果德安, 俞君, 楊曉萍, 李玉書. 腺梗豨薺化學成分的研究 I. *中草藥*. 1997: 28(5): 259-262.
12. 王桂紅, 張雁冰, 趙清治, 薛華珍, 殷明文. 豨薺草的化學成分研究. *鄭州大學學報(理學版)*. 2003: 35(2): 73-74.
13. 이종훈, 김중수, 김재훈, 장일무. 豨薺이 心臟筋에 미치는 영향에 관한 연구. *대한구강생물학회지*. 1984: 8(1): 103-108.
14. 김호현, 김길원. 豨薺이 家兔의 혈관내피세포성 이완인자에 미치는 영향. *대한한의학회지* 1997: 18(2): 15-32.
15. 신흥목. 豨薺의 혈관이완 효능과 항산화동태에 관한 연구. *대한한의학회지*. 2000: 21(1): 77-83.
16. 김광호, 장동순. 豨薺이 실험적 고지혈증의 예방

- 및 치료효과에 미치는 영향. 경희대학교 대학논문집. 1994 ; 17(1) : 29-43.
17. 소경순. 稀莨이 endotoxin으로 유발된 흰쥐의 혈전에 미치는 영향. 대한예방의학회지. 1998 ; 2(1) : 165-173.
18. 柯銘華, 楊伯寧, 黃紹明. 稀莨草對家兔眼壓影響的實驗研究周永祺. Chinese Ophthal. Res. 1996 ; 14(3).
19. Kang BK, Lee EH, Kim HM. Inhibitory effects of Korean folk medicine 'Hi-Chum' on histamine release from mast cells in vivo and in vitro. J Ethnopharmacol. 1997 ; 57(2) : 73-9.
20. 조영주. 稀莨이 염증성 싸이토카인 및 류마티스관절염에 미치는 영향. 대전대학교 박사학위논문. 2003.
21. 한지숙, 신동화, 윤세억, 김문숙. *Listeria monocytogenes*의 증식을 억제하는 식용 가능한 식물 추출물의 검색. Korean J. Food Sci. Technol. 1994 ; 26(5) : 545-551.
22. Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. J Neurosci. 1987 ; 7 : 357-368.
23. 崔東日. 稀莨類 한약재의 유전자 분석 및 포제가 혈압에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2004.
24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 ; 65 : 55.
25. 蘇頌 撰, 胡乃長 王致譜 輯注. 圖經本草 輯復本. 福建: 龍源出版公社. 1988 : 269,270.
26. 陳貴廷 主編, 本草綱目通釋. 北京: 學苑出版社. 1992 : 808,809.
27. 全國韓醫科大學 共同教材編纂委員會 編著. 本草學. 서울: 영림사. 2004 : 324,325.
28. 行政院衛生署編. 中華民國中藥典範. 臺北: 達昌印刷有限公司. 1985 : 319,320.
29. 常志均 輯校. 開寶本草 輯復本. 合肥: 安徽科學技術出版社. 1998 : 245,246.
30. Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. Annu Rev Neurosci. 1990 ; 13 : 171-182.
31. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. Science. 1993 ; 262 : 689-694.
32. 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 : 1369-1374.