

일시적 국부 뇌허혈 동물모델에서 한약재의 신경보호 효과

오진경 · 정지옥 · 안남윤 · 오혜림 · 정재훈¹ · 류종훈*
경희대학교 약학대학, ¹삼육대학교 약학과

Neuroprotective Effects of Medicinal Herbs in the Transient Focal Ischemia in Rats

Jin Kyung Oh, Ji Wook Jung, Nam Yoon Ahn, Hye Rim Oh, Jae Hoon Cheung¹, and Jong Hoon Ryu*

Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, KyungHee University,

1 Hoeki-dong, Dongdeamoon-ku, Seoul 130-701, Korea

¹Department of Pharmacy, Sahmyook University, Nowon-goo, Seoul 139-742, Korea

Abstract – It is thought that highly reactive oxygen species generated after strokes plays a key role in damaging the brain. We examined free radical scavenging activity and neuroprotective effects of several medicinal herbs in a rat model of transient ischemia. Free radical scavenging property of medicinal herbs was examined in vitro using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl stable free radical. Transient ischemia was induced by intraluminal occlusion of the right middle cerebral artery for 120 min, followed by reperfusion for 22 hr in rats. Aqueous extracts of 8 medicinal herbs (200 mg/kg) were orally administered twice to transient ischemic rat prior to reperfusion and 2 hr after reperfusion. Total infarction volume in the hemisphere ipsilateral to the ischemia-reperfusion was significantly decreased in 7 groups treated with *Sophora flavescens*, *Lycopus lucidus*, *Sanguisorba officinalis*, *Caesalpinia sappan*, *Albizia julibrissin*, *Rubia akane*, *Psoralea corylifolia*, or *Prunella vulgaris*. However, neuroprotective effects of these medicinal herbs were not correlated with their antioxidative activities. These results suggest that these medicinal herbs exert neuroprotection via antioxidative as well as unknown mechanism.

Key words – Cerebral ischemia, medicinal herbs, neuroprotective effect, antioxidative activity

뇌허혈(cerebral ischemia)은 뇌혈관질환(cerebral vascular disease)의 하나인 뇌졸중(stroke)에서 가장 많이 나타나는 형태로서, 이로 인해 뇌신경세포에 손상이 일어나 뇌기능이 소실되어 여러 장애를 일으킨다. 뇌허혈은 신경세포를 손상시켜 신경학적 결손을 초래하여 신체마비, 인식장애, 시각 또는 언어장애 등 심각한 문제를 일으키는 질환으로 주로 내경동맥 혹은 중대뇌동맥(middle cerebral artery)의 폐쇄가 가장 큰 원인이 되고 있다.

뇌졸중으로 발생하는 뇌신경세포 손상의 원인은 과도한 흥분성 신경 전달 물질의 유리, free radical의 생성, 단백질 합성의 저해, 유전자 발현 이상 및 면역반응의 활성화 등으로 설명될 수 있으나, 아직까지 뇌신경세포 손상 기전의 복잡성 등으로 뇌졸중으로 발생하는 뇌신경세포의 손상을 보호해 줄 수 있는 치료제가 개발되지 못한 실정이다. 현재 뇌허혈 치료제로 NMDA 수용체 길항제, 칼슘 channel blocker,

protein kinase C 억제제 등이 연구개발 되고 있으나, 임상 의 부작용 때문에 또는 효능이 검증되지 않아서 여전히 연구되어야 할 부분으로 남아있다. 21-aminosteroid 계열의 free radical scavenger인 tirilazad는 안전성 문제로 말미암아 개발이 중단되었으며, 최근에는 Na⁺ channel 차단제, NOS (nitric oxide synthase) 억제제와 여러 종류의 neurotrophic factor 들도 뇌신경보호 에 효과가 있는 것으로 관찰되어 이 들을 응용한 약물을 개발하려는 연구가 진행되고 있다.¹⁾ 허혈성 뇌손상의 neurotoxic cascade에 있어 세포 내 과량의 cytotoxic 칼슘 이온은 NOS의 활성화 및 과량의 NO 생성을 통해 RNS(reactive nitrogen species)를 발생시킨다.²⁾ 생체 내에서 ROS(reactive oxygen species) 또는 RNS는 DNA 분절, 지질 과산화, 단백질의 불활성화 등을 통하여 암, 당뇨병, 뇌졸중, 동맥경화, 심-혈관 질환, 심부전, 빈혈 등 광범위한 질병의 병태 생리적 원인을 제공하고 노화를 촉진시키는 것으로 잘 알려져 있다.³⁻⁵⁾ 또한 mitochondria에 있어 증가된 칼슘 이온은 oxidative phosphorylation을 uncou-

