

防風類 藥材의 신경세포보호효과 및 아세틸콜린에스터라제 저해 효과 비교

주인경^{1#}, 이승민², 최진규², 오명숙^{1,2*}

1 : 경희대학교 일반대학원 나노의약생명과학과, 2 : 경희대학교 약학대학 한약학과

Comparative Study of Bang-poong (root of *Saposhnikovia divaricata* Schischkin) and Related Species on Neuroprotective and Acetylcholinesterase Inhibitory Effects

In Gyoung Ju^{1#}, Seungmin Lee², Jin Gyu Choi², Myung Sook Oh^{1,2*}

1 : Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, Graduate School, Kyung Hee University

2 : Department of Oriental pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : Bang-poong (*Saposhnikovia divaricata*; SD) was traditionally used to treat inflammatory disorders. In this study, we aimed to investigate whether Bang-poong and related species including SD, *Glehnia littoralis* (GL), and *Peucedanum japonicum* (PJ) possess neuroprotective effects and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activities.

Methods : Roots of SD, GL and PJ were extracted with distilled water (DW) or 70% ethanol (EtOH). We assessed 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activities of the extracts. To examine neuroprotective effects, we measured cell viability in PC12 or HT22 cells after treatment of the extracts with H₂O₂ or amyloid-beta (A β). To assess anti-neuroinflammatory effects, we measured the nitric oxide (NO) levels after treatment with the extracts and lipopolysaccharide (LPS) in BV2 microglial cells. In addition, we performed AChE inhibition assay to explore effects of the extracts on the cholinergic system.

Results : DW and EtOH extracts of SD, GL and PJ showed mild DPPH free radical scavenging activities. Also, DW extracts of GL and PJ showed protective effects against H₂O₂-induced toxicity in PC12 cells. In LPS-activated BV2 cells, EtOH extracts of SD, GL and PJ exerted inhibitory effects on NO production. Meanwhile, DW extracts of SD, GL and PJ inhibited the A β -induced cell death in HT22 cells. In addition, DW and EtOH extracts of GL exhibited remarkable inhibitory activities on AChE.

Conclusions : We demonstrated that SD, GL and PJ exert anti-oxidative, anti-neuroinflammatory and AChE inhibitory activities. These results indicate that SD, GL and PJ could be potential candidates for neurological disorders.

Key words : *Saposhnikovia divaricata*, *Glehnia littoralis*, *Peucedanum japonicum*, neuroprotection, neuroinflammation, acetylcholinesterase inhibition

I. 서 론

방풍(防風)은 산형과(Umbelliferae) 방풍(*Saposhnikovia divaricata* Schischkin)의 뿌리를 건조한 것으로, 봄에는 꽃

대가 나오기 전에, 가을에는 莖葉이 말랐을 때 캐어 莖葉과 鬚根을 제거하여 사용한다. 본초학적으로는 祛風解表, 勝濕止痛, 祛風止癢하는 효능을 가지고 있어 外感風寒 또는 風熱表證, 風疹瘙癢證, 風寒으로 인한 風濕痺證, 破傷風, 抽搦瘛攣

*Corresponding Author : Myung Sook Oh, Department of Life and Nanopharmaceutical 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 : In Gyoung Ju, Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, Graduate School, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel : +82-02-961-2252 · E-mail : igju801@khu.ac.kr

· Received : 28 Aug 2019 · Revised : 18 Sep 2019 · Accepted : 25 Sep 2019

등의 질환에 사용한다¹⁾. 防風과 이름 및 효능이 유사한 약재(防風類 藥材)로서 해방풍(海防風)과 식방풍(植防風)이 防風과 혼용되어 유통되고 사용된다. 海防風은 산형과(Umbelliferae) 갯방풍(*Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miquel)의 뿌리 및 뿌리줄기를 사용하며 養陰清熱, 益胃生津, 鎮痛, 發汗의 효능이 있어 肺熱燥咳, 虛勞久咳, 陰陽咽乾, 口渴로 인한 천식, 만성결핵, 기관지염, 폐결핵 및 관절염 등의 질환 치료에 민간약으로써 사용된다²⁾. 植防風은 산형과(Umbelliferae) 갯기름나물(*Peucedanum japonicum* Thunberg)의 뿌리로서 發汗, 祛痰, 解熱의 효능이 있어 感氣 증상인 가래, 기침, 두통 치료에 사용하며, 전신마비나 신경통 등을 치료한다³⁾.

防風의 외면에는 윗부분에 촘촘한 돌림마디 모양의 가로주름이 보이고 갈색의 털 모양으로 된 엽초와 가는 뿌리 자국이 있다. 횡단면 피부는 회갈색으로 열극이 여러 개 보이고, 목부는 황색이고, 방사상 무늬와 황갈색 원형무늬가 있다. 한편, 海防風은 짧고 가는 가로주름의 돌림마디가 있는 뿌리줄기가 있으며 뿌리에는 어두운 적갈색의 작은 입상돌기가 있다. 횡단면 피부는 옅은 유백~유황색이며 빈틈이 있고 갈색의 작은 점이 산재되어 있으며 목부는 옅은 황색으로 비교적 치밀하다. 植防風은 근두부에 오목한 줄기자국이 보이고 잔뿌리자국이 있으며 횡단면에 갈색 환상의 형성층이 뚜렷하다. 피부는 회갈색~옅은 갈색이고 목부는 황갈색이며 치밀하다⁴⁾. 防風은 prim-O-glucosylcimifugin, cimifugin, 4'-O-β-D-glucosyl-5-O-methylvisamminol, 海防風은 bergapten, imperatorin, 植防風은 peucedanol 7-O-β-D-glucopyranoside 등을 함유하며, hamaudol, scopoletin, psoralen 등 coumarin 및 chromone 계열의 화합물을 공통으로 함유한다^{5,6,7,8)}.

