

뇌졸중 치료 생약 추출물의 흥분성 신경독성 억제효과

조정숙[#] · 양재하* · 박창국* · 이희순** · 김영호***

동국대학교 의과대학, *경산대학교 한의과대학, **충북대학교 약학대학, ***충남대학교 약학대학
(Received October 8, 1999)

Inhibition of Excitotoxic Neuronal Cell Death By Total Extracts From Oriental Medicines Used For Stroke Treatment

Jungsook Cho[#], Chae Ha Yang*, Chang Gook Park*,
Heesoon Lee** and Young Ho Kim***

College of Medicine, Dongguk University, Kyongju, Kyongbuk 780-714,
*College of Oriental Medicine, Kyungsan University, Taegu, Kyongbuk 706-060,
**College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, and
***College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon, Chungnam 305-764, Korea

Abstract — The methanol extracts were prepared from 46 oriental medicines currently used for stroke treatment, and the effects were assessed on the excitotoxic neuronal cell death induced by L-glutamate(Glu) in primary cultured rat cortical neurons. The extracts from *Angelicae gigantis Radix*, *Manitis Squama*, *Acori graminei Rhizoma*, *Uncariae Ramulus et Uncus*, *Alpiniae Fructus*, *Paoniae Radix*, and *Cnidii Rhizoma* inhibited the Glu-induced neurotoxicity with the IC_{50} values of 95.2, 218.6, 263.3, 295.1, 297.9, 310.1, and 446.7 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The extracts from *Arisaematis Rhizoma*, *Loranthi Ramulus*, *Anemarrhenae Rhizoma*, *Carthami Flos*, *Clematidis Radix*, *Bambusae Concretio Silicea*, and *Angelicae koreanae Radix* also exhibited significant inhibition of the toxicity. In contrast, the extracts from *Aconiti Tuber*, *Araliae cordatae Radix*, *Curcuma Rhizoma*, *Leonuri Herba*, *Polygalae Radix*, *Salviae Radix*, and *Siegesbeckiae Herba* increased the Glu-induced toxicity at the concentrations of 500 and 1000 $\mu\text{g/ml}$. Rest of the extracts evaluated in the present study showed minor or negligible inhibition. Taken together, the oriental medicines including *Angelicae gigantis Radix*, *Manitis Squama*, *Acori graminei Rhizoma*, *Uncariae Ramulus et Uncus*, and *Alpiniae Fructus* appear to exert pharmacological effects through the inhibition of excitotoxic neuronal cell death. Further studies are in progress to characterize active principles in these extracts.

Keywords □ Excitotoxicity, stroke, *angelicae gigantis radix*, *manitis squama*, *acori graminei rhizoma*, *uncariae ramulus et uncus*.

중추신경계 신경질환의 발생률은 세계적으로 증가 추세에 있으며, 특히 뇌졸중의 경우 심장순환계 질환과 약성종양 다음으로 3대 사망원인을 차지하고 있다.¹⁾ 급격한 의식장애와 제반 운동 및 감각장애를 수반하는 뇌졸중은 회복이 된다 하더라도 여러 가지 정신적, 육체적 후유증을 남기기 때문에 가정적, 사회적인 문제점을

을 야기하는 경우가 많다. 뇌졸중에서 관찰되는 신경학적 손상과 각종 후유증을 줄이기 위해서는 현재 사용되고 있는 약물²⁾ 외에 보다 더 효과적인 치료방법을 제공할 수 있는 새로운 약물의 개발이 시급하다.

중추신경계에서 연접가소성, 학습 및 기억 등에 관여하는 흥분성 신경전달물질인 L-glutamate(Glu)는 뇌졸중, 간질, 뇌손상 등의 뇌신경질환에서 비정상적으로 다량 유리되어 신경세포에 존재하는 수용체를 지속적으로 자극시킴으로서 흥분성 세포독성을 초래하는 일

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0561-770-2419 (팩스) 0561-770-2447

련의 과정을 유도한다고 알려져 있다.^{3,4)} 중추성 신경 질환에서 관찰되는 신경세포 손상을 억제하기 위하여, 이들 질환에서 Glu에 의해 유발되는 흥분성 신경독성을 효과적으로 차단하는 약물을 개발하고자 최근 많은 연구자들이 다각적 노력을 기울여 왔다. 그 결과, Glu 수용체의 작용을 길항하는 약물로서 시험관내 및 생체내 연구를 통해 효능이 입증된 몇 가지 약물은 현재 인체를 대상으로 임상적 연구단계에 진입해 있다.^{5,6)}