*교신저자(E-mail) : jhyu63@khu.ac.kr
(FAX) : 02-966-3885

pling 시킴으로써 에너지 공급을 더욱 감소시키고 free radical 들의 생성 증가를 초래한다. 이와 같은 free radical들은 DNA 손상 외에도 lipid peroxidation에 의해 세포막을 손상시킨다.¹⁾ 이와 같이 다양한 기전으로 발생하는 뇌졸중에 대한 치료 약물은 단일의 작용기전이 아닌 다양한 작용기전을 갖는 약물 또는 이러한 약물의 복합투여가 더 효과적일 수 있다. 이러한 점에서 천연물로부터 뇌졸중 치료 약의 개발 가능성을 검토하는 것은 매우 타당한 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서는 다양한 한약재 추출물들의 *in vivo*에서 뇌허혈 손상에 대한 신경 보호 효과를 검색하였으며 아울러 이들의 작용기전을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 한약재는 경동시장에서 시판되는 것을 구입하였고, 본 대학의 육창수 교수로부터 감정을 받아 본 연구실의 표본실에 보관하고 있다(고삼: No. KHOPS-03-019, 택란: No. KHOPS-03-014, 지유: No. KHOPS-02-012, 소목: No. KHOPS-02-013, 합환피: No. KHOPS-02-016, 천초: No. KHOPS-01-007, 보골지: No. KHOPS-00-008, 하고초: No. KHOPS-02-010). 각 한약재는 10배량의 증류수를 가하여 환류 냉각장치에서 80-100°C로 2시간 추출하였다. 추출이 완료된 다음 Whatman(No. 1) filter paper로 여과하고, 여액을 일정 volume이 될 때까지 감압 농축한 후 동결건조(Eyela, model FD-5N, Japan)하여 실험에 사용하였다. 각 한약재의 수득율(%)은 다음과 같다. *Sophora flavescens* 고삼: 22.1, *Lycopus lucidus* 택란: 22.8, *Sanguisorba officinalis* 지유: 16.3, *Caesalpinia sappan* 소목: 6.8, *Albizia julibrissin* 합환피: 3.4, *Rubia akane* 천초: 11.3, *Psoralea corylifolia* 보골지: 12.3, *Prunella vulgaris* 하고초: 3.4.

실험동물 - 실험동물은 7 주령의 웅성 Spague-Dawley rat (260-270 g)를 (주오리엔트사에서 공급 받아 경희대학교 약학대학의 clean cage에 약 7일간 적응시켜 사용하였으며, 명암주기는 12시간씩 자동적으로 조절되는 환경에서 사육하였다. 사육실의 온도는 23±2°C로 유지되었고, 습도는 55±10%로 하였으며, 먹이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

뇌허혈 동물모델 - 뇌허혈 동물 모델을 만들기 위하여 Nagasawa 등의 방법에 의거하여 중대뇌동맥폐쇄(middle cerebral artery occlusion; MCAO) 수술을 하였다.⁶⁾ 뇌허혈은 120분 동안 중대뇌동맥을 폐쇄하고 재관류를 하여 22시간 동안 유지하였다. 모든 수술 과정은 체온저하를 막기 위해 heating pad와 heating lamp를 이용하여 체온을 37±0.5°C로 유지하였다. 약물의 투여는 뇌허혈 유발 2, 4시간 후

에 각 한약재 추출물 200 mg/kg을 생리식염수에 녹여 경구로 투여하였다. 양성 대조약물로는 free radical scavenger로 acute stroke의 치료제로 알려져 있는 MCI-186을 10 mg/kg으로 경구로 투여하였다.⁷⁾

