

호장근의 일시적 국소뇌허혈 흰쥐 모델에 대한 신경보호효과

김진모^{1#}, 차동석¹, 전소라¹, 전훈¹, 임종필¹, 최훈¹, 이기진¹, 강민석¹, 나호정¹, 김미연^{2,4},
임강현³, 김호철^{2,4}, 부영민^{2*}

1: 우석대학교 약학대학 한약학과 본초학교실, 2: 경희대학교 한의과대학 본초학교실,
3: 세명대학교 한의과대학 본초학교실, 4: 뉴메드 한의과학기술연구소

Neuroprotective Effect of the Roots of *Polygonum Cuspidatum* on Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats

Jinmo Kim^{1,#}, Dongsuk Cha¹, Sora Jeon¹, Hoon Jeon¹, Jong pil Lim¹,
Hoon Choi¹, Ki Jin Lee¹, Minseok Kang¹, Hojeong Na¹, Miyeon Kim^{2,4},
Kang-Hyun Leem³, Hocheol Kim^{2,4}, Youngmin Bu^{2*}

1: Dept. of Herbal Pharmacology, College of pharmacy, Woosuk University,
2: Dept. of Herbal Pharmacology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University,
3: Dept. of Herbal Pharmacology, College of Oriental Medicine, Semyung University,
4: Korea Institutue of Science and Technology of East Medicine, NeuMed Co. Ltd

ABSTRACT

Objectives : The purpose of the present study was to development of neuroprotective antioxidant agents. For the purpose, we investigated the neuroprotective effect of anti oxidant herb, the root of *Polygonum cuspidatum* on transient focal cerebral ischemia in rats.

Methods : The roots of *Polygonum cuspidatum* were extracted by 85% MeOH (PCE). Radical scavenging effects were investigated using DPPH assay and TBARs (Thiobarbituric acid reaction substance) assay in brian homogenates. Neuroprotective effect was investigated using transient focal cerebral ischemia rat model (2 h of ischemia, 22 h of reperfusion) by behavioral test and measurement of brain damage using 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride staining.

Results : PCE showed potent and dose dependent radical scavenging effects in DPPH and TBARs assay. Oral administration of PCE reduced brain infarct volume by 29.7% and improved the sensory motor functional deficit by 29% compared with vehicle treated group.

Conclusions : PCE showed radical scavenging effects and neuroprotective effect on stroke rat model. Therefore, *Polygonum cuspidatum* could be a candidate for the development of neuroprotective-antioxidant agents.

Key words : *Polygonum cuspidatum*, Radical scavenging effect, Neuroprotection, Middle cerebral artery occlusion, Stroke

* 교신저자 : 부영민, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 02-961-9462 · E-mail : dockhan@naver.com

제1저자 : 김진모, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490 우석대학교 약학대학 한약학과 본초학교실

· Tel : 063-290-1573 · E-mail : kjmo99@naver.com

· 접수 : 2008년 5월 26일 · 수정 : 2008년 6월 20일 · 채택 : 2008년 6월 20일

서론

虎杖根은 蓼科(Polygonaceae)에 속하는 호장(Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc), 왕호장(P. sachalinensis Fr. Schm.) 및 동속 근연식물의 根莖과 根으로 鬚根을 제거하고 洗淨하여 乾燥한 것이다. 이 두 종 이외에 등근잎호장(P. ellipticum Migo)도 虎杖根의 기원식물로 사용되고 있다^{1,2)}. 虎杖根은 《名醫別錄》에 “微溫. 主通利月水. 破留血癥結”이라고 최초로 기재된 이래³⁾, 大蟲杖, 苦杖, 酸杖, 斑杖, 斑杖根의 異名으로 불리었다⁴⁾. 性味는 苦酸, 微寒하고 肝膽肺經으로 들어가 祛風利濕, 散瘀定痛, 止咳化痰, 瀉下通便, 清熱解毒의 效能으로 임상에서는 關節痺痛, 濕熱黃疸, 經閉, 癥瘕, 咳嗽痰多, 水火燙傷, 跌打損傷, 癰腫瘡毒, 熱結便秘 등을 치료하는데 사용되어져 왔다^{1,4)}.

주요 成分으로 phenol 화합물, stilbene 유도체, anthraquinone 유도체 및 flavonoid 화합물들이며 emodin, emodin 8-O-β-D-glucopyranoside, resveratrol, polydatin(piceid), physcion, chrysophanol, rhein, anthraglycoside A, anthraglycoside B, fallacinol, questinol 등이 분리되어 보고되고 있다⁴⁻⁶⁾.

호장근은 항산화, 항염증작용, 항산화 작용, 골다공증에 대한 치료효과, 항콜레스테롤작용, 항암작용, 혈관신생억제작용, 항간염바이러스작용, 항균효과, 거담작용 등이 보고되고 있다⁷⁻¹⁰⁾.

中風은 뇌혈관의 문제로 야기되는 뇌손상으로 의식장애, 운동장애 및 언어장애 등이 급성적으로 발생하여 후유증도 야기하는 병증을 말하며, 질병이환 후 사망률이 높으며, 혹 사망하지 않더라도 후유증으로 인하여 많은 사회적, 경제적 문제를 야기 한다¹¹⁾. 일반적으로 뇌경색과 뇌출혈로 나뉘는데, 뇌경색이 80%를 차지하며, 중풍에 대한 연구로 대체적으로 뇌경색에 대한 연구로 집중되고 있다¹²⁾.

