大韓本草學會誌 제25권 제2호(2010년 6월)
Kor. J. Herbology 2010 ; 25(2) : 71-79

허혈성뇌졸중 흰쥐모델에서 加味補陽還五湯와 주요 구성약재인 黃芪, 丹蔘의 뇌신경보호효과에 대한 연구

손혜영[1], 박용기[1,2*]

1 : 동국대학교 한방신약개발센터, 2 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실

Neuroprotective effect of modified Boyanghwano-Tang and the major medicinal plants, Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix on ischemic stroke in rats

Hye-Young Son[1], Yong-Ki Park[1,2*]

1 : Oriental Medicine R&D Center, 2 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, South Korea.

ABSTRACT

Objectives : In this study, the neuroprotective effects of modified Boyanghwano-Tang (mBHT) and the major medicinal plants, Astragali Radix(AR) and Salviae Miltiorrhizae Radix(SMR) were investigated in transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO)-induced ischemic stroke of rats.
Methods : mBHT(400 ㎎/㎏) and AR(154 ㎎/㎏) or SMR(62 ㎎/㎏) water extract orally injected in rats after 90 min occlusion of MCA and then allow reperfusion to 24 h. Brain infarction was measured by TTC staining and the expressions of NOS isoforms and apoptotic molecules were determined in ischemic brain by Western blot.
Results : The results showed that mBHT has stronger neuropreotective property through inhibitions of the PARP cleaved and caspase-3 activation in ischemic rats, and could reduced infarction volumes comparison of those of AR or SMR, respectively. While, AR extract has an angiogenic property through increasing the expressions of eNOS and VEGF, and SMR extract has a strong anti-inflammatory effects through inhibition of iNOS expression in ischemic brains.
Conclusions : These results suggest that mBHT has multifactorial therapeutic advantages through anti-apoptosis, anti-inflammation and angiogenesis for ischemic stroke based on a synergistic combination of ingradients rather than monotherapy.

Key words : Boyanghwano-tang, Astragali Radix, Salviae Miltiorrhizae Radix, ischemic stroke, tMCAO, neuroprotection

서 론

뇌졸중은 뇌에 혈액을 공급하는 혈관이 막히거나 터짐으로써 그 부분의 뇌가 손상되어 나타나는 신경학적 증상을 의미하는 뇌혈관질환으로서 사망원인 중 단일 질환으로는 1위의 질환이다[1)]. 뇌졸중에는 뇌혈관이 좁아지거나 막혀서 산소와 영양분을 공급받을 수 없게 되어 손상을 받는 뇌허혈과 뇌혈관 파열로 뇌조직 내부

*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실
· E-mail : yongki@dongguk.ac.kr · Tel : 054-770-2835
· 접수 : 2010년 4월 22일 · 수정 : 2010년 6월 15일 · 채택 : 2010년 6월 22일

에 혈액이 고이면서 주위의 뇌조직을 압박하여 신경손상을 일으키는 뇌출혈이 있으며, 우리나라의 경우 약 80% 가량의 뇌졸중 환자가 허혈성 뇌졸중에 속한다[2]. 뇌졸중은 손상 받은 부위에 따라 다르나 반신마비, 감각장애, 언어장애, 발음장애, 의식장애, 두통, 어지럼증, 치매 등의 증상을 나타내게 되어 근본적인 병인의 이해, 예방 및 치료기술개발이 요구된다[3].

Nitric Oxide(NO)는 여러 조직에서 다양한 생리과정에 참여하여 대사적 변화를 유도하는 물질로서 대식세포의 종양파괴 및 살균작용에 참여하고 신경계에서는 화학적 신호전달물질로서, 혈관계에서는 혈압조절, 혈소판의 응집 및 호중성구의 집합작용과 내피유도이완 인자 활동에 영향을 주는 등 다양한 역할을 한다[4]. 허혈성 뇌졸중에서 뇌혈관세포의 칼슘이온(Ca^{2+})의 농도가 높아짐에 따라 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로 부터 산화질소가 다량 합성되는데 이러한 산화질소는 NOS isoform의 종류에 따라 신경보호 또는 독성작용을 하게 된다[5,6]. NOS는 constitutive NOS(cNOS)와 inducible NOS(iNOS)로 분류되는데 cNOS는 endothelial NOS(eNOS)와 neuronal NOS(nNOS)가 있다. cNOS는 칼슘에 의해 활성화됨으로써 소량의 NO를 일정하게 생성하는 반면, iNOS는 간세포, 혈관평활근세포, 섬유아세포, 대식세포 등에서 면역자극이나 염증자극에 의해 합성되고 다량의 NO를 생성함으로써 독성작용을 하게 된다[3,7]. 또한 nNOS로부터 생성되는 NO도 초기 신경손상을 유발하는데 중요한 역할을 하게 되는 반면[8,9], eNOS로부터 생성되는 NO는 대뇌혈류를 유지시키고, 혈소판응집과 백혈구 유착을 막으며, 염증반응억제 및 혈관확장작용을 통하여 뇌허혈로 인한 신경손상을 완화시키는 것으로 알려져 있다[10].

