

혈색통연교낭(血塞通軟膠囊)의 산화적 및 흥분성 신경세포독성 억제작용

조 정 숙[#]

동국대학교 의과대학 약리학교실 및 의학연구소 신경과학 연구부

(Received November 25, 2004; Revised December 28, 2004)

Inhibition of Oxidative Stress-induced and Excitotoxic Neuronal Cell Damage by Xuesaitong Ruanjiaonang

Jungsook Cho[#]

Department of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University and Section of Neuroscience,
Medical Institute of Dongguk University, Gyeongju, Gyeongbuk 780-714, Korea

Abstract — Xuesaitong Ruanjiaonang (XR), a soft capsule containing *Panax notoginseng* saponins as main ingredients, is believed to remove extravasated blood and increase cerebral blood flow by improving blood circulation, and therefore, has been used in China to treat ischemic stroke or hemiplegia caused by cerebral thrombosis. To characterize pharmacological actions of XR, the present study evaluated its effects on neuronal cell damage induced by various oxidative insults or excitotoxic amino acids in primary cultured rat cortical cells. The neuronal cell viability was not affected by XR with the exposure for 2 h at the concentrations tested in this study (10~1000 µg/ml). However, significant reduction of the cell viability was observed when the cultured cells were exposed to XR at 1000 µg/ml for 24 h. XR was found to concentration-dependently inhibit the oxidative neuronal damage induced by H₂O₂, xanthine/xanthine oxidase or Fe²⁺/ascorbic acid. In addition, it dramatically inhibited the excitotoxic damage induced by glutamate or N-methyl-D-aspartate (NMDA). We found that the NMDA-induced neurotoxicity was inhibited more effectively and potently than the glutamate-induced toxicity. Moreover, XR was found to exert mild inhibition of lipid peroxidation induced by Fe²⁺/ascorbic acid in rat brain homogenates and some 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. Taken together, these results demonstrate neuroprotective and antioxidant effects of XR, showing inhibition of oxidative and excitotoxic damage in the cultured cortical neurons, as well as inhibition of lipid peroxidation and its radical scavenging activity. Considering that excitotoxicity and oxidative stress play crucial roles in neuronal cell damage during ischemia and reperfusion, these results may provide pharmacological basis for its clinical usage to treat ischemic stroke.

Keywords □ Xuesaitong Ruanjiaonang, *Panax notoginseng* saponins, neuroprotection, excitotoxicity, oxidative stress, primary cultured rat cortical cells, stroke

혈색통연교낭(血塞通軟膠囊, Xuesaitong Ruanjiaonang)은 삼칠(Radix Notoginseng, the root of *Panax notoginseng*(Burk.) FH. Chen)의 사포닌을 주성분으로 함유하고 있으며, 중국에서 생산 및 시판되고 있는 갈색의 경구용 연질캡슐 제제이다. 이 제제는 혈액순환을 원활하게 하고 관상동맥의 혈류를 증가시키는 작용이 있어 협심증 치료제로 사용될 뿐만 아니라, 혈소판 응집을 억제하여 어혈을 제거하고 뇌혈류를 증가시킨다고 하여 뇌혈전에 의한 뇌경색 후유증 또는 반신불수 등을 주 적응증으로 하고 있다.

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 054-770-2419 (팩스) 054-770-2447
(E-mail) jscho@dongguk.ac.kr

삼칠에 함유된 사포닌은 20종 이상이 존재하는 것으로 보고되었으며, 그 중에서 ginsenoside Rg1과 Rb1 및 notoginsenoside R1이 주요 성분으로 알려져 있다.^{1,2)} 삼칠의 사포닌은 생쥐에서 미세혈관을 확장시켜 뇌혈류를 증가시키는 것으로 나타났으며,³⁾ 중대뇌동맥 폐색으로 뇌허혈을 유발한 주에서 뇌경색 면적을 감소시키고 수분의 함량을 감소시켜 뇌부종을 억제하였으며, 신경학적 결손을 완화시키는 것으로 동물실험에 의해 확인되었다.⁴⁾ 또한, 삼칠 사포닌은 뇌손상을 유발한 토끼의 뇌에서 malondialdehyde 함량을 감소시켰으며, 배양한 신경세포에서 저산소/재판류로 유발한 신경손상 및 glutamate에 의한 흥분성 독성을 완화시키는 것으로 보고^{5,6)}되어 삼칠 사포닌의 뇌허혈에 대한 보호작용을 뒷받침하고 있다.

본 연구에서는 혈색통연교낭이 삼칠 사포닌을 주성분으로 하고 있으며, 중국에서 뇌혈전에 의한 뇌졸증의 치료에 사용되고 있다는 점에 착안하여, 이 제제를 대상으로 일차 배양한 대뇌피질 신경세포를 이용하여 신경세포 보호작용을 확인함으로써 임상적 활용에 대한 직접적인 근거를 제시하고자 하였다. 또한, 뇌 균질액에서 유도한 지질 과산화와 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼에 대한 작용을 측정하여 혈색통연교낭의 항산화 활성을 평가하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

임신된 Sprague-Dawley(SD) 흰쥐와 수컷 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-aspartic acid(NMDA), cytosine arabinoside, lactate dehydrogenase(LDH) assay kit, H₂O₂, DPPH, xanthine, xanthine oxidase, 2-thiobarbituric acid(TBA) 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma(St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 혈색통연교낭은 운남의약집단(중국)에서 제조한 제품을 사용하였으며, 세포배양 용기는 Falcon(Franklin Lakes, USA)에서 구입하였고, 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