防風은 항산화, 항암⁹⁾, 염증 억제를 통한 관절염 완화효과¹⁰⁾를 나타내는 것으로 보고되어 있다. 防風에 함유된 chromone 계열의 화합물들은 진통효과를 가지고¹¹⁾, cimifugin은 알레르기성 염증을 억제한다¹²⁾. 또한, panaxynol은 항암효과를 나타내며¹³⁾ 4'-O-β-D-glucosyl-5-O-methylvisamminol은 혈관경련 억제 효과를 나타내는 것¹⁴⁾으로 보고된 바 있다. 海防風은 항산화¹⁵⁾, 항염증¹⁶⁾, 항진균¹⁷⁾, 항암¹⁸⁾, 피부염 완화 효과¹⁹⁾에 대한 보고가 있으며, 海防風의 염화메틸렌 분획과 海防風이 함유하는 성분 중 imperatorin은 항염증 작용을 나타내고^{20,21)}, (9Z)1,9-heptadecadiene-4,6-diyne-3,8,11-triol, (10E)1,10-heptadecadiene-4,6-diyne-3,8,9-triol은 항균 및 항진균 작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다²²⁾. 植防風은 항비만^{23,24)}, 항암²⁵⁾, 항천식²⁶⁾, 골다공증 억제 효과²⁷⁾, 퇴행성관절염 완화²⁸⁾ 효과에 대한 보고가 있다. 植防風에서 분리된 coumarin 들은 평활근 수축을 억제하고²⁹⁾ 항혈소판 작용을 보이며³⁰⁾ pteryxin은 항비만 효과를 나타낸다³¹⁾.

중추신경계에서의 防風類 藥材의 작용에 대한 선행연구를 살펴보면, 海防風은 뇌유래신경성장인자(brain-derived neurotrophic factor)를 조절하여 성체 신경발생을 유도하며^{32,33)}, 植防風은 미세아교세포의 활성화를 조절하여 뇌염증을 억제한다³⁴⁾. 그러나 防風의 약리활성에 대하여는 연구가 되지 않았으며, 防風類 藥材의 기원별 및 추출 용매별 약리활성을 비교한 연구는 보고된 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 防風, 海防風, 植防風을 물 및 에탄올로 추출한 시료들의 뇌신경질

환에 대한 약리 활성을 평가 하고 비교하고자 하였다. 뇌신경 질환은 다양한 원인에 의해 발생되며, 노화에 의한 산화스트레스와 염증반응의 활성화가 주된 병리작용기전으로 알려져 있다^{35,36)}. 또한, 뇌신경질환의 대표적인 질환 중 치매에서는 아세틸콜린의 신경전달이 감소하여 학습 및 기억 기능의 감퇴가 나타난다³⁷⁾. 이에, 防風類 藥材의 용매별 추출물들의 항산화, 항염증 및 아세틸콜린을 가수분해하는 아세틸콜린에스터라제(AChE)에 대한 억제 활성을 평가하였을 때 의미 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 防風은 중국 동북지방, 海防風은 경북 영천, 植防風은 경북 영주에서 재배된 것이며 모두 정도생약(Gyeonggi, Korea)에서 구입하였다. 각각의 약재 10 g에 10 배의 증류수(DW) 또는 70% ethanol (EtOH)을 가하여 환류 추출기에서 3 시간 동안 가열 추출하였다. 각 추출물을 감압 여과 후 농축하였으며, 이후 동결건조하여 powder 형태의 시료를 얻었다. 시료는 -20℃에서 보관 후 매 실험마다 적절한 용매에 녹여 사용하였다.

2) 시약

세포배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), Horse serum, penicillin/streptomycin (P/S)은 Hyclone (Auckland, New Zealand)에서 구입하여 사용하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Dimethyl sulfoxide (DMSO), hydrogen peroxide (H₂O₂), lipopolysaccharide (LPS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), acetylthiocholine iodide, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), AChE from *Electrophorus electricus*와 기타 언급하지 않은 시약은 Sigma-Aldrich사 (St Louis, CA USA)에서 구입하였다. amyloid beta 25-35 (Aβ₂₅₋₃₅)는 Anaspec사(Fremont, CA USA)에서 구입하였으며, 증류수를 가하여 500 μM이 되도록 희석 후 37℃에서 3일 동안 incubation하여 amyloid plaque을 제조하였다³⁸⁾. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) DPPH radical 소거작용측정

0.2 mM DPPH solution 100 μL와 1 mg/mL의 한약재 추출물 100 μL를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 spectrophotometer (Versamax microplatereader; Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였으며, 흡광도 값을 이용하여 DPPH 자유 라디칼 소거능을 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH free radical scavenging activity (\%)} = \{\text{control} - (\text{sample} - \text{blank})\} / \text{control} \times 100$$

2) HT22 세포에서 $A\beta_{25-35}$ plaque에 대한 세포 보호 효과 측정

HT22 hippocampal neuronal 세포는 강인숙 교수 연구실 (Kyung Hee University, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 37°C의 5% CO₂, 95% air 조건에서 10% FBS, 1% P/S를 포함하는 high-glucose DMEM 배지를 사용하였다. 세포 보호 효과를 측정하기 위하여 HT22 세포를 96 well microplate에 4.0×10^3 cells/well로 분주하였다. 24시간 후, 한약재 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 1시간 전처리 한 후, 3 μM 의 $A\beta_{25-35}$ plaque를 23시간 더 처리하였다. 약물처리 및 $A\beta_{25-35}$ plaque과의 반응이 종료된 후 상층액을 제거하고 MTT 1 mg/ml를 처리하여 4시간 동안 반응시킨 후, 용액을 제거하고 DMSO를 이용해 decrystallization 후 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