예로부터 우리 나라를 비롯한 동양의 여러 나라에서는 뇌졸중의 예방 및 치료에 한약을 많이 사용해왔다. 전통적으로 사용되어 온 한약의 치료효과를 인정하고, 더 나아가 보다 효율적인 사용, 새로운 한방처방과 제제의 개발, 한약에 함유된 활성성분을 이용한 신약개발 등을 위해서는 한약의 약리적 효능을 실험적으로 입증하고 작용기전을 규명하는 연구가 필수적이다. 이러한 시도로서 배양한 뇌신경세포를 이용한 실험을 통해 Glu에 의한 흥분성 신경독성을 억제하는 생약을 검색한 결과, 신경세포 피사 억제작용을 나타내는 지모, 반하, 오미자, 창포의 추출물과 은행잎 추출 성분에 대한 뇌졸중 또는 알츠하이머씨병 치료제로서의 가능성이 제기된 바 있다.⁷⁻⁹⁾ 또한, 뇌졸중 치료에 사용되는 한방처방인 소합향원은 흰쥐의 뇌경색 실험모델에서 경색면적을 감소시켜 그 효능이 실험적으로 입증되었다.¹⁰⁾

본 연구에서는 문헌적인 고찰과 현재 임상에서 뇌졸중 치료에 사용중인 처방에 함유된 생약을 종합적으로 검토하여 46종의 단미생약을 일차적으로 선정하고, 선정된 생약의 메탄올 추출물에 대하여 일차 배양한 흰쥐 대뇌피질 신경세포에서 Glu로 유발한 흥분성 독성에 대한 효과를 측정하고, 신경세포 보호효과를 나타내는 수종의 생약을 선별하였다. 선별된 생약으로부터 약효를 발휘하는 성분을 규명하기 위한 연구가 진행중이며, 이와 같은 연구는 본 연구와 더불어 한방의 과학화와 효과적인 뇌졸중 치료제 개발을 위해 유익한 정보를 제공할 것이다.

실험방법

시약

임신된 흰쥐(Sprague-Dawley)는 대한실험동물에서 구입하였고, minimum essential media(MEM; with Earle's salts, without L-glutamine and sodium

bicarbonate), fetal bovine serum(FBS), horse serum(HS)은 Gibco BRL(Gaithersburg, USA)에서, poly-L-lysine, laminin, glucose, L-glutamine, L-Glu, cytosine arabinoside 및 lactate dehydrogenase(LDH) 정량 kit(Sigma 500C)은 Sigma Chemical Company(St. Louis, USA)에서 구입하였으며, 세포배양용 24-well plate는 Falcon(Lincoln Park, USA)에서 구입하여 사용하였고, 기타 일반 시약은 특급품을 사용하였다.

메탄올 추출물의 제조

생약(46종)은 대구 소재 건재상에서 구입하여 경산대학교 한의과대학 본초학 교실에서 검증을 거친 후 사용하였다. 각 생약(약 40 g)을 세절한 후, 70% methanol을 사용하여 실온에서 72시간동안 추출하고 Whatman filter paper로 여과한 후 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하였다. 농축된 메탄올 추출물은 다시 동결건조기에서 건조시킨 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 필요 농도의 200배로 용해시킨 다음 희석하여 사용하였다. 배양세포에 처리할 때의 최종 DMSO 농도는 배양세포에 영향을 미치지 않는 0.5% 이하의 농도를 사용하였다.

흰쥐 대뇌피질 신경세포의 일차배양

대뇌피질 신경세포의 배양은 Ditcher의 방법을 수정하여 수행하였다.¹¹⁾ 즉, 16~18일 된 Sprague-Dawley embryo에서 대뇌피질 부분을 분리한 후 해부 현미경을 이용하여 뇌막을 제거한 다음, 25 mM 포도당, 5% FBS, 5% HS, 2 mM L-glutamine을 함유한 MEM에서 알코올 램프로 pore size를 조절한 파스텔 피펫을 이용하여 단일세포로 분리한 후, poly-L-lysine과 laminin으로 피막을 입힌 24-well plate에 well당 4×10^5 의 밀도로 이식하여 37°C 배양기에서 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 배양하였다. 주당 2회 배양액의 일부를 교환하였으며, 이식 후 7~9일에 10 μM cytosine arabinoside로 24~72시간 동안 처리하여 신경세포 이외의 세포 성장을 억제시켰다. 배양 세포는 이식 후 10~14일에 실험에 사용하였다.