뇌에 허혈상태가 유발되면 뇌혈관세포 내 산소 분압이 떨어져 저산소증 상태가 되는데 이를 극복하기 위하여 혈관신생작용이 일어나게 된다[11,12]. 혈관신생에 중요한 vascular endothelial cell growth factor(VEGF)는 성체에서의 혈관 생성과 배아발생에서의 혈관발달을 조절하는 중요한 인자로서 혈관신생과 혈관 투과성조절을 통해 세포사멸로부터 혈관세포를 보호하게 된다[11]. 최근에는 VEGF/VEGFR이 혈관조절을 통해 암의 전이나 감염, 신경보호, 나아가 기억과 학습능력에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있어 그 기능을 증가시키거나 조절하는 약물개발에 대한 연구도 이루어지고 있다[12,13].

補陽還五湯(Boyanghwano-tang; BHT)은 청대 王淸任의 醫林改錯에 처음 수록된 한방처방으로 주로 氣虛血瘀로 인한 중풍의 치료에 활용되어 왔으며, 허혈성 뇌혈관질환, 동맥경화, 심근경색, 협심증, 다발성 신경염, 혈전성 정맥염 등의 치료에 사용되어 오고 있다[14]. 최근 補陽還五湯은 뇌혈전 생성억제, 혈중 지질 개선효과, 국소 뇌혈류량 증가에 따른 혈압강하, 학습과 기억력 증가 및 치매 억제효과, 가역성 전뇌허혈로 인한 신경세포사멸 억제효과 등 다양한 효과가 보고되고 있다[16-20]. 본 연구에서는 보양환오탕에 瘀血을 순환시키는 한약재인 丹參, 牛膝, 桂枝와 뇌신경을 보호하는 遠志, 石菖蒲를 추가하여 加味補陽還五湯(modifed Boyanghwano-tang; mBHT)을 제조하고, 구성 약재 중 가장 배합비가 높은 黃芪와 加味한 구성약재 중에 가장 배합비가 높은 丹蔘의 뇌경색 억제 및 뇌신경보호효과를 비교하였다. 즉, 일시적 허혈-재관류(tMCAO)로 허혈성 뇌졸중이 유발된 흰쥐의 뇌조직에서 허혈손상에 따르는 NOS isoforms의 발현 변화와 혈관혈관신생인자들 및 세포사멸 유도인자들의 변화에 대한 조절효과를 조사하였다.

방 법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 가미보양환오탕(mBHT) 처방(Table 1)의 구성약재는 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입하여 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선한 후 사용하였다.

韓藥名	生藥名	配合比
黃芪	Astragali Radix	10
當歸尾	Angelicae gigantis Radix	2
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	1.5
川芎	Cnidii Rhizoma	1
蚯蚓	Lunbricus	1
桃仁	Percicae Semen	1
紅花	Cartgami Flos	1
牛膝	Achyranthis Bidentatae Radix	1.5
丹蔘	Salviae Miltiorrhizae Radix	4
桂枝	Cinnamomi Ramulus	1
遠志	Polygalae Radix	1
石菖蒲	Acori Graminei Rhizoma	1

Table 1. Prescription contents of modified BoyangHwano-Tang(mBHT)

2) 동물

중대뇌동맥 폐색에 의한 국소적 뇌허혈 흰쥐모델(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAo rat model)에 사용된 동물은 7-8 주령으로 체중 260~280 g되는 수컷 Sprague-Dawley(SD)계 흰쥐를 코아텍(경기도, 한국)로부터 구입하여 사용하였다. 실험기간 동안 일반 고형사료(삼양사료주식회사)와 물을 충분히 공급하였으며 실내온도 22±2℃, 습도는 55±5%, 명암은 12시간(Day light 06:00~18:00)을 주기로 실험종료 시까지 일정한 사육조건을 유지시켰다. 생쥐의 관리, 사용 및 취급은 미국 NIH 기준과 대한의학회 제정 동물실험지침(2000년)에 준하여 시행하였다.

