

土牛膝, 懷牛膝의 항신경염증 및 신경세포 보호 효과 비교

박시연^{1#}, 최유진^{2#}, 이승민², 주인경¹, 오명숙^{1,2*}

1 : 경희대학교 약학대학 한약학과, 2 : 경희대학교 일반대학원 융합생명약학과

Comparative Study of *Achyranthes japonica* Nakai and *Achyranthes bidentata* Blume on Anti-Neuroinflammatory and Neuroprotective Effects

Siyeon Park^{1#}, Yujin Choi^{2#}, Seungmin Lee², In Gyoung Ju¹, Myung Sook Oh^{1,2*}

1 : Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University

2 : Department of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Graduate School, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : *Achyranthes japonica* Nakai (AJ) and *Achyranthes bidentata* Blume (AB) have been used without distinguishment. Moreover, comparative studies of AJ and AB on physiological activity in the organism levels remain fully understood. In this study, we aimed to evaluate and compare the effects of AJ and AB on anti-neuroinflammatory and neuroprotective effects.

Methods : AJ and AB were extracted with distilled water (DW) and 70% ethanol (EtOH) extract. For the evaluation of anti-neuroinflammatory effects, we measured the production of nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide (LPS)-treated BV2 microglial cells. To evaluate the neuroprotective effects, we assessed cell viability against toxicity, including hydrogen peroxide (H₂O₂), 6-hydroxydopamine (6-OHDA), and amyloid-beta (A β), respectively, in PC12 or HT22 cells.

Results : DW and 70% EtOH extracts of AJ and AB inhibited LPS-induced NO production in BV2 cells, with no significant differences between the origins and extraction solvents. Additionally, AJ and AB had no cytotoxicity, and exhibited the similar neuroprotective effects against H₂O₂ and 6-OHDA toxicities in PC12 cells, showing stronger activity in 70% EtOH extract compared to the DW extract. Furthermore, 70% EtOH extracts of AJ and AB protected neuronal cell against A β toxicity-induced cytotoxicity in HT22 cells.

Conclusions : We demonstrated that AJ and AB have anti-neuroinflammatory and neuroprotective effects in the 70% EtOH extract compared to DW extract, with no significant differences between the species. These results suggested that AJ and AB would be the potential candidates for neurodegenerative diseases.

Key words : *Achyranthes japonica* Nakai, *Achyranthes bidentata* Blume, Neuroinflammation, Neuroprotection, Neurodegenerative disease

*Corresponding author : Myung Sook Oh, Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.
Department of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Graduate School, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel: +82-02-961-9436 · E-mail: msohok@khu.ac.kr

#First author : Siyeon Park, Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel: +82-02-961-2252 · E-mail: psy9788@naver.com,

Yujin Choi, Department of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, Graduate School, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel: +82-02-961-2252 · E-mail: yj001217@khu.ac.kr

These authors have contributed equally to this work.

· Received : 12 August 2024

· Revised : 31 August 2024

· Accepted : 25 September 2024

I. 서론

우슬(牛膝)은 비름과(Amaranthaceae) 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai) 또는 우슬(牛膝, *Achyranthes bidentata* Blume)의 뿌리를 건조한 것으로, 겨울철에 줄기와 잎이 마른 후 캐어 蘆頭를 제거하고 曬乾하여 쓴다. 쓰고 시며 평이한 성질을 가지며 肝과 腎經에 작용한다. 본초학적으로 活血祛瘀, 利尿通淋, 補肝腎強筋骨, 引血引火下行 등의 효능을 가지고 있어, 血瘀로 인한 月經不調, 風濕痺痛, 小便淋痛, 頭痛眩暈 등의 질환에 사용한다¹⁾. *Achyranthes japonica* Nakai를 기원으로 한 것을 토우슬(土牛膝), *Achyranthes bidentata* Blume을 기원으로 한 것을 회우슬(懷牛膝)이라 명명한다. 牛膝은 국가마다 기원식물이 상이해 국내산 우슬의 경우 土牛膝, 중국에서는 懷牛膝, 천우슬(川牛膝), 마우슬(麻牛膝)을 사용하고 있으나, 현재 대한약전에서는 土牛膝과 懷牛膝 2종을 牛膝로 규정하고 있다. 土牛膝은 원기둥 모양의 원뿌리에 가늘고 긴 측근이 붙어있으며, 바깥면은 회색빛을 띤 노란색이거나 연한 노란색이다. 懷牛膝은 가늘고 인 원기둥 모양으로 약간 구부러져 있으며, 바깥면은 회황색과 황갈색을 띤다. 여러 개의 세로주름이 보인다²⁾.