흥분성 세포독성 유발 및 유발된 세포손상 측정

배양된 대뇌피질 신경세포에서 Glu에 의한 흥분성 신경독성은 Patel 등¹²⁾의 방법을 변형하여 유발하였다. Earle's balanced salt solution(EBSS)으로 3회 세척

한 배양세포를 300 μM Glu를 함유한 Mg^{2+} -free EBSS로 15분간 실온에서 처리하고, 다시 EBSS로 3회 세척한 후 25 mM 포도당 및 2 mM L-glutamine을 함유한 MEM으로 배양액을 교환하여 37°C 배양기에서 95% 공기/5% CO_2 를 유지하면서 24시간동안 배양하였다. Glu에 의해 유발된 신경독성에 대한 생약 추출물의 효과를 측정하기 위해서는 배양세포를 Glu로 처리할 때 여러 농도의 추출물을 동시에 첨가하여 처리하였다. 유발된 세포독성은 phase-contrast microscope을 이용하여 형태학적으로 평가하거나, 배양액 상층에 유리되는 LDH의 양을 측정하여 세포의 손상정도를 정량화하였다.

Data 분석

실험결과는 1회 2군씩 3회 반복하여 얻은 실험 data를 평균하여 나타내었으며, 50% 억제효과(IC_{50})를 나타내는 농도는 Prism(Graphpad software Inc., USA)을 이용한 비선형 회귀분석으로 계산하였다. 통계학적 유의성은 Student's *t*-test로 검정하였다.

실험결과 및 고찰

뇌졸중에서 관찰되는 신경세포의 손상과정에는 과다 유리된 Glu에 의한 흥분성 세포독성이 매우 중요한 역할을 한다. 일차배양된 흰쥐의 대뇌피질 신경세포를 Glu(300 μM)로 15분간 처리하여 Glu에 의한 흥분성 세포독성을 실험적으로 유도한 결과, 시간 의존적인 형태학적 변화가 보고¹³⁾된 결과와 유사하게 관찰되었다. 초기에는 세포가 팽창되었고 시간이 지남에 따라 세포로부터 뺀어 나온 축삭돌기가 손상되기 시작하였으며, 24시간 경과 후에는 형체를 알아볼 수 없을 정도로 세포가 손상되는 자연성 세포독성이 나타났다. 이러한 실험조건에서 손상을 입은 세포는 이미 보고¹³⁾된 바와 같이 대부분이 신경세포였으며, 정상세포와 같은 신경 세포 이외의 세포들은 손상되지 않은 상태로 현미경으로 관찰되었다. 이와 같이 배양 뇌세포에서 Glu에 의해 유발되는 흥분성 독성은 세포의 종류에 따라 감수성에 차이가 있을 뿐만 아니라 배양기간에 따라서도 다르게 나타난다. 배양 7일 이내의 미성숙세포는 Glu로 처리하더라도 비교적 손상을 받지 않는 반면, 본 연구에서 사용한 것과 같이 10~14일간 배양한 성숙 세포는 Glu에 의해 현저한 세포독성을 나타내며,¹³⁻¹⁵⁾

이는 신경세포의 발달과정에서 발현되는 Glu 수용체의 차이에 기인하는 것으로 알려져 있다.^{4,14)} 과다 유리된 Glu에 의한 흥분성 신경세포 손상에는 이온 channel 형태의 Glu 수용체 subtype인 *N*-methyl-D-aspartic acid(NMDA) 수용체와 (\pm)- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid(AMPA) 및 kainic acid 수용체가 관여한다.⁴⁾

배양 신경세포에서 Glu에 의해 유발된 손상은 비상경적 NMDA 수용체 길항제인 MK-801에 의해 농도 의존적으로 억제되었으며, 8.7 nM에서 50%의 억제효과를 나타냄으로서 기존의 보고¹⁶⁾된 결과와 일치함을 확인한 후 실험을 시행하였다. 이와 같이 Glu로 유발된 흥분성 독성에 대한 생약의 작용을 연구하기 위하여, 실험방법에 명시한 바와 같이 70% 메탄올을 사용하여 선정된 46종의 생약으로부터 각각의 추출물을 제조하였다. 추출물의 수득율은 Table I에 나타낸 바와 같이 생약의 종류별로 다양했으며, 가온추출 방법을 사용했다면 더 높은 수득율을 얻었을 것으로 생각된다. 흥분성 신경독성에 대한 추출물의 효과는, 배양세포를 추출물과 Glu로 동시에 처리했을 때 배양액으로 유리되는 LDH 활성을 Glu만으로 처리하였을 때 유리되는 LDH의 활성에 대한 백분율로 표시하였다. 우선, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 1000 $\mu\text{g}/\text{m}$ 의 두 농도에서 각 추출물의 효과를 측정한 결과, 석창포, 당귀, 천궁, 조구등은 500 $\mu\text{g}/\text{m}$ 에서 Glu로 유발한 독성의 25.5, 39.1, 45.5, 31.0%를 각각 발현하였다. 농도를 1000 $\mu\text{g}/\text{m}$ 로 증가시킨 경우 당귀의 효과는 500 $\mu\text{g}/\text{m}$ 에서와 유사하였으나 조구등의 효과는 오히려 감소하였다. 이는 조구등 추출물 자체가 고농도에서 배양세포에 미치는 영향 때문인 것으로 판단된다. 홍화, 위령선, 상기생, 초오, 강활 등은 500 $\mu\text{g}/\text{m}$ 에서의 억제효과보다 증가된 효과를 1000 $\mu\text{g}/\text{m}$ 에서 발현하였으며, 세포에 대한 추출물 자체의 영향은 없었다.