2. 방법

1) 가미보양환오탕, 황기 및 단삼 추출물의 제조

가미보양환오탕은 각 약재를 일정 처방 비율대로 정량하여(50 ㎏) 세말한 다음, 물 1000 L를 용매로 하여 98℃에서 3시간 동안 추출하여 연조엑스를 제조하였다. 이를 다시 700 mmHg, 55℃에서 15시간 감압건조하여 건조엑스(JP05)를 제조하였다(yield, 34.8%).

한편, 황기와 단삼은 각각 200 g을 세말한 다음, 물 2L를 용매로 하여 가미보양환오탕과 같은 방법으로 추출하여 황기(yield, 5.74%), 단삼(yield, 46.07%) 각각의 건조엑스를 제조하였다.

2) 국소적 뇌허혈 흰쥐모델 제작

흰쥐를 80% 니트로스 산화물(N_2O)과 20% 산소(O_2)가 혼합한 1.5-5% isoflurane으로 흡입하여 마취시킨 후 보온패드와 보온램프를 사용하여 체온을 약 37±0.5℃로 유지하면서 중대뇌동맥을 폐색하였다. 즉, 마취 하에서 목의 정중선을 따라 경부를 절개하고 미주신경에 손상을 주지 않도록 주의하면서 우측 총경동맥, 내경동맥, 외경동맥을 분리한 다음, 총경동맥과 외경동맥을 결찰하고 내외경동맥의 분지점으로부터 내경동맥 내로 probe를 삽입하고 그 바로 위쪽을 결찰하였다. Probe는 4-0 nylon surgical thread의 한쪽 끝을 열에 의해 구형으로 만든 다음, 30mm 길이로 절단 하여 사용하였다. 90분간 결찰(occlusion)한 후 probe를 제거하여 24시간 동안 재관류(reperfusion) 시켰다.

3) 약물처리

실험동물을 대조군과 실험군으로 나누고, 실험군은 다시 가미보양환오탕 투여군(mBHT; 400 ㎎/㎏)과 그것의 배합비에 준하는 용량으로 황기 추출물(AR; 154 ㎎/㎏) 및 단삼 추출물(SMR; 62 ㎎/㎏) 투여군으로 나누었다. 대조군은 생리식염수를 투여하였으며, 실험군은 생리식염수 1 ml에 각 약물을 일정 농도로 완전히 녹여 폐색 즉시 복강 투여하였다.

4) 허혈성 뇌손상 부위의 면적 및 용적의 측정

중대뇌동맥 폐색 24시간 경과 후 흰쥐를 1.5% isoflurane으로 흡입마취 시킨 다음 신속하게 뇌를 적출하고, 뇌 주형틀을 이용하여 전두극(frontal pole)에서 1 ㎜ 되는 지점부터 2 ㎜ 두께로 잘라 6개의 뇌 관측 절편을 만든 다음, 0.9% 생리식염수로 제조한 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 용액으로 37℃에서 10분간 염색하였다. TTC 용액으로 붉게 염색된 뇌 절편을 4% paraformaldehyde 용액으로 고정시킨 후 각 절편의 뒤편 영상을 카메라로 촬영하여 허혈이 일어난 반구의 총 면적에서 TTC 염색이 되지 않은 경색부위를 백분율(%)로 계산하였다.

5) Western blot

중대뇌동맥 폐색 24시간 경과 후 흰쥐를 1.5% isoflurane으로 흡입마취 시킨 다음 신속하게 뇌를 적출하고 허혈이 일어난 반구조직 총 부피의 5배 용량의 M-PER protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)로 Telfon-glass 균질화기를 이용하여 균질화한 후 14,000 rpm, 4℃에서 20분간 원심 분리하여 나온 상층액을 단백질 분석에 사용하였다. 분리된 단백질의 농도를 protein assay 용액(Thermo Fisher Scientific Inc.,)으로 정량 한 다음 30 μ g의 단백질을 2x sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithithreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)와 섞어 8~15% SDS-PAGE를 통해 분리하였다. 분리된 gel 상의 단백질을 nitrocellulose membrane(Bio-Rad, Berkeley, CA, USA)으로 transfer시킨 후 membrane은 5% skim milk (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 실온에서 1시간 blocking하였다. 이를 nNOS (1:1000, Santa Cruz), eNOS (1:1000, Santa Cruz), iNOS (1:1000, BD), VEGF (1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), HIF-1α (1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc.), casapase-3 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc.), PARP (1:1000, Cell signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA) 및 β -actin (1:5000, Sigma)에 대한 일차항

체와 함께 4℃에서 하룻밤 반응시킨 후 0.01% Tween-20이 들어간 TBS로 3회 세척하였다. 여기에 다시 HRP conjugated anti-mouse IgG 또는 rabbit IgG (1:5000, Santa Cruz)항체를 넣어 실온에서 1시간 반응시키고 이를 다시 0.05% Tween이 들어간 TBS로 3회 세척한 다음 ECL 용액을 이용하여 x-ray film에 감광시켰다.