뇌허혈 손상의 조직학적 평가 - 뇌조직 손상을 평가하기 위하여 중대뇌동맥 폐쇄 24시간 후에 뇌를 적출하여 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma) 염색을 시행하였다.⁸⁾ TTC 염색이 된 뇌절편을 10% neutral-buffered formalin 용액에 담가 고정시킨 후 각 절편의 이미지를 digital camera를 이용하여 촬영한 후 computer에 저장하였다. 뇌경색이 일어난 부위의 면적(infarct area, mm²)은 computerized image analysis system을 사용하여 측정하였으며, 경색용적(infarct volume, mm³)은 각 절편의 경색 면적의 총 합계를 절편의 두께로 곱하여 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거활성 검색 - 시료를 각 농도별로 조제한 용액 100 µl에 methanol에 녹인 0.1 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma) 용액 1.9 ml를 가하였다. 각 시료는 3가지 농도로 조제하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation 시킨 후 UV spectrophotometer (SHIMADZU, model UV-1201, Japan)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.⁹⁾ 양성 대조약물로는 (-)-epicatechin을 사용하였다.

결과 및 고찰

뇌허혈 손상평가 - 일시적 중대뇌동맥 폐쇄 후 약물 대신 생리식염수를 투여한 대조군과 MCI-186을 투여한 양성 대조군, 그리고 8종류의 한약재를 뇌허혈 유발 후 2시간 및 4시간에 2회 투여한 군에서 TTC 염색을 한 결과, 대조군의 경우 brain의 cortex와 striatum에서 정상조직과 뚜렷이 구분되는 infarction 부위가 확인되었다. 양성대조군과 7종류의 한약재를 투여한 군의 경우 cortex와 striatum에서 모두 infarction 부위가 유의성 있게 감소하였다. 대조군과 양성대조군, 한약재 투여군의 infarct volume과 부종율(% edema)은 Table I과 같다. 허혈이 유발된 대뇌 반구의 부종율은 아래의 식에 의해 산출했다.

$$\text{부종율(\%)} = \frac{A-B}{B} \times 100$$

A: 총 coronal slice에서 허혈이 유발된 대뇌 반구의 용적 (mm³)

B: 총 coronal slice에서 정상 대뇌 반구의 용적 (mm³)

MCI-186을 경구로 투여한 경우 infarct volume은 183.43±19.10 mm³으로 대조군과 비교했을 때 약 40% 정도 감소하

Table I. Neuroprotective effects of several medicinal herbs in the transient focal ischemic rat model

Treatment	Infarct volume (mm ³)	Edema (%)
Control	323.41±10.14	13.54±0.30
MCI-186	183.43±19.10***	6.81±1.11***
<i>Sophora flavescens</i> (고삼)	177.79±23.87***	9.55±0.57*
<i>Lycopus lucidus</i> (택란)	182.07±15.57***	10.56±1.23
<i>Sanguisorba officinalis</i> (지유)	210.61±10.67**	8.30±0.60**
<i>Caesalpinia sappan</i> (소목)	127.66±41.98***	8.65±1.78*
<i>Albizia julibrissin</i> (합환피)	196.13±8.86**	9.04±1.10*
<i>Rubia akane</i> (천초)	196.40±26.16**	0.78±0.94
<i>Psoralea corylifolia</i> (보골지)	217.62±33.02**	2.49±0.70
<i>Prunella vulgaris</i> (하고초)	292.67±28.43	12.52±0.82

Data represent mean±SEM. The significance of the differences between the total infarction volumes of the control (n=10), MCI-186 (10 mg/kg, n=8), medicinal herbs (200 mg/kg, n=6) was determined by ANOVA followed by Duncan's test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (vs. control group).

었다. 부종을 또한 대조군과 비교할 때 MCI-186을 투여한 군에서 13.54±0.30에서 6.81±1.11로 약 50% 정도 감소하였다. 한약제를 투여한 군과 대조군을 비교했을 때는 *Prunella vulgaris*(하고초)를 투여한 군을 제외하고 7종류의 한약제 *Caesalpinia sappan*(소목), *Sophora flavescens*(고삼), *Lycopus lucidus*(택란), *Sanguisorba officinalis*(지유), *Albizia julibrissin*(합환피), *Rubia akane*(천초), *Psoralea corylifolia*(보골지)를 투여한 군에서 모두 infarction 부위가 유의성있게 감소하였다. 부종율은 4종류의 한약제 *Sanguisorba officinalis*(지유), *Sophora flavescens*(고삼), *Caesalpinia sappan*(소목), *Albizia julibrissin*(합환피) 투여군에서 유의성있게 감소하였다.