약 30여 년 동안 허혈성 중풍 동물모델이 개발된 이후 현재까지 수많은 물질들이 이 모델들에 적용되어 효과를 밝히는 연구가 진행되고 있다¹²⁾. 뇌혈관이 폐쇄되는 뇌경색에서는 신경세포들이 혈액공급의 저하로 인하여 손상을 입게 되는데, 그 구체적인 기전들은 글루타메이트 독성¹³⁾, 자유기¹⁴⁾, 염증¹⁵⁾ 및 뇌교세포 활성화¹⁶⁾ 등이며, 이들을 차단하는 물질을 개발하기 위하여 많은 연구가 진행되어져 왔다.

그러나 임상시험에서 부작용 및 효과 없음으로 인하여 포기되는 관계로 아직까지 효과 있는 신경보호제가 없는 상황이다. 따라서 최근에는 단일 물질로

하나의 기전을 치료하는 방법보다는 각기 다른 기전에 작용하는 단일약제들을 혼합하여 여러 기전을 치료하는 방법이 시도되고 있다¹⁷⁾. 이러한 현재의 중풍 치료제 연구개발의 추세는 많은 성분을 함유하고 있는 천연물 특히 임상에서 그 효과가 많이 알려져 있는 한약을 이용한 연구는 많은 발전가능성을 가지고 있다¹⁸⁾.

여러 기전 중에서 산화적 손상은 뇌허혈 후 생성되는 자유기에 의해 발생하며, 뇌손상을 유발하는 주요 물질로 잘 알려져 있다¹⁹⁾. 산화적 손상을 억제하는 물질들이 우수한 신경보호의 효과를 보이며, 임상시험에서도 좋은 결과를 보이고 있다²⁰⁾. 또한 중풍에서의 약제 혼합 치료에 있어서 기본적으로 선택되는 기전 중의 하나로서 매우 중요시되고 있다¹⁷⁾.

중풍 모델에서의 뇌손상은 손상된 뇌부위의 지배 신체 영역의 기능부전을 유발하는데, 중풍에 대한 신경보호효과가 있는 약제의 약효를 평가할 때 뇌손상 측정과 더불어 감각 운동 기능을 평가하는 것이 중요하다²¹⁾.

본 연구에서는 活血祛瘀의 효능으로 임상에서 사용되어져 왔고, 항산화작용 및 항고지혈작용에 대한 약리작용을 보이며, 특히 허혈성 심장손상에 대한 보호작용이 있는 호장근이 뇌허혈 신경세포 손상에 효과가 있으며, 그 기전은 항산화 효과일 것이라는 가설을 설정하였다. 이 가설의 증명을 위해서 in vitro 실험으로 DPPH자유기에 대한 전자 공여능을 관찰하고, 적출 뇌조직으로부터 FeSO₄로 유발한 OH⁻로 인한 지질과산화 반응에 대한 억제작용을 관찰하는 등 항산화 작용을 확인하고, 신경보호효과가 있는 지 확인하기 위하여 intraluminal suture 방법으로 유발한 일시적 국소 뇌허혈 흰쥐모델에 투여하여 뇌손상에 대한 보호효과를 확인하였고, 뇌손상으로 인한 감각 운동기능실조에 대한 보호효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조

본 실험에 사용한 호장근은 *Polygonum cuspidatum*의 뿌리를 사용하였다. 호장근 건조약재 100 g을 2,000 ml 플라스크에 넣고 85% MeOH 1,500 ml를 가하여 120분 동안 초음파 추출하여 여과지로 여과한 후 재차 85% MeOH 1,000 ml를 가하여 90분간 초음파 추출한 후 여과포로 여과하였다. 처음 여과액과 2

차 여과액을 합하여 감압농축 시킨 후 동결건조하여 고형추출물 18 g을 얻어 실험에 사용하였다.

2. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay

DPPH radical 소거 활성법은 free radical을 갖는 안정한 화합물인 DPPH를 기질로서 항산화활성을 측정하는 방법이다. DPPH radical에 대한 영향을 관찰하기 위해 Chu의 방법²²⁾을 이용하였다. DPPH 1 g을 MeOH 14.3 ml에 녹여 DPPH 용액을 만들었다. DPPH 용액 900 μ l에 시료 100 μ l를 넣어 시료의 농도가 1, 10, 100 및 1000 μ g/ml이 되게 하여 암실에서 30분간 반응 시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모두 3회 반복 실험하여 평균값을 구하였다. 대조군은 DPPH용액에 시료를 넣는 대신 MeOH를 넣어 실험하였고, blank는 DPPH용액과 시료 대신 MeOH를 넣어 실험하였다. 호장근 추출물의 효과는 대조군에 비해 억제된 비율로 결과를 계산하였다. 양성대조군으로 BHT (butylated hydroxytoluene)를 100 mg/ml을 같은 방법으로 처리하여 비교 분석하였다.

