

竹瀝과 대나무 추출액의 혼합물이 뇌혈류 및 혈압에 미치는 작용 기전

김천중 · 정현우* · 김계엽¹

동신대학교 한의과대학, 1: 동신대학교 물리치료학과

Mechanism of Mixture of Bambusae Caulis in Liquamen and Bamboo Extract on the Cerebral Blood Flow and Blood Pressure in Rats

Cheon Joong Kim, Hyun Woo Jeong*, Gye Yeop Kim¹

College of Oriental Medicine of Dongshin University, 1: Department of Physical Therapy, Dongshin University

This Study was designed to investigate the mechanism of Mixture of Bambusae Caulis in Liquamen and Bamboo Extract on the change of regional cerebral blood flow (rCBF) and blood pressure (BP) in normal rats, and further to investigate cytokines production in serum of cerebral ischemic rats. Mixture were as follows ; Bamboo Extract extracted with distilled water at 98 °C for 3 hrs, Mixture of Bambusae Caulis in Liquamen and Bamboo Extracts (MLE) mixed at the ratio 1 to 100 (MLE100), 1 to 50 (MLE50), 1 to 20 (MLE20), 1 to 10 (MLE10), 1 to 5 (MLE5). The results were as follows ; The MLE-induced increase in rCBF was significantly inhibited by pretreatment with indomethacin (1 mg/kg, i.p.), an inhibitor of cyclooxygenase as well as methylene blue (10 μg/kg, i.p.), an inhibitor of guanylate cyclase. The MLE-induced increase in BP was significantly inhibited by pretreatment with methylene blue. In cytokines production in the serum drawn from femoral arterial 1 hr after middle cerebral artery occlusion, MLE5 significantly increased production of TGF-β and increased production of IL-10, but significantly decreased production of TNF-α compared with control group. In cytokines production in the serum drawn from femoral arterial 1 hr after reperfusion, MLE5 significantly increased production of TGF-β and IL-10, but significantly decreased production of TNF-α compared with control group. As results above ; The present authors thought that Mixture increased rCBF by dilating pial arterial diameter mediating guanylate cyclase. And MLE5 had anti-ischemic effect by inhibiting TNF-α production, and by accelerating IL-10 and TGF-β production.

Key words : Bambusae Caulis in Liquamen, Bamboo Extract, cyclooxygenase, guanylate cyclase, cytokines

서 론

대나무의 연구 보고를 살펴보면, 대나무 잎을 이용해 생리활성 및 항균성에 대한 보고¹⁾와 지방 대사 작용에 대한 보고²⁾, 그리고 대나무 수액의 성분에 대한 보고³⁾와 대나무를 에탄올로 추출한 추출액의 항산화 효과에 대한 보고⁴⁾가 있으며, 죽령의 연구 보고로는 적출 심장에 미치는 효과⁵⁾, 비만 흰쥐의 지질 대사에 미치는 효과⁶⁾, 혈당감하에 미치는 효과^{7,8)}, 뇌허혈 병태모델에 미치는 죽령과 생강즙의 항허혈 효과⁹⁾에 대한 보고가 있다. 또한 본 저자들도 현대인들의 생활 변화로 고혈압, 당뇨, 비만 등의 성

인병과 노인성 질환들이 다발되고 있고, 그 중에서도 뇌혈관계 질환의 발생 빈도가 높아 사회적으로 많은 관심을 갖고 있기에¹⁰⁾ 죽령에 대한 연구의 일환으로 죽령에 대나무 추출액을 다양하게 혼합한 혼합물이 뇌혈류 및 혈압에 미치는 영향과 뇌허혈 흰쥐에 미치는 뇌혈류 변동 개선에 관한 보고¹¹⁾를 하였다.

이에 저자들은 더 나아가 뇌혈류량 및 혈압에 미친 작용 기전을 알아보고자 혈관확장에 관여하는 인자들을 중심으로 죽령과 대나무 추출액을 혼합한 혼합물의 혈관확장 기전을 밝히고, 뇌혈관의 직경을 확장시킴으로써 뇌혈류량을 증가시킨 것으로 생각되어지는 죽령과 대나무 추출액을 1:5로 혼합한 혼합물 (MLE5)을 중뇌동맥 폐색으로 유발된 뇌허혈 흰쥐에 투여한 후 뇌허혈 흰쥐의 혈청에서 생성되는 사이토카인 양을 알아본 결과 유의성을 얻었기에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 정현우, 전남 나주시 대호동 252 동신대학교 한의과대학

· E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr, · Tel : 061-330-3524

· 접수 : 2006/09/26 · 수정 : 2006/10/09 · 채택 : 2006/11/14

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

체중 300 g내외의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 (주) 다불 사이언스에서 구입하여 사용하였다. 사육조건은 항온항습 장치가 부착된 사육장에서 고형사료와 1 차 증류수를 충분히 공급하면서 실험실 환경 (실내온도 24±2 °C, 습도 55±5%, 12 시간 dark/light)에 적응시켰다.

2) 시료

실험에 사용된 대나무로는 전라남도 담양군에서 자라는 솜대 (*Phyllostachy nigra* var *henonis* Starf)를 이용하였고, 대나무의 추출은 솜대 줄기를 톱밥 정도의 입자 크기로 파쇄한 후 4 °C에서 보관하면서 다음과 같은 추출 방법을 이용하여 시료를 얻었다.

(1) 대나무 추출액 (Bamboo Extract)

시료의 추출은 대나무 톱밥과 증류수의 비율을 1:10으로 혼합시킨 후 98 °C하에서 3 시간 열수 추출하여 당도가 1.2 °Brix가 되도록 조정한 후 62 °C에서 30 분간 저온 살균하였다¹²⁾. 정상 흰 쥐에게 투여되는 용량은 0.01 ml/kg, 0.1 ml/kg, 1.0 ml/kg, 10.0 ml/kg (i.p.)으로 하였다.