한편, 부자, 독활, 울금, 두충, 익모초, 원지, 단삼, 오공, 희령 추출물은 Glu에 의해 유발된 흥분성 신경독성을 전혀 억제하지 못했으며, 오히려 Glu의 독성을 증강시키는 것으로 나타났다. 이 경우에도 고농도의 조구등과 마찬가지로 배양 뇌세포에 대한 추출물 자체의 독성에 의한 영향으로 측정되었다. 뇌졸중 치료처방에 사용되고 있는 생약의 추출물이 배양세포에서 손상을 초래한다는 결과는 의외이긴 하지만, 이 실험에서 사용한 추출방법과 임상에서 사용하는 추출방법이 다르

Table I – Effects on glutamate(Glu)-induced neuronal cell death of total extracts prepared from 46 oriental medicines. Primary cultured rat cortical neurons were exposed to Glu (300 μ M) for 15 min in the presence of the extracts at the concentrations of 500 or 1000 mg/ml. After 24h of incubation, the neuronal injury was assessed by measuring LDH activities in the culture media. Control LDH activity was determined in the culture media of cortical neurons exposed to Glu in the absence of the extracts. Data are expressed as the means of % control LDH release from 3 separate experiments of 2 determinations.

Samples (70% MeOH Ex)	Yield ^{c)} (%)	% Control LDH release	
		at 500 μ g/ml	at 1000 μ g/ml
Achyranthis Radix (우슬)	13.3	97.2	70.7
Aconiti koreani Tuber (백부자)	3.7	97.7	91.3
Aconiti ciliare Radix (초오)	13.0	91.4	65.4
Aconiti Tuber (부자)	1.7	110.2	104.1
Acori graminei Rhizoma (석창포)	6.1	25.5	40.6
Alpiniae Fructus (익지인)	2.2	55.7	105.7
Anemarrhenae Rhizoma (지모)	29.8	55.5	58.9
Angelicae gigantis Radix (당귀)	13.8	39.1	38.5
Angelicae koreanae Radix (강활)	16.5	86.9	57.3
Araliae cordatae Radix (독활)	3.0	134.3	129.1
Antelopsis Cornu (영양각)	1.6	83.5	91.2
Arisaematis Rhizoma (천남성)	2.1	61.8	66.5
Astragali Radix (황기)	7.5	81.9	63.4
Bambusae Caulis In Liquamen (죽력)	n.d.	104.2 ^{a)}	113.8 ^{b)}
Bambusae Concretio Silicea (천축황)	0.4	69.7	57.5
Bombycis Corpus (백강잠)	7.1	n.d.	117.4
Carthami Flos (홍화)	11.7	62.4	42.9
Cinnamomi Ramulus (계지)	2.1	83.7	118.2
Clematidis Radix (위령선)	2.4	72.9	51.7
Cnidii Rhizoma (천궁)	15.4	45.5	58.3
Curcumae Rhizoma (울금)	2.5	114.7	113.7
Cyperi Rhizoma (향부자)	5.1	76.5	121.7
Eucommiae Cortex (두충)	3.6	105.5	99.5
Gastrodiae Rhizoma (천마)	2.6	102.9	94.5
Gentianae macrophyllae Radix (진교)	6.5	86.0	83.5
Hirudo (수질)	9.0	61.5	68.1
Leonuri Herba (익모초)	1.7	105.1	116.2
Linderae Radix (오약)	3.6	101.4	123.2
Liriopsis Tuber (맥문동)	6.3	98.4	94.5
Loranthi Ramulus (상기생)	11.4	52.7	37.5
Lumbricus (구인)	7.9	87.3	95.4
Manitis Squama (천산갑)	2.9	72.8	70.1
Mori Ramulus (상지)	1.5	63.1	64.8
Notoginseng Radix (삼칠)	8.1	82.5	86.2
Paeoniae Radix (작약)	5.5	72.5	105.6
Persicae Semen (도인)	4.2	88.1	84.1
Phellodendri Cortex (황백)	7.5	83.5	100.9
Polygalae Radix (원지)	19.0	119.3	98.0
Ponciri Fructus (지실)	14.9	n.d.	122.2