흰쥐 대뇌피질 신경세포의 일차 배양

임신 16~18일된 SD 흰쥐의 태자에서 얻은 대뇌피질 신경세포의 배양은 Cho 등^{7,8)}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 단일세포로 분리한 다음, 상기 배양액에 혼탁시켜 poly-L-lysine과 laminin으로 미리 코팅해 놓은 24-well 배양용기에 well당 4~5 × 10⁵의 밀도로 이식하였다. 세포는 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 37°C 배양기에서 배양하였으며 주당 2회 배양액의 일부를 교환하였다. 배양 1주 후 10 μM cytosine arabinoside로 24~48시간 동안 처리하여 신경세포 이외의 세포 성장을 억제시켰으며,⁷⁾ 10~14일간 배양 후 실험에 사용하였다.

배양한 신경세포에서 산화적 또는 흥분성 신경세포손상 유발 및 약물 처리

배양한 대뇌피질 신경세포에서 산화적 손상 유발은 Jung 등⁹⁾ 및 Dok-Go 등¹⁰⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 배양한 세포를

HEPES-controlled salt solution(HCSS, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 2.3 mM CaCl₂, 15 mM glucose, 20 mM HEPES, 10 mM NaOH)으로 세척한 후, 100 μM H₂O₂로 5분 동안 처리하거나 0.5 mM xanthine과 10 mU/ml xanthine oxidase로 10분 동안, 또는 100 μM Fe²⁺와 25 μM ascorbic acid로 2시간 동안 처리한 후 다시 HCSS로 세척하고 나서, 25 mM glucose를 함유한 MEM 배양액으로 교환한 다음 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 37°C에서 20~24시간 동안 배양하여 유발하였다.

배양한 대뇌피질 신경세포에서 흥분성 신경세포손상은 Cho 등^{11,12)}의 방법에 따라 유발하였다. 즉, 배양한 세포를 HCSS로 세척한 다음 100 μM의 glutamate 또는 NMDA를 함유하는 Mg²⁺-free HCSS로 15분간 처리한 후, 25 mM glucose를 함유하는 MEM 배양액으로 교환하여 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 37°C에서 20~24시간 동안 배양하여 유발하였다.

유발된 손상에 대한 혈색통연교낭의 영향을 연구하기 위해서는 각각의 손상 유발시에 적정 농도의 약물을 동시에 적용하였다. 시험약물은 혈색통연교낭의 연질캡슐을 자른 후 내용물을 취하여 100 mg/ml의 농도로 dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해시킨 다음 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 대조군 세포는 1% DMSO 용액으로 처리하였으며, 이는 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.⁷⁾

세포의 손상 정도 측정

세포의 손상 정도는 배양액으로 유리되는 LDH의 활성을 Cho 등^{7,12)}의 방법에 의해 측정하거나 MTT 환원법¹³⁾에 의해 평가였으며, 위상차 현미경으로 세포의 형태학적 변화를 관찰하여 확인하였다. 실험결과는 LDH 활성을 측정한 경우, 세포에 각 손상을 유발하였을 때 유리되는 LDH 활성을 기준으로 하여 시험약물로 처리하였을 때의 LDH 활성을 백분율로 계산하여 나타내었으며, MTT 환원법의 경우, 용매로 처리한 대조군 세포에서의 MTT 환원력을 기준으로 하여 유발된 손상에 대한 백분율로 표시하였다.

지질 과산화에 대한 작용

수컷 SD 흰쥐로부터 얻은 뇌 균질액에서 유도한 지질 과산화에 대한 작용은 Cho와 Lee¹⁴⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 일정양의 뇌 균질액과 10 μM Fe²⁺, 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_{max} microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 532 nm에서 측정하였다. 시험약물에 의한 지질 과산화 억제율은 다음 식을 이용하여 계산하였다. 이 때, 대조군은 시료 대신 DMSO로 처리하였다.

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

DPPH 라디칼에 대한 작용

DPPH 라디칼에 대한 작용은 Cho와 Lee¹⁴⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 메탄올에 용해시킨 150 μM의 DPPH와 적정농도의 시험약물을 함유하는 반응액을 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 VERSA_{max} microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거율은 위의 식을 이용하여 계산하였다.

통계 처리

각 실험결과는 1회 2군씩 3회 이상 반복하여 측정한 값으로부터 계산한 평균값±S.E.M.으로 나타내었으며, 통계적 유의성은 Student's t-test로 검정하여 $p < 0.05$ 인 것을 유의하다고 간주하였다.

실험 결과

혈색통연교낭이 배양한 대뇌피질 신경세포의 생존율에 미치는 영향

먼저, 일차배양한 흰쥐 대뇌피질 신경세포를 혈색통연교낭으로 처리하였을 때 적용농도와 시간에 따른 세포생존율의 변화를 알아보았다. 다양한 농도(10~1000 μg/ml)의 혈색통연교낭을 5분,