Table 1. The Physical & chemical properties of *Bambusae Caulis* in Liquamen

Item Kind	content of soluble tar(%)	transparency (680 nm)	pH	density	hue's demarcation			smell
					L	a	b	
OBCL	0.674	0.151	4.00	1.012	55.57	33.37	-15.11	burn
BCL	0.015	0.036	2.32	1.008	99.83	-0.22	1.22	burn

OBCL : Original *Bambusae Caulis* in Liquamen. BCL : *Bambusae Caulis* in Liquamen. L : degree of light and shade. a : degree of red. b : degree of yellow

Table 2. Chemical constituents of *Bambusae Caulis* in Liquamen

No	RT (min)	Mw (g)	Compound	Area
1	0.658	32	Methanol	-
2	2.792	46	Ethanol	△
3	3.050	58	Propanol	△
4	3.692	60	Acetic acid	○
5	5.640	104	Propanoic acid	△
6	7.510	88	Hydroxy buthanone	-
7	8.550	96	Furanaldehyde	-
8	11.36	86	Furanone	-
9	15.14	94	Phenol	-
10	16.49	110	Cyclopentanone	-
11	17.50	108	o-Cresol	-
12	18.23	108	m,p-Cresol	-
13	18.46	124	Mepoxyphenol	-
14	21.65	122	Dimethylphenol	-
15	26.50	139	Nitrophenol	-

RT : Retention time. Mw : Molecular weight. * - : non detect, △ : trace, ○ : larger than 20,000 cps

(2) 죽력과 대나무 추출액 의 혼합물 (Mixture of *Bambusae Caulis* in Liquamen and Bamboo Extract, MLE)

MLE의 배합 비율은 1:100 (MLE100), 1:50 (MLE50), 1:20 (MLE20), 1:10 (MLE10), 1:5 (MLE5)로 각각 달리 하였다. 죽력의 정제 방법은 전통 황토 가마에 대나무를 넣어 900~1000 °C 이상 고온 가열하여 대나무 숲을 얻으면서 그 부산물로 대나무 추출액

을 얻어 3 년간 숙성시킨 죽력 원액 (Original *Bambusae Caulis* in Liquamen, OBCL, 진영상사 : 특허출원번호 제 98-400625 호)을 죽력 중량 대비 10% 활성탄 (200~250 mesh, Yakuri pure chemical Inc. Japan)으로 흡착시킨 후 자체 제작한 상압 증류장치를 이용하여 108 °C에서 상압 증류하여 유출되는 액 가운데 초기와 후기 증류액 각각 10%를 제거하고 중간의 80%만을 취하였다. 황토 가마에서 고온 추출 공법에 의하여 추출되었고 여과 정제된 정제 죽력의 물리 화학적 특성은 아래와 같았다 (Table 1, 2, Fig. 1). 정상 흰쥐 및 뇌허혈 흰쥐에게 투여되는 용량은 각각의 혼합물 1.0 ml/kg (i.p.)으로 하였다.

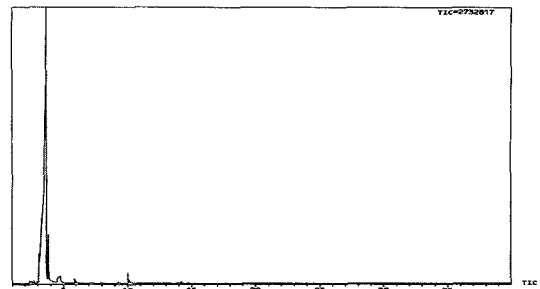


Fig. 1. The result of *Bambusae Caulis* in Liquamen by Gaschromatography

2. 방법

1) 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량 및 혈압에 미치는 변화 측정

(1) 국소 뇌혈류량 변화 측정

흰쥐를 stereotaxic frame (DKI, U.S.A.)에 고정시키고 정중선을 따라 두피를 절개하여 두정골을 노출시킨 후 bregma의 4~6 mm 측방, -2~1 mm 전방에 직경 5~6 mm의 두개창 수술을 시행하였다. 이때 두개골의 두께를 최대한 얇게 남겨 경막의 출혈을 방지토록 하였다. laser doppler flowmeter (Transonic Instrument, U.S.A.)용 needle probe (직경 0.8 mm)를 대뇌 (두정엽)피질 표면에 수직이 되도록 stereotaxic micromanipulator를 사용하여 뇌연막 동맥에 조심스럽게 근접시켰다. 일정시간 동안 안정시킨 후 실험 protocol에 따라 각각의 시료를 용량별로 투여한 다음 변화되는 국소 뇌혈류량을 용량별로 각각 30 분씩 측정하였다¹³⁾.

(2) 혈압 변화 측정

흰쥐를 urethane (750 mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후 체온이 37~38 °C로 유지될 수 있도록 heat pad 위에 복외위로 고정시켰다. 각각의 시료 투여 용량에 따른 혈압은 흰쥐의 대퇴동맥에 삽입된 polyethylene tube에 연결된 pressure transducer (Grass, U.S.A.)를 통하여 MacLab과 macintosh computer로 구성된 data acquisition system으로 용량별로 각각 30 분씩 측정하였다¹³⁾.

(3) 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량 및 혈압에 미치는 기전 관찰
죽력과 대나무 추출액을 혼합한 혼합물 (MLE)이 국소 뇌혈류량 및 혈압 변화에 미친 작용기전을 알아보기 위하여 prostaglandin의 생성효소인 cyclooxygenase 억제제 인도메타신 (1 mg/kg, i.p., Sigma I7378), 그리고 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)의 생성효소인 guanylate cyclase 억제제 메틸렌블루 (10 μg

/kg, i.p., Sigma M9140)를 전처치한 후 MLE를 혼합 비율별로 투여한 다음 변화되는 국소 뇌혈류량 및 혈압을 30 분씩 측정하였다¹⁴⁾.

2) 뇌허혈 흰쥐의 혈청내 사이토카인 생성능 측정

(1) 뇌허혈 흰쥐 유발

뇌허혈 흰쥐 유발은 Longa 등의 방법¹⁵⁾에 따라 중뇌대동맥 폐색법 (middle cerebral artery occlusion, MCAO)을 이용하였다. 정상 흰쥐의 총경동맥과 외경동맥을 결찰하고 내·외 경동맥의 분지점으로부터 내경 동맥내로 외경동맥을 통하여 3-0 단선조 나일론 봉합사를 삽입함으로써 MCA 기저부를 폐쇄하였다. 2 시간 후 내경 동맥내에 삽입되어 있는 단선조 나일론 봉합사를 중뇌대동맥 기저부로부터 제거해 줌으로써 혈액을 재관류시켰다.