3) PC12 세포에서 H₂O₂에 대한 세포 보호효과 측정

Rat pheochromocytoma PC12세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 세포 배양은 37°C의 5% CO₂, 95% air 조건에서 10% horse serum, 5% FBS, 1% P/S를 포함하는 high-glucose RPMI1640 배지를 사용하였다. 세포 보호효과를 측정하기 위하여 PC12 세포를 96 well microplate에 3.0×10^4 cells/well로 분주하였다. 24시간 후, 한약재 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 1시간 전처리하고 75 μM 의 H₂O₂를 23시간 더 처리하였다. 약물처리 및 H₂O₂와의 반응이 종료된 후 상층액을 제거하고 MTT 1 mg/ml를 처리하여 4시간 동안 반응시킨 후 용액을 제거하고 DMSO를 이용해 decrystallization 후 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

4) BV2 세포에서의 LPS에 대한 항염증 효과 측정

BV2 세포는 김선여 교수 연구실(Gachon University,

Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 37°C의 5% CO₂, 95% air 조건에서 10% FBS, 1% P/S를 포함하는 high-glucose DMEM 배지를 사용하였다. 세포생존율과 NO 생성에 대한 억제 활성을 측정하기 위하여 BV2 세포를 96 well microplate에 2.0×10^4 cells/well로 분주하였다. 24시간 후, 한약재 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 1시간 전처리하고 100 mg/ml의 LPS를 23시간 더 처리하였다. 약물처리 및 LPS와의 반응이 종료된 후 상층액 70 μL 을 회수하여 NO 생성량 측정에 사용하였다. 상층액이 제거된 세포에 MTT 1 mg/ml를 처리하여 4시간 동안 반응시킨 후 용액을 제거하고 DMSO를 이용해 decrystallization 후 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다. 회수한 상층액은 동량의 griess reagent와 반응시켜 10분 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 농도는 sodium nitrite를 표준물질로 하여 정량곡선 대비 수치로 계산하였다.

5) AChE 저해 활성 측정

AChE 저해 활성 측정은 Ellman법의 방법을 변형하여 colorimetric 방법으로 측정하였으며, acetylthiocholine iodide를 기질로 사용하였다³⁹⁾. 620 μL 의 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 7.0), 25 μL 의 Ellman's reagent (10mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), 15 mM sodium bicarbonate), 25 μL 의 AChE 및 80 μL 의 한약재 추출물(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 가한 후 shaking 하였다. 이후 blank 설정을 위하여 각각 tube에 반으로 나눈 후 하나는 25 μL acetylthiocholine iodide (75 mM)을 가하여 반응시키고, 다른 하나는 25 μL 의 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 8.0)를 가하여 반응시켰다. 96 well microplate에 넣고 37°C에서 20분간 incubation 시킨 후 412 nm에서 spectrophotometer (Versamax microplatereader; Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. AChE 저해 활성(AChE inhibition (%))은 다음의 수식을 이용하여 계산하였으며, control군에 대한 %로 표시하였다.

$$\text{AChE inhibition (\%)} = \{\text{control} - (\text{sample} - \text{blank})\} / \text{control} \times 100$$

3. 통계처리

모든 측정값은 mean \pm SEM으로 표시하였다. 통계처리는 Graphpad Prism 5.0 software (San Diego, USA)를 이용하였으며, 통계적 유의성은 One-way ANOVA, 사후검정은 Tukey's test를 사용하였다. 분석 시 p 값이 0.05 미만일 때 유의하다고 판단하였다.

III. 결 과

1. 시료 추출

防風類 藥材를 추출한 결과는 다음과 같다(Table 1). 防風은 DW 추출물이 46.6%, EtOH 추출물이 31.6%, 海防風은 DW 추출물이 38.0%, EtOH 추출물이 20.9%, 植防風은 DW 추출물이 50.4%, EtOH 추출물이 41.8%의 수득률을 보였다. 용매별로 수득률을 비교하였을 때, DW, EtOH 추출물 모두 植防風에서 수득률이 가장 높았으며, 防風, 海防風, 植防風에서 모두 EtOH 추출물보다 DW 추출물에서 높은 수득률을 보였다.

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

Herb	Extraction method	Solvent	Yield (%)
<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schischkin	Boiling (3 h)	DW	46.6
		70% EtOH	31.6
<i>Glehnia littoralis</i> Fr. Schmidt ex Miquel	Boiling (3 h)	DW	38.0
		70% EtOH	20.9
<i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	Boiling (3 h)	DW	50.4
		70% EtOH	41.8

2. 防風類 藥材의 DPPH radical 소거 활성

防風類 藥材의 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 Table 2에 표시하였다. 防風 추출물 중에는 DW 추출물이 31.23%로 EtOH 추출물보다 더 강한 활성을 보였으며, 海防風,

植防風 추출물 중에는 EtOH 추출물이 각각 32.87%, 30.28%로 DW 추출물보다 더 강한 활성을 보였다. 양성대조약물인 黃芩 물 추출물⁴⁰⁾의 1 mg/ml에서 소거 활성은 89.86%로 나타났다.

Table 2. DPPH free radical scavenging activities of extracts at concentration of 1 mg/ml. DW extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi root is used as a positive control.

Herb	Solvent	DPPH free radical scavenging activity (%)
黃芩 <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	DW	89.96
<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schischkin	DW	31.23
	70% EtOH	22.74
<i>Glehnia littoralis</i> Fr. Schmidt ex Miquel	DW	24.24
	70% EtOH	32.87
<i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	DW	13.26
	70% EtOH	30.28

3. PC12 세포에서 防風類 藥材의 H₂O₂로 유도된 세포독성에 미치는 영향

PC12 세포에서 防風類 藥材가 H₂O₂ 독성에 대한 세포보호 효과를 나타내는지 평가하기 위하여 MTT 법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, H₂O₂ 단독 처리군의 세포 생존율은 대조군 대비 41.26±0.26%로 유의하게 감소하였다.

