

# 왕머루포도 뿌리에서 분리한 heyneanol A의 신경보호효과

황화수<sup>1</sup> · 남궁미애<sup>1</sup> · 이은옥<sup>2</sup> · 심범상<sup>2</sup> · 안규석<sup>2</sup> · 김성훈<sup>1,2\*</sup>

1: 경희대학교 동서의학대학원, 2: 경희대학교 한의과대학

## Neuroprotective Effect of Heyneanol A from the roots of *vitis amurensis* Rup

Hwa Soo Hwang<sup>1</sup>, Mi Ae Namgung<sup>1</sup>, Eun Ok Lee<sup>2</sup>, Bum Sang Shim<sup>2</sup>, Kyoo Seok Ahn<sup>2</sup>, Sung Hoon Kim<sup>1,2\*</sup>

1: Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University,  
2: College of Oriental Medicine, Kyunghee University

According to the report of Korea National Statistical Office in 2007, cerebral vascular disease is second cause of deaths in Korean. Cerebral ischemia is one of the main reason of cerebral vascular diseases. To evaluate the neuroprotective effect of heyneanol A against cerebral ischemia, we used the middle cerebral artery occlusion model (MCAO). Heyneanol A from root of *vitis amurensis* Rup is a tetramer of resveratrol as known anti-oxidant and anti-cancer agent. Although the effects of resveratrol in the various fields have been well established, little is known of the effects of heyneanol A. In this study, heyneanol A reduced infarction and edema volume by 33.5% and 57% compared with control groups (vehicle), respectively. Also, neurological score was decreased by heyneanol A. It's effects were more potent than resveratrol. Taken together, these results exerted that heyneanol A has a neuroprotective effect against cerebral ischemia.

Key words : heyneanol A, resveratrol, MCAO, infarct, edema, neurological score

### 서 론

2007년 1월 통계청 발표에 따르면 뇌혈관질환은 2005년 한국인에서 암 다음으로 높은 사망원인을 차지하였다<sup>1)</sup>. 그 중 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 언어 장애 등 심각한 문제를 일으키는 질환으로 주로 내경동맥 또는 중대뇌동맥 폐쇄가 가장 큰 원인이 되고 있다<sup>2,4)</sup>. 현재 뇌허혈치료제로 NMDA 수용체 길항제, 칼슘 channel blocker, protein kinase C 억제제 등이 연구개발 되고 있으나, 임상 부작용이나 효능이 검증되지 않아 뚜렷한 치료제가 개발되지 못한 실정이다<sup>2)</sup>.

본 논문에서 사용된 heyneanol A는 항산화물질로 알려진

resveratrol의 tetramer 형태로 1996년<sup>5)</sup>에 처음 분리되었고 2001년<sup>6)</sup>에 왕머루포도의 뿌리에서도 분리되었다. 그간 혈액암주의 세포고사를 유도하거나<sup>7)</sup>, 혈관형성 유도 저해를 통한 항암효능이 보고<sup>8)</sup>되었다. Resveratrol은 항산화효능, 심혈관질환 저해효능, 신경세포 보호효능<sup>9-14)</sup> 등 많은 연구가 이뤄졌으나 heyneanol A에 대한 연구는 거의 이뤄지지 않았다. 최근에 왕머루포도에서 분리한 vitisin A와 heyneanol A가  $\beta$ -amyloid에 의한 산화적 스트레스를 감소시켜 신경세포를 보호한다는 연구결과가 유일하다<sup>15)</sup>. 이에 본 연구에서는 동물모델을 활용하여 heyneanol A의 신경보호 효능이 resveratrol 보다 유의적으로 효과적임을 입증하였으므로, 이에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

실험동물은 6주령의 수컷 Spague-Dawley rat (250-270 g)을 (주)대한바이오링크로부터 공급받아 clean cage에 약 7일간 적응시켜 사용하였으며, 명암주기는 12시간씩 자동적으로 조절되는

\* 교신저자 : 김성훈, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-9233

· 접수 : 2007/11/03 · 채택 : 2007/11/22

환경에서 사육하였다. 사육실 온도는 23±2℃로 유지되었고, 습도는 55±10%로 하였으며, 먹이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 뇌허혈 동물모델