(2) 채혈 및 혈청분리

뇌허혈 흰쥐를 유발시킨 후 MLE 5.0 ml/kg (i.p.)을 투여한 다음 폐색 1 시간 후와 재관류 1 시간 후에 뇌허혈 흰쥐의 대뇌동맥에서 1.0 ml를 채혈하였다. 채혈시에는 반드시 뇌혈류량의 변동이 변화되지 않도록 하기 위하여 조심스럽게 5.0 ml 주사기를 통해 채혈하였고, 만약 채혈시 뇌혈류역학 변동에 이상이 발생되면 사이토카인 생성능 측정 혈청으로 사용하지 않았다. 채혈 후 30 분 동안 실온에 방치한 후 3,000 rpm으로 30 분 동안 원심 분리시킨 후 혈청만을 취해 냉동 보관하면서 필요시마다 해동시켜 사용하였다.

(3) 인터루킨 (IL)-1 β 생성능 측정

뇌허혈 흰쥐의 혈청내에서 생성되는 IL-1 β 양 측정은 rIL-1 β ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 rIL-1 β standard diluent buffer (SDB) 100 μ l를 농도별로 넣은 후, 나머지 well에는 혈청 50 μ l와 SDB 50 μ l를 넣은 다음 실온에서 3 시간 동안 방치한 뒤 washing buffer (WB)로 4 회 세척하였다. 이후 각 well에 biotin-labeled anti-rIL-1 β 100 μ l를 넣은 후 실온에서 1 시간 동안 방치한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 각 well에 streptavidin-Peroxidase (HRP) 100 μ l를 넣은 다음 실온에서 30 분 동안 방치한 뒤 WB로 4 회 세척한 후 stabilized chromogen (SC) 100 μ l를 넣은 다음 빛을 차단시킨 실온에서 30 분 동안 방치하였다. 이후 stop solution (SS) 100 μ l를 넣은 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다^{16,17)}.

(4) Tumor necrosis factor (TNF)- α 생성능 측정

뇌허혈 흰쥐의 혈청내에서 생성되는 TNF- α 양 측정은 rTNF- α ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 rTNF- α SDB 50 μ l를 농도별로 넣은 다음, 나머지 well에 혈청과 control (high, low)을 각각 50 μ l씩 분주한 후 SDB 50 μ l를 넣었다. 이후 각 well에 biotin-labeled anti-rTNF- α 50 μ l를 넣고 실온에서 90 분 동안 incubation한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해놓은 HRP를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 다시 실온에서 45 분 동안 incubation한 후 WB로 4 회 세척하였다. 그 다음 SC를 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 SS를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다^{18,19)}.

(5) IL-10 생성능 측정

뇌허혈 흰쥐의 혈청내에서 생성되는 IL-10 양 측정은 rIL-10 ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 SDB 100 μ l씩 분주한

후 나머지 well에 혈청과 control (high, low)을 각각 50 μ l씩 분주한 다음 SDB 50 μ l를 넣었다. 이후 각 well에 biotin-labeled anti-rIL-10 50 μ l를 넣고 실온에서 2 시간 동안 incubation한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해놓은 HRP를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 다시 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 WB로 4 회 세척하였다. 그 다음 SC를 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 SS를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다^{20,21)}.

(6) Transforming growth factor (TGF)- β 생성능 측정

뇌허혈 흰쥐의 혈청내에서 생성되는 TGF- β 양 측정은 TGF- β 1 ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 SDB 200 μ l씩 분주한 후 나머지 well에 혈청과 control을 각각 200 μ l씩 넣은 다음 각 well에 biotin-labeled anti-TGF- β 1 50 μ l를 분주한 후 실온에서 3 시간 동안 incubation한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해놓은 HRP를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 다시 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 WB로 4 회 세척하였다. 그 다음 SC를 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 SS를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다^{22,23)}.

3. 통계처리

통계처리는 student's t-test에 의하였고, p-value는 0.05 미만인 경우에만 유의성을 인정하였다.

실험성적

1. 죽력과 대나무 추출액의 혼합물 (MLE) 투여로 변화된 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량 작용기전 관찰

MLE 투여로 변화된 국소 뇌혈류량의 작용기전을 알아보기 위하여 MLE 투여로 나타난 국소 뇌혈류량 변화를 대조군으로, 혈관 확장 인자중 cyclooxygenase의 억제제인 인도메타신을 전처치한 다음 MLE 투여로 변화된 국소 뇌혈류량을 인도메타신 처리군으로, 혈관 확장 인자중 guanylate cyclase의 억제제인 메틸렌블루를 전처치한 다음 MLE 투여로 변화된 국소 뇌혈류량을 메틸렌블루 처리군으로 하였다(Fig. 1). 인도메타신을 전처치한 후 MLE를 투여하지 않았을 때의 국소 뇌혈류량 기저치를 100.00 \pm 0.05%라 하였을 때, 인도메타신 전처치한 후 MLE를 혼합 비율별로 투여하였을 때의 국소 뇌혈류량은 각각 92.58 \pm 0.07%, 102.06 \pm 0.07%, 91.34 \pm 0.08%, 89.66 \pm 0.08%, 86.23 \pm 0.07%로 나타났으며, 대조군의 국소 뇌혈류량 변화보다 유의성 (P<0.05) 있게 감소되었다. 메틸렌블루를 전처치하고 MLE를 투여하지 않았을 때의 국소 뇌혈류량 기저치를 100.00 \pm 0.05%라 하였을 때, 메틸렌블루를 전처치한 후 MLE를 혼합 비율로 투여하였을 때의 국소 뇌혈류량은 각각 98.20 \pm 0.06%, 103.32 \pm 0.05%, 109.15 \pm 0.06%, 111.11 \pm 0.07%, 115.37 \pm 0.07%로 죽력의 혼합 농도에 의존해 증가되었으나 대조군의 국소 뇌혈류량 보다는 유의성 (P<0.05) 있게 감소되었다.