3. 적출 뇌균질액을 이용한 MDA assay

흰쥐를 희생시킨 후 뇌조직을 적출하여 적출한 뇌조직을 ice cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)에 넣어 뇌균질기 (PRO 200, pro scientific Inc. oxford, CT USA)를 이용하여 균질화하고 최종 뇌균질액의 농도가 0.1 g tissue/ml이 되게 하였다.

지질과산화의 정도는 thiobarbituric acid reactive substances (TBARs)의 수치를 구한 후 억제력으로 나타내었다. 측정은 Asakawa의 방법²³⁾을 변형하여 이용하였다. 뇌균질액 0.5 ml를 EP tube에 취하고 5% DMSO에 녹인 시료 (1, 10, 100 및 1000 μ g/ml) 0.1 ml를 가하였다. 50 mM FeSO₄ 30 μ l를 가하고 지질 과산화 활성을 위해 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양 후 TCA 100 μ l를 가하고 원심분리기를 이용하여 4°C에서 5분간 13,000 g에서 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액 500 μ l를 취하여 EP tube에 넣고 thiobarbituric acid (TBA) 500 μ l를 가한 후 97°C에서 10분간 반응 시킨다. 반응 후 5분간 냉장실에 넣어 식힌 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

TBARs의 수치는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)를 standard로 하여 0.01, 0.1, 1 및 10 μ M로 만들어 시료의 수치와 비교하여 μ moles/g tissue로 표현하였다.

4. 국소 뇌허혈 모델의 제조 및 시료의 투여

중대뇌동맥 폐쇄 흰쥐 모델은 체중 180~200 g의 샘타코 (주)에서 구입한 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 실험실 조건에서 상용시키면서 물과 사료를 충분히 공급하면서 사육하여 체중 200~220 g이 될 때 구별하여 수술 전날 물만 공급하여 시험에 사용하였다. 사육실 내의 온도는 22.0 \pm 2.0°C, 습도는 50 \pm 10%로 유지하였고 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다.

국소 뇌허혈 모델은 Zea Longa의 방법²⁴⁾을 응용하여 사용하였다. 25 mm의 4-0 나일론 봉합사(Dafilon®, Malaysia)의 끝 부분에서 약 5-10 mm 길이를 실리콘(Xantopren, Bayer Dental, Germany)과 경화유(Xantopren activator, Bayer Dental, Germany)를 혼합하여 지름이 0.28-0.30 mm가 되도록 코팅하여 실험에 사용하였다.

흰쥐를 70% N₂O와 30% O₂가 섞인 혼합가스에 5%의 isoflourane으로 전 마취를 한 후, 목 전방 부위 중양을 피부 절개하여, probe를 외경동맥에서 내경동맥으로, 총경동맥분지에서 약 17-18 mm정도 삽입한 후 실로 고정하였다. 피부절개 부위를 다시 봉합한 후 마취에서 자연 회복시켰다. 수술 120분 후 같은 방법으로 재마취하고 probe를 제거하여 재관류시켰다. 모든 수술과정은 isoflourane을 2%로 유지하면서 수술 현미경하에서 시행하였으며, 허혈을 유발시키는 동안과 재관류 및 회복기 동안 체온이 37.5 \pm 0.5°C이하로 떨어지지 않도록 체온 유지 장치 (Harvard apparatus, USA)를 사용하였다. 체온측정은 직장 속으로 최소한 6 cm 들어가게 탐침을 삽입하여 뇌내 온도를 반영하는 직장 체온을 측정하였다.

호장근 추출물 일시적 국소 뇌허혈에 대한 신경보호 효과를 측정하기 위하여, 호장근 추출물을 3차 증류수에 용해시켜 뇌허혈 유발 전 30분, 유발 후 90분에 100, 300, 1000 mg/kg의 용량을 2회 경구 투여하였고, 대조군으로는 3차 증류수를 경구 투여하여 사용하였다.

5. TTC 염색에 의한 뇌경색 부피 측정

재관류 후 24시간 뒤에 흰쥐를 희생시켜 뇌를 적출한 후, brain dissection guide (Harvard Instruments Large Rat Brain Matrix, Coronal, #52-4512c, USA)를 이용하여 bregma로부터 -1 mm의 부위에서부터 2 mm 두께로 잘라서 총 6개의 절편으로 나누었다. 이 절편들을 2% 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chloride (TTC) 용액에 충분히 담그고 37°C에서 30

분동안 방지하였다. 고정된 7개의 조직을 디지털 카메라로 하나씩 촬영한 후 컴퓨터에서 옮겼고, 이미지 분석프로그램(Optimas 6.5 Media cybernetics, USA)을 이용하여 TTC 염색상 뇌경색 부위인 흰색 부위의 부피를 계산하였다. 뇌경색 부위의 측정은 각 슬라이스 별 뇌경색과 전체의 뇌경색 부피를 측정하여 약효를 평가하였다.