^{a)}at 25 μ l/ml, ^{b)}at 50 μ l/ml, ^{c)}Recovery yield of the MeOH extract from each sample. n.d., not determined.

Table I – Continued

Samples (70% MeOH Ex)	Yield ^{c)} (%)	% Control LDH release	
		at 500 μ g/ml	at 1000 μ g/ml
Puerariae Radix (갈근)	11.7	80.7	91.3
Rhei Rhizoma (대황)	30.5	n.d.	125.1
Salviae Radix (단삼)	14.0	128.3	126.1
Scelopendrae Corpus (오공)	11.0	104.6	98.4
Scorpion (전충)	12.5	78.1	61.5
Siegesbeckiae Herba (회령)	5.2	121.6	131.9
Uncariae Ramulus et Uncus (조구동)	4.1	31.0	65.0

n.d., not determined.

므로 이와 같은 세포독성이 실제로 생체 내에서도 유발될 수 있는지는 알 수 없다. 또한 이 추출물에 함유된 성분 중에서 생체 내에서 뇌세포까지 도달하는 성분 및 도달 농도에 따라 작용이 다를 수 있고, 다른 생약과의 상호작용도 있을 수 있으므로 다각적 연구 없이는 이들 생약의 치료효과에 대한 확실한 결론을 내릴 수는 없을 것이다.

Table I에 제시된 생약 중에서 상당한 정도의 흥분성 신경독성 억제효과를 나타낸 당귀, 석창포, 홍화,

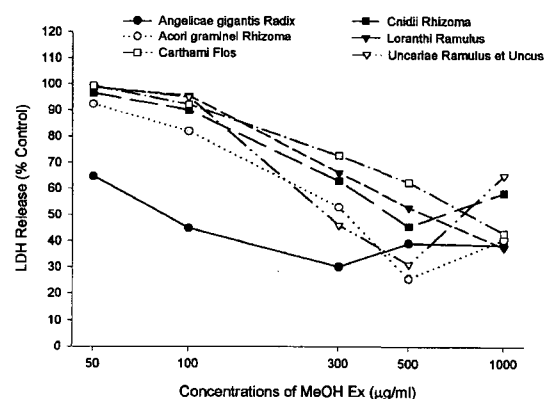


Fig. 1 – Concentration-dependent inhibition of Glu-induced neuronal cell death by the methanol extracts from six oriental herbal medicines. Primary cultured rat cortical neurons were exposed to Glu (300 μ M) for 15 min in the presence of the indicated concentrations of the extracts, and the neuronal injury was assessed by LDH measurements. Control LDH activity was determined in the culture media of cortical neurons exposed to Glu in the absence of the extracts. Each point represents the mean value of the data obtained from 3 separate experiments of 2 determinations.

Table II – IC₅₀ values of the methanol extracts from oriental medicines. IC₅₀ values were determined by non-linear regression of the data shown in Figs. 1 and 2 using Prism.

Samples (70% MeOH Ex)	IC ₅₀ values (µg/ml)
Angelicae gigantis Radix	95.2
Manitis Squama	218.6
Acori graminei Rhizoma	263.3
Uncariae Ramulus et Uncus	295.1
Alpiniae Fructus	297.9
Paeoniae Radix	310.1
Cnidii Rhizoma	446.7
Loranthi Ramulus	582.9
Carthami Flos	805.5