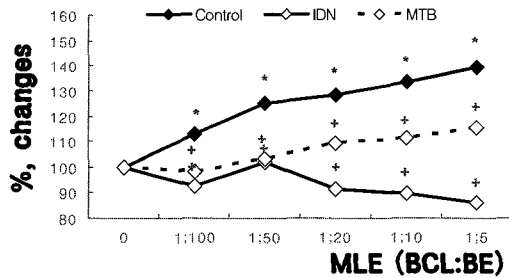


Fig. 1. Effects of pretreatments with IDN and MTB on the MLE-induced rCBF changes in normal rats. BE : Bamboo Extract extracted with distilled water at 98 °C for 3 hrs, BCL : Bambusae Caulis in Liquamen, MLE : Mixture of BCL and BE, IDN : indomethacin (1 mg/kg, i.p.), MTB : methylene blue (10 μg/kg, i.p.), Control : MLE treated group, 0 : After IDN or MTB treated but MLE non-treated, group-measured for 30 min, 1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5 : After IDN or MTB treated, MLC (1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5) injected (1.0 ml/kg, i.p.), group-measured for 30 min. rCBF : regional cerebral blood flow. The present data were expressed as mean±SE of 6 experiments. * : Statistically significant compared with 0 group (* : P<0.05). + : Statistically significant compared with Control group (+ : P<0.05).

2. 죽력과 대나무 추출액의 혼합물 (MLE) 투여로 변화된 정상 흰쥐의 혈압 작용기전 관찰

MLE 투여로 변화된 혈압의 작용기전을 알아보기 위하여 MLE 투여로 나타난 혈압 변화를 대조군으로, 인도메타신을 전처치한 다음 MLE 투여로 변화된 혈압을 인도메타신 처리군으로, 메틸렌블루를 전처치한 다음 MLE 투여로 변화된 혈압을 메틸렌블루 처리군으로 하였다(Fig. 2). 인도메타신을 전처치한 후 MLE를 투여하지 않았을 때의 혈압 기저치를 100.00±0.05%라 하였을 때, 인도메타신 전처치한 후 MLE 혼합 비율 1:100과 1:50을 투여하였을 때의 혈압은 각각 101.46±0.04%와 100.79±0.04%로 대조군의 혈압 변화보다 증가되었지만 혼합 비율이 증가될수록 혈압 변화는 각각 98.70±0.05%, 96.11±0.04%, 100.31±0.05%로 대조군보다 감소되었다. 메틸렌블루를 전처치하고 MLE를 투여하지 않았을 때의 혈압 기저치를 100.00±0.05%라 하였을 때, 메틸렌블루를 전처치한 후 MLE를 혼합 비율별로 투여하였을 때의 혈압은 각각 97.63±0.05%, 98.83±0.05%, 102.95±0.07%, 104.21±0.07%, 104.40±0.08%로 죽력 혼합 농도에 의존해 증가되었으나 대조군의 혈압보다는 유의성 (P<0.05) 있게 감소되었다.

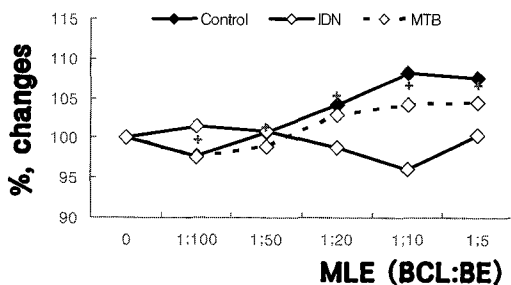


Fig. 2. Effects of pretreatments with IDN and MTB on the MLE-induced BP changes in normal rats. Other legends are the same as Fig. 1. BP : blood pressure. The present data were expressed as mean±SE of 6 experiments. + : Statistically significant compared with control group (+ : P<0.05).

3. 죽력과 대나무 추출액의 혼합물 (1:5 농도, MLE5)이 뇌허혈 흰쥐의 혈청에서 생성되는 사이토카인 양에 미치는 효과

1) 중뇌대동맥 폐색 (MCAO) 1 시간 후 생성되는 사이토카인 양에 미치는 효과

뇌허혈 흰쥐의 혈청에서 생성되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 중뇌대동맥 폐색으로 뇌허혈을 유발시킨 후 MLE5를 투여하고, 유발 1 시간 경과된 다음 뇌허혈 흰쥐의 혈청을 취하여 생성되는 사이토카인 양을 측정하였다(Fig. 3). 대조군의 혈청에서 생성되는 항염증 사이토카인중 IL-10의 양을 100.00±0.03%라 하였을 때 실험군의 IL-10 양은 108.82±0.08%로 대조군보다 증가되었고, 대조군의 혈청에서 생성되는 항염증 사이토카인중 TGF-β의 양을 100.00±0.05%라 하였을 때 실험군의 TGF-β 양은 118.14±0.02%로 대조군보다 유의성 (P<0.01) 있게 증가되었다. 대조군의 혈청에서 생성되는 염증 촉발 사이토카인중 IL-1β의 양을 100.00±0.04%라 하였을 때 실험군의 IL-1β 양은 89.52±0.02%로 대조군보다 유의성 (P<0.05) 있게 감소되었고, 대조군의 혈청에서 생성되는 염증 촉발 사이토카인중 TNF-α의 양을 100.00±0.11%라 하였을 때 실험군의 TNF-α 양은 97.79±0.07%로 대조군과 유사하게 나타났다.

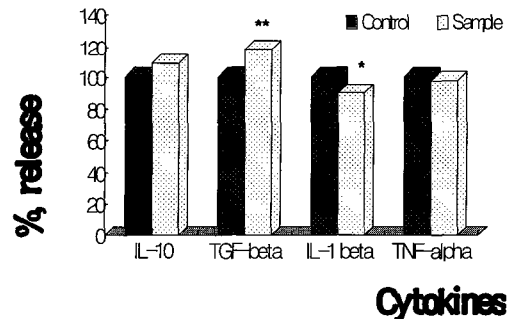


Fig. 3. Effects of MLE5 on the cytokines production in the serum of cerebral ischemic rats 1 hr after MCAO. MLE5 : Mixture of BCL and BE at the ratio of 1 to 5, MCAO : right middle cerebral artery occlusion, Control : MLE5 non-treated group, Sample : MLE5 1.0 ml/kg (i.p.) treated group. The present data were expressed as mean±SE of 6 experiments. * : Statistically significant compared with control group (* : P<0.05, ** : P<0.01).