6. Beam balance test

뇌허혈 유발 후 24시간에 균형감각에 미치는 효과를 측정하기 위하여 푸루넨 등의 방법²⁵⁾을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 너비 3 cm, 길이 150 cm의 나무로 된 봉을 바닥에서 약 50 cm 높이에 걸쳐 놓고, 흰쥐를 중심에 균형을 잡게 놓은 후 30초간 흰쥐의 행동을 보고 3명의 관찰자가 그 점수를 매기는데 점수의 평가기준은 다음과 같다. 0점; 봉에 균형을 잡을 수 없는 상태, 1점; 30 초간 균형을 잡기만 하고 다른 움직임이 없는 상태, 2점; 30 초간 균형을 잡고 봉의 길이 방향으로 몸을 트는 상태, 3점; 2점에 몸을 트 상태에서 봉의 길이 방향으로 걷되 스텝의 50 % 이상이 미끄러지는 상태, 4점; 3점에서 50 % 이하로 미끄러지는 상태, 5점; 4점에서 1스텝 정도 미끄러지는 상태, 6점; 5점에서 미끄러지는 스텝이 없이 자유롭게 걷는 상태로 정하여 실시하였다. 흰쥐마다 매 3회 실시하여 평균값을 데이터로 사용하였다.

7. 통계

실험성적은 항산화 in vitro의 경우에는 평균±표준편차(mean ± SD)로 in vivo의 경우에는 평균±표준오차(mean ± SEM)로 나타내었으며, 대조군과 약물 투여군과의 평균의 차이를 검정하기 위해서 Student's t-test로 검정하여, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 호장근의 DPPH 소거효과

호장근 85% MeOH 추출물의 전자 공여능에 의한 항산화 효과를 측정하기 위하여 DPPH 자유기 소거율을 측정한 결과 1, 10, 100 및 1,000 µg/ml의 농도에서 농도의존적인 자유기 소거효과를 보였는데, 각각 5.09 ± 2.85 , 31.22 ± 12.09 , 86.97 ± 3.47 및 93.37

$\pm 0.87\%$ 의 자유기 소거율을 보여 모든 농도에서 유의한 소거율을 보였으며 ($p < 0.001$), 100 µg/ml 이상의 농도에서는 거의 완벽한 소거효능을 보였는데, 양성대조군으로 사용된 강력한 합성 항산화제인 BHT의 소거효과 ($93.6 \pm 0.5\%$)와 유사한 효과를 보여 강력한 자유기 소거효능을 보인 것을 확인하였다(Fig. 1).

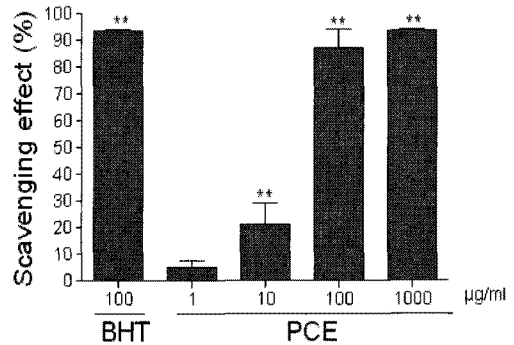


Fig. 1. DPPH radical scavenging effect of 85% MeOH extract of *P. cuspidatum*(PCE)

The values are % inhibition compared with vehicle treated group. Data is expressed by mean±SD. The symbol* represents statistically difference from vehicle treated group (** $p < 0.001$).

2. 호장근의 지질과산화에 대한 억제작용

적출 뇌 균질액에서 호장근 85% MeOH 추출물의 지질과산화에 대한 억제 효과를 측정하기 위하여 FeSO₄로 지질과산화를 유발하고 시료를 처리한 후 MDA를 thiobarbituric acid를 사용하여 측정하여 지질과산화 반응에 대한 억제효과를 확인 한 결과 농도의존적인 효과를 보였는데, 대조군이 1.14 ± 0.05 µmol/g tissue를 보인 반면 호장근은 10, 100 및 1,000 µg/ml의 농도에서 각각 1.1 ± 0.03 , 0.7 ± 0.16 , 0.2 ± 0.1 µmol/ml의 TBARs양을 보였다($p < 0.05$, $p < 0.001$). 억제 효과는 각각 5.0%, 42.0% 및 82.1%를 보였다(Fig. 2).

3. 호장근 일시적 국소뇌허혈의 뇌손상에 대한 보호효과

중대뇌동맥 일정시간 폐쇄후 24시간에 TTC로 염색 하면 뇌경색 부위와 정상부위는 각각 백색과 선홍색으로 염색된다. 이 모델에서의 뇌손상 조직학적인 결과는 뇌경색 중심부와 주변부로 나누는데 뇌경색 중심부는 temporal/parietal cortex 및 striatum 부위이며 괴사 형태로 세포가 사멸한다. 주변부는 괴사의 형태

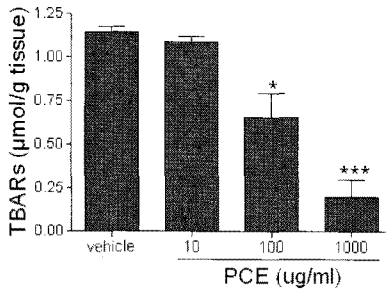


Fig. 2. Inhibitory effects of 85% MeOH extract of *P. cuspidatum* (PCE) on lipid peroxidation

The values are TBARS (μmol/ g tissue) and the values were expressed by mean ± SD. The * represents statistically differences from vehicle treated group (*p<0.05, *** p<0.001).