Fig. 1은 자유라디칼 생성 억제효과가 가장 높게 나타난 *Lycopus lucidus*(택란)의 용량의존 실험 결과이다. 택란 100, 200 및 400 mg/kg 용량에서 infarction 부위가 용량의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 택란 400 mg/kg 투여군에서는 대조군과 비교했을 때 infarct volume은 323.41±10.14 mm³에서 155.39±35.68 mm³으로 약 50% 정도 감소하였다. 그러나 부종율은 대조군과 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 택란은 본초학적 분류상 활혈거어약(活血祛瘀藥)에 속하는 약물로서 활혈거어(活血祛瘀), 행기소종(行氣消腫) 등의 효능이 있다고 알려져 있지만, 많은 연구가 이루어져 있지 않다. 단지 Tian 등은 혈소판 응집 억제, 혈액순환 촉진, 울혈제거의 효능이 있다고 보고하고 있으며,¹⁰⁾ Shi 등도 택란의 추출물이 적혈구의 변형 등을 증가시키며 혈액순환을 촉진시킨다고 보고하고 있다.¹¹⁾ 그러나 아직까지 택란의 어

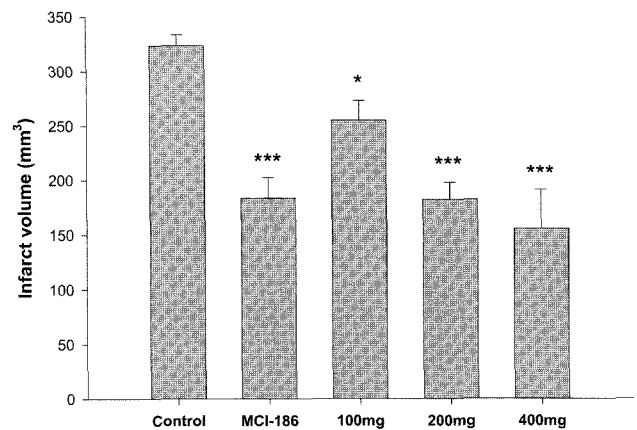


Fig. 1. The effect of *Lycopus lucidus* on the transient ischemia in rat. Total infarct volume was measured after 2 h of MCA occlusion followed by 22 h reperfusion. MCI-186 and water extract of *Lycopus lucidus* were orally administered promptly prior to reperfusion and 2 h after reperfusion. Data represent mean±SEM from 6–10 rats. The significance of the differences between the total infarction volumes of the control, MCI-186 (10 mg/kg), *Lycopus lucidus* was determined by ANOVA followed by Duncan's test. *P<0.05, ***P<0.001 (vs. control group).

Table II. The free radical scavenging effects of medicinal herbs

Medicinal herbs	Inhibition rate (%)
(-)-Epicatechin	95.9
<i>Sophora flavescens</i> (고삼)	84.8
<i>Lycopus lucidus</i> (택란)	94.1
<i>Sanguisorba officinalis</i> (지유)	89.6
<i>Caesalpinia sappan</i> (소목)	50.5
<i>Albizia julibrissin</i> (합환피)	37.1
<i>Rubia akane</i> (천초)	30.6
<i>Psoralea corylifolia</i> (보골지)	26.4
<i>Prunella vulgaris</i> (하고초)	82.4

Values are means of duplicate determination. Data shown in the table are inhibition rate compared to standard samples at 1 mg/ml of the water extract of each medicinal herb.