6) 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean)±표준오차(SEM)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 GraphPad Prism program의 one-way ANOVA test를 수행하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

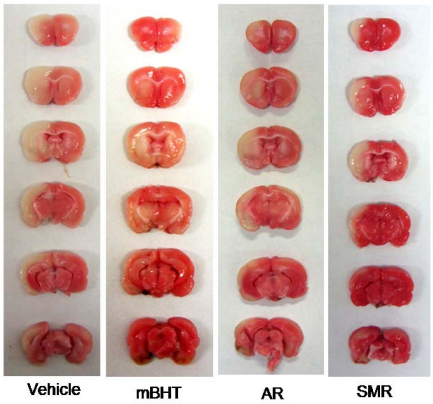
결 과

1. 뇌경색에 대한 효과

허혈성 뇌손상에 대한 가미보양환오탕(mBHT)과 황기추출물(AR) 및 단삼추출물(SMR)의 효과를 조사하기 위해서 중대뇌동맥을 90분 동안 폐쇄한 후 24시간 동안 재관류하여 허혈을 유발시킨 흰쥐의 뇌를 적출하여 TTC 염색법으로 뇌경색의 면적을 측정하였다(Fig. 1).

그 결과, 허혈 유발 24시간 후 생리식염수를 투여한 대조군(vehicle)의 뇌절편에서는 허혈에 의한 손상으로 뇌경색과 혈관손상이 유발됨으로써 상당부분 TTC 용액에 염색되지 않아 뇌경색의 면적이 25.50±9.97%인 반면, mBHT(400 ㎎/㎏) 처리군에서는 대조군에 비해 유의적으로 뇌경색의 면적이 4.30±2.47%($p<0.01$)로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 2A).

한편, AR(154 ㎎/㎏)과 SMR(64 ㎎/㎏)을 투여한 처리군에서는 뇌경색의 면적이 각각 7.94±7.63% ($p<0.01$), 22.11±7.5%로 측정되었으며, 황기를 투여한 군의 경우 뇌경색이 대조군에 비해 비교적 감소한 형태는 얻을 수 있었으나 유의적인 결과를 얻을 수는 없었다(Fig. 2B).



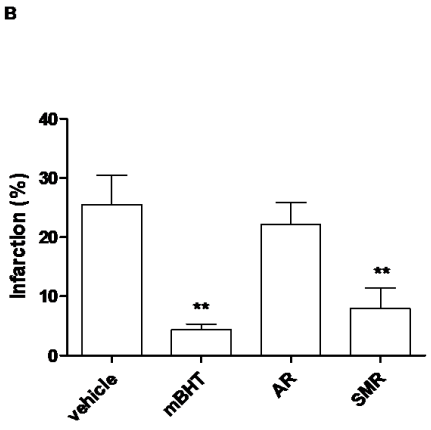


Fig. 1. Effects of the mBHT, AR and SMR on infarct volume in ischemic hemisphere. The mBHT (400 ㎎/㎏), AR (154 ㎎/㎏) and SMR (62 ㎎/㎏) administrated immediately after occlusion. Brain sections were stained with 2% TTC (A). Effect of mBHT, AR and SMR treated group (n=6) on infarction are expressed as the percentage of hemisphere volumes and are presented as the means±SEM (B). **$p<0.01$ compared to the vehicle treated group (n=6).

2. NOS isoforms 발현에 대한 효과

허혈성 뇌손상에 대한 가미보양환오탕(mBHT)와 황기추출물(AR) 및 단삼추출물(SMR)의 신경보호효과를 조사하기 위해서 허혈을 유발시킨 흰쥐의 뇌를 적출하여 Western blot 방법으로 NOS isoforms의 발현 변화를 확인하였다(Fig. 2).

그 결과, 허혈에 의해 손상이 일어난 대조군(vehicle)의 뇌조직에서는 nNOS, eNOS, iNOS의 발현이 모두 정상군(sham)에 비하여 증가하였으며, 특히 대조군에서 iNOS 발현이 현저히 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 2A).

반면, iNOS 발현은 모든 약물 처리군에서 유의적으로 감소하였으며, 이는 mBHT와 구성약재인 AR 및 SMR이 후기 뇌경색을 유도하는 iNOS발현을 유의적으로 억제함으로써 NO의 다량 생성을 감소시켜 뇌조직손상을 막을 수 있음을 의미한다. 한편, eNOS의 발현은 모든 약물 처리군에서 유의적으로 증가하였으며, 특히 SMR 처리군에서 다른 약물 처리군에 비해 더욱 증가되었다. nNOS의 발현은 SMR 처리군에서만 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다.