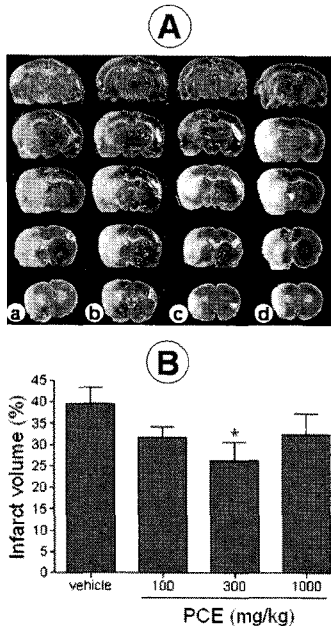


Fig. 3. A is are representative coronal brain sections (2-mm thick) stained with 2% TTC after 2 h of MCAO and 24 h of reperfusion showing infarction.

White area indicates infarct area and red area indicates the intact area. The brain was cut into 2-mm-thick coronal sections from -3 mm from bregma. a is vehicle treated group, b, c and d is PCE 100, 300 and 1000 mg/kg treated group, respectively. B is the graph shows the neuroprotective effects of 85% MeOH extract of *P. cuspidatum* (PCE) on MCAO in rats. The data was expressed by mean ± SEM. The * represents statistically differences from control (*p<0.05)

보다 천천히 세포가 사멸하는 것으로 알려져 있다 (Fig. 3A) 호장근 85% MeOH 추출물을 100, 300 and 1,000 mg/kg의 용량으로 유발 전 30분 및 유발 후 90 분에 투여한 결과 각각 31.67±3.36%, 26.40±4.94% 및

32.34±63.75%의 뇌손상을 보여 300 mg/kg에서 유의한 신경보호효과를 보였다 (p<0.05). 그러나 1,000 mg/kg에서는 다시 증가하는 경향이 있었다(Fig. 3B).

4. 호장근의 뇌허혈 후 감각 운동신경기능에 대한 증진효과

뇌손상 후 자발 운동과 전정운동을 측정하기 위하여 beam balance test를 수행하였다. 가수술군은 5.0±0.5점을 받은 반면, 대조군은 0.9±0.3점을 받아 뇌손상 후 상기한 감각운동기능의 실조를 보였다 (p<0.001, Fig. 4). 호장근 300 mg/kg 투여군은 2.1±0.26 을 보여 대조군에 비하여 유의한 운동기능 실조에 대한 보호효과를 나타내었다(P<0.01, Fig. 4).

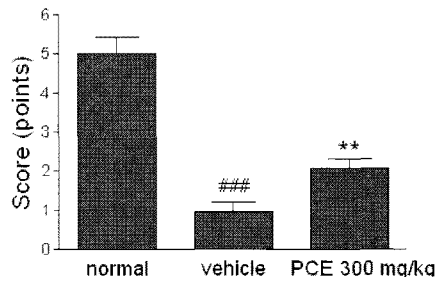


Fig. 4. Effect of 85% MeOH extract of *P. cuspidatum* (PCE) on balance beam test at 23 h after transient focal cerebral ischemia rat model

The number of animals are 6-8. The values are mean ± SEM. # and * represent statistically differences from normal group and vehicle treated group, respectively (###p<0.001, **p<0.01).

고 찰

본 연구에서는 호장근 85% 메탄올 추출물은 1, 10, 100 및 1,000 μg/ml의 농도에서 농도의존적인 자유기 소거효과를 보이며, 100 μg/ml 이상의 농도에서는 거의 완벽한 소거효능을 보였고, 양성대조군인 BHT의 효능과 유사한 전자공여능을 보였다.

DPPH는 제품화 하여 판매되는 몇 안되는 안정된 자유기로서 전자공여능을 비교적 정확히 측정하기 위해 사용되는 것으로 국제적으로 많이 사용되고 있다²⁶⁾. DPPH는 짙은 보라색을 띠는 물질이나 자유기 소거의 효능을 가진 물질과 반응하면 노란 diphenylpicrylhydrazine으로 변하게 되는데, 이러한 색의 변화를 분광광도계로 515 nm의 파장에서 측정하여 전자공여능을 평가하는

간단한 실험방법이다. 그러나 이 실험방법은 pH 및 용해물질로 MeOH를 사용하는데, in vivo의 조건과 매우 다른 측면이 있다. 따라서 DPPH를 이용한 자유기 소거 효능은 vivo 환경과 같은 조건의 다른 실험을 같이 병행해야 자유기 소거효능을 제대로 평가할 수 있다²⁶⁾.

따라서 본 연구는 뇌허혈에 대한 신경보호제를 찾는 것이 목적이므로, 뇌조직을 이용하여 산화적 손상을 유발하고 이에 대한 보호작용이 있는지 확인하는 실험을 실시하였다. 이를 위해서 OH를 생성하는 FeSO₄을 이용하여 산화적 반응으로 유발하고, 이로 인한 지질과산화 반응에 대한 억제효과를 MDA assay를 통하여 관찰하였다^{23,27)}.