牛膝의 주요 성분으로는 ecdysterone, inokosterone, ponaseroside A, rubrosterone 등이 알려져 있다³⁾. High performance liquid chromatography (HPLC) 분석 결과, 土牛膝과 懷牛膝 모두 ecdysterone을 함유하고 있었으며, 土牛膝에서 ecdysterone의 피크가 더 높게 나타났다⁴⁾. β -Ecdysterone은 항산화⁵⁾, 항염증, 면역 조절 효과⁶⁾ 및 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) 유도 신경독성으로부터 세포 보호 효과⁷⁾에 대한 보고가 있다. 土牛膝의 선행 연구는 lipopolysaccharide (LPS)로 유도한 염증 억제⁸⁾, 콜라겐 유도 관절염 생쥐에서의 관절염 개선⁹⁾, 허혈성 뇌손상 유발 흰쥐에서의 뇌신경세포 보호¹⁰⁾ 등의 효과가 보고되었다. 懷牛膝은 amyloid-beta ($A\beta$)에 의한 인지 기능 감퇴 및 신경염증 억제¹¹⁾, 연골 재생¹²⁾, 항당뇨¹³⁾, 면역 조절 활성화¹⁴⁾ 등의 효과가 보고된 바 있다. 또한 懷牛膝 유래 폴리펩타이드는 신경세포에서 MPP⁺¹⁵⁾, 6-hydroxydopamine (6-OHDA)¹⁶⁾으로 유도된 신경염증, 신경세포 사멸 억제 효과가 보고되었다.

土牛膝과 懷牛膝의 기원별 활성 비교 연구는 다음과 같이 보고된 바 있다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 소거능, SOD 활성도 측정을 통해 土牛膝 에탄올 추출물에서 懷牛膝 추출물 대비 항산화 효능이 높았으며¹⁷⁾, RAW264.7 cell에서 LPS에 의한 nitric oxide (NO) 생성 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현 증가를 土牛膝이 가장 강하게 억제한다는 결과가 보고되었다. 그러나 牛膝의 기원 및 추출 용매별 항신경염증 및 신경세포 보호에 대한 약리 활성을 비교한 연구는 전무하다. 따라서 본 연구에서는 土牛膝, 懷牛膝을 증류수 (distilled water; DW)와 70% 에탄올 (ethanol; EtOH)로 추출한 뒤, 이들의 항신경염증 및 신경세포 보호 효과를 비교하여 퇴행성뇌질환에 적용하기에 더 우수한 약재와 추출 용매의 근거를 제시하고자 하였다. 퇴행성뇌질환은 노화에 의한 신경세포의 퇴행으로 인해 발생되며, 대표적으로 신경염증 및 산화스트레스가 병리현상에 관여한다. 이에, BV2 미세아교세포에서 土牛膝 및 懷牛膝 용매별 추출물의 LPS로 유

도된 NO 생성 억제 효과를 비교하고, PC12 혹은 HT22 신경세포에서 산화스트레스 유발 독성인 hydrogen peroxide (H_2O_2), 퇴행성뇌신경질환 중 파킨슨병 및 알츠하이머병 모델에서 사용되는 독성인 6-OHDA 및 $A\beta$ plaque에 대한 신경세포 보호 효과를 평가하여 의미 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 *Achyranthes japonica* Nakai (AJ)는 자연 세상에서 국산 재배품을, *Achyranthes bidentata* Blume (AB)는 한뜻약초에서 중국산 재배품을 구입하였으며, 대한민국 약전 공정서를 기준으로 관능검사를 진행하였다. 각각의 원물 5 g에 20배의 DW와 70% EtOH을 가하여 환류 추출기에서 2 시간 동안 가열 추출하였다. 여과지를 사용하여 여과 후 70% EtOH 추출물은 감압농축을 진행하였다. 이후 동결건조를 통해 분말 형태의 시료를 확보하여 실험 전까지 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

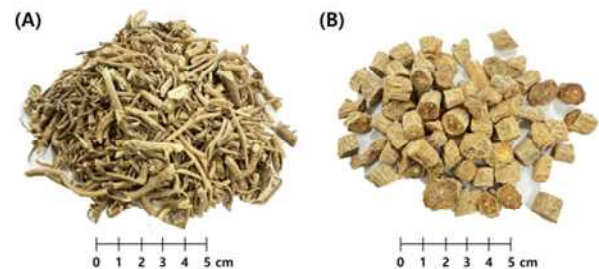


Figure 1 External view of herbal medicines.
(A) 土牛膝, *Achyranthes japonica* Nakai
(B) 懷牛膝, *Achyranthes bidentata* Blume

2) 시약

세포 배양에 필요한 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin (P/S)은 Gibco Industries Inc.에서 구입하였다. Ascorbic acid는 Junsei Inc.에서 구입하였다. 또한 6-OHDA, H_2O_2 , LPS, Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 기타 언급하지 않은 시약은 Sigma-Aldrich Inc. (St Louis, CA USA)에서 구입하였다. $A\beta_{25-35}$ 는 Anaspec사 (Fremont, CA USA)에서 구입하였다. 이후 증류수를 가하여 $500\text{ }\mu\text{M}$ 이 되도록 희석 후 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 3일 동안 incubation하여 amyloid plaque을 제조하였다.