즉, mBHT 처리군은 AR, SMR 처리군에 비해 후기 큰 경색을 유도하는 iNOS의 발현을 더욱 감소되었으며, 뇌허혈 상태에서 자가 보호기전을 가동하는데 있어 중요한 역할을 하는 eNOS의 발현은 증가되었다(Fig. 2B). 또한 nNOS 발현의 감소는 SMR 처리군에서 가장 우수하였고, eNOS의 발현 증가는 AR 처리군에서 가장 우수한 것으로 나타났다.

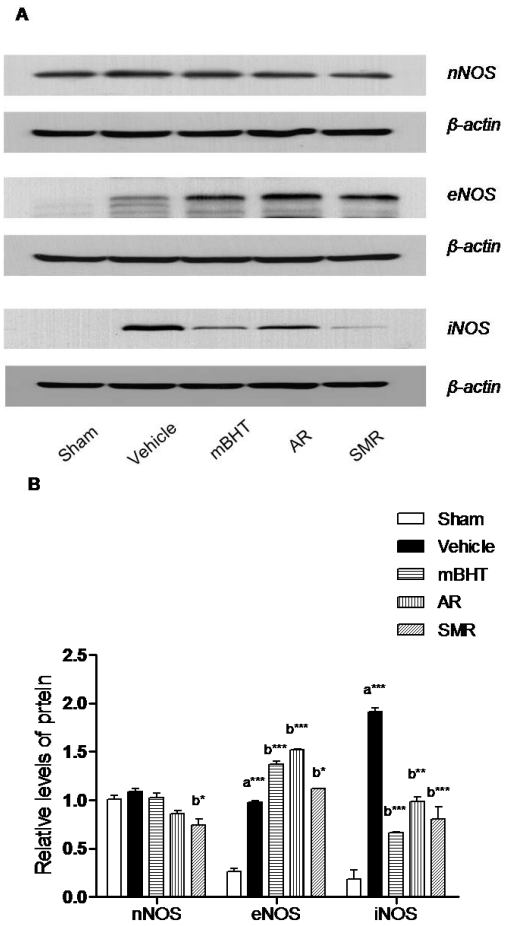


Fig. 2. Effects of the mBHT, AR and SMR on the expressions of NOS isoforms in ischemic hemisphere. The mBHT (400 ㎎/㎏), AM (154 ㎎/㎏) and SM (62 ㎎/㎏) administrated immediately after occlusion. Western blot analysis of the mBHT, AR and SMR on the expression of NOS isoforms in the ischemic hemisphere (A). They quantified by densitometry analysis and expressed in bar charts. Values are the means±SEM of three different experiment groups (B). Statistical test: a significantly different with sham group, b significantly different with vehicle treated group (*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001).

3. 혈관신생인자 발현에 대한 효과

허혈성 뇌손상에 대한 가미보양환오탕(mBHT)과 황기추출물(AR) 및 단삼추출물 (SMR)의 혈관신생효과를 조사하기 위해서 중대뇌동맥을 90분 동안 폐쇄한 후 24시간 동안 재관류하여 허혈을 유발시킨 흰쥐의 뇌를 적출하여 Western blot 방법으로 혈관형성의 과정에서 가장 중심이 되는 인자인 VEGF와 hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α)의 발현 변화를 측정하였다(Fig. 3).

그 결과, 허혈성 뇌손상이 일어난 뇌조직에서의 VEGF 및 HIF-1α 의 발현은 정상군(sham)에 비해 대조군(vehicle)에서 발현 차이는 유의적인 결과는 얻을 수 없었다(Fig. 3A). 반면, mBHT 처리군에서는 HIF-1α 의 발현이 유의적으로 증가하였으며, 특히 AR 처리군에서 VEGF와 HIF-1α 의 발현이 현저히 증가하였다(Fig. 3B).