호장근 85% MeOH추출물은 10-1,000 µg/ml의 농도에서 농도의존적인 억제효과 보였고, 1,000 µg/ml에서 최고의 효능을 보였다. 지질과산화 반응에 대한 억제효과는 자유기로 인한 세포막의 손상에 대한 보호효과를 의미하며, 더 나아가 세포내에서 발생할 수 있는 OH로 인한 세포막 및 핵막의 구성물질인 지질, 세포내 소기관의 구성물질인 단백질 등 세포내에서 구조를 이루는 물질들에 대한 손상에 대한 보호작용이 있다는 것을 의미한다고 할 수 있다.

본 연구에서는 MDA의 양을 TBARs를 측정하는 방식으로 실험을 실시하였는데, TBA는 MDA와 반응하여 TBARs를 형성하며 TCA 등에 의해 분홍색의 반응물질을 형성하게 되는데, 이 색의 변화를 분광광도계로 측정하는 방식으로 실험을 실시한다²³⁾. 또한 OH의 기원 물질로 FeSO₄를 이용하였는데, 이 물질은 용해되면서 OH⁻를 생성하는 물질로 많은 항산화제 연구에 많이 사용되는 물질 중의 하나로 잘 알려져 있다²⁷⁾.

이러한 항산화 작용의 실험결과로 산화적 손상이 주요 기전 중의 하나로 보고 되고 있는 뇌허혈로 인한 신경세포 손상에 대하여 효과가 있을 것이라는 가정 하에 중풍 동물 모델에 투여하여 신경보호효과를 확인하였다. 호장근 85% 메탄올 추출물은 일시적 국소뇌허혈 흰쥐모델(2 h 폐쇄, 24 h 재관류)에 경구 투여하여 관찰한 결과 300 mg/kg의 용량에서 36.0%의 비교적 높은 신경보호효과를 보였다.

뇌는 자유기에 의해 민감한 기관으로 뇌허혈이나 다른 독성 화합물로 인하여 발생하는 자유기에 의해 쉽게 손상을 받게 된다²⁸⁾. 뇌허혈에서는 백혈구 유주²⁹⁾, 글루타메이트 흥분독성³⁰⁾, 산화효소 및 재관류로 인한 갑작스런 산소공급³¹⁾ 등으로 발생하게 된다. 이러한 자유기는 세포내 기관에 대한 손상을 야기하게 되

고 심지어 세포가 사멸하게 되는 것이다. 많은 연구자들이 이러한 산화적 손상에 대하여 초점을 맞추고 신경보호 효과를 보이는 약을 개발하기 위하여 항산화물질에 대한 연구를 다양하게 시도하고 있으며, 이러한 연구들의 성과로 개발된 많은 항산화 물질들에 대한 임상연구가 진행되고 있다²⁰⁾. 그 예로 N-acetylcysteine³²⁾, NXY-059³³⁾, Melatonin³⁴⁾, Vitamin E³⁵⁾, DHA³⁶⁾, Resveratrol³⁷⁾, U-7406F³⁸⁾, Uric acid³⁹⁾ 및 Edaravone⁴⁰⁾ 등이 있다. 이들 물질들은 임상 3단계를 통과하여 제품화 하는 것도 있고, 3단계가 진행중인 물질들도 있다²⁰⁾. 이러한 국제적인 연구 성과들로 인하여 항산화 작용이 뛰어나며, 신경보호작용을 보이는 물질을 찾기 위하여 천연물에 관심이 집중되고 있으며, 이러한 측면에서 한약이 매우 우수한 자원이 된다고 할 수 있다¹⁸⁾.

이러한 측면에서 호장근은 매우 의미가 있는 약제로서 동맥경화, 혈소판 응집, 심허혈 등에 대한 보호작용이 증명되었으며, 호장근의 성분 중에서 resveratrol 및 그 이성질체인 polydatin의 경우에 중풍 모델에서 신경보호효과가 증명된 바 있다⁴¹⁾. 호장근의 성분 중에서 신경보호효과를 보이는 물질 2개가 보고 되었지만 이들 성분의 경우 호장근에만 있는 성분들이 아니고, 포도주 등 여러 항산화 식품들에서 연구가 진행된 경우이며, 또한 본 연구에서는 아직 호장근 약물 자체의 신경보호효과에 대한 보고가 없어 연구를 진행하게 된 것이며, 호장근의 신경보호 효과는 resveratrol 및 polydatin과 같은 페놀류 화합물의 항산화 작용에서 기인된 것으로 생각된다.

항산화 작용 이외의 기전에 대한 연구는 실시하지 않았으나, 호장근은 항염증 작용에 대한 보고들이 있어 항산화작용 이외에도 항염증 작용 등으로 효과가 있을 것으로 생각 된다⁷⁾.

뇌손상에 대한 보호효과가 뇌손상으로 인한 감각 운동 기능 실조에 대한 영향을 확인하기 위하여 중대 뇌동맥 폐쇄 후 23시간에 근력, 균형감각과 자발운동 기능을 측정하기 위하여 Balance beam test²⁵⁾를 수행하였는데, 호장근 300 mg/kg의 투여용량에서 감각 운동기능 실조에 대한 보호 작용을 보였다.