2. 방법

1) 세포배양

Rat의 부신 수질에 발생한 pheochromocytoma PC12 세포, mouse 유래 해마 신경세포인 HT22 세포, 및 mouse 유래 미세아교세포인 BV2 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. PC12 세포의 세포배양은 37°C의 5% CO₂, 95% air 조건에서 이루어졌다. 배지는 10% FBS, 1% P/S가 포함된 high-glucose RPMI1640 배지를 사용하였다. HT22 세포와 BV2 세포의 세포배양은 37°C의 5% CO₂, 95% air 조건에서 이루어졌다. 배지는 10% FBS, 1% P/S가 포함된 high-glucose DMEM 배지를 사용하였다.

2) BV2 세포에서 LPS에 대한 항신경염증 효과 측정

土牛膝, 懷牛膝 추출물의 LPS에 대한 항신경염증 효과를 평가하고자 NO assay를 진행하였다. BV2 세포를 96 well plate에 2.0×10^4 cells/well 로 seeding 후 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 다음으로 土牛膝 및 懷牛膝 DW, 70% EtOH 추출물을 100 µg/mL로 전처리하고 배양하였다. 1시간 후 LPS 100 ng/mL로 독성을 유도한 후 incubator에서 23시간 배양했다. 반응이 종료된 후 상층액을 70 µL을 회수하여 동량의 griess reagent와 반응시킨 뒤, NO 생성량 확인을 위해서 10분 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 농도는 sodium nitrite를 표준물질로 설정하여 정량곡선 대비 수치로 계산하였다.

3) PC12 세포에서 세포 독성 측정

노란색 tetrazole인 MTT는 살아있는 세포 내 미토콘드리아에서 불용성인 보라색 formazan으로 환원되며, 세포 생존율 측정에 많이 사용된다. 해당 원리¹⁸⁾로 MTT assay를 진행하여 土牛膝, 懷牛膝 추출물의 세포 독성을 평가하였다. 약물의 세포 독성을 평가하기 위해, PC12 세포를 96 well plate에 4.0×10^4 cells/well로 seeding 후 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 다음으로 土牛膝 및 懷牛膝 DW, 70% EtOH 추출물을 100 µg/mL 농도로 전처리한 후, 6시간 배양했다. 반응이 종료된 후 상층액을 제거하고 MTT의 농도를 1 mg/mL로 처리하여 incubator에서 3시간 배양하였다. 이후 용액을 제거한 뒤, DMSO 100 µL를 넣어준 뒤, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군 대비 백분율로 표기하였다.

4) PC12 세포에서 H₂O₂ 및 6-OHDA에 대한 세포 보호 효과 측정

土牛膝, 懷牛膝 추출물의 H₂O₂, 6-OHDA 독성에 대한 신경세포 보호 효과를 평가하고자 MTT assay를 진행하였다. PC12 세포를 96 well plate에 4.0×10^4 cells/well로 seeding 후 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 다음으로 土牛膝 및 懷牛膝 DW, 70% EtOH 추출물을 100 µg/mL 농도로 전처리하고 배양하였다. 3시간 후 H₂O₂ 1 mM, 6-OHDA 250 µM 로 독성을 유도한 후 incubator에서 3시간 배양했다. 반응이 종료된 후 상층액을 제거하고 MTT의 농도를 1 mg/mL로 처리하여 incubator에서 3시간 배양하였다. 이후 용액을

제거한 뒤, DMSO 100 µL를 넣어준 뒤, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군 대비 백분율로 표기하였다.

5) HT22 세포에서 세포 독성 측정

土牛膝 및 懷牛膝 추출물의 세포 독성을 평가하기 위해, HT22 세포를 96 well plate에 4.0×10^3 cells/well로 seeding 후 incubator에서 18시간 동안 배양하였다. 다음으로 土牛膝 및 懷牛膝 DW, 70% EtOH 추출물을 100 µg/mL 농도로 전처리한 후, 24시간 배양했다. 반응이 종료된 후 상층액을 제거하고 MTT의 농도를 1 mg/mL로 처리하여 incubator에서 3시간 배양하였다. 이후 용액을 제거한 뒤, DMSO 100 µL를 넣어준 뒤, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군 대비 백분율로 표기하였다.

6) HT22 세포에서 Aβ₂₅₋₃₅ plaque에 대한 세포 보호 효과 측정

土牛膝 및 懷牛膝 추출물의 Aβ에 대한 신경세포 보호 효과를 평가하고자 MTT assay를 진행하였다. HT22 세포를 96 well plate에 4.0×10^3 cells/well로 seeding 후 incubator에서 18시간 동안 배양하였다. 다음으로 土牛膝 및 懷牛膝 DW, 70% EtOH 추출물을 100 µg/mL로 전처리하고 배양하였다. 1시간 후 Aβ₂₅₋₃₅ plaque 5 µM로 독성을 유도한 후 incubator에서 23시간 배양했다. 반응이 종료된 후 상층액을 제거하고 MTT의 농도를 1 mg/mL로 처리하여 incubator에서 3시간 배양하였다. 이후 용액을 제거한 뒤, DMSO 100 µL를 넣어준 뒤, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군 대비 백분율로 표기하였다.