海防風, 植防風 추출물 처리군에서는 DW 추출물 처리군에서 각각 대조군 대비 55.94±1.40%, 56.74±1.24%의 세포 생존율을 보여 H₂O₂ 단독 처리군에 비해 통계적으로 유의하게 증가한 것을 확인하였으며, EtOH 추출물 처리군에서는 H₂O₂ 단독 처리군의 세포생존율과 차이를 보이지 않았다. 防風은 DW, EtOH 추출물 모두 유의한 효과를 보이지 않았다(Fig 1.).

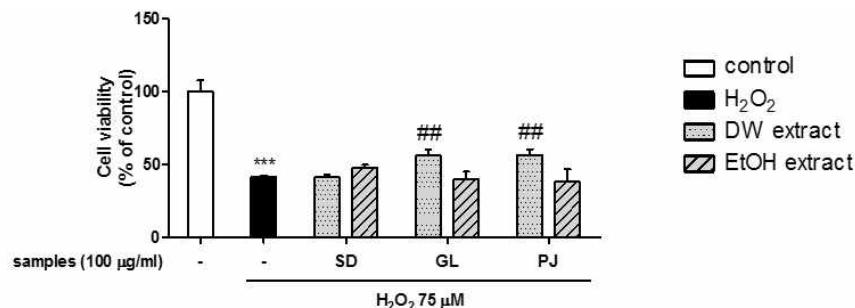


Fig. 1. Protective effects of SD, GL, and PJ on H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells. Cells were treated with DW or EtOH extract of SD, GL and PJ at concentration of 100 μg/ml for 1 h and treated with 75 μM of H₂O₂ for a further 23 h. Cell viability was presented as a percentage of the control. Values are expressed as the mean ± SEM. *** p < 0.001; compared with the control group. ## p < 0.01; compared with the H₂O₂ only treated group. SD; *Saposhnikovia divaricata*, GL; *Glehnia littoralis*, PJ; *Peucedanum japonicum*

4. BV2 세포에서 防風類 藥材의 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향

防風類 藥材가 BV2 세포 생존율에 미치는 영향과 LPS에 의한 NO 생성 억제 효과를 확인하고자 BV2 세포에 6종 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 LPS를 처리하였다. MTT assay로 세포 생존율을 확인하였을 때, 세포 독성이 관찰되지 않았다(Fig 2A.). NO 양을 측정한 결과, LPS 단독 처리군($17.04 \pm 0.21 \mu\text{M}$)에서 대조군($0.86 \pm 0.06 \mu\text{M}$) 대비 통계적으로 유의하게 NO 양이 증가하였다. 防風, 海防風, 植防風 각 약재의 EtOH 추출물 처리군에서 각각 $9.34 \pm 0.19 \mu\text{M}$, $13.72 \pm 0.31 \mu\text{M}$, $5.22 \pm 0.16 \mu\text{M}$ 로 LPS 단독 처리군 대비 통계적으로 유의한 억제효과를 보였다(Fig 2B.).

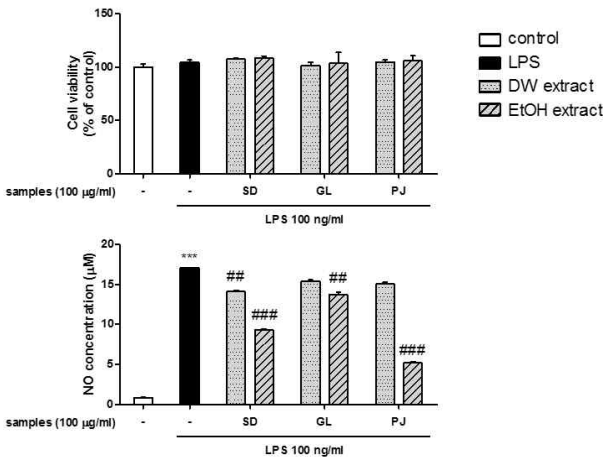


Fig 2. Inhibitory effects of SD, GL, and PJ on NO production in LPS-activated BV-2 cells. Cells were treated with DW or EtOH extract of SD, GL and PJ at concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 1 h and stimulated with LPS for a further 23 h. The culture medium was then collected for measurement of secreted NO. Cell viabilities (A) are expressed as a percentage of the controls, NO production (B) in BV-2 cells was assayed by measuring the levels of nitrite in the supernatant fluid. Values are indicated as the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$; compared with the control group. ### $p < 0.001$; ## $p < 0.01$; compared with the LPS only treated group. SD; *Saposhnikovia divaricata*, GL; *Glehnia littoralis*, PJ: *Peucedanum japonicum*

5. HT22 세포에서 防風類 藥材의 A β 로 유도된 세포독성에 미치는 영향

HT22 세포에서 防風類 藥材가 A β 독성에 대한 세포 보호 효과를 나타내는지 평가하기 위하여 MTT 법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, A β_{25-35} plaque 단독 처리군의 세포 생존율은 대조군 대비 $62.61 \pm 0.26\%$ 로 유의하게 감소하였다. 防風, 海防風, 植防風 각 약재의 DW 추출물 처리군에서 각각 대조군 대비 $72.14 \pm 0.13\%$, $69.92 \pm 0.49\%$, $77.23 \pm 0.87\%$ 의 세포 생존율을 보여 A β_{25-35} plaque 단독 처리군에 비해 통계적으로 유의하게 증가한 것을 확인하였다 (Fig 3.).