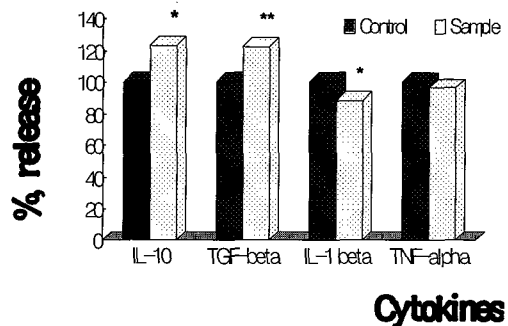


Fig. 4. Effects of MLE5 on the cytokines production in the serum of cerebral ischemic rats 1 hr after reperfusion. Other legends are the same as Fig. 3. The present data were expressed as mean±SE of 6 experiments. * : Statistically significant compared with control group (* : P<0.05, ** : P<0.01).

2) 재관류 1 시간 후 생성되는 사이토카인 양에 미치는 효과

뇌허혈 흰쥐의 혈청에서 생성되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 중뇌대동맥 폐색으로 뇌허혈을 유발시킨 후 MLE5를 투여하고, 재관류 1 시간이 경과된 다음 뇌허혈 흰쥐의 혈청을 취하여 생성되는 사이토카인 양을 측정하였다(Fig. 4). 대조군의 혈청에서 생성되는 항염증 사이토카인중 IL-10의 양을 100.00±0.04%라 하였을 때 실험군의 IL-10 양은 123.08±0.06%로 대조군보다 유의성 (P<0.05) 있게 증가되었고, 대조군의 혈청에서 생성되는 항염증 사

이토키인종 TGF- β 의 양을 $100.00 \pm 0.05\%$ 라 하였을 때 실험군의 TGF- β 양은 $122.51 \pm 0.03\%$ 로 대조군보다 유의성 ($P < 0.01$) 있게 증가되었다. 대조군의 혈청에서 생성되는 염증 촉발 사이토카인종 IL-1 β 의 양을 $100.00 \pm 0.03\%$ 라 하였을 때 실험군의 IL-1 β 양은 $88.63 \pm 0.03\%$ 로 대조군보다 유의성 ($P < 0.05$) 있게 감소되었고, 대조군의 혈청에서 생성되는 염증 촉발 사이토카인종 TNF- α 의 양을 $100.00 \pm 0.11\%$ 라 하였을 때 실험군의 TNF- α 양은 $96.40 \pm 0.03\%$ 로 대조군보다 감소되었다.

고 찰

대나무를 이용한 한약제^{24,25)} 중 죽력 (Bambusae Caulis in Liquamen)은 솜대의 莖을 불에 구워서 빼낸 液汁으로 性味는 寒·無毒하고 甘하며, 淸熱刮痰 및 鎮痙通竅의 효능을 갖고 있어 痰熱이 淸竅를 막아 발생하는 中風不語, 혼미 등의 風痙과 驚癇, 驚厥, 肢體麻木 등에 활용된다.

대나무를 이용한 연구들을 살펴보면 김 등¹²⁾은 대나무 잎을 이용해 생리활성 및 항균성과 지방 대사 작용에 대하여, 정 등³⁾은 대나무 수액의 성분 조성에 대하여, 임 등⁴⁾은 대나무 에탄올 추출물에 대한 항산화 효과에 대하여 보고하였고, 죽력을 이용한 연구들을 살펴보면 김 등⁵⁾은 적출 심장에 미치는 효과를, 최 등⁶⁾은 고지방식으로 유발된 비만 흰쥐의 지질 대사에 미치는 효과를, 장 등⁷⁾은 죽력 및 죽력과 오가피를 배합한 혼합물이 혈당강화에 미치는 효과를, 류 등⁹⁾은 MCAO로 인한 뇌허혈 병태모델에 미치는 죽력과 생강즙의 항허혈 효과에 대하여 보고하였고, 본 저자들도 죽력과 대나무 추출액의 혼합물을 다양하게 혼합하여 뇌혈류 및 혈압에 미치는 영향과 뇌허혈 흰쥐에 미치는 뇌혈류 변동 개선에 관해 보고¹⁰⁾하였다.

이에 저자들은 죽력의 맛과 향, 불순물 및 산도 등이 높아 원액 그대로 복용하기 어려운 불편함이 있고, 생산 원가도 높고 고부가가치 창출을 위한 응용이 편리한 기능성 음료로의 개발 가능성을 확인하고자 죽력의 원료이면서 수공예품 생산에만 의존하고 있는 대나무에서 추출한 추출액과 혼합하여 죽력 연구의 일환으로 뇌혈류량 및 혈압에 미친 작용 기전을 알아보고자 하였다.

혈관확장에 관여하는 인자로는 혈류 변화와 혈관내피세포에서 유리되는 prostaglandin 및 nitric oxide (NO) 등이 있다^{15,27)}. NO 중 constitutive NO는 주위의 혈소관에 작용하여 혈소관내 세포전령 분자물질인 cGMP 양을 증가시키는 동시에 그의 생성 효소로서 혈관을 이완시키는 guanylate cyclase도 활성화시킨다^{28,30)}. Prostaglandin은 renin-angiotensin계에 작용하는 약물로 혈관을 이완시키는 작용과 함께 혈압을 강하시키는 작용을 한다¹⁵⁾. 이러한 혈관확장에 관여하는 인자들을 억제할 수 있는 약물로는 여러 가지가 있지만 그 중에서도 메틸렌블루³¹⁾는 cGMP의 생성 효소인 guanylate cyclase를 억제하는 약물이고, 인도메타신³²⁾은 prostaglandin의 생성 효소인 cyclooxygenase를 억제하는 약물이다.