국소 뇌허혈 모델은 뇌손상으로 인한 인지기능 부전과 감각운동 기능 부전의 형태로 신체 기능에 대한 손상이 발생하게 된다. 뇌손상에 있어서 주요부위는 대뇌피질과 선조체며, 이 부위들이 손상을 받으면 사지의 감각 기능 및 운동기능의 실조가 발생하게 되는 것으로 보고되고 있다^{42,43)}. 신경학적 기능의 증진은 조직 병리학적인 신경보호효과 더불어 신경보호효과를 증명하는데 있어서 유용한 방법으로 중풍에 대한 임상시

험을 하기 위하여 필요한 결과로 평가받고 있다⁴³⁾. 따라서 호장근은 뇌손상에 따른 감각 운동 기능 실조에 대한 증진효과가 있다는 것을 의미하며, 또 한편으로는 중대뇌동맥 폐쇄 후 발생하는 대뇌 피질과 선조체의 손상을 억제하였다는 증거가 될 수 있다.

결 론

호장근의 항산화 작용을 검증하고, 산화적 손상이 신경세포 손상 기전인 일시적 국소뇌허혈 흰쥐모델의 뇌손상에 대한 신경보호효과를 살펴보기 위하여, DPPH assay, 적출 뇌조직을 이용한 TBARs assay 및 일시적 중대뇌동맥 폐쇄 흰쥐모델을 이용한 뇌손상측정 및 감각운동 기능 평가의 실험을 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 호장근 85% 메탄올 추출물은 1, 10, 100 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 농도의존적인 자유기 소거효과를 보였는데, 각각 5.09 ± 2.85 , 31.22 ± 12.09 , 86.97 ± 3.47 및 $93.37 \pm 0.87\%$ 의 자유기 소거율을 보였다.
2. 호장근 85% MeOH 추출물의 지질과산화에 대한 억제 효과를 측정하기 위하여 FeSO_4 로 지질과산화를 유발하고 시료를 처리한 후 지질과산화 반응에 대한 억제효과를 확인 한 결과 10, 100 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 4.38 ± 7.15 , 42.06 ± 19.68 및 $82.06 \pm 12.6\%$ 의 억제효과를 보였다.
3. 자유기 소거효과를 보이는 호장근 85% 메탄올 추출물의 신경보호효과를 확인하기 위해 일시적 국소뇌허혈 모델에 경구투여 하여 뇌손상을 관찰한 결과, 대조군이 $41.2 \pm 2.04\%$ 의 뇌손상을 보인 반면 호장근 100, 300 및 1,000 mg/kg를 뇌허혈 유발 전 30분과 유발 후 90분에 경구 투여한 결과 각각 $31.7 \pm 3.4\%$ 및 $26.4 \pm 4.9\%$, $32.3 \pm 6.7\%$ 의 뇌손상을 보여 300 mg/kg의 용량에서 신경보호의 효능을 보였다.
4. 뇌손상 후 자발 운동과 전진운동을 측정하기 위하여 beam balance test를 수행하였다. 가수술군은 5.0 ± 0.5 점을 받은 반면, 대조군은 0.9 ± 0.3 점을 받아 뇌손상 후 상기한 감각운동기능의 실조를 보였다. 호장근 300 mg/kg 투여군은 2.1 ± 0.26 을 보여 대조군에 비하여 유의한 운동기능 실조에 대한 보호효과를 나타내었다.

호장근은 페놀류 화합물을 함유하고 있으며, 이로 인하여 자유기소거와 같은 항산화작용을 보이는 약제

로서 중풍 뇌손상에 의한 신경 보호 작용을 보이는 바 신경 보호 작용을 갖는 항산화 한약으로서 산화적 손상과 관련된 뇌신경 질환에 대한 치료제 개발에 있어서 후보 약제로 거론 될 수 있을 것으로 생각되며, 항산화 작용 이외에 다른 기전에 대한 연구도 진행할 가치가 있다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 21세기 프론티어 연구개발사업인 자생식물이용기술개발사업단의 연구비지원(PF0320201-00)과 2007년도 경희대학교 연구비지원에 의한 결과임(KHU-20070702)

참고문헌

1. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 永林社. 1995 : 420-1.
2. 지형준 외. 대한약전 및 대한약전 외 한약규격주해. 한국메디컬인덱스사. 1998 : 678-9.
3. 陶弘景. 名醫別錄. 人民衛生出版社. 1986 : 228-9.
4. 國家中醫藥管理局 中華本草編輯委. 中華本草卷 2. 上海科學技術出版社. 1998. 653-9.
5. Qian G, Leung S, Lu G, and Leung K. Differentiation of Rhizoma Et Radix Polygoni Cuspidati from Closely Related Herbs by HPLC Fingerprinting. Chem Pharm Bull. 2006 ; 54 : 1179-86.
6. Sato M, Maulik G, Bagchi D, Das DK. Myocardial protection by protykin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin. Free Radic Res. 2000 ; 32 : 135-44.
7. Rho TC, Choi HC, Lee SW, Kim YH, Rho M, Kim YK, Lee HS. Inhibition of Oxide Synthesis by Coumarins from Polygonum cuspidatum in LPS-Activated RAW 264.7 cells. Kor J Pharmacogn. 2001 ; 32 : 181-8.
8. Jayasuriya H, Koonchanok NM, Geahlen RL, McLaughlin JL, Chang CJ. Emodin, a protein kinase inhibitor from Polygonum cuspidatum. J Nat Prod. 1992 ; 55 : 696-8.
9. 이태규, 김종화, 소준노. 호장근으로부터 분리된 emodin의 혈관신생 억제 활성. J Korean Soc Agric

Chem Biotechnol. 2003 ; 46 : 50-4.