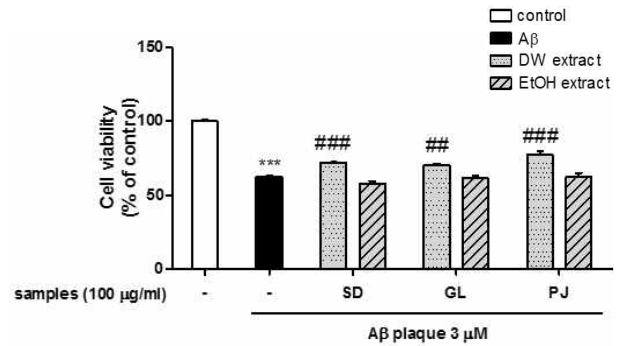


Fig. 3. Protective effects of SD, GL, and PJ on A β plaque-induced cytotoxicity in HT22 cells. Cells were treated with DW or EtOH extract of SD, GL and PJ at concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 1 h and treated with 3 μM of A β plaque for a further 23 h. Cell viability was presented as a percentage of the control. Values are expressed as the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$; compared with the control group. ### $p < 0.001$; ## $p < 0.01$; compared with the A β plaque only treated group. SD; *Saposhnikovia divaricata*, GL; *Glehnia littoralis*, PJ; *Peucedanum japonicum*

6. 防風類 藥材의 AChE 저해효과 비교

防風類 藥材의 AChE 억제 활성을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 측정한 결과 防風 추출물은 DW 추출물에서 1.20%, EtOH 추출물에서 1.28%로 가장 약한 효과를 보였고 植防風 추출물 또한 DW 추출물에서 4.28%, EtOH 추출물에서 3.63%로 약한 효과를 나타냈다. 海防風 추출물은 DW 추출물에서 17.48%, EtOH 추출물에서 8.62%로 비교한 6종 추출물 중 가장 강한 효과를 보였다. 양성대조약물인 Donepezil은⁴¹⁾의 10 ng/ml에서 소거활성은 53.82%로 나타났다(Table 3).

Table 3. Inhibitory effect of DW or EtOH extract of SD, GL and PJ at concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ on AChE activity in comparison with donepezil at 10 ng/ml.

Herb	Solvent	AChE inhibition (%)
Donepezil	-	53.82
<i>Saposhnikovia divaricata</i>	DW	1.20
	70% EtOH	1.28
<i>Glehnia littoralis</i>	DW	17.48
	70% EtOH	8.62
<i>Peucedanum japonicum</i>	DW	4.28
	70% EtOH	3.63

IV. 고찰

본 연구에서는 防風類 藥材 DW 및 EtOH 추출물의 신경 세포 보호 효과 및 AChE 저해 효과를 비교하였다.

防風은 風을 치료하는 약으로, 祛風解表, 勝濕止痛, 祛風止癢하는 효능이 있다. 이러한 효능 때문에 防風은 風寒濕痹,

關節疼痛, 四肢攣急 등을 치료하는 처방에 구성약재로 사용이 된다¹⁾. 風寒濕邪는 肢體에 침범하여 痺痛을 유발하며, 오래 停滯할 경우 熱로 전환되어 紅腫疼痛을 유발한다⁴²⁾. 이러한 증상은 현대의학적 관점에서 염증으로 해석이 가능하며, 이러한 해석은 祛風濕製를 관절염 치료 등에 사용하는 근거가 된다⁴³⁾. 防風의 風을 치료하는 효능 또한 항염증 활성을 매개하는 것으로 해석할 수 있으므로 만성염증이 원인이 되는 질환인 뇌 신경질환에 대한 치료 가능성을 기대할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 防風類 藥材 3종의 신경계에 대한 약리활성에 대하여 평가하였다.

중추신경계에서 산화스트레스는 다양한 뇌신경 질환의 병인으로 작용한다. 산화스트레스는 활성산소종의 증가와 이를 방어하는 항산화 시스템의 기능 저하로 인하여 발생하며 활성산소는 신경세포에 세포막 지질 과산화, 세포내 미토콘드리아, 단백질과 DNA 등을 손상시켜 세포독성을 야기한다³⁶⁾. 본 연구에서는 防風類 藥材의 자유 라디칼 소거 활성을 측정하기 위해 DPPH free radical의 소거활성을 측정하였다. DPPH assay는 안정화된 자유 라디칼을 가지고 있는 물질인 DPPH가 자유 라디칼이 소거될 때 짙은 자색에서 옅은 황색이 되는 원리를 이용한 시험법이다⁴⁴⁾. 실험 결과, 防風, 海防風, 植防風 DW 및 EtOH 추출물 1 mg/ml에서 모두 10~35% 범위의 약한 자유라디칼 소거능을 보였다. 또한, 산화스트레스가 유도하는 신경 세포 독성에 대하여 防風, 海防風, 植防風 DW 및 EtOH 추출물이 보호효과를 나타내는지 확인하고자 PC12 세포에서 H₂O₂ 독성에 대한 세포보호효과를 평가하였다. 그 결과, 海防風, 植防風 DW 추출물에서 유의한 세포보호효과를 나타내는 것을 확인하였다. 본 연구 결과는 防風類 藥材의 항산화 작용을 통한 뇌신경 질환 개선 가능성을 시사한다.

미세아교세포는 중추신경계의 대식세포 유사세포 (macrophage-like cell)로, 병적 상태, 즉 신경퇴행성 질환, 뇌졸중, 외상성 손상 그리고 뇌종양의 침범 등과 같은 상태에서 면역방어 기능을 수행한다⁴⁵⁾. 어떠한 자극에 의해 미세아교세포가 과도하게 활성화되면 염증 매개물질 중 하나인 NO를 방출하여 신경세포에 손상을 야기한다⁴⁵⁾. 본 연구에서는 그람음성균의 표면을 구성하는 물질로 염증을 유도하는 대표적인 독성인 LPS를 이용하여 미세아교세포의 활성화를 유도하였으며⁴⁶⁾, 이에 따라 증가되는 NO에 대한 防風類 藥材의 억제 활성을 평가하였다. 그 결과 防風, 海防風, 植防風의 EtOH 추출물이 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, 그 중 植防風 EtOH 추출물이 가장 강한 것을 확인하였다.