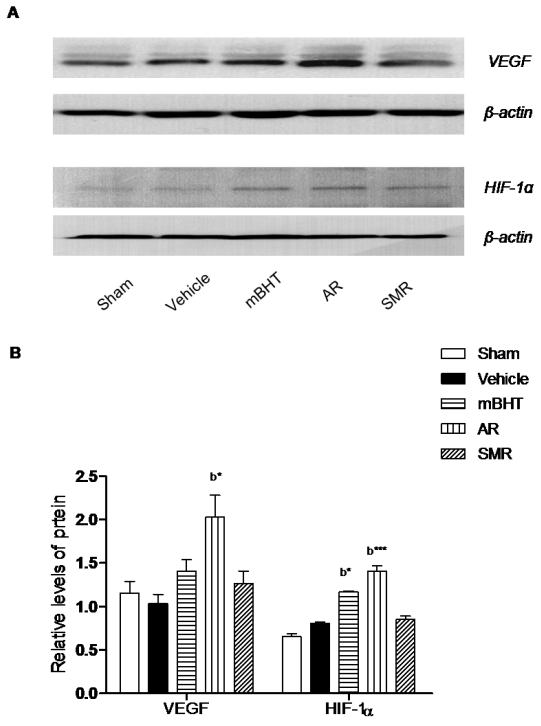


Fig. 3. Effects of the mBHT, AR and SMR on the expressions of angiogenic molecules in ischemic hemisphere. The mBHT (400 ㎎/㎏), AR (154 ㎎/㎏) and SMR (62 ㎎/㎏) administrated immediately after occlusion. Western blot analysis of the mBHT, AR and SMR on the expression of VEGF and HIF-1α in the ischemic hemisphere (A). They quantified by densitometry analysis and expressed in bar charts. Values are the means±SEM of three different experiment groups (B). Statistical test: a significantly different with sham group, b significantly different with vehicle treated group (*p<0.05 and ***p<0.001).

4. 세포사멸 억제에 대한 효과

허혈성 뇌손상에 대한 가미보양환오탕(mBHT)과 황기추출물(AR) 및 단삼추출물(SMR)의 뇌손상 부위에서 일어나는 뇌신경세포사멸에 대한 보호효과를 조사하기 위해서 허혈을 유발시킨 흰쥐의 뇌를 적출하여 Western blot 방법으로 세포사멸 유도인자인 caspase-3와 PARP의 발현 변화를 측정하였다(Fig. 4).

그 결과, 세포사멸이 진행이 되면 나타나는 caspase-3의 활성화는 정상군(sham)에 비해 대조군(vehicle)에서 현저히 증가되었으며, 모든 처리군에서 유의적으로 감소되었다. 또한 caspase-3의 활성화로 인하여 발현되는 cleaved-PARP는 대조군에서 현저히 증가되었으나, mBHT 및 구성약재인 AR과 SMR을 처리하였을 때 그 발현이 현저히 억제되었다(Fig. 4A).

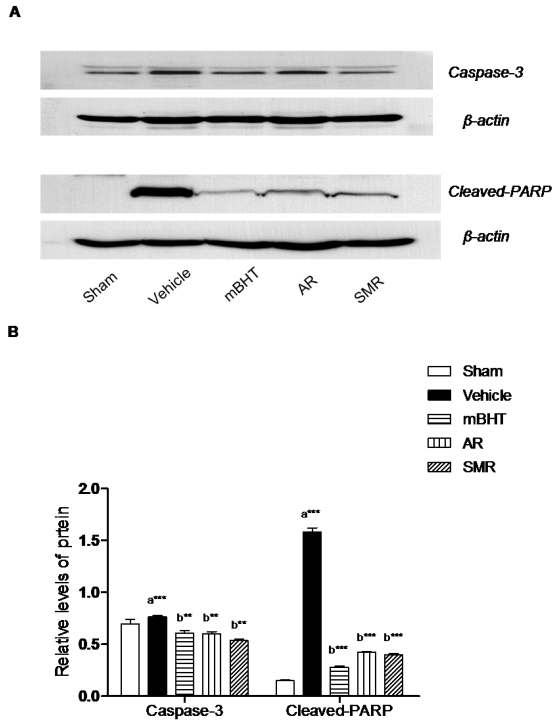


Fig. 4. Effects of the mBHT, AR and SMR on the expressions of apoptotic molecules in ischemic hemisphere. The mBHT (400 ㎎/㎏), AR (154 ㎎/㎏) and SMR (62 ㎎/㎏) administrated immediately after occlusion. Western blot analysis of the mBHT, AR and SMR on the expression of VEGF and HIF-1α in the ischemic hemisphere (A). They quantified by densitometry analysis and expressed in bar charts. Values are the means±SEM of three different experiment groups (B). Statistical test: a significantly different with sham group, b significantly different with vehicle treated group (**p<0.01 and ***p<0.001).

고 찰

腦卒中은 뇌의 혈액순환장애에 의하여 일어나는 급격한 의식장애와 운동마비를 수반하는 증후군으로 최근 인구의 노령화와 더불어 뇌졸중의 사회적 · 경제적 중요성도 커지고 있다. 뇌졸중은 사망 원인 가운데 그 빈도가 매우 높은 질병으로 뇌졸중으로 사망하는 경우 그 원인은 뇌출혈이 가장 많고, 다음으로 뇌혈전증과 뇌색전증이다.