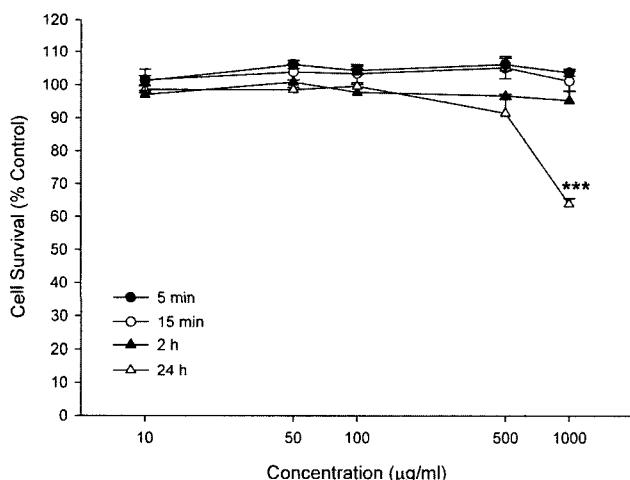


Fig. 1 – Effect of Xuesaitong Ruanjiaonang (XR) on the cell viability of the primary cultured rat cortical neurons. Cultures were exposed to XR at the concentrations (10~1000 μg/ml) tested in this study for the indicated periods of time, and the cell viability was determined after 20~24 h by MTT reduction assay as described in the Materials and Methods. Data are expressed as percentage of the control cell viability measured in the cultures treated with vehicle (1% DMSO). Each point represents the mean±S.E.M. from 6~8 measurements (***, $p < 0.001$ vs control).

15분, 2시간 동안 배양한 세포에 적용시킨 후 20~24시간이 경과한 다음 MTT 환원력을 측정하거나, 24시간 동안 적용시킨 후 MTT 환원력을 측정하여 세포생존율을 계산하였다. Fig. 1에 제시한 바와 같이 혈색통연교낭을 2시간 동안 적용시킨 경우, 시험한 모든 농도에서 세포손상이 관찰되지 않은 반면, 24시간 동안 적용시킨 경우 1000 μg/ml 농도에서 세포생존율이 유의하게 감소하였다.

배양한 대뇌피질 신경세포에서 유발한 산화적 손상에 대한 작용

배양한 흰쥐의 대뇌피질 신경세포를 100 μM H₂O₂로 5분 동안 처리하고 20시간 동안 배양한 후 위상차 현미경으로 관찰한 결과, 1% DMSO로 처리한 대조군 세포(Fig. 2A)보다 H₂O₂로 처리한 세포(Fig. 2C)에서 현저한 손상이 관찰되었다. 초기에는 신경세포가 서서히 팽창하였으며 시간이 경과함에 따라 세포손상이 진행되어 20시간 후에는 대부분의 세포가 파괴되는 것으로 나타났다(Fig. 2C). H₂O₂와 혈색통연교낭(500 μg/ml)으로 동시에 처리한 세포(Fig. 2D)에서는 H₂O₂로 처리한 세포(Fig. 2C)보다 손상이 감소하였으며, 혈색통연교낭(500 μg/ml)만으로 처리한 세포(Fig. 2B)는 DMSO로 처리한 대조군 세포와 마찬가지로 세포의 형태학적 변화가 관찰되지 않았다.

이번에는 H₂O₂로 유발되는 산화적 신경세포손상에 대한 혈색통연교낭의 억제작용을 배양액 중으로 유리되는 LDH 활성을 측정하여 정량화하였다. 이전에 보고^{10,14)}된 바와 같이, H₂O₂로 처리한 세포에서 측정한 LDH 활성을 용매로 처리한 대조군 세포에서의 활성보다 80~90% 정도 증가하는 것으로 나타나, H₂O₂에 의해 현저한 세포손상이 유발되었음을 확인하였다. 세포의 손상정도를 MTT 환원법으로 측정한 결과, 보고¹⁵⁾된 바와 같이 LDH 활성으로 측정한 것과 유사한 정도로 H₂O₂에 의해 세포의 생존율이 감소하는 것으로 나타났다. H₂O₂와 혈색통연교낭(10~1000 μg/ml)으로 동시에 처리한 세포에서 측정한 LDH 활성에 따르면, 500 μg/ml 농도에서 혈색통연교낭은 H₂O₂에 의해 유발되는 산화적 손상을 약 30%, 1000 μg/ml에서 약 50% 정도 억제하는 것으로 나타났다. 같은 실험 조건에서 세포의 생존율을 MTT 환원법으로 측정한 결과, 100 μg/ml 농도에서 약 40% 정도 증가하였으며, 500 μg/ml 이상에서 약 50% 정도 증가하는 것으로 나타나 농도 의존적인 신경세포 보호효과를 확인하였다 (Fig. 3).

다음으로, 배양한 신경세포를 0.5 mM xanthine과 10 μM/ml xanthine oxidase로 10분 동안 처리하고 20~24시간 경과 후 유발된 산화적 손상을 LDH 활성으로 측정한 결과, 보고된 바와 같이 대조군에 비해 70~80% 증가하였다.^{10,14)} 혈색통연교낭은 500 μg/ml 농도에서 xanthine/xanthine oxidase에 의해 유발되는 손상을 억제하기 시작하여 1000 μg/ml에서 약 60% 정도 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이번에는 배양한 신경세포를 100 μM