뇌혈관을 확장시킴으로써 뇌혈류량을 증가시킨 것으로 생각되는 혼합물의 작용기전을 확인하고자 이미 보고¹¹⁾바와 같이 혼합물 투여로 변화된 국소 뇌혈류량과 혈압을 대조군으로 하였다. 인도메타신을 전처치한 후 혼합물을 투여함으로써 나타난 국소 뇌혈류량 변화를 인도메타신 처리군으로, 메틸렌블루를 전처치

한 후 혼합물을 투여하여 나타난 국소 뇌혈류량 변화를 메틸렌블루 처리군으로 한 결과, 인도메타신 처리군은 혼합 비율에 의존해 오히려 감소되었고, 대조군에 비해서도 유의성 ($P < 0.05$) 있게 감소되었다. 그러나 메틸렌블루 처리군은 혼합 비율에 의존해 증가되었지만 대조군보다는 유의성 ($P < 0.05$) 있게 감소되었다. 혼합물 투여로 증가된 혈압 변화를 대조군으로 하고, 인도메타신을 전처치한 후 혼합물을 투여함으로써 나타난 혈압 변화를 인도메타신 처리군으로, 메틸렌블루를 전처치한 후 혼합물을 투여하여 나타난 혈압 변화를 메틸렌블루 처리군으로 하였다. 그 결과 인도메타신 처리군은 저농도 혼합 비율 투여시에는 대조군보다 증가되는 경향을 보이다가 고농도 혼합 비율 투여시에는 대조군보다 감소되는 경향을 보였지만 유의성은 인정되지 않았고, 메틸렌블루 처리군은 혼합 비율에 의존해 증가되는 경향을 나타내었지만 대조군에 비해서는 유의성 ($P < 0.05$) 있게 감소되었다.

위와 같은 결과들은 Bakalova³³⁾ 등³⁴⁾이 인도메타신 처리로 국소 뇌혈류량이 감소되는 것은 cyclooxygenase와 관련이 있다고, Shin 등^{35,37)}이 메틸렌블루 전처치로 국소 뇌혈류량이 감소되는 것은 cGMP의 생성 효소인 guanylate cyclase와 관련이 있다고 보고한 것들에 미루어서 볼 때, 혼합물의 작용기전은 국소 뇌혈류량 측면에서 볼 때 cyclooxygenase 및 guanylate cyclase와 모두 관련이 있는 것처럼 보이지만 혈압과 관련지어 종합적으로 살펴보게 되면 인도메타신 처리군의 혈압이 대조군보다 증가되었음은 물론 유의성도 인정되지 않아 혼합물의 작용기전은 cyclooxygenase보다는 guanylate cyclase와 더욱 밀접한 것으로 판단된다.

최근 보고에 의하면 허혈성 뇌손상은 허혈 당시보다는 허혈이 일어난 조직으로 산소가 재공급될 때 주로 일어나고³⁸⁾, 뇌허혈에 의해 ATP가 저하되면 ATP 의존성 Na⁺-K⁺ 수송계 억제, 세포내 Na⁺ 축적, Na⁺-Ca²⁺ antiport의 역전 및 내형질 세포로부터 세포질로의 칼슘 유리 등이 나타남으로써 허혈성 세포손상이 나타난다^{39,40)} 하였다. 또한 뇌허혈이 일어나면 혈액중의 다형 백혈구 등에 의해 염증 반응이 진행됨으로써 허혈성 뇌조직 손상이 나타나게 되는데^{41,42)}, 이 때 생물학적 작용을 조절하기 위하여 각종의 사이토카인들이 작용하게 된다^{43,44)}. 염증에 관여하는 사이토카인으로는 대식 세포 및 내피 세포로부터 유리되는 IL-1 β 와 출혈성 괴사 등에 관여하는 TNF- α 가 있고, 염증 촉발 사이토카인을 억제하는 항염증 사이토카인으로는 IL-1 β 와 TNF- α 를 생성하는 대식세포의 생성을 억제하는 IL-10과 혈소관 및 내피세포 등에서 생산되는 TGF- β 등이 있다^{44,46)}.

Guanylate cyclase와 관련되어 뇌혈관의 직경을 확장시킴으로써 뇌혈류량을 증가시킨 것으로 생각되어지는 죽력과 대나무 추출액을 1:5로 혼합한 혼합물 (MLE5)을 중뇌대동맥 폐색으로 유발된 뇌허혈 흰쥐에 투여한 후 뇌허혈 흰쥐의 혈청에서 생성되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 중뇌대동맥 폐색으로 뇌허혈을 유발시킨 후 MLE5를 투여하였다. 유발 1 시간이 경과된 다음 뇌허혈 흰쥐의 혈청을 취하여 생성되는 사이토카인 양을 측정된 결과, 중뇌대동맥 폐색 유발 1 시간 후 항염증 사이토카인인 IL-10의 양은 대조군보다 증가되었고, TGF- β 의 양은 대조군보다 유의성 ($P < 0.01$) 있게 증가되었으며, 염증 촉발 사이토카인인 IL-1 β 의 양은 대조군보다 유의성 ($P < 0.05$) 있게 감소되었지만 TNF- α 의 양은 대조군과 유사하게 나타났다.

폐색된 부위를 재관류시킨 1 시간 후의 항염증 사이토카인인 IL-10과 TGF-β의 양은 대조군보다 유의성 (P<0.05, P<0.01) 있게 증가되었고, 염증 촉발 사이토카인인 IL-1β의 양은 대조군보다 유의성 (P<0.05) 있게 감소되었지만 TNF-α의 양은 대조군보다 약간 감소되는 경향을 나타내었다.

위의 사이토카인 생성과 관련된 결과와 함께 IL-10과 TGF-β가 뇌허혈시 재관류로 인해 나타나는 뇌손상을 감소시킨다는 Dadii 등의 보고⁴⁶⁾, 뇌허혈시 IL-1β와 TNF-α가 상승된다는 Hayashi 등의 보고^{47,48)}에 근거하여 볼 때 MLC5는 IL-10과 TGF-β의 생성을 촉진시킴으로써 IL-1β의 생성을 억제시켜 항허혈 작용을 나타낸 것으로 생각된다.