천궁, 상기생, 조구등의 농도반응곡선은 Fig. 1과 같다. 당귀 추출물의 경우 Table I에 나타난 농도보다 훨씬 낮은 농도인 50 µg/ml에서도 약 35%의 억제효과가 관찰되었으며, 농도가 증가함에 따라 억제효과도 증가하여 300 µg/ml에서 최대효과인 70%의 억제를 나타내었다. 당귀의 농도반응곡선으로부터 비선형 회귀분석에 의해 계산된 50% 억제농도(IC₅₀)는 95.2 µg/ml로서(Table II) 시험대상 생약 중에서 가장 강력한 신경세포 보호효과를 나타내었다. 보익약으로 구분되는 당귀는 뇌졸중 외에도 흔히 작약, 천궁, 숙지황과 함께 보혈을 요하는 질환에 널리 사용된다. 중추신경계에서의 당귀의 작용으로는, 고립 스트레스에 처한 생쥐에서 pentobarbital로 유도한 수면시간 감소현상을 억제한다는 것과 GABA나 5-HT 수용체에 작용하는 특성이 알려져 있다.^{17,18)} 본 연구결과로부터 제시된 신경세포 보호효과와 더불어 중추신경계에서의 당귀의 약리작용을 규명하고, 활성성분과 작용기전을 밝히기 위한 연구가 향후 진행된다면 매우 흥미로울 것이다.

다음으로, 석창포, 조구등, 천궁의 농도별 효과를 측정한 결과(Fig. 1), Table I에서 보여준 500 µg/ml에서의 효과가 각각 최대였으며, 상기생과 홍화는 1000 µg/ml에서 최대효과를 나타내었다. 석창포는 진정, 항간질 등의 다양한 중추억제작용을 나타내며, 석창포 추출물은 GABA 및 dopamine 수용체에 작용한다.¹⁹⁾ 또한, 석창포는 본 논문에서 제시하는 바와 같이 흥분성 신경독성 억제작용을 발현하며, 이는 Glu 수용체의 작용을 차단함으로써 중추억제효과를 발현하는 것으로 여겨진다. 한편, 조구등은 뇌졸중이나 간질에서 Glu에 의한 흥분성 신경손상과정 중에 생성된다고 알려진³⁾ 자유라디칼을 제거하는 작용이 있으며,²⁰⁾ Glu로 유발

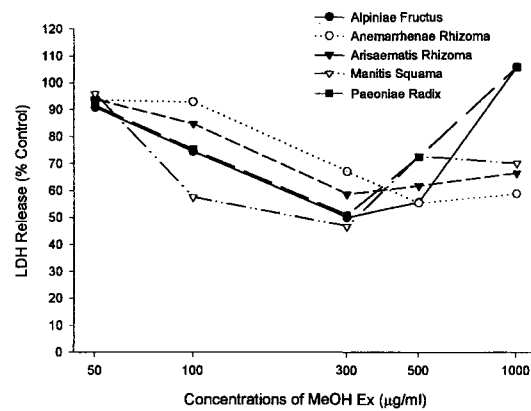


Fig. 2 – Concentration-dependent inhibition of Glu-induced neuronal cell death by the methanol extracts from five oriental medicines. See the legend in Fig. 1.

한 간질에서 선택적으로 항간질효과를 나타내는 특성²¹⁾ 등이 보고된 바 있어, 이를 본 연구결과와 종합하여 볼 때, 조구등의 효과 또한 Glu 수용체에 대한 작용의 결과일 수 있음을 시사한다. 홍화에 관한 보고로는, 홍화에 함유된 포도당이 망막 허혈에서 신경세포를 보호했으며,²²⁾ 흰쥐의 총경동맥 결찰에 의한 뇌허혈 실험모델에서 홍화를 함유하는 한방추출물이 뇌손상을 감소시켰다는 보고²³⁾가 있어 본 연구결과와 일관성이 있음을 알 수 있다.

한편, 천산갑, 익지인, 작약, 천남성, 지모 추출물은 Fig. 1에 제시된 생약의 추출물보다 억제효과는 적었지만 상당한 농도 의존적 효과를 나타내었다(Fig. 2). 이 중에서 작약과 익지인은 농도를 1000 µg/ml로 증가시키면 세포독성도 현저히 증가하였다. 따라서 이들은 배양세포에서 세포손상을 유발하는 다른 생약(Table I)들과 더불어 다각적인 연구를 시행한 후 임상에서의 유의성을 판단하거나, 이들 추출물에 함유되어 있는 유효한 성분만을 분리하여 임상에 응용해야 할 것이다. Fig. 1과 Fig. 2에 제시된 농도반응곡선으로부터 얻은 IC₅₀ 값을 비교해 보면, 당귀, 천산갑, 석창포, 조구등, 익지인, 작약, 천궁, 상기생, 홍화의 순으로 나타났다(Table II).