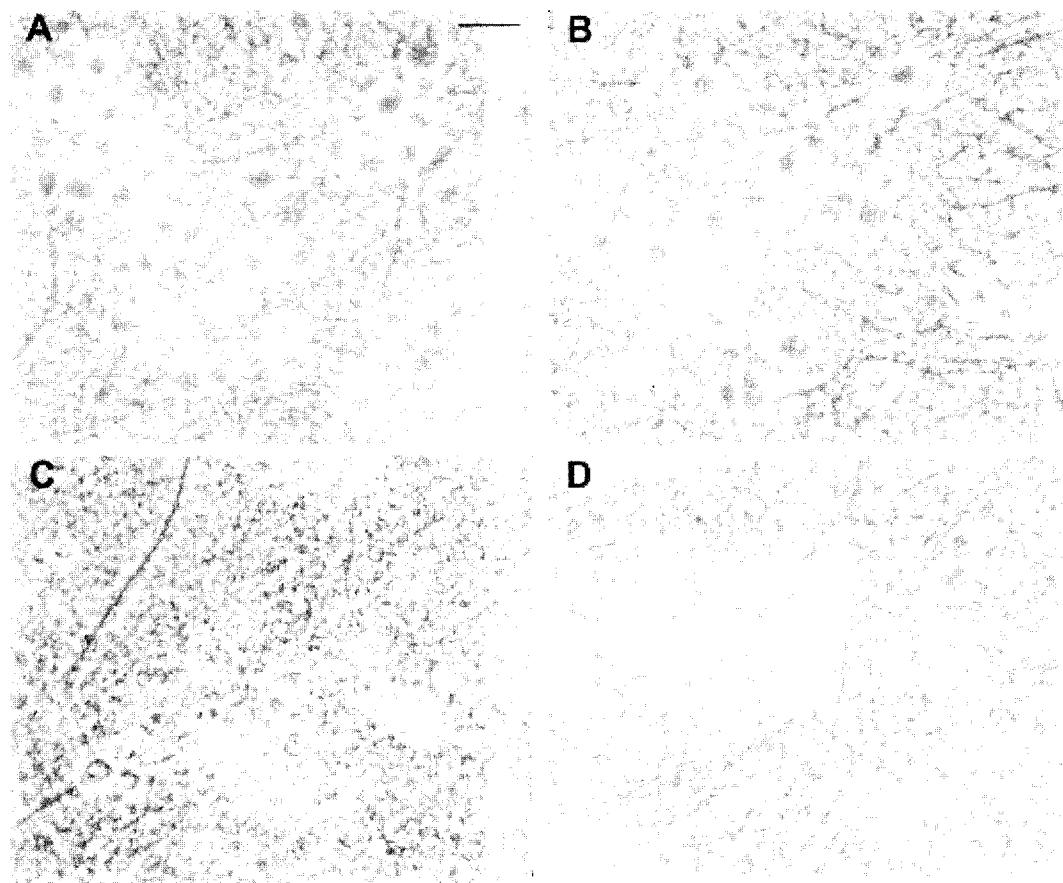


Fig. 2 – Protection of rat cortical cells by Xuesaitong Ruanjiaonang (XR) against H_2O_2 -induced oxidative damage. Phase-contrast photomicrographs of primary cultured rat cortical cells (12 days after plating) are shown after exposure for 5 min to vehicle (1% DMSO, A), XR (500 $\mu g/ml$, B), H_2O_2 (100 μM , C), or H_2O_2 +XR (100 μM +500 $\mu g/ml$, respectively, D), followed by incubation for 20 h at 37°C. (Scale bar=50 μm).

Fe^{2+} 와 25 μM ascorbic acid로 2시간 동안 처리한 다음 20~24시간 배양한 후 유발되는 산화적 손상을 LDH 활성으로 측정한 결과, 대조군에 비해 50~60% 정도의 세포가 손상되는 것으로 관찰되었다.⁹⁾ 혈색통연교낭은 Fe^{2+} 와 ascorbic acid로 유발된 손상을 500 $\mu g/ml$ 농도에서 약 30% 억제하였으며, 1000 $\mu g/ml$ 에서는 완전히 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

배양한 대뇌피질 신경세포에서 유발한 흥분성 신경세포독성에 대한 작용

배양한 대뇌피질 신경세포를 100 μM glutamate 또는 NMDA로 15분 동안 처리하고 20~24시간 동안 배양한 후 유발된 흥분성 신경독성을 LDH 활성으로 측정한 결과, 70~80% 정도의 세포손상이 나타났다.^{11,12,14)} Fig. 5에서 볼 수 있는 바와 같이 혈색통연교낭은 glutamate나 NMDA에 의해 유발되는 흥분성 신경세포독성을 강력하게 억제하였다. Glutamate에 의해 유발된 독성의 경우, 500 $\mu g/ml$ 농도에서 약 40%가 억제되었고 1000 $\mu g/ml$ 에서는 70%가 억제되었으며, NMDA-유발 독성은 100 $\mu g/ml$

에서 약 30%가 억제되었고 500 $\mu g/ml$ 에서 80%, 1000 $\mu g/ml$ 에서 90%가 억제되는 것으로 나타나, 이 제제는 glutamate로 유발한 독성보다 NMDA로 유발한 독성을 더 강력하게 억제함을 알 수 있었다(Fig. 5).

지질 과산화 및 DPPH 라디칼에 대한 작용

흰쥐의 뇌 균질액을 지질원으로 사용하여 Fe^{2+} 와 ascorbic acid로 유도한 지질 과산화에 대한 혈색통연교낭의 작용을 측정한 결과, 1000 $\mu g/ml$ 에서 약 20% 정도의 억제를 나타내었다(Fig. 6). 또한, 혈색통연교낭은 1000 $\mu g/ml$ 농도에서 DPPH 라디칼을 약 10% 정도 감소시키는 것으로 나타나 미약하지만 유의성있는 항산화작용을 나타내었다(Fig. 6).