이상의 결과, cGMP가 IL-10과 관련되고⁴⁹⁾, cGMP의 억제제가 TGF-β의 양을 억제하며⁵⁰⁾, cGMP가 IL-1β, TNF-α 및 산소자유기를 억제하기⁵¹⁾ 때문에 이를 종합해 살펴보면 죽력에 증류수로 추출한 대나무 추출액 C를 1:5로 혼합한 혼합물이 정상 흰쥐 및 뇌허혈 흰쥐에서 뇌혈관의 직경을 확장시킴으로써 뇌혈류량을 유의하게 변화시켰고, 그 작용기전으로는 guanylate cyclase와 관련되어 있으며, 또한 항염증 사이토카인의 생성을 촉진시킴으로써 IL-1β의 염증 촉발 사이토카인 생성을 억제해 항허혈 작용을 한 것으로 생각된다.

결 론

죽력과 대나무 추출액을 혼합한 혼합물이 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량 및 혈압에 미치는 작용기전을 관찰하고, 중뇌동맥 폐색으로 유발된 뇌허혈 흰쥐의 혈청내 항염증 사이토카인과 염증 촉발 사이토카인의 생성을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

정상 흰쥐에 인도메타신을 전처치한 후 MLE를 투여한 결과, 국소 뇌혈류량은 혼합 비율에 의존해 대조군보다 유의성 있게 감소되었지만 평균혈압은 저농도 혼합 비율 투여시 대조군보다 증가되었다. 메틸렌블루를 전처치한 후 MLE를 투여한 결과, 혼합 비율에 의존적으로 국소 뇌혈류량과 혈압이 모두 대조군보다 유의성 있게 감소되었다. 뇌허혈 흰쥐에 MLE5를 투여한 결과, 중뇌동맥 폐색 1 시간 후의 혈청내 TGF-β 양은 유의성 있게 증가되었고, IL-10 양도 증가되었으며, TNF-α 양은 유의성 있게 감소되었다. 재관류 1 시간 후에는 혈청내 IL-10과 TGF-β 양은 유의성 있게 증가되었고, TNF-α 양은 유의성 있게 감소되었다.

이상의 결과, 혼합물은 guanylate cyclase에 관련되어 뇌혈류량을 유의하게 증가시켰고, 혼합 농도중 죽력과 대나무 추출액을 1:5로 혼합한 MLE5가 뇌허혈 흰쥐의 항염증 사이토카인의 생성을 촉진하는 한편 염증 촉발 사이토카인의 생성을 억제해 항허혈 효과가 있는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 김미정, 변명우, 장명숙. 대나무(신의대) 잎의 생리활성 및 항균성 효과. 한국식품영양과학회지 25(1):135-143, 1996.
2. 신미경, 한성희. 대나무(이대) 잎 추출물이 지방 및 고콜레스테롤 식이 급여에 의한 흰쥐의 지방 대사에 미치는 효과. 한

- 국식생활문화학회지 17(1):30-37, 2002.
3. 정미자, 조종수, 김행자. 고로쇠 및 대나무 수액간장의 성분 조성. 한국식품영양학회지 14(2):167-175, 2001.
4. 임진아, 나영순, 백승화. 대나무 에탄올 추출물의 항산화 효과 및 아질산염 소거작용. 한국식품과학회지 36(2):306-311, 2004.
5. 김상수, 고창남, 조기호, 배형섭, 이경섭. 죽력이 흰쥐의 적출 심장에 미치는 영향. 경희의학 14(1):89-104, 1998.
6. 최현숙, 하진옥, 추명희, 나명순, 이명렬. 죽력이 고지방식을 급여한 흰쥐의 체내 지질대사에 미치는 영향. 한국식품저장유통학회지 11(3):373-383, 2004.
7. 정기상, 최찬현, 장경선. 죽력이 db/db 마우스의 혈당강화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 17(1):177-182, 2003.
8. 장경선, 정기상, 최찬현, 오영준. 오가피와 죽력 배합약물이 Streptozotocin으로 유발된 당뇨 생쥐에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 17(3):742-745, 2003.
9. 류주열, 김영균, 권정남. 죽력과 생강즙이 중뇌동맥 폐색에 의한 뇌허혈 손상에 미치는 영향. 대한한의학회지 23(3):134-144, 2002.
10. 나영설, 윤상현, 민병일. 최근 뇌졸중에 대한 역학적 고찰. 경희의학 7:280-286, 1991.
11. 김천중, 정현우, 장경선, 조수인, 김계엽. 대나무 추출액과 죽력의 혼합물이 국소 뇌혈류량 및 평균 혈압에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 20(3):575-580, 2006.
12. 김탁구, 조숙현, 이상대, 류재산, 심기환. 대나무 추출물의 기능성 및 항균성. 농산물저장유통학회지 8(4):475-480, 2001.
13. Chen, S.T., Hsu, C.Y., Hogan, E.L., Maricque, H., Balentine, J.D. A model of focal ischemic stroke in the rat ; reproducible extension cortical infarction. Stroke 17:738-743, 1986.
14. 김경환. 이우주의 약리학 강의(제4판). 서울, 의학문화사, pp 82, 120-124, 146, 355, 397, 404, 432-442, 1998.
15. Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 20(1):84-91, 1989.
16. Trembaly, L.F., Valenza, S.P., Ribelro, J.Li. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model. J. Clin. Invest 99(5):944-952, 1999.
17. Wang, C.X., Olschowka, J.A., Wrathall, J.R. Increase of interleukin-1beta mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat. Brain Res. 759(2):190-196, 1997.
18. Stepaniak, J.A., Gould, K.E, Sun, D., Swanborg, R.H. A comparative study of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis and DA rats. J. Immunol. 155: 2762-2769, 1995.
19. Rivera, D.L., Ollister, S.M., Liu, X., Thompson, J.H., Zhang, X.J., Pennline, K., Azuero, R., Clark, D.A., Miller, M.J. Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise. FASEB J. 12(2):189-197, 1998.