Fig. 3에는 Fig. 1, Fig. 2 및 Table II에 열거한 생약보다 효력은 낮지만 Glu에 의한 흥분성 신경독성 억제작용을 나타내는 생약들의 최대효과와 최대효과를 발현하는 추출물의 농도 및 통계학적 유의성을 표시하였다. 이 중에서 위령선, 강활, 천축황, 전충은 1000

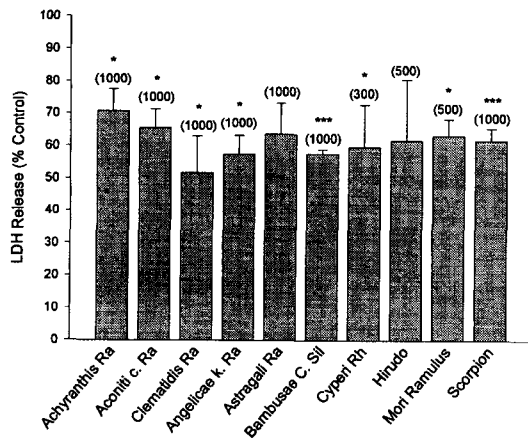


Fig. 3 – Inhibition of Glu-induced neuronal cell death by the methanol extracts prepared from the indicated oriental medicines. Primary cultured rat cortical neurons were exposed to Glu (300 μM) for 15 min in the presence of various concentrations of the extracts, and the neuronal injury was assessed as in Fig. 1. Maximum inhibitions achieved at the indicated concentrations (labeled in parentheses, μg/ml) are shown. Each point represents the mean ± SEM of the data obtained from 3 separate experiments of 2 determinations. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ by Student's *t*-test (vs control).

μg/ml에서 약 40~50% 정도의 억제작용을 나타내었으며, 위령선의 농도반응곡선으로부터 얻은 IC_{50} 값은 1102.8 μg/ml였다.

이상에서 현재 뇌졸중 치료제로 사용중인 처방에 함유되는 생약 중에서 선정된 46종 생약의 70% 메탄올 추출물에 대하여 Glu로 유발한 흥분성 신경독성 억제 효과를 배양 대뇌피질 신경세포를 이용하여 연구한 결과, 당귀, 천산갑, 석창포, 조구등, 익지인, 작약, 천궁 추출물은 흥분성 신경독성을 현저히 억제하여 신경세포 보호작용을 나타내었으며, 천남성, 상기생, 지모, 홍화 추출물도 상당한 정도의 신경세포 보호효과를 발현함을 알 수 있었다. 이 결과는 지모, 반하, 오미자, 창포가 신경세포의 피사를 유의성있게 차단하였다는 보고⁷⁾와 부분적으로 일치하는 결과이다. 이 외에도 위령선, 강활, 천축황을 비롯한 다수의 생약 추출물에서도 유의한 신경독성 억제효과가 관찰되었다. 그러나, 부자, 독활, 울금, 익모초, 원지, 단삼, 희령 추출물에서는 독성억제 효과가 전혀 관찰되지 않았으며, 오히려 배양 뇌세포에서 손상을 유발하였다. 이들 추출물의 세포손상 유발기전은 현재로서는 알 수 없으나, 이들 생약을

뇌졸중 치료제로 계속 사용하기 위해서는 먼저 약리작용을 실험적으로 규명하여야 할 것이다. 한편, 천산갑, 조구등, 익지인, 작약 추출물은 현저한 신경세포 보호효과를 나타내기는 하였으나, 농도를 증가시키에 따라 세포손상을 유발하여 보호효과가 감소하였다. 이 때 관찰되는 손상이 신경세포 보호효과를 발현하는 성분과 관련이 있는지 또는 이들 생약에 함유된 다른 성분의 작용인지는 알 수 없다.

본 연구팀은 뇌졸중, 간질 등에서 과다하게 유리된 Glu에 의한 세포손상을 억제함으로써 신경세포 보호효과를 발현하는 생약과 그 생약에 함유된 생리활성물질의 약리작용 및 기전을 연구하기 위하여 당귀, 석창포를 비롯한 다수의 생약으로부터 분획을 제조하여 효과를 발휘하는 성분을 추적중이다. 이와 같은 연구와 더불어 Glu 이외의 다른 신호전달 경로에 작용하여 뇌졸중 치료효과를 갖는 생약에 관한 연구가 함께 이루어진다면, 현재 사용중인 처방보다 더 탁월한 치료효과를 갖는 새로운 한약처방을 개발할 수 있을 뿐만 아니라, 생약 중에 함유된 활성성분을 이용한 신약개발에도 활용할 수 있을 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업 (HMP-98-M-6-0061)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Parnetti, L., Senin, U. and Mecocci, P.: Cognitive enhancement therapy for Alzheimer's disease; The way forward. *Drug* **53**, 752 (1997).
- 2) Sandercock, P., Lindley, R. and Wardlaw, J.: Antiplatelet, anticoagulant and fibrinolytic agents in acute ischemic stroke and TIA. *Br. J. Hosp. Med.* **47**, 731 (1992).
- 3) Sauer, D. and Fagg, G. E.: Excitatory amino acids, excitotoxicity and neurodegenerative disorders. In *Excitatory amino acid receptors*. Krogsgaard-Larsen, P. and Hansen, J.J. eds, Ellis Horwood, London. p.13 (1992).
- 4) Choi, D. W.: Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **23**, 1261 (1992).