고 찰

혈색통연교낭은 중화인민공화국약전¹⁶⁾에 수록되어있는 삼칠의 사포닌을 주성분으로 하는 제제이며 중국에서 뇌혈전에 의한 뇌

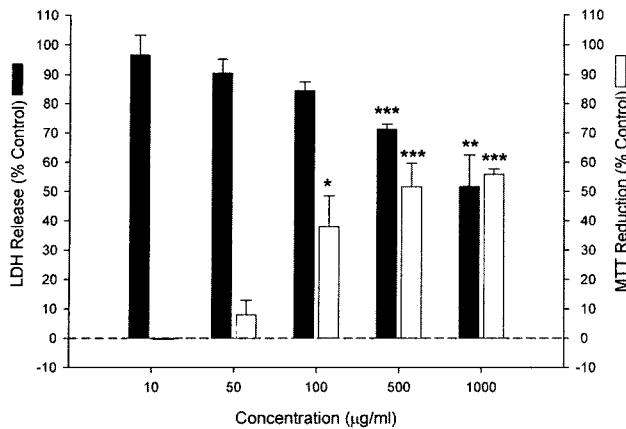


Fig. 3 – Effects of Xuesaitong Ruanjiaonang (XR) on the H_2O_2 -induced oxidative damage in primary cultured rat cortical cells. Cultures were exposed to 100 μ M H_2O_2 for 5 min in the absence or presence of the indicated concentrations of XR, and maintained at 37°C in MEM supplemented with glucose. Measurements of LDH activity in the culture media or MTT reduction were performed at 20~24 h after the exposure. Data are expressed as percentage of the control LDH activity measured in the culture exposed to H_2O_2 in the absence of XR, or as percentage of the control MTT reduction capacity measured in the cells treated with vehicle. Each bar represents the mean \pm S.E.M. from 6~8 measurements (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ vs control).

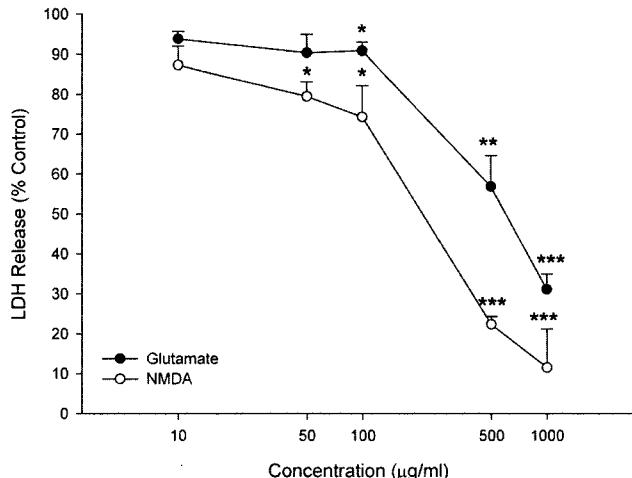


Fig. 5 – Effects of Xuesaitong Ruanjiaonang (XR) on the glutamate- or NMDA-induced excitotoxic damage in primary cultured rat cortical cells. Cultures were exposed for 15 min to 100 μ M glutamate or NMDA in Mg^{2+} -free HCSS in the absence or presence of the indicated concentrations of XR, and maintained 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 the control LDH activity measured in the culture exposed to glutamate or NMDA in the absence of XR. Each point represents the mean \pm S.E.M. from 4~6 measurements (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ vs control).

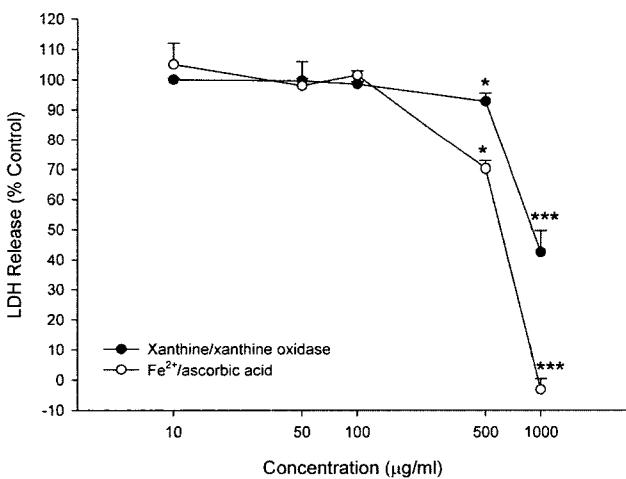


Fig. 4 – Effects of Xuesaitong Ruanjiaonang (XR) on the xanthine/xanthine oxidase- or Fe^{2+} /ascorbic acid-induced oxidative damage in primary cultured rat cortical cells. Cultures were exposed to xanthine (0.5 mM) and xanthine oxidase (10 mU/mL) for 10 min or 100 μ M Fe^{2+} and 25 μ M ascorbic acid for 2 h in the absence or presence of the indicated concentrations of XR, 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 the control LDH activity measured in the culture exposed to xanthine/xanthine oxidase or Fe^{2+} /ascorbic acid in the absence of XR. Each point represents the mean \pm S.E.M. from 6 measurements (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ vs control).