3. 통계처리

모든 실험 측정값은 mean ± standard error of the mean (SEM)으로 표시하였다. Graphpad Prism 8.0.1 software (San Diego, USA)를 이용하여 시료 간 비교는 Student's *t*-test를 대조군과 비교한 시료의 효능은 One-way ANOVA, 사후 검증은 Tukey's test를 사용하여 통계적 유의성을 판단하였다. 분석 시 *P*값이 0.05 미만일 때 유의하다고 판단하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 시료 추출

다음은 土牛膝과 懷牛膝을 추출한 결과이다(Table 1). 土牛膝은 DW 추출물이 35.86%, 70% EtOH 추출물이 8.18%의 수득률을 보였다. 懷牛膝은 DW 추출물이 18.90%, 70% EtOH 추출물이 14.13%의 수득률을 보였다. 土牛膝과 懷牛膝 모두 DW에서 더 높은 수득률을 보였으며, DW 추출물에서는 土牛膝이, 70% EtOH 추출물에서는 懷牛膝이 더 높은 수득률을 나타내었다.

Table 1. Extraction Method, Solvent and Yield of Each Sample

Herb	Extraction method	Solvent	Yield (%)
<i>Achyranthes japonica</i> Nakai	Boiling (2 h)	DW	35.86
		70% EtOH	8.18
<i>Achyranthes bidentata</i> Blume	Boiling (2 h)	DW	18.90
		70% EtOH	14.13

2. BV2 세포에서 土牛膝 및 懷牛膝의 LPS에 의한 NO 생성 억제 효과 측정

BV2 세포에 土牛膝, 懷牛膝의 DW, 70% EtOH 추출물 100 µg/mL로 전처리하여 LPS에 의한 NO 생성 억제 효과를 확인하고자 하였다. NO 양 측정 결과, 대조군(3.17±0.63 µM)과 비교하여 LPS 단독 처리군(22.85±0.67 µM)에서 NO가 유의하게 증가하였다. 시료의 효능을 측정한 결과, 土牛膝, 懷牛膝 추출물 처리군에서 NO 생성량이 LPS 단독 처리군 대비 통계적으로 유의한 NO 발현 억제 효과를 확인하였다(AJD: 16.54±2.00 µM, AJE: 14.77±2.28 µM, ABD: 16.97±1.97 µM, ABE: 15.22±1.91 µM).

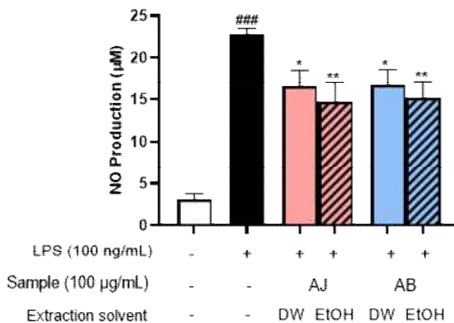


Figure 2. NO Inhibitory effects of AJ, AB in LPS-induced BV2 cells. The cells were pre-treated with DW and EtOH extracts of AJ and AB at a concentration of 100 µg/mL for 1 h and exposed to LPS 100 mg/mL for an additional 23 h. NO concentration was measured by colorimetric assay at 540 nm. Values were given as the mean ± SEM. ###p<0.001; compared with control group. **p<0.01. *p<0.05; compared with LPS only treated group.

3. PC12 세포에서 土牛膝 및 懷牛膝의 세포 독성 측정

土牛膝, 懷牛膝의 DW, 70% EtOH 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 PC12 세포에 牛膝 추출물을 100 µg/mL 농도로 처리한 뒤, MTT assay를 통해 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, 대조군 대비 土牛膝, 懷牛膝 추출물 처리 군에서 통계적으로 유의적인 차이를 보이는 세포독성이 나타나지 않았다.

4. PC12 세포에서 H2O2에 대한 土牛膝 및 懷牛膝의 신경세포 보호 효과 측정

PC12 세포에 土牛膝, 懷牛膝의 DW, 70% EtOH 추출물 100 µg/mL로 전처리한 뒤, H₂O₂ 독성을 처리하여 MTT assay를 통해 세포 생존율을 평가하였다. H₂O₂ 독성은 대조군과 비교하여 유의하게 세포 사멸을 유도하였다(49.6±1.59%). 반면, 土牛膝, 懷牛膝 추출물 처리군의 세포 생존율은 H₂O₂ 독성 단독 처리군 대비 통계적으로 유의한 신경보호 효과를 보였으며 같은 기원 내에서 DW 추출물보다 70% EtOH 추출물에서 유의적으로 강한 신경세포 보호 효능을 나타내었다(AJD: 57.04±1.30%, AJE: 73.23±1.58%, ABD: 62.82±1.02%, ABE: 74.02±0.92%).

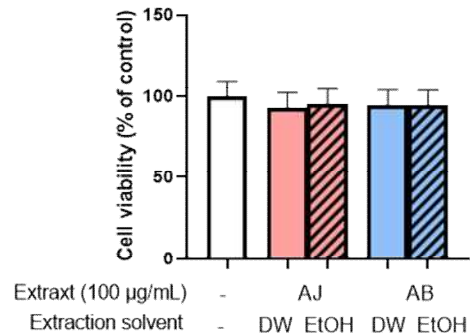


Figure 3 Cytotoxicity of AJ and AB extracts in PC12 cells. The cells were treated with DW and EtOH extracts of AJ and AB at a concentration of 100 µg/mL for 6 h. Cell viability was measured by MTT assay at 570 nm. Values were given as the mean ± SEM.