뇌허혈 동물모델을 만들기 위하여 Belayev<sup>16)</sup>등의 방법에 의거하여 중대뇌동맥 폐쇄 (middle cerebral artery occlusion ; MCAO)수술을 하였다. 체중 250-270 g의 흰쥐를 enflurane (1% to 3.5% in a mixture of 70% N<sub>2</sub>O and 30% O<sub>2</sub>)으로 마취하여 수술판에 고정시키고 목의 중앙선을 절개한 후, 오른쪽 총경동맥과 외경동맥을 노출시켜 분리 후, 외경동맥과 총경동맥을 결찰하고, polysiloxane (Xantoprene)으로 코팅한 봉합사 (4-0 nylon thread [Ethicon, Johnson and Johnson])을 20 mm 정도 외경동맥을 통하여 삽입하여 중대뇌동맥을 폐쇄하였다. 뇌허혈은 2시간동안 중대뇌동맥을 폐쇄하고 재관류하여 22시간 동안 유지하였다. 모든 수술과정은 체온저하를 막기 위해 heating pad를 이용하여 체온을 37±0.5℃로 유지하였다. 약물투여는 뇌허혈 유발 2시간 후에 heyneanol A 0.1 ug/kg을 0.4% propylene glycol 생리식염수에 녹여 재관류 전에 정맥으로 투여하였다. 양성대조군으로는 뇌허혈 보호작용이 보고되어진 heyneanol A의 전구체인 resveratrol을 같은 용량으로 투여하였다.

3. 뇌허혈 손상의 조직학적 평가

뇌조직 손상을 평가하기 위하여 중대뇌동맥 폐쇄 24시간 후에 뇌를 적출하여 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, sigma T-8877)염색을 시행하였다. TTC 염색이 된 뇌절편을 10% neutral-buffered formalin용액에 담가 고정시킨 후 각 절편의 이미지를 digital camera를 이용하여 촬영한 후 computer에 저장하였다. 뇌경색이 일어난 부위의 면적 (infarct area, mm<sup>2</sup>)은 computerized image analysis system을 이용하여 측정하였다. 뇌허혈 손상 면적은(A) 부중에 의하여 손상면적이 늘어난 것을 보정하기 위하여, 먼저 정상 측 대뇌반구 면적(B)을 측정하고 손상 측 대뇌반구 정상조직 면적(C)을 측정한 다음 정상 측 대뇌반구 면적에서 손상 측 대뇌반구의 정상조직 면적을 감하는 방법 (A=B-C)으로 계산하였다. 총뇌허혈 손상 체적은 아래 식과 같이 계산하였다.

$$\text{Total infarct volume (mm}^3\text{)} = \sum \text{infarct area (mm}^2\text{) per side} \times 2 \text{ mm (slice thickness)}$$

허혈이 유발된 대뇌 반구의 부종율을 아래의 식에 의해 산출되었다.

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

A : 총 coronal slice에서 허혈이 유발된 대뇌 반구의 용적 (mm<sup>3</sup>)  
 B : 총 coronal slice에서 정상 대뇌 반구의 용적 (mm<sup>3</sup>)

4. 뇌허혈 손상의 신경학적 평가

신경학적인 검사는 수술후 24시간이 경과한 다음 Thiagarajan<sup>17)</sup>등의 방법에 따라 그 결손 정도를 5등급으로 점수

화 하였다. 즉, 꼬리를 잡고 있는 동안 자세의 균형과 앞발의 굴곡성에 중점을 두어 앞발의 뒤땡거림이 전혀 없고 대칭운동에 지장이 없는 것을 0으로 하고, 앞발의 굴곡운동을 하지 못하는 것을 1로 하였으며, 꼬리를 잡고 있는 동안 몸의 균형을 잃고 빙글빙글 도는 것을 2로 하였으며, 앞발의 굴곡운동성이 전혀 없고 밀면 쓰러지는 것을 3으로 하였으며 계속적으로 걷지 못하고 일어나지 못하는 상태를 4로 하여 5등급으로 나누었다.

5. 통계처리

모든 실험결과는 Means ± S.E.M으로 표시하였으며 유의성 검정은 student's T-test를 사용하여 유의성 (\*p<0.05, \*\*p<0.01)을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 뇌허혈 손상의 조직학적 평가

뇌허혈 유발 2시간 후에 대조군으로 0.4% propylene glycol, 양성대조군으로 resveratrol, 실험군으로 heyneanol A를 단회 투여한 후 뇌를 적출하여 TTC염색을 한 결과, 대조군의 경우 brain의 cortex와 striatum에서 정상조직과 뚜렷이 구분되는 infarction 부위가 확인되었다(Fig. 1). Resveratrol과 heyneanol A를 0.1 ug/kg 정맥 투여한 군의 경우 cortex와 striatum에서 모두 infarction 부위가 유의성 있게 감소하였으며, heyneanol A를 투여한 경우 대조군의 infarct volume 459.09 ± 21.83 mm<sup>3</sup>과 비교하여 약 33.5% 정도 감소시켜 양성 대조군 resveratrol의 18.5% 감소한 것보다도 우수한 것으로 확인되었다(Fig. 1, 2).