경색 치료제 또는 협심증 등의 심장질환 치료제로 사용되고 있다. 본 연구에서는 일차배양한 대뇌피질 신경세포와 시험관내 실험을 통하여 신경세포 보호작용 및 항산화 작용을 연구한 결과, 혈색통연고낭이 H_2O_2 나 xanthine/xanthine oxidase 또는 Fe^{2+} /ascorbic acid로 유발되는 다양한 산화적 신경손상 및 glutamate 나 NMDA에 의해 유발되는 흥분성 신경독성을 농도 의존적으로 억제함을 발견하였으며, 약간의 지질파산화 억제작용과 DPPH 라디칼 소거작용을 확인하였다.

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.¹⁷⁾ 뿐만 아니라 뇌혈전에 의해 산소 및 포도당의 공급이 감소하는 상황에 처하게 되면 다양한 기전에 의해 뇌신경세포에 치명적인 손상이 유발되며, 이 때 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 비정상적으로 다량 유리됨은 잘 알려진 사실이다.¹⁸⁾ 과다 유리된 glutamate는 NMDA 수용체를 비롯한 glutamate 수용체를 지속적으로 자극하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키고, 여러 가지 효소를 활성화시킴으로써 단백질, 지질, DNA 등에 손상을 유발하여 흥분성 신경세포독성을 초래하는 일련의 과정을 유도한다.^{18,19)} 이 과정에서 생성되는 nitric oxide와 반응성 산소종은 자유 라디칼을 형성하여 신경세포의 손상을 더

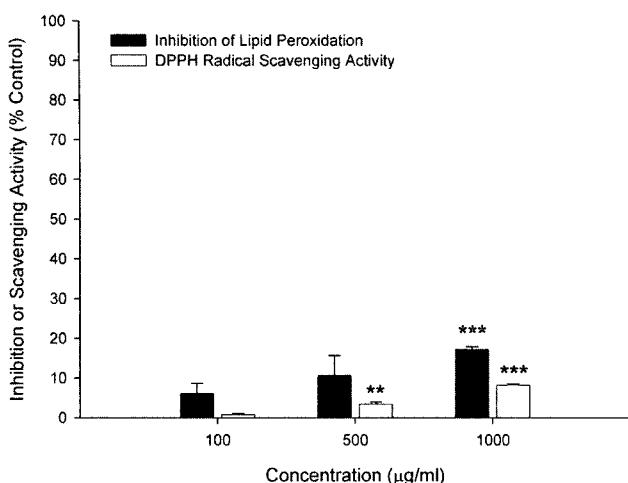


Fig. 6 – Inhibition of lipid peroxidation by Xuesaitong Ruanjiaonang (XR) and its DPPH radical scavenging activity. Lipid peroxidation initiated by Fe^{2+} and ascorbic acid in rat brain homogenates and DPPH radical scavenging activity were measured as described in the Materials and Methods in the absence or presence of the indicated concentrations of XR. Each bar represents the mean \pm S.E.M. from 3 experiments performed in duplicate (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ vs control).

육 가속화시킨다.²⁰⁾ 과다 유리된 glutamate에 의한 홍분성 신경 세포독성과 과다 생성된 자유라디칼에 의한 산화적 독성 및 염증 반응 등은 복합적으로 진행되며 결과적으로 신경세포에 치명적인 손상을 야기한다.¹⁸⁻²⁰⁾ 또한, 혈전이 용해되고 산소공급이 재개될 경우에도 산화적 스트레스하에서 superoxide 라디칼과 같은 자유라디칼을 포함하는 각종 반응성 산소종이 발생하게 되어 신경세포의 손상을 촉진시킨다.^{18,19)} 그러므로, 홍분성 독성과 산화적 스트레스는 뇌허혈 및 재판류시 매우 중요한 뇌손상 유발기전으로 작용한다고 할 수 있다.

본 연구에서는 혈색통연교낭의 홍분성 또는 산화적 독성에 대한 연구에 앞서 먼저 배양한 대뇌피질 신경세포의 세포생존율을 미치는 영향을 측정하였다. 혈색통연교낭은 측정한 농도범위(10~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 2시간 이내 동안 세포에 적용하였을 때 세포의 생존율에 별 영향을 미치지 않았으나, 24시간 동안 적용한 경우 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 현저한 독성이 관찰되었다(Fig. 1). 혈색통연교낭의 약동학적 연구는 아직 보고된 바가 없으므로 임상적 상황에서 인체에 이 제제를 투여하였을 때 실제로 이 농도에 도달할 가능성이 대해서는 현재로서는 알 수가 없다. 그러나, 혈색통연교낭의 주성분인 삼칠 사포닌을 함유하고 있는 주사제(Xuesaitong injection)가 유사한 적응증으로 중국에서 사용되고 있는 점을 감안할 때 약동학적 확인이 필요할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 이전의 보고^{7-12,14)} 및 예비실험결과에 근거하여 시료의 약리 작용을 유의하게 측정할 수 있을 정도의 손상이 유발되는 실험 조건을 사용하였으며, 손상을 유발하는 기간 동안 시료를 동시

에 처리하였기 때문에, Fig. 2~5에 제시된 결과는 모두 시료의 적용시간이 2시간 이내이며 시료 자체의 독성이 발현되는 실험 조건은 배제하였다.