20. Okura, Y., Takeda, K., Honda, S., Hanawa, H., Watanabe, H., Kodama, M., Izumi, T., Aizawa, Y., Seki, S., Abo, T. Recombinant murine interleukin-12 facilitates induction of cardiac myosin-specific type 1 helper T cells in rats. *Circ Res.* 82(10):1035-1042, 1998.
21. Lobell, A., Weissert, R., Storch, M.K., Svanholm, C., de Graaf, K.L., Lassmann, H., Andersson, R., Olsson, T., Wigzell, H. Vaccination with DNA encoding an immunodominant myelin basic protein peptide targeted to Fc of immunoglobulin G suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 187(9):1543-1548, 1998.
22. Kim, S.J., Romeo, D., Yoo, Y.D., Park, K. Transforming growth factor-beta ; expression in normal and pathological conditions. *Horm. Res.* 42(1-2):5-8, 1994.
23. Kloen, P., Gebhardt, M.C., Perez-Atayde, A., Rosenberg, A.E., Springfield, D.S., Gold, L.I., Mankin, H.J. Expression of transforming growth factor-beta(TGF-beta) isoforms in osteosarcomas ; TGF-beta3 is related to disease progression. *Cancer* 80(12):2230-2239, 1997.
24. 馬繼興 主編. 神農本草經輯注. 北京, 人民衛生出版社, pp 260-261, 1995.
25. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編. 本草學. 서울, 永林社, pp 166-167, 466-468, 1999.
26. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, p 740, 1994.
27. 성호경. 생리학(제6판). 서울, 의학문회사, p 110, 1996.
28. Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the Brain. *Nature* 336:385-388, 1988.
29. Palmer, P.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biology activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526, 1990.
30. Shibuki, K., Okada, D. Endogenous nitric oxide release required for long term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349:326-328, 1991.
31. Iwamoto, J., Yoshinaga, M., Yang, S.P., Krasney, E., Krasney, J. Methylene blue inhibits hypoxic cerebral vasodilation in awake sheep. *J. Appl Physiol* 73(6):2226-2232, 1992.
32. Wang, Q., Pelligrino, D.A., Paulson, O.B., Lassen, N.A. Comparison of the effects of NG-nitro-L-arginine and indomethacin on the hypercapnic cerebral blood flow increase in rats. *Brain Res.* 641(2):257-264, 1994.
33. Bakalova, R., Matsuura, T., Kanno, I. The cyclooxygenase inhibitors indomethacin and Rofecoxib reduced regional cerebral blood flow evoked by somatosensory stimulation in rats. *Exp. Biol. Med.* 227(7):465-473, 2002.
34. Okamoto, H., Ito, O., Roman, R.J., Hudetz, A.G. Role of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 endotoxin-induced cerebral hyperemia. *Stroke* 29(6): 1209-1218, 1998.
35. Shin, H.K., Shin, Y.W., Hong, K.W. Role of adenosine A(2B) receptors in vasodilation of rat pial artery and cerebral blood flow autoregulation. *Am J. Physiol Heart Circ Physiol.* 278(2):339-344, 2000.
36. Yamamoto, S., Nishizawa, S., Yokoyama, T., Ryu, H., Uemura, K. Subarachnoid hemorrhage impairs cerebral blood flow response to nitric oxide but not to cyclic GMP in large cerebral arteries. *Brain Res.* 757(1):1-9, 1997.
37. Iadecola, C., Zhang, F., Xu, X. SIN-1 reverses attenuation of hypercapnic cerebrovasodilation by nitric oxide synthase inhibitors. *Am J. Physiol.* 267(1Pt 2):228-235, 1994.
38. McCord, J.M. Mechanisms of disease : oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J. Med.* 312:159-163, 1985.
39. Cheung, J.Y., Bonventre, J.V., Malis, C.D., Leaf, A. Mechanisms of disease ; calcium and ischemic injury. *New Eng J. Med.* 26:1670-1676, 1986.
40. Weisfeldt, M.L. Reperfusion and Reperfusion injury. *Clin Res.* 35:13-20, 1987.
41. Hallenbeck, J.M., Dutka, A.J., Tanishima, T., Kochanek, P.M., Kumaroo, K.K., Thompson, C.B., Obrenovich, T.P., Contreras, T.J. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain region with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 17:246-253, 1986.
42. Garcia, J.H., Liu, K.F., Yoshida, Y., Lian, J., Chen, S., del Zoppo, G.J. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct(Wistar rat). *Am J. Pathol.* 144: 188-199, 1994.
43. Vila, N., Castillo, J., Davalos, A., Esteve, A., Planas, A.M., Chamorro, A. Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke* 34(3):671-675, 2003.
44. 하대유 외 25인. 번역학 pp 100-105, 1994.
45. 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사, pp 87-99, 1994.
46. Daddi, N., Suda, T., D'Ovidio, F., Kanaan, S.A., Tagawa, T., Grapperhaus, K., Kozower, B.D., Ritter, J.H., Yew, N.S., Mohanakumar, T., Patterson, G.A. Recipient intramuscular cotransfection of naked plasmid transforming growth factor beta1 and interleukin 10 ameliorates lung graft ischemia-reperfusion injury. *J. Thorac Cardiovasc Surg.* 124(2):259-269, 2002.
47. Hayashi, Y., Jikihara, I., Yagi, T., Fukumura, M., Ohashi, Y., Ohta, Y., Takagi, H., Maeda, M. Immunohistochemical investigation of caspase-1 and effect of caspase-1 inhibitor in delayed neuronal death after transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 2;893(1-2):113-120, 2001.
48. Cain, B.S., Meldrum, D.R., Dinarello, C.A., Meng, X., Joo, K.S., Banerjee, A., Harken, A.H. Tumor necrosis factor-alpha

- and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med.* 27(7):1309-1318, 1999.
49. Lei, Y., Zhen, J., Ming, X.L., Jian, H.K. Induction of higher expression of IL-beta and TNF-alpha, lower expression of IL-10 and cyclic guanosine monophosphate by pulmonary arterial hypertension following cardiopulmonary bypass. *Asian J. Surg.* 25(3):203-208, 2002.
50. Lagente, V., Naline, E., Guenon, I., Corbel, M., Boichot, E., Burgaud, J.L., Del Soldato, P., Advenier, C. A nitric oxide-releasing salbutamol, elicits potent relaxant and anti-inflammatory activities. *J. Pharmacol Exp Ther.* 14(Epub ahead of print), 2004.
51. Schubert, P., Morino, T., Miyazaki, H., Ogata, T., Nakamura, Y., Marchini, C., Ferroni, S. Cascading glia reactions ; a common pathomechanism and its differentiated control by cyclic nucleotide signaling. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 903:24-33, 2000.