한의학에서 뇌졸중은 중풍(中風) 혹은 이를 줄여서 풍(風)이라고 지칭하며, 서양의학에서 뇌졸중으로 분류하지 않는 질환도 포함하고 있어 뇌졸중과 중풍은 구분하여 사용하기도 한다[21]. 중풍의 後遺障碍 치료와 개선을 위한 많은 치료방법과 처방들이 사용되고 있는데 그 중 淸時代의 王淸任이 소개한 補陽還五湯은 대표적인 偏痲痺 치료법 중 하나로 알려져 있다[22]. 補陽還五湯은 補氣하는 黃芪와 活血祛瘀作用이 있는 當歸尾, 赤芍藥, 川芎, 桃仁, 紅花와 通經活血하는 地龍으로 구성되어 있으며, 補氣, 活血化瘀, 通絡하는 효능으로 氣虛로 인한 瘀血證을 치료하는 처방으로 활용되고 있다[22-26]. 보양환오탕에 대한 실험적 연구로는 뇌혈전과 혈중지질 개선, 국소 뇌혈류량 증가, 혈압강하, 혈전생성 억제, 학습과 기억의 감퇴 및 치매억제 예방, 면역조절, 항염증, 신경세포사멸억제 등 다양한 효과가 보고되어 있다[14-20].

한편, 실제 한방임상에서는 보양환오탕의 기본처방에 瘀血을 순환시키는 丹蔘, 牛膝, 桂枝와 뇌신경을 보호하는 것으로 알려진 遠志, 石菖蒲를 加味하여 사용하고 있다. 따라서, 본 연구에서는 허혈성 뇌졸중 흰쥐에서 가미보양환오탕(加味補陽還五湯, mBHT)과 mBHT의 주요 구성약재인 황기, 단삼의 뇌경색 억제 및 뇌신경보호효과를 확인하였다. 먼저 허혈성 뇌졸중에서 뇌경색 발생에 대한 mBHT와 황기 및 단삼추출물의 억제효과를 TTC 염색방법으로 측정하였다. 뇌조직을 TTC 용액으로 염색하면 정상부위는 미토콘드리아의 산화효소에 의해 적색의 formazone을 형성하므로 붉은색으로 관찰되는 반면, 허혈에 의해 손상을 받은 뇌조직은 염색되지 않으므로 뇌경색 정도를 확인할 수 있다[27]. 복합약물인 mBHT는 구성약재인 황기, 단삼에 비해 효과적으로 뇌경색의 부피를 감소시키는 것으로 나타났으며 이는 복합요인 질환인 뇌졸중에서 복합약리기전을 갖는 mBHT가 단미약재 보다 뇌경색의 발생을 더욱 효과적으로 줄일 수 있음을 의미한다.

NO는 혈관유지, 염증조절, 신경전달 등의 기능을 가지는 물질로서 NO의 농도는 뇌허혈로 인한 손상과 직접적으로 연관이 되어 있을 뿐 아니라, 신경세포 손상에 따른 퇴행성 뇌질환 발병에도 중요한 역할을 한다[28]. 이러한 NO는 뇌허혈과 같은 저산소 상태가 되면 뇌세포 내에 칼슘이온(Ca^{2+})의 농도가 높아지면서 NOS의 활성이 증가하게 되어 생성이 된다[5,6]. NOS isoforms에는 칼슘이온의 농도에 의존적인 nNOS, eNOS와 칼슘이온의 농도에 비의존적이며 면역자극이나 염증과 같은 외부자극으로부터 유도되는 iNOS가 있는데 이런 NOS isoform의 종류에 따라 생성되는 NO가 뇌신경에 대해 보호작용을 하거나 독성작성을 하게 된다[8]. 즉, eNOS에서 생성되는 NO는 대뇌 혈류의 흐름을 원활하게 하여 뇌신경을 보호하는 역할을 하지만 뇌허혈 상태에서 nNOS와 iNOS로부터 다량 생성되는 NO는 미토콘드리아의 전자전달계 complex I, II 및 포도당 연소에 필요한 aconitase를 억제하여 에너지 생성을 방해하고 미토콘드리아의 호흡을 저해함으로써 세포사멸을 유도하게 된다[9]. 본 연구에서 mBHT와 황기 및 단삼 추출물의 NOS isoform의 발현 변화를 조사한 결과 mBHT는 황기,

단삼에 비해 뇌졸중 후기에 큰 뇌경색을 유도하는데 중요한 역할을 하는 iNOS의 발현은 효과적으로 감소시키고 뇌허혈 상태에서 혈류흐름을 촉진하여 뇌신경을 보호하는 역할을 하는 eNOS의 발현은 증가시키며, 초기 신경손상을 유도하는 nNOS의 발현은 감소시킴으로써 허혈에 의한 뇌손상으로부터 뇌조직을 보호할 수 있는 것으로 나타났다. 한편 단삼추출물은 nNOS의 발현을 효과적으로 감소시키고 황기추출물은 eNOS의 발현을 효과적으로 증가시키는 것으로 나타났다.