또한 허혈이 유발된 대뇌 반구의 부종율을 살펴본 결과, heyneanol A 투여군만 대조군의 70.04 ± 24.76 mm<sup>3</sup>에서 30.57 ± 9.99 mm<sup>3</sup>로 약 57% 정도 감소하여 resveratrol 보다 효과적이었(Fig. 3).

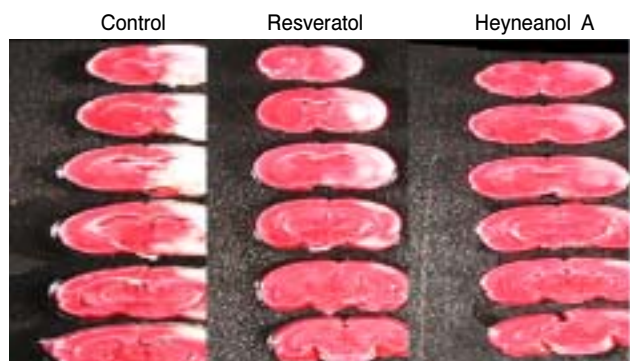
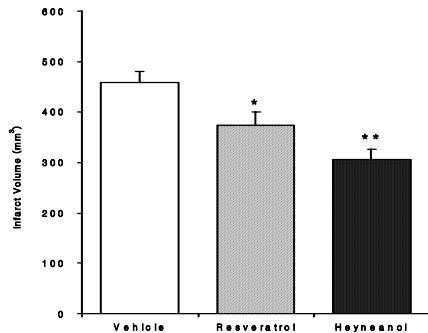


Fig. 1. Resveratrol and heyneanol A reduced the infarct volume. Brain tissue was cut coronally into 2-mm sections with a brain slicer and stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride monohydrate (TTC) followed by 10% formaldehyde solution. The infarct area was quantified by an image analysis system. White area indicate infarction area.

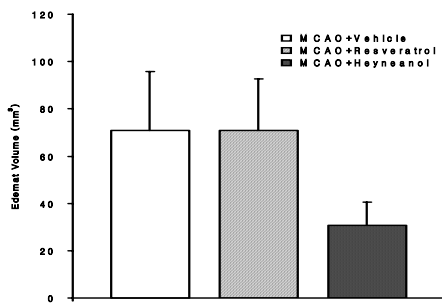
2. 뇌허혈 손상의 신경학적 평가

뇌허혈 유발 2시간 후에 약물처리를 하고 중대뇌동맥 폐쇄 24시간 후에 신경학적 평가를 한 결과 Table 1에서 보는바와 같

이 허혈 24시간 경과 후 신경결손은 양성대조군인 resveratrol (1.60 ± 0.22)에서는 대조군 (1.60 ± 0.22)과의 차이를 보이지 않았으나 heyneanol A (1.44 ± 0.22)에서는 약간의 회복을 보였다.



**Fig. 2. Statistical analysis of infarct volume.** Infarct volume was calculated as described in the Materials and Methods. All values are represented as Means ± S.E.M. (n=10 each group). The statistically significant differences between control (Vehicle) and sample groups were calculated by the Student's t-test. \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01.



**Fig. 3. Resveratrol and heyneanol A reduced the edema volume.** Edema volume was calculated as described in the Materials and Methods. All values are represented as Means ± S.E.M. (n=10 each group). The statistically significant differences between control (Vehicle) and sample groups were calculated by the Student's t-test.