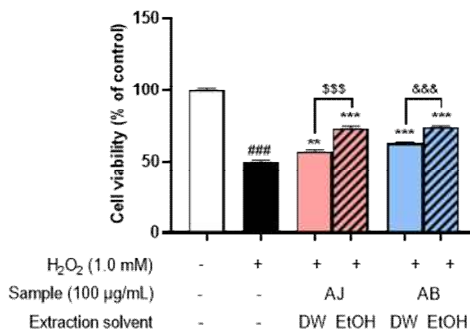


Figure 4 Protective effects of AJ, AB on H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells. The cells were pre-treated with DW and EtOH extracts of AJ and AB at a concentration of 100 µg/mL for 3 h and exposed to H₂O₂ 1 mM for an additional 3 h. Cell viability was measured by MTT assay at 570 nm. Values were given as the mean ± SEM. ###p<0.001; compared with control group. ***p<0.001, **p<0.01; compared with H₂O₂ only treated group. \$\$\$p<0.001; compared with AJ-treated groups. \$\$\$p<0.001; compared with AB-treated groups.

5. PC12 세포에서 6-OHDA에 대한 土牛膝 및 懷牛膝의 신경세포 보호 효과 측정

PC12 세포에 土牛膝, 懷牛膝의 DW, 70% EtOH 추출물 100 µg/mL로 전처리한 뒤, 6-OHDA 독성을 처리하여 MTT assay를 통해 세포 생존율을 평가하였다. 6-OHDA 독성은 대조군과 비교하여 유의하게 세포 사멸을 유도하였다(57.27 ± 2.42%). 土牛膝, 懷牛膝 추출물 처리군에서 6-OHDA 독성 단독 처리군 대비 통계적으로 유의한 신경보호 효과를 보였으며 같은 기원 내에서 DW 추출물보다 70% EtOH 추출물에서 유의적으로 강한 신경세포 보호 효능을 나타내었다(AJD: 63.80 ± 1.68%, AJE: 75.96 ± 1.57%, ABD: 64.59 ± 1.11%, ABE: 72.50 ± 1.25%).

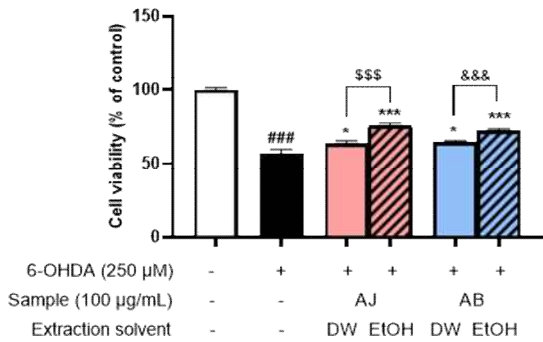


Figure 5 Protective effects of AJ, AB on 6-OHDA-induced cytotoxicity in PC12 cells. The cells were pre-treated DW and EtOH extracts of AJ and AB at a concentration of 100 µg/mL for 3 h and exposed to 6-OHDA 250 µM for an additional 3 h. Cell viability was measured by MTT assay at 570 nm. Values were given as the mean ± SEM. ###p < 0.001; compared with control group. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05; compared with 6-OHDA only treated group. \$\$\$p < 0.001; compared with AJ-treated groups. &&&p < 0.001; compared with AB-treated groups.

6. HT22 세포에서 土牛膝 및 懷牛膝의 세포 독성 측정

HT22 세포에서 土牛膝, 懷牛膝의 DW, 70% EtOH 추출물의 세포독성을 평가하고자 100 µg/mL 농도로 牛膝 추출물을 처리한 뒤, MTT assay를 통해 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, PC12 세포와 동일하게 대조군 대비 土牛膝, 懷牛膝 추출물 처리 군에서 세포독성이 확인되지 않았다.

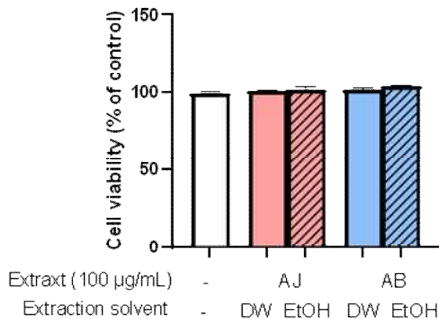


Figure 6 Cytotoxicity of AJ and AB extracts in HT22 cells. The cells were treated DW and EtOH extracts of AJ and AB at a concentration of 100 µg/mL for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay at 570 nm. Values were given as the mean ± SEM.