다음으로, 배양한 신경세포에서 다양한 조건으로 유발한 산화적 신경세포손상에 대한 혈색통연교낭의 작용을 시험하였다. 그 결과, 혈색통연교낭은 배양한 세포를 H_2O_2 로 처리하여 유발되는 손상과 xanthine으로부터 xanthine oxidase에 의해 생성되는 superoxide 라디칼로 유발되는 손상 및 Fe^{2+} 와 ascorbic acid로 처리하여 발생하는 hydroxyl 라디칼에 의한 손상을 농도 의존적으로 억제함을 LDH 활성 또는 MTT 환원력 측정 및 위상차 현미경을 통한 관찰로 확인하였다(Fig. 2~4). Fig. 3에서 알 수 있는 바와 같이 LDH 활성측정에 의한 결과와 MTT 환원법에 의한 결과가 서로 유사하기 때문에, 이후의 결과(Fig. 4~5)는 LDH 활성측정에 의한 결과만을 제시하였다. 생성된 라디칼들은 지질을 파산화시킬 뿐만 아니라, 단백질과 DNA 등 세포내 거대분자를 손상시킴으로써 결과적으로 세포에 치명적 손상을 유발하는 물질로 잘 알려져 있다.²¹⁾ 이 결과로부터 혈색통연교낭이 다양한 산화적 스트레스로 인해 유발되는 신경손상을 억제하여 신경 세포 보호작용을 나타낸을 확인하였다.

뇌허혈 상태에서는 산화적 스트레스에 의해서 뿐만 아니라 과다 유리된 glutamate에 의해 홍분성 신경세포독성이 유발된다.¹⁸⁻²⁰⁾ 이 과정에서 특히 NMDA 수용체는 세포의 손상과정에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 이에 본 연구에서는 혈색통연교낭이 배양한 세포에서 glutamate 또는 NMDA로 유발한 홍분성 독성에 대하여 미치는 영향을 시험하였다. 혈색통연교낭은 glutamate로 유발한 홍분성 독성을 억제하는 것으로 나타나(Fig. 5), 삼칠의 사포닌이 배양한 대뇌피질 신경세포를 glutamate로 처리하여 유발되는 홍분성 독성을 억제한다는 이전의 보고^{6,12)}와 일치하는 결과를 보였다. 뿐만 아니라, 혈색통연교낭은 NMDA로 처리하여 유발되는 홍분성 독성을 억제하였으며, glutamate에 의한 독성보다 NMDA에 의한 독성을 더 강력하게 억제함을 확인하였다(Fig. 5). 이 결과는 혈색통연교낭이 NMDA 수용체나 그와 관련된 신호전달체계에 선택적으로 작용하여 홍분성 신경독성을 차단할 가능성을 시사하는 연구결과이다. NMDA 수용체가 Ca^{2+} 을 통과시킬 수 있는 이온 채널임을 고려할 때, 본 연구결과는 삼칠 사포닌이 synaptosome에서 Ca^{2+} uptake를 억제하는 Ca^{2+} channel blocker로 작용한다는 이전의 보고²²⁾와도 일맥상통하는 결과라 할 수 있다. 한편, 삼칠 사포닌은 사람의 대뇌피질 세포막에서 시행한 수용체 결합실험에서 [^3H]-DL-glutamate의 결합에 영향을 미치지 않는다는 또 다른 보고²³⁾가 있어, 사포닌이 수용체에 직접 작용하기 보다는 신호전달경로에 작용할 가능성이 더 크다고 할 수 있다. 하지만 NMDA 수용체에는 수용체 활성 조절에 관여하는 여러 리간드 결합부위가 존재하기 때문에¹⁸⁾ glutamate 결합부위 이외의 부위에 결합하여 수용체의

활성을 조절할 가능성을 배제할 수는 없다. 이 외에도 삼칠 사포닌은 synaptosome에서 Ca^{2+} 의존성 glutamate의 유리를 억제한다는 보고²³⁾가 있어, 다양한 작용점이 있을 가능성성이 제기되고 있다.

이상의 결과로부터 혈색통연교낭은 뇌혈전 및 재관류시에 노출될 수 있는 다양한 산화적 스트레스에 의한 손상 및 과다 유리되는 흥분성 아미노산에 의해 유발되는 흥분성 신경세포독성을 억제함으로써 신경세포 보호작용을 발현함을 알 수 있다. 앞서 제시한 바와 같이 혈색통연교낭은 배양한 신경세포에서 다양한 산화적 스트레스로 유발되는 손상을 억제한다는 사실(Fig. 2~4)에 근거하여 이번에는 시험관 내 실험을 이용하여 혈색통연교낭의 항산화작용을 평가하였다. 혈색통연교낭은 흰쥐의 뇌 균질액에서 Fe^{2+} 와 ascorbic acid로 유발한 지질 과산화를 미약하긴 하지만 유의성있게 억제하는 것으로 나타났으며, 약간의 DPPH 라디칼 소거작용을 나타내었다. 이 결과는, 삼칠의 추출물이 뇌 균질액에서 유발한 지질과산화를 부분적으로 억제하고 약한 hydroxyl 라디칼 소거작용을 나타내며, 삼칠 사포닌을 투여한 동물에서 혈청의 지질 과산화가 억제되었다는 보고^{24,25)} 등과 일치하는 결과이다.

이상의 결과에서 확인한 바와 같이 혈색통연교낭의 신경세포 보호작용과 항산화작용은 삼칠 사포닌의 뇌혈류 개선작용³⁾과 더불어 뇌허혈에서 경색을 억제하고 부종을 감소시키는 데 기여할 것이다.