- 5) 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-isoxazole-propionic acid (AMPA) subtypes of glutamate receptors. *Current Opinion in Therapeutic Patents* July, 951 (1993).
- 6) Muir, K.W. and Lees, K. R. : Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* **26**, 503 (1995).
- 7) Park, M. J., Kim, S. R., Moon, A., Kim, S. H. and Kim, Y. J. : Primary cultured brain cells as screening methods for natural products acting on glutamatergic neurons. *Yakhak Hoeji* **39**, 444 (1995).
- 8) Kim, S. R., Jeon, M. H. and Kim, Y. J. : Ginkgolides attenuate glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. *Yakhak Hoeji* **40**, 720 (1996).
- 9) Kim, S. R., Jang, Y. P., Sung, S. H., Lee, H. S., Moon, A. and Kim, Y. J. : Bilobalide attenuates glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. *Yakhak Hoeji* **41**, 111 (1997).
- 10) Choi, E.-J., Shin, G.-C. and Lee, W.-C. : The effect of Sohabhyangwon on regional cerebral blood flow and area of cerebral infarction in experimentally induced cerebral infarction in rats. *J. Korean Orient. Med. Soc.* **18**, 456 (1997).
- 11) Ditcher, M. A. : Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology and synapse formation. *Brain Res.* **149**, 279 (1978).
- 12) Patel, M., Day, B. J., Crapo, J. D., Fridovich, I and McNamara, J. O. : Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron* **16**, 345 (1996).
- 13) Choi, D. W., Maulucci-Gedde, M. A. and Kriegstein, A. R. : Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* **7**, 357 (1987).
- 14) Koh, J. and Choi, D. W. : Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. *J. Neurosci.* **8**, 2153 (1988).
- 15) Cho, J. : Effects of spermine on quisqualate-induced excitotoxicity in rat immature cortical neurons. *Yakhak Hoeji* **43**, 535 (1999).
- 16) Pristley, T., Horne, A. L., McKernan, R. M. and Kemp, J. A. : The effect of NMDA receptor glycine site antagonists on hypoxia-induced neurodegeneration of rat cortical cell culture. *Brain Res.* **531**, 183 (1990).
- 17) Matsumoto, K., Kohno, S., Tezuka, Y., Kadota, S. and Watanabe, H. : Effect of Japanese angelica root extract on pentobarbital-induced sleep in group-housed and socially isolated mice-evidence for the central action. *Jap. J. Pharmacol.* **73**, 353 (1997).
- 18) Liao, J.-F., Jan, Y.-M., Huang, S.-Y., Wang, H.-H., Yu, L.-L. and Chen, C.-F. : Evaluation with receptor binding assay on the water extracts of ten CNS-active Chinese herbal drugs. *Proc. Natl. Sci. Coun, ROC-Part B, Life Sci.* **19**, 151 (1995).
- 19) Liao, J.-F., Huang, S.-Y., Jan, Y.-M., Yu, L.-L., and Chen, C.-F. : Central inhibitory effects of water extract of *Acori graminei* rhizoma in mice. *J. Ethnopharmacol.* **61**, 185 (1998).
- 20) Liu, J. and Mori, A. : Antioxidant and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* Bl. and *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks. *Neuropharmacol.* **31**, 1287 (1992).
- 21) Mimaki, Y., Toshimizu, N., Yamada, K. and Sashida, Y. : Anti-convulsion effects of Choto-san, and Chotoko (*Uncariae Uncis cam Ramulus*) in mice, and identification of the active principles. *J. Pharmaceut. Soc. Jap.* **117**, 1011 (1997).
- 22) Romano, C., Price, M., Bai, H. Y. and Olney, J. W. : Neuroprotectants in Honghua: glucose attenuates retinal ischemic damage. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **34**, 72 (1993).
- 23) Leung, A. W., Mo, Z. X. and Zheng, Y. S. : Reduction of cellular damage induced by cerebral ischemia in rats. *Neurochem. Res.* **16**, 687 (1991).