7. HT22 세포에서 Aβ₂₅₋₃₅ plaque에 대한 土牛膝 및 懷牛膝의 신경세포 보호 효과 측정

HT22 세포에 AJ, AB의 DW, 70% EtOH 추출물 100 µg/mL로 전처리한 뒤, Aβ₂₅₋₃₅ plaque 독성을 처리하여 MTT assay를 통해 세포 생존율을 평가하였다. Aβ₂₅₋₃₅ plaque 단독 처리군은 대조군과 비교하여 유의하게 세포 사멸을 유도하였다(31.53 ± 0.32%). 土牛膝, 懷牛膝 70% EtOH 추출물 처리군은 각각 36.87 ± 0.26%, 36.98 ± 1.66%의 세포 생존율을 보여 Aβ₂₅₋₃₅ plaque 독성 단독 처리군 대비 통계적으로 유의한 신경세포 보호 효과를 보였다.

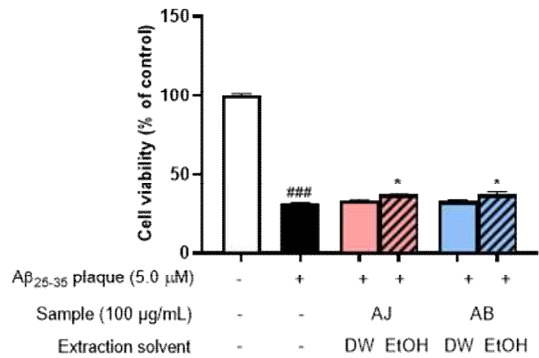


Figure 7 Protective effects of AJ, AB on Aβ₂₅₋₃₅ plaque-induced cytotoxicity in HT22 cells. The cells were pre-treated DW and EtOH extracts of AJ and AB at a concentration of 100 µg/mL for 1 h and exposed to Aβ₂₅₋₃₅ plaque 5 µM for an additional 23 h. Cell viability was measured by MTT assay at 570 nm. Values were given as the mean ± SEM. ###p < 0.001; compared with control group. *p < 0.05; compared with Aβ₂₅₋₃₅ plaque only treated group.

IV. 고 찰

본 연구에서는 土牛膝와 懷牛膝 DW 및 70% EtOH 추출물의 항신경염증 및 신경보호 효능을 비교하였다.

고령화 사회로의 진입과 함께 파킨슨병, 알츠하이머병 등과 같은 퇴행성 뇌질환의 발병률이 급증하고 있으며¹⁹⁾, 이는 중대한 사회적 문제로 대두되고 있다. 이러한 질환에서는 신경세포 사멸이 두드러지게 나타나며, 신경세포의 사멸은 자유라디칼 형성, 미토콘드리아 기능 장애 등 다양한 요인에 의해 유발될 수 있다²⁰⁾. 그중에서도 염증반응은 주요한 병리적 원인으로, 중추신경계의 염증반응은 미세아교세포의 과활성화를 동반하며, 이 과정에서 염증 매개물질인 NO가 과도하게 방출되어 신경세포의 사멸을 유도하여 질환의 진행을 가속화한다²¹⁾.

본 연구에서는 BV2 미세아교세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 대한 土牛膝 및 懷牛膝의 억제 효과를 평가하였다. LPS는 그람 음성균의 외막에 존재하는 독성 물질로 toll like receptor에 결합하여 NO 및 염증성 cytokine들의 발현을 증가시킨다²²⁾. 실험 결과, 土牛膝 및 懷牛膝 추출물은 모두 유의적으로 NO 생성을 억제하였으며, 기원 및 추출용매 별 유의적인 효능 차이를 보이지 않았다. 향후 신경염증 관련 신호전달

경로에 대한 기원 및 추출용매 별 牛膝의 약리 기전 비교 연구 또한 필요하다고 사료된다.

6-OHDA는 파킨슨병 모델에 대표적으로 사용하는 독성으로 도파민, 노르아드레날린성 뉴런에 들어가 카테콜아민 신경계를 손상시킨다²³⁾. 이는 빠른 속도로 산화하여 H₂O₂, superoxide radical 등의 산화 물질을 생성 후 세포자멸사를 일으킨다. 본 실험 결과, 土牛膝 및 懷牛膝 추출물 처리군에서 강한 신경세포 보호 효과를 보였으며, 기원 간 효능의 유의미한 차이는 없었으나 70% EtOH 추출물에서 DW 추출물보다 더 강한 활성을 보였다. 나아가, HT22 세포에서 Aβ 에 대한 土牛膝 및 懷牛膝의 세포 보호 정도를 평가하였다. 알츠하이머형 치매의 대표적인 병리적 산물인 Aβ 는 뇌에서 산화스트레스 및 신경염증을 유도시켜 신경세포 및 시냅스 기능 장애와 사멸을 촉진시키는 것으로 알려져있다²⁴⁾. 실험 결과, 土牛膝 및 懷牛膝의 70% EtOH 추출물 처리군에서 유의적인 신경세포 보호 효과를 확인하였으며, 향후 각 독성으로 유도된 파킨슨병 및 알츠하이머병 마우스 모델에서 牛膝 70% EtOH 추출물의 용량 의존적 효능 검증 및 기원별 약리 기전을 비교하는 연구가 필요하다.