본 연구 결과는 防風, 海防風, 植防風의 항염증 효능에 대한 기 보고 연구들을 뒷받침하며, 항염증 효과를 통해 뇌신경질환을 개선할 수 있는 가능성을 제시한다. 防風類 藥材의 항염증 활성에 대한 유효성분 규명 연구로서 Kamino 등의 防風, 海防風의 항염증을 나타내는 성분 분석 연구에 따르면 防風은 3'-O-angeloylhamaudol, ledebouriellol, hamaudol 성분이, 海防風은 umbelliferone, scopoletin 성분이 항염증 활성에 관여하는 것으로 확인되었다⁴⁷⁾. 植防風의 항염증에 관한 활성 성분은 praeruptorin A, xanthotoxin, psoralen, bergapten 등의 coumarin 계열 성분들일 것으로 사료된다³⁴⁾.

A β 는 퇴행성뇌질환인 알츠하이머형 치매의 가장 잘 알려진 병리적 산물이자 병을 일으키는 요인이다⁵¹⁾. A β 의 병리 기전은

명확히 규명되지 않았지만 뇌에서 산화스트레스와 염증을 발생시켜 지속적인 신경 세포의 기능장애를 야기하고 신경퇴행을 가속화시키는 것으로 알려져 있어 알츠하이머병 약물 개발에 있어 대표적인 신경독성으로 사용된다^{36,48)}. 본 연구에서는 HT22 세포에서 A β 독성에 대한 防風類 藥材의 세포 보호 효과를 확인하였으며, 본 연구 결과 防風, 海防風, 植防風 DW 추출물에서 세포 보호효과를 보였다. 이는 防風類 藥材가 알츠하이머병에 대한 개선 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

아세틸콜린은 신경 말단에서 신호를 전달하는 신경전달물질 중 하나로, 뇌에서 학습과 기억 형성에 관여한다³⁷⁾. 알츠하이머병과 같은 퇴행성 치매 환자에서는 아세틸콜린의 양이 감소되어 학습 및 기억 장애가 일어나기 때문에, 증상 개선을 위해 아세틸콜린을 분해하는 AChE를 저해하여 아세틸콜린을 증가시키는 AChE 저해제를 사용한다⁴⁹⁾. 본 연구에서는 AChE의 기질인 acetylthiocholine의 분해를 발색법을 통해 분석하여 AChE의 활성을 측정하였다. 防風類 藥材의 AChE 억제활성을 평가한 결과, 防風과 植防風은 AChE 억제효과를 보이지 않았으며, 海防風은 DW 추출물, EtOH 추출물 100 μ g/ml에서 각각 17.48%, 8.62%의 약한 억제효과를 나타냈다.

본 연구의 결과를 통해, 防風類 藥材의 뇌신경질환 개선 가능성을 확인하였으며, 신경세포보호 효과는 防風, 海防風, 植防風 모두 DW 추출물이 우수하며 염증 억제 효과는 防風, 海防風, 植防風 모두 EtOH 추출물이 우수한 것을 확인하였다. 또한, AChE 저해 활성은 海防風에서만 나타나는 것을 확인하였다.

V. 결 론

본 연구에서는 防風, 海防風, 植防風의 용매별 시료들에서 신경세포보호효과 및 AChE 저해 효과를 비교하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 防風類 藥材를 DW와 EtOH로 각각 추출하였을 때 수득물은 防風, 海防風, 植防風 추출물 모두 EtOH 추출물보다 DW 추출물에서 높았다.
2. 防風類 藥材 용매별 시료의 DPPH radical 소거 활성을 비교하였을 때 큰 차이를 보이지 않았다.
3. PC12 세포에서 防風類 藥材 용매별 시료의 H₂O₂ 독성에 대한 세포 보호효과를 비교하였을 때 海防風, 植防風 DW 추출물에서 防風 추출물 및 海防風, 植防風 EtOH 추출물에 비해 강한 효과를 보였다.
4. HT22 세포에서 防風類 藥材 용매별 시료의 A β 독성에 대한 세포 보호효과를 비교하였을 때 防風, 海防風, 植防風 모두 DW 추출물에서 EtOH 추출물에 비해 강한 효과를 보였다.
5. BV2 세포에서 防風類 藥材 용매별 시료의 LPS로 유도한 NO 생성에 대한 억제 효과를 비교하였을 때 防風, 海防風, 植防風 모두 EtOH 추출물에서 DW 추출물에서

비해 강한 효과를 보였다.

6. 防風類 藥材 용매별 시료의 AChE 억제 활성을 비교하였을 때 海防風 추출물이 防風, 植防風에 비해 강한 효과를 보였다.

이상의 결과는 뇌신경질환에 대한 防風, 海防風, 植防風의 적용 가능성을 시사한다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(318027-04).