10. Chang J, Liu H, Wang K, Chen M, Chiang L, Hua Y, Lin C. Ethanol extract of *Polygonum cuspidatum* inhibits hepatitis B virus in a stable HBV-producing cell line. *Antiviral Reserch.* 2005 ; 66 : 29-34.

11. Bamford J. The frequency causes and timings of deaths within 30days of first stroke: The Oxfordshire Community Stroke Project. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1990 ; 53 : 824-9.

12. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999 ; 79(4) : 1431-568.

13. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1988 ; 1 : 623-34.

14. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol.* 1992 ; 32 : 297-311.

15. Barone FC, Schmidt DB, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Feuerstein GZ, Clark RK, Lee EV, Griswold DE and Sarau HM. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. *Stroke.* 1992 ; 23(9) : 1337-47.

16. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets *Ann N Y Acad Sci.* 1997 ; 825 : 179-93

17. Lyden P, Lonzo L, Nunez S. Combination chemotherapy extends the therapeutic window to 60 minutes afterstroke. *J Neurotrauma.* 1995 ; 12(2) : 223-30.

18. Kim H. Neuroprotective herbs for stroke therapy in traditional eastern medicine. *Neurol Res.* 2005 ; 27 : 287-301.

19. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 1996 ; 27(6) : 1124-9.

20. Margail I, Plotkine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005 ; 39 : 429-43.

21. Zhang L, Chen J, Li Y, Zhang ZG, Chopp M. Quantitative measurement of motor and somatosensory impairments after mild(30min) and severe(2h) transient middle cerebral artery

occlusion in rats. *J Neurol Sci.* 2000 ; 174 : 141-6.

22. Chu YH, Chang CL, Hsu HF. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *J Sci Food Agric.* 2000 ; 80 : 561-6.

23. Asakawa T, Matsushita S. Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. *Lipids.* 1979 ; 14 : 401-406.

24. Longa Z, Weinstein PR, Carlson S, Summins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989 ; 20 : 84-91.

25. Puurunen K, Jolkonen J, Sirvio J, Haapalinna A, Sivenius J. An α 2-adrenergic antagonist, atipamezole, facilitates behavioral recovery after focal cerebral ischemia in rats. *Neuropharmacology.* 2001 ; 40 : 597-606.

26. Sanchez-Moreno C. Review, Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int.* 2002 ; 8 : 121-37.

27. Reif DW. Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic Biol Med.* 1992 ; 12 : 417-27.

28. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci.* 1985 ; 8 : 22-6.

29. Clark RK, Lee EV, Fish CJ, White RF, Price WJ, Jonak ZL, Feuerstein CZ, Barone FC. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull.* 1993 ; 31 : 565-72.

30. Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LMT, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci.* 1995 ; 15 : 6377-88.

31. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988 ; 255 : H1269-H1275.

32. Carroll JE, Howard EF, Hess DC, Wakade CG, Chen Q, Cheng C. Nuclear factor- κ B activation during cerebral reperfusion: effect of attenuation with N-acetylcysteine treatment. *Mol Brain Res.* 1998 ; 56 : 186-91.

33. Sydserff SG, Borelli AR, Green AR, Cross AJ. Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat: studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window. *Br J Pharmacol.* 2002 ; 135 : 103-112.
34. Kilic E, Kilic U, Reiter RJ, Bassetti CL, Hermann DM. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1. *J Pineal Res.* 2004 ; 37 : 247, 251.
35. van der Worp HB, Bar PR, Kappelle LJ, de Wildt DJ. Dietary vitamin E levels affect outcome of permanent focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 1998 ; 29 : 1002-6.
36. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005 ; 53 : 1841-56.
37. Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci.* 2002 ; 71 : 655-65.
38. Andrabi SA, Spina MG, Lorenz P, Ebmeyer U, Wolf G, Horn TF. Oxyresveratrol(trans-2,3V,4,5V-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 2004 ; 1017 : 98-107.
39. Yu ZF, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, Mattson MP. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res.* 1998 ; 53 : 613-25.
40. Mizuno A, Umemura K, Nakashima M. Inhibitory effect of MCI-186, a free radical scavenger, on cerebral ischemia following rat middle cerebral artery occlusion. *Gen Pharm.* 1998 ; 30 : 575-8.
41. Usum S, Geeta C, Yogendra KG. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci.* 2002 ; 71 : 655-65.
42. Tamura A, Graham, DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981 ; 1 : 53-60.
43. DeVriesa AC, Nelsona RJ, Traystmanb RJ, Hum PD. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2001 ; 25 : 325-42.