본 연구에서는 牛膝의 기원별 추출물의 화학적 성분 프로파일을 비교하지 못한 한계점이 있지만, 실험 결과 확인 시, 土牛膝과 懷牛膝의 항신경염증 및 신경세포 보호 효능은 기원 간 유의적인 활성 차이가 보이지 않았다. 반면, 70% EtOH 추출물이 DW 추출물보다 대체로 우수한 신경세포 보호 효능을 확인하였다. HPLC 성분 분석 연구에 따르면 土牛膝과 懷牛膝은 대표 유효성분인 ecdysterone, inokosterone를 모두 함유하고 있으며 이들의 함량 차이는 ecdysterone을 제외하고 유사한 정도를 보였다²⁵⁾. 한편, 70% EtOH은 추출 용매로 사용 시 DW에 비해 극성 및 비극성 물질을 모두 효과적으로 용해시키는 것으로 알려져 있으며, 특히 페놀류와 플라보노이드 계열 화합물의 추출 효율이 높은 것으로 보고되었다²⁶⁾. 土牛膝과 懷牛膝은 폴리페놀과 플라보노이드를 풍부하게 함유하고 있어²⁷⁾, 퇴행성뇌질환 제어를 위한 유망한 후보물질로 고려되는 만큼, 70% EtOH이 DW보다 더 효과적인 용매일 것으로 고려되며, 향후 활성 성분 프로파일을 통해 퇴행성뇌질환에 대한 牛膝의 정확한 유효 성분을 도출하는 후속 연구가 필요하다.

V. 결 론

본 연구에서는 土牛膝과 懷牛膝의 용매별 시료들의 항신경염증 및 신경세포 보호 효과를 비교 후 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BV2 세포에서 LPS에 의한 NO 생성에 대한 土牛膝과 懷牛膝의 억제 효능을 측정된 결과, 土牛膝과 懷牛膝 DW, 70% EtOH 추출물은 모두 강한 효능을 보였으며, 기원 및 용매별 활성의 큰 차이를 보이지 않았다.

2. PC12 세포에서 H₂O₂, 6-OHDA 독성에 대한 土牛膝과 懷牛膝의 신경세포 보호 효과를 측정된 결과, 土牛膝과 懷牛膝 처리군에서 모두 유사하게 강한 효과를 보였으며 70% EtOH 추출물이 DW 추출물 대비 더 우수한 효과를 보였다.

3. HT22 세포에서 Aβ 독성에 대한 土牛膝과 懷牛膝의 신경세포 보호 효과를 측정된 결과, 土牛膝과 懷牛膝 70% EtOH 추출물 처리군에서 유사하게 강한 효과를 보였다.

이상의 결과에서 土牛膝과 懷牛膝은 유사하게, 그리고 DW 추출물보다 70% EtOH 추출물이 항신경염증 및 신경보호 효능이 우수함을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한국보건산업진흥원의 한의디지탈융합기술개발사업(HI23C1263) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Seo BI, Kwon DY, Choi HY, Lee JH, Oh MS, Bu YM. Medicinal Herbology. 8th rev. ed. Seoul : YounglimSa, 2012:612-3.
2. Seo BI, Kwon DY, Choi HY, Lee JH, Oh MS, Bu YM. Medicinal Herbology. 8th rev. ed. Seoul : YounglimSa, 2012:612.
3. Yang L, Jiang H, Wang QH, Yang BY, Kuang HX. A new feruloyl tyramine glycoside from the roots of *Achyranthes bidentata*. Chin J Nat Med. 2012 Jan; 10(1):16-9. doi: 10.1016/S1875-5364(12)60003-X.
4. Zhao BT, Jeong SY, Moon DC, Son KH, Son JK, Woo MH. High performance liquid chromatography used for quality control of *Achyranthis Radix*. Arch Pharm Res. 2012 Aug;35(8):1449-55. doi: 10.1007/s12272-012-0815-2.
5. Gholipour P, Komaki A, Ramezani M, Parsa H. Effects of the combination of high-intensity interval training and Ecdysterone on learning and memory abilities, antioxidant enzyme activities, and neuronal population in an Amyloid-beta-induced rat model of Alzheimer's disease. Physiol Behav. 2022 Jul 1:251:113817. doi: 10.1016/j.physbeh.2022.113817.
6. Zhang X, Xu X, Xu T, Qin S. β-Ecdysterone suppresses