References

1. Seo BI, Kwon DY, Choi HY, Lee JH, Oh MS, Bu YM. Medicinal Herbology. 8th rev. ed, Seoul : Younglim-Sa, 2012 : 144-5.
2. Gu YR, Kim SW, Son YW, Hong JH. Antioxidant activities of solvent extracts from different Glehnia Radix parts and their inhibitory effect against nitric oxide production in Raw 264.7 cell. Korean journal of food preservation. 2017 ; 24(1) : 116-24.
3. Kang SY, Oh TW, Kim JW, Park YK. Effect of the water extract of Peucedani Japonici Radix on ovalbumin-induced allergic asthma in mice. Kor J Herbology 2013 ; 28(6) : 1-7.
4. Korea Food and Drug Administration. The Guideline on the Visual and Organoleptic Examination of Herbal Medicine. Seoul : Korea Food and Drug Administration, 2009 : 1 : 49, 103, 72.
5. Seo UM, Zhao BT, Kim YH, Kang JS, Son JK, Woo MH. Simultaneous analysis of seven marker compounds from Saposhnikovia Radix, Glehnia Radix and Peucedani Japonici Radix by HPLC/PDA. Arch Pharm Res. 2016 ; 39(5) : 695-704.
6. Kreiner J, Pang E, Lenon GB, Yang AWH. Saposhnikovia divaricata: a phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review Chin J Nat Med. 2017 ; 15(4) : 255-64.
7. Yuan Z, Tezuka Y, Fan W, Kadota S, Li X. Constituents of the underground parts of Glehnia littoralis. Chem Pharm Bull. 2002 ; 50(1) : 73-7.
8. WK Whang, SJ Lee, HH Kim, HK Cho, KS Lee, IH Kang, IH Ham. Standardization of Peucedani Radix. Kor J Pharmacogn. 2001 ; 32(4) : 292-6.
9. Tai J, Cheung S. Anti-proliferative and antioxidant activities of Saposhnikovia divaricata. Oncol Rep. 2007 ; 18(1) : 227-34.
10. Chun JM, Kim HS, Lee AY, Kim SH, Kim HK. Anti-Inflammatory and Antiosteoarthritis Effects of Saposhnikovia divaricata ethanol Extract: In Vitro and In Vivo Studies. Evid Based Complement Alternat Med. 2016 ; 2016 : 1984238.
11. Okuyama E, Hasegawa T, Matsushita T, Fujimoto H, Ishibashi M, Yamazaki M. Analgesic components of saposhnikovia root (Saposhnikovia divaricata). Chem Pharm Bull (Tokyo). 2001 ; 49(2) : 154-60.
12. Wang X, Jiang X, Yu X, Liu H, Tao Y, Jiang G, Hong M. Cimifugin suppresses allergic inflammation by reducing epithelial derived initiative key factors via regulating tight junctions. J Cell Mol Med. 2017 ; 21(11) : 2926-36.
13. Kuo YC, Lin YL, Huang CP, Shu JW, Tsai WJ. A tumor cell growth inhibitor from Saposhnikovia divaricata. Cancer Invest. 2002 ; 20(7-8) : 955-64.
14. Chang CZ, Wu SC, Kwan AL, Lin CL. 4'-O-β-D-glucosyl-5-O-methylvisamminol, an active ingredient of Saposhnikovia divaricata, attenuates high-mobility group box 1 and subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm in a rat model. Behav Brain Funct. 2015 ; 11(1) : 28.
15. Ng TB, Liu F, Wang HX. The antioxidant effects of aqueous and organic extracts of Panax quinquefolium, Panax notoginseng, Codonopsis pilosula, Pseudostellaria heterophylla and Glehnia littoralis. J Ethnopharmacol. 2004 ; 93 (2-3) : 285-8.
16. Lee JW, Lee C, Jin Q, Yeon ET, Lee D, Kim SY, Han SB, Hong JT, Lee MK, Hwang BY. Pyranocoumarins from Glehnia littoralis inhibit the LPS-induced NO production in macrophage RAW 264,7 cells. Bioorg Med Chem Lett. 2014 ; 24(12) : 2717-9.
17. McCutcheon AR, Ellis SM, Hancock RE, Towers GH. Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. J Ethnopharmacol. 1994 ; 44(3) : 157-69.
18. de la Cruz JF, Vergara EJ, Cho Y, Hong HO, Oyungerel B, Hwang SG. Glehnia littoralis Root Extract Induces G0/G1 Phase Cell Cycle Arrest in the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. Asian Pac J Cancer Prev. 2015 ; 16(18) : 8113-7.
19. Yoon T, Lee do Y, Lee AY, Choi G, Choo BK, Kim HK. Anti-inflammatory effects of Glehnia littoralis extract in acute and chronic cutaneous inflammation. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2010 ; 32(4) : 663-70.
20. Huang GJ, Deng JS, Liao JC, Hou WC, Wang SY, Sung PJ, Kuo YH. Inducible nitric oxide synthase