결 론

본 연구에서는 일차배양한 흰쥐 대뇌피질 신경세포와 시험관 내 실험을 이용하여 중국에서 뇌혈전에 의한 뇌경색 또는 반신 불수 치료제로 사용되고 있는 갈색의 연질캡슐 제제인 혈색통연교낭의 약리작용을 규명함으로써 임상적 활용에 대한 약리학적 근거를 제시하고자 하였다. 혈색통연교낭은 배양한 신경세포에 10~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 2시간 이내 동안 적용시켰을 때 세포 생존율에 별 영향을 미치지 않았다. 혈색통연교낭은 배양한 세포를 H_2O_2 나 xanthine/xanthine oxidase 또는 Fe^{2+} /ascorbic acid로 처리하여 유발되는 산화적 스트레스에 의한 손상을 억제하였으며, glutamate 또는 NMDA로 유발되는 흥분성 신경독성을 억제하였다. 또한, 이 제제는 뇌 균질액에서 Fe^{2+} 와 ascorbic acid로 유도한 지질 과산화를 미약하지만 유의하게 억제하였으며, DPPH 라디칼을 소거하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 삼칠의 총 사포닌을 주성분으로 하는 혈색통연교낭의 신경세포 보호 및 항산화 작용을 규명하였다. 뇌졸중을 비롯한 퇴행성 신경질환에서 과다 유리된 glutamate에 의한 흥분성 신경독성과 재관류에 의해 발생하는 반응성 산소종 및 각종 라디칼에 의한 산화적 스트레스가 신경세포손상의 주 요인임을 고려할 때, 이

제제는 뇌혈전으로 인한 뇌허혈의 치료에 기여할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Gan, F. Y. and Zhen, G. Z. : Chemical composition studies of *Panax notoginseng*. *Chin. Pharm. J.* **27**, 138 (1992).
- Li, W. and Fitzloff, J. F. A. : Validated method for quantitative determination of saponins in notoginseng (*Panax notoginseng*) using high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 1637 (2001).
- Ma, L., Xiao, P., Guo, B., Wu, J., Liang, F. and Dong, S. : Cerebral protective effects of compounds isolated from Traditional Chinese Herbs. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* **24**, 238 (1999).
- Wei, H., Zunping, Z., Jianxin, L., Heyang, Y., Jin, Z., Xianhua, H. and Fei, L. : Study on therapeutic window of opportunity for *Panax notoginseng* saponins following focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *J. Chin. Med. Mat.* **27**, 25 (2004).
- Han, J.-A., Kuang, Y.-Q., Zhou, H.-T., Yang, L.-B., Zeng, F.-J., Sun, Z.-H., Hu, W.-Y. and Wang, X.-L. : Effects of *Panax notoginseng* saponins on malondialdehyde content of the brain following brain injury in rabbits. *Zhongguo Bingli Shengli Zashi* **16**, 269 (2000).
- Ma, L., Xiao, P., Liang, F. and Wu, J. : Protective effects of panax notoginseng saponins on neurons of primary cortical cultures of rat. *Zhongguo Yaoxue Zashi* **33**, 143 (1998).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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. *saboteni*. *Brain Res.* **965**, 130 (2003).
- 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).

- 12) 조정숙, 양재하, 박창국, 이희순, 김영호 : 뇌졸중 치료 생약 추출물의 흥분성 신경독성 억제효과. *약학회지* **44**, 29 (2000).
- 13) Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. : Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203 (1989).
- 14) Cho, J. and Lee, H.-K. : Wogonin inhibits excitotoxic and oxidative neuronal damage in primary cultured rat cortical cells. *Eur. J. Pharmacol.* **485**, 105 (2004).
- 15) Xie, C., Lovell, M. A., Xiong, S., Kindy, M. S., Guo, J.-T., Xie, J., Amaranth, V., Montine, T. J. and Markesberry, W. R. : Expression of glutathione-S-transferase isozymes in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 73 (2001).
- 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) Sauer, D. and Fagg, G. E. : Excitatory amino acids, excitotoxicity and neurodegenerative disorders. In: Krosgaard-Larsen, P., Hansen, J. J., eds. *Excitatory amino acid receptors*. Ellis Horwood, London, 13 (1992).
- 19) Bigge, C. F. and Malone, T. C. : Agonists, antagonists and modulators of the N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) subtypes of glutamate receptors. *Curr. Opin. Ther. Patents* July, 951 (1993).
- 20) Lynch, D. R. and Guttmann, R. P. : Excitotoxicity: Perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 717 (2002).
- 21) Halliwell, B. : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**, 1609 (1992).
- 22) Ma, L.-Y., Xiao, P.-G., Liang, F.-Q., Chi, M.-G. and Dong, S.-J. : Effect of saponins of *Panax notoginseng* on synaptosomal ^{45}Ca uptake. *Zhongguo Yaoli Xuebao* **18**, 213 (1997).
- 23) Ma, L. and Xiao, P. : Effects of *Panax notoginseng* saponins on synaptosomal glutamate release and its specific binding to glutamic receptor. *Zhongguo Yaolixue Tongbao* **14**, 311 (1998).
- 24) Xuejiang, W., Ichikawa, H. and Konishi, T. : Antioxidant potential of Qizhu Tang, a Chinese herbal medicine, and the effect on the cerebral oxidative damage after ischemia reperfusion in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 558 (2001).
- 25) Ng, T. B., Liu, F. and Wang, H. X. : The antioxidant effects of aqueous and organic extracts of *Panax quinquefolium*, *Panax notoginseng*, *Codonopsis pilosula*, *Pseudostellaria heterophylla* and *Glehnia littoralis*. *J. Ethnopharmacol.* **93**, 285 (2004).