- interleukin- 1β -induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes via inhibition of NF- κ B signaling pathway. *Drug Dev Res.* 2014 May;75(3):195-201. doi: 10.1002/ddr.21170.
7. Zou Y, Wang R, Guo H, Dong M. Phytoestrogen β -Ecdysterone Protects PC12 Cells Against MPP+-Induced Neurotoxicity In Vitro: Involvement of PI3K-Nrf2-Regulated Pathway. *Toxicol Sci.* 2015 Sep;147(1):28-38. doi: 10.1093/toxsci/kfv111.
 8. Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Park KC, Seo SH, Kim DG, Shin JY, Gwak TS, Lee JH, ee GS, Park SJ, Song-HJ. The anti-inflammatory effect of *Lithospermum Erythrorhizon* on lipopolysaccharide - induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbology.* 2013;28(2):67-73. doi: 10.6116/kjh,2013,28,2,67.
 9. Park YK, Kim CS. The therapeutic effect of *Achyranthis Radix* on the collagen-induced arthritis in mice. *Kor. J. Herbology.* 2010;25(4):129-135. doi: 10.6116/KJH,2010,25,4,129.
 10. Oh TW, Park KH, Lee MY, Choi GY, Park YK. Effects of the water extract from *Achyranthis Radix* on serum-deprivation-induced apoptosis in PC12 cells and transient cerebral middle artery occlusion-induced ischemic brains of rats. *Kor. J. Herbology.* 2012;27(2):77-83. doi: 10.6116/kjh,2012,27,2,77.
 11. Lin LW, Tsai FH, Lan WC, Cheng YD, Lee SC, Wu CR. Steroid-Enriched Fraction of *Achyranthes bidentata* Protects Amyloid β Peptide 1-40-Induced Cognitive Dysfunction and Neuroinflammation in Rats. *Mol Neurobiol.* 2019 Aug;56(8):5671-5688. doi: 10.1007/s12035-018-1436-7.
 12. Peng LP, Ma DJ, Pei JY, Lin DD, He SH, Wang LX, Yu TA. Effect of alcohol extract of *Achyranthes* on the cartilage in rabbits with acute cartilage damage. *Trad Chin Med.* 2013; 54(17):1504-6. doi: 10.13288/j.11-2166/r.2013.17.028.
 13. Zhang J, Yang XD, Song GC. Protective effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharide on brain tissue of diabetic rats and its mechanism. *Trad Chin Med.* 2010;9:58-9. doi: 10.14046/j.cnki.zyytb2002.2010.05.017.
 14. Fan SR, Wang YX, Zhang Y, Wu YM, Chen XM. *Achyranthes bidentata* polysaccharide activates nuclear factor-Kappa B and promotes cytokine production in J774A 1 cells through TLR4/MyD88 signaling pathway. *Front Pharmacol.* 2021 Oct 1:12:753599. doi: 10.3389/fphar.2021.753599.
 15. Peng S, Wang C, Ma J, Jiang K, Jiang Y, Gu X, Sun C. *Achyranthes bidentata* polypeptide protects dopaminergic neurons from apoptosis in Parkinson's disease models both in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 2018 Feb;175(4):631-643. doi: 10.1111/bph.14110.
 16. Peng S, Xu L, Ma JY, Gu XS, Sun C. *Achyranthes bidentata* polypeptide protects dopaminergic neurons from apoptosis induced by rotenone and 6-hydroxydopamine. *Neural Regen Res.* 2018 Nov;13(11):1981-1987. doi: 10.4103/1673-5374.239446.
 17. Park JS, Seong NS, Lee YJ. Comparative Study on the Anti-Oxidative Effects of *Achyranthis Japonicae Radix*, *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulale Radix*. *Kor. J. Herbology.* 2007;22(4):155-167.
 18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
 19. Kim JS, Baik JS, Kim SJ, Cho JW, Koh SB, Park KW, Ma hl, Kim YJ, Lee PH, Ahn TB, Ahn JY, Chung SJ, Kim YD, Choi SM, Park JH, Lee HW, Park MY, Kim JH, Kim HT. Current status and future of Parkinson's disease in Korea. *Parkinsonism Relat Disord.* 2003 Aug;9 Suppl 2:99-104. doi: 10.1016/s1353-8020(03)00025-7.
 20. Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med.* 2010 Mar;14(3):457-87. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01010.x.
 21. Inkanuwat A, Sukaboon R, Reamtong O, et al. Nitric Oxide Synthesis Inhibition and Anti-Inflammatory Effect of Polypeptide Isolated from Chicken Feather Meal Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Food Technol Biotechnol.* 2019 Jun;57(2):200-212. doi: 10.17113/ftb.57.02.19.5964
 22. Romano KP, Hung DT. Targeting LPS biosynthesis and transport in gram-negative bacteria in the era of multi-drug resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2023 Mar;1870(3):119407. doi: 10.1016/j.bbamcr.2022.119407.
 23. Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* 2005 Jul;2(3):484-94. doi: 10.1602/neurorx.2.3.484.
 24. Zhang Y, Chen H, Li R, Sterling K, Song W. Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 Jun 30;8(1):248. doi: 10.1038/s41392-023-01484-7.
 25. Zhao BT, Jeong SY, Moon DC, Son KH, Son JK, Woo MH. High performance liquid chromatography used for quality control of *Achyranthis Radix*. *Arch Pharm Res.* 2012 Aug;35(8):1449-55. doi: 10.1007/s12272-012-0815-2.
 26. Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang H. Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant

Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015: 595393. doi: 10.1155/2015/595393.

27. Lee YS, Kim MS, Duck JK, Ho YS. A Comparison of the Components and Biological Activities of the Ethanol Extracts of *Achyranthes japonica* Nakai and *Achyranthes bidentata* Blume. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 41(4): 416–424. doi: 10.4014/kjmb.1307.07001.