- and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory activity of imperatorin from *Glehnia littoralis*. *J Agric Food Chem*, 2012 ; 60(7) : 1673-81.
21. Yoon T, Cheon MS, Lee AY, Lee do Y, Moon BC, Chun JM, Choo BK, Kim HK. Anti-inflammatory activity of methylene chloride fraction from *Glehnia littoralis* extract via suppression of NF- κ B and mitogen-activated protein kinase activity. *J Pharmacol Sci*, 2010 ; 112(1) : 46-55.
 22. Matsuura H, Saxena G, Farmer SW, Hancock RE, Towers GH. Antibacterial and antifungal polyine compounds from *Glehnia littoralis* ssp. *leiocarpa*. *Planta Med*, 1996 ; 62(3) : 256-9.
 23. Nugara RN, Inafuku M, Iwasaki H, Oku H. Partially purified *Peucedanum japonicum* Thunb extracts exert anti-obesity effects in vitro. *Nutrition*, 2014 ; 30(5) : 575-83.
 24. Nukitragansan N, Okabe T, Toda T, Inafuku M, Iwasaki H, Oku H. Effect of *Peucedanum japonicum* Thunb extract on high-fat diet-induced obesity and gene expression in mice. *J Oleo Sci*, 2012 ; 61(2) : 89-101.
 25. Kim JM, Noh EM, Kim HR, Kim MS, Song HK, Lee M, Yang SH, Lee GS, Moon HC, Kwon KB, Lee YR. Suppression of TPA-induced cancer cell invasion by *Peucedanum japonicum* Thunb. extract through the inhibition of PKC α /NF- κ B-dependent MMP-9 expression in MCF-7 cells. *Int J Mol Med*, 2016 ; 37(1) : 108-14.
 26. Chun JM, Lee AR, Kim HS, Lee AY, Gu GJ, Moon BC, Kwon BI. *Peucedanum japonicum* extract attenuates allergic airway inflammation by inhibiting Th2 cell activation and production of pro-inflammatory mediators. *J Ethnopharmacol*, 2018 ; 211 : 78-88.
 27. Kim JM, Erkhembaatar M, Lee GS, Lee JH, Noh EM, Lee M, Song HK, Lee CH, Kwon KB, Kim MS, Lee YR. *Peucedanum japonicum* Thunb. ethanol extract suppresses RANKL-mediated osteoclastogenesis. *Exp Ther Med*, 2017 ; 14(1) : 410-6.
 28. Chun JM, Lee AY, Kim JS, Choi G, Kim SH. Protective Effects of *Peucedanum japonicum* Extract against Osteoarthritis in an Animal Model Using a Combined Systems Approach for Compound-Target Prediction. *Nutrients*, 2018 ; 10(6) : E754.
 29. Takeuchi N, Kasama T, Aida Y, Oki J, Maruyama I, Watanabe K, Tobinaga S. Pharmacological activities of the prenylcoumarins, developed from folk usage as a medicine of *Peucedanum japonicum* THUNB. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1991 ; 39(6) : 1415-21.
 30. Chen IS, Chang CT, Sheen WS, Teng CM, Tsai IL, Duh CY, Ko FN. Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from Formosan *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry*, 1996 ; 41(2) : 525-30.
 31. Nugara RN, Inafuku M, Takara K, Iwasaki H, Oku H. Pteryxin: a coumarin in *Peucedanum japonicum* Thunb leaves exerts antiobesity activity through modulation of adipogenic gene network. *Nutrition*, 2014 ; 30(10) : 1177-84.
 32. Park JH, Lee TK, Yan BC, Shin BN, Ahn JH, Kim IH, Cho JH, Lee JC, Hwang IK, Kim JD, Hong S, Lee YJ, Won MH, Kang IJ. Pretreated *Glehnia littoralis* Extract Prevents Neuronal Death Following Transient Global Cerebral Ischemia through Increases of Superoxide Dismutase 1 and Brain-derived Neurotrophic Factor Expressions in the Gerbil Hippocampal Cornu Ammonis 1 Area. *Chin Med J (Engl)*, 2017 ; 130(15) : 1796-803.
 33. Park JH, Shin BN, Ahn JH, Cho JH, Lee TK, Lee JC, Jeon YH, Kang IJ, Yoo KY, Hwang IK, Lee CH, Noh YH, Kim SS, Won MH, Kim JD. *Glehnia littoralis* Extract Promotes Neurogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus of the Adult Mouse through Increasing Expressions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Tropomyosin-Related Kinase B. *Chin Med J (Engl)*, 2018 ; 131(6) : 689-95.
 34. Ju IG, Choi JG, Kim N, Kwak C, Lee JK, Oh MS. *Peucedani Japonici Radix* ameliorates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation by regulating microglial responses. *Neurosci Lett*, 2018 ; 686 : 161-7.
 35. Song HR, Lee HY, Shim SH, Kwon YJ. Neuroinflammation and Psychiatric Illness. *Korean J Biol Psychiatry*, 2016 ; 23(1) : 12-7.
 36. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res*, 2008 ; 39(1) : 73-82.
 37. Haam J, Yakel JL. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J Neurochem*, 2017 ; 142 Suppl 2 : 111-21.
 38. Kim N, Choi JG, Park S, Lee JK, Oh MS. Butterbur Leaves Attenuate Memory Impairment and Neuronal Cell Damage in Amyloid Beta-Induced Alzheimer's Disease Models. *Int J Mol Sci*, 2018 ; 19(6) : 1644.
 39. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961 ; 7 : 88-90.
 40. Ju MS, Kim HG, Choi JG, Ryu JH, Hur J, Kim YJ, Oh MS. *Cassiae semen*, a seed of *Cassia obtusifolia*, has neuroprotective effects in Parkinson's disease models. *Food Chem Toxicol*, 2010 ; 48 : 2037-44.
 41. Iqbal J, al-Rashida M, Babar A, Hameed A, Khan MS, Munawar MA, Khan AF. Cholinesterase

- Inhibitory Activities of N-Phenylthiazol-2-Amine Derivatives and their Molecular Docking Studies. *Med Chem*. 2015 ; 11(5) : 489-96.
42. Seo BI, Kwon DY, Choi HY, Lee JH, Oh MS, Bu YM. *Medicinal Herbology*. 8th rev. ed. Seoul : Younglim-Sa. 2012 : 345.
43. Lee WC, Jeon WJ, Shin GJ. An Experimental Studies on the alleviation effects of Daebangpoongtang in LPS-induced arthritis. *Dongguk Journal of the Institute of Oriental Medicine*. 2009 ; 9:35-49.
44. Sánchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. 2002 ; 8 : 121-37.
45. Fetler L, Amigorena S. *Neuroscience*. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science*. 2005 ; 309 : 392-3.
46. Catorce MN, Gevorkian G. LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Curr Neuropharmacol*. 2016 ; 14(2) : 155-64.
47. Kamino T, Shimokura T, Morita Y, Tezuka Y, Nishizawa M, Tanaka K. Comparative analysis of the constituents in *Saposhnikovia Radix* and *Glehnia Radix cum Rhizoma* by monitoring inhibitory activity of nitric oxide production. *J Nat Med*. 2016 ; 70(2) : 253-9.
48. Selkoe DJ. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis*. 2001 ; 3 : 75-80.
49. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*. 2016 ; 14(1) : 101-15.