**Table 1. Neurological score of vehicle, resveratrol and Heyneanol A in MCAO rats.**

Treatment	N	Neurological score
Vehicle	10	1.60 ± 0.22
Resveratrol (0.1 ug/kg, i.v.)	10	1.60 ± 0.22
Heyneanol A (0.1 ug/kg, i.v.)	10	1.44 ± 0.22

Neurological score measured after 2 h of MCAO and 22 h of reperfusion. All values are represented as median ± 95% confidence interval

## 결론

왕머루포도 뿌리에서 분리한 resveratrol 의 전구체인 heyneanol A는 세포고사유도, 혈관형성저해를 통한 항암활성 효능만 알려졌고 연구가 거의 전무한 상태였다. 최근에 in vitro 실험을 통해 heyneanol A가 산화적스트레스 저해를 통한 신경 세포를 보호한다는 연구결과를 바탕으로 중대뇌동맥폐쇄를 통한 뇌허혈 동물모델을 활용하여 실험을 하였다. 결과 heyneanol A는 뇌의 cortex와 striatum 모두 infarction 부위를 유의적으로 감소시켰고, 허혈이 유발된 대뇌 반구의 부종율도 효과적으로 감소

시켰으며, 신경결손에서 약간의 회복을 보였다. Heyneanol A의 이런 효과들은 전구체인 resveratrol 보다 더욱 뛰어난 결과로 뇌 허혈 치료제로서의 가능성을 제시해준 것이다.

## 감사의 글

이 논문은 바이그린 21 프로젝트, 보건복지부, ARPC사업의 연구비 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 2006년 9월, 통계청.
- 오진경, 정지욱, 안남윤, 오혜림, 정재훈, 류종훈. 일시적 국부 뇌허혈 동물모델에서 한약재의 신경보호 효과, 생약학회지 34(4):335-338, 2003.
- 한석희, 박진혁, 김진숙, 이선미. 황기와 원지분획의 뇌허혈에 관한 약효연구, 생약학회지 44(4):371-377, 2000.
- Yang, J.W., Ouyang, J.P., Liao, W.J., Tian, J., Liu, Y.M., Wei, L., Wang, B.H., Li, K. The effects of Chinese herb Angelica in focal cerebral ischemia injury in the rat. Clin. Hemorheol Microcirc. 32(3):209-215, 2005.
- Li, W.W., Ding, L.S., Li, B.G., Chen, Y.Z. Oligostibenes from vitis heyneana. Phytochemistry 42: 1163-1165, 1996.
- Huang, K.S., Lin, M., Cheng, G.F. Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of Vitis amurensis and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. Phytochemistry 58: 357-362, 2001.
- Lee, E.O., Lee, H.J., Hwang, H.S., Ahn, K.S., Chae, C., Kang, K.S., Lu, J., Kim, S.H. Potent inhibition of Lewis lung cancer growth by heyneanol A from the roots of Vitis amurensis through apoptotic and anti-angiogenic activities. Carcinogenesis 27(10):2059-2069, 2006.
- Lee, E.O., Kwon, B.M., Song, G.Y., Chae, C.H., Kim, H.M., Shim, I.S., Ahn, K.S., Kim, S.H. Heyneanol A induces apoptosis via cytochrome c release and caspase activation in human leukemic U937 cells. Life Sci. 74(18):2313-2326, 2004.
- Sinha, K., Chaudhary, G., Gupta, Y.K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. Life Sci. 71(6):655-665, 2003.
- Lu, K.T., Chiou, R.Y., Chen, L.G., Chen, M.H., Tseng, W.T., Hsieh, H.T., Yang, Y.L. Neuroprotective effects of resveratrol on cerebral ischemia-induced neuron loss mediated by free radical scavenging and cerebral blood flow elevation., J Agric Food Chem. 54(8):3126-3131, 2006.
- Wang, Q., Xu, J., Rottinghaus, G.E., Simonyi, A., Lubahn, D., Sun, G.Y., Sun, A.Y. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. Brain Res.

- 958(2):439-447, 2002.
12. Huang, S.S., Tsai, M.C., Chih, C.L., Hung, L.M., Tsai, S.K. Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci.* 69(9):1057-1065, 2001.
  13. Goldberg, D.M. More on antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clin. Chem.* 42: 113-114, 1996.
  14. Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W., Szekeres, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res.* [Epub ahead of print] Aug 17, 2007.
  15. Jang, M.H., Piao, X.L., Kim, H.Y., Cho, E.J., Baek, S.H., Kwon, S.W., Park, J.H. Resveratrol oligomers from *Vitis amurens* attenuate beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 30(6):1130-1134, 2007.
  16. Belayev, L., Alonso, O.F., Busto, R., Zhao, W., Ginsberg, M.D. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke.* 27(9):1616-1622, 1996.
  17. Thiyagarajan, M., Sharma, S.S. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats., *Life Sci.* 74(8):969-985, 2004.