떠한 성분이 이러한 효능을 갖는지는 불분명하다. 향후 택란의 뇌신경보호 효과에 대한 정확한 작용기전 및 유효성분에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

자유라디칼 생성억제효과 - 8가지 한약 추출물들의 항산화 효과를 DPPH 를 이용하여 측정하였다. 대조군과 한약 추출물의 1 mg/ml 농도에서 inhibition rate (%)는 Table II와 같다. *Lycopus lucidus*(택란), *Sanguisorba officinalis*(지유), *Sophora flavescens*(고삼), *Prunella vulgaris*(하고초) 등에서 항산화효과가 우수하다는 사실을 확인 하였으며, 양성 대조군으로 사용한 (-)-epicatechin과 유사한 활성을 보였다. 그러

나 *Albizia julibrissin*(합환피), *Rubia akane*(천초), *Psoralea corylifolia*(보골지) 등에는 항산화 활성을 보이지 않았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 *Sophora flavescens*(고삼), *Lycopus lucidus*(택란), *Sanguisorba officinalis*(지유)는 신경 보호효과와 항산화효과가 뛰어남을 확인할 수 있었고, *Caesalpinia sappan*(소목), *Albizia julibrissin*(합환피), *Rubia akane*(천초), *Psoralea corylifolia*(보골지)는 뇌신경 보호 효과는 있었지만 우수한 항산화효과는 나타나지 않았다. *Prunella vulgaris*(하고초)는 항산화효과는 뛰어났지만 뇌신경 보호 효과는 미미하였다. 이러한 연구결과는 다양한 기전으로 발생되는 뇌졸중에 대한 치료약은 다양한 활성을 가지고 있는 약물이나 여러 약물의 복합투여가 더 효과적일 수 있다고 보인다. 한편 본 연구의 결과는 항산화 작용이 우수하다고 하여 뇌신경 보호작용을 기대하기는 어렵다는 사실을 의미하고 이는 한약재의 흡수 및 뇌로의 이송 등 다양한 원인에 의해 나타난 결과로 생각된다.

결 론

8가지 한약 추출물의 뇌허혈 손상에 대한 뇌신경 보호 효과를 검색한 결과 *Prunella vulgaris*(하고초)를 투여한 군을 제외하고 7종류의 한약재, *Caesalpinia sappan*(소목), *Sophora flavescens*(고삼), *Lycopus lucidus*(택란), *Sanguisorba officinalis*(지유), *Albizia julibrissin*(합환피), *Rubia akane*(천초), *Psoralea corylifolia*(보골지)를 투여한 군에서 모두 infarction 부위가 유의성있게 감소하였다. 8가지 한약 추출물의 자유라디칼 생성 억제 효과는 *Lycopus lucidus*(택란), *Sanguisorba officinalis*(지유), *Sophora flavescens*(고삼), *Prunella vulgaris*(하고초) 등에서 우수하게 나타남을 확인하였다.

감사의 말씀

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술개발 사업단의 연구지원(PF0320601-00)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 또한 한약재의 감정에 도움을 주신 육창수 교수님께 감사드립니다.

인용문헌

1. Jacques De Keyser, Geert Sulter, and Paul G. Luiten (1999) Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci.* **22**: 535-540.
2. Wahl F., Allix M., Plotkine M., and Boulu R.G. (1992) Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **23**: 267-272.
3. Kensler, T. W. and Trush, M. A. (1984) Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environ. Mutagen.* **6**: 593-616
4. Richter, C. (1988) Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett.* **241**: 1-5.
5. Cerutti, P. A. (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet* **344**: 862-863.
6. Nagasawa H. and Kogure K. (1989) Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* **20**: 1037-1043.
7. Tanaka M. (2002) Pharmacological and clinical profile of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotective agent. *Folia Pharmacol. Jan.* **119**: 301-308.
8. Bederson and Pitts L.H. (1986) Germano S.M., Nishimura M.C., Davis R.L., Batkowski H.M Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* **17**: 1304-1308.
9. Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., and Merillon, J. M. (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from vitis vinifera cell cultures using in vitro tests. *Life Sci.* **61**: 2103-2110.
10. Tian Z., Gao N., Li L., Yu J., and Luo X. (2001) Effect of two extracted fraction from *Lycopus lucidus* on coagulation function. *Zhong YAO Cai* **24**: 507-508.
11. Shi H.Z., Gao N.N., Li Y.Z., Yu J.G., Fan Q.C., and Bai G.E. (2002) Effects of active fractions from *Lycopus lucidus* L. F04 on erythrocyte rheology. *Space Med. Med. Eng.* **15**: 331-334.

(2003년 11월 2일 접수)