한편, 허혈성 뇌손상에 대한 mBHT와 황기 및 단삼 추출물의 혈관신생효과를 조사한 결과 mBHT는 혈관형성의 과정에서 가장 중심이 되는 인자인 VEGF와 HIF-1α 의 발현을 증가하였으며, 황기가 단삼에 비해 이들의 발현을 더욱 증가시키는 것으로 나타났다. 뇌조직에서는 초기 배아발생에서 뇌조직 외부에 존재하는 신경외초혈관총(perineural vascular plexus)의 혈관들이 뇌조직으로 이동하면서 혈관신생이 일어나게 되며 이러한 혈관신생은 허혈로 인한 산소부족(hypoxia)과 매우 밀접하게 연관되어 있다[29]. 즉, 뇌허혈로 인해 뇌조직 내에 산소부족 상태가 되면 산소분압을 유지하기 위해 다양한 세포반응이 나타나게 되는데 혈관신생은 이런 상태를 가장 효과적으로 극복하는 방법이 된다. 최근 VEGF 외 HIF-1α 가 혈관신생의 중요한 인자로 알려지고 있으며 HIF은 평상시(normoxia)에는 ODD(oxygen- dependent degradation) domain의 자가분해를 유도하지만 산소부족 상태가 되면 HIF-1α 가 세포질 내 축적되면서 HIF-1β 와 결합하여 핵 내로 이동하게 되며 이는 VEGF 유전자의 전사를 촉진하게 된다[30,31]. HIF-1α 유전적 결손 생쥐는 VEGF 발현이 급격히 감소하여 혈관신생 이상에 의한 신경세포사멸이 일어나며, 허혈성 뇌졸중 흰쥐의 뇌조직에서 VEGF와 같은 혈관신생인자의 증가는 뇌경색 발생을 감소시킨다고 보고되고 있다[13,31]. 본 연구에서 mBHT는 허혈성 뇌손상에서 VEGF 및 HIF-1α 발현을 증가시켰으며, 특히 황기 추출물은 이를 효과적으로 증가시키는 것으로 나타났다. 이는 mBHT가 허혈성 뇌졸중에서 혈관신생을 유도함으로써 뇌경색 발생을 감소시킬 수 있음을 의미한다.

허혈 및 재관류 손상에 대한 세포사멸 유도인자인 PARP의 활성 억제에 대한 작용기전은 아직 구체적으로 밝혀지지는 않았지만 일반적으로 뇌허혈 환자에서 허혈에 의해 손상을 받은 뇌부위에서 PARP의 면역활성도가 증가하며, PARP 저해제를 처리하면 가역적인 중뇌동맥폐색에 의해 유발된 허혈성 뇌손상에 대한 저항성이 증가된다고 알려져 있으며, PARP 과잉활성은 NAD^+와 ATP 소실을 초래하여 이때 생기는 에너지 고갈에 의한 세포사멸이 허혈성 뇌졸중에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[32]. 또한 PARP는 허혈이 진행되는 동안 caspase-3의 과발현을 통해 최종적으로는 파편화(cleavage)가 이루어지므로 caspase-3와 PARP의 활성화를 억제하는 것은 허혈 및 재관류 손상에 따른 신경세포사멸을 막을 수 있는 방법이 될 수 있다. 본 연구에서 mBHT와 구성약재인 황기와 단삼은 모두 caspase-3의 발현과 PARP의 파편화를 억제함으로써 세포사멸로부터 신경세포를 보호할 수 있는 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 mBHT와 황기는 주로 eNOS와 VEGF 및 HIF-1α 발현을 증가시킴으로써 허혈성 손상으로부터 뇌신경을 보호하는 것으로 나타났으며, 단삼은 뇌허혈 초기 손상에 관여하는 nNOS와 후기 큰 경색을 유도하는 iNOS의 발현을 억제시킴으로써 뇌경색을 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 mBHT는 세포사멸 유도분자들인 caspase-3와 PARP의 활성을 억제함으로써 뇌신경을 보호하는 것으로 나타났으며 이는 황기와 단삼의 적절한 효능의 조화를 통해 이루어진 결과로 사료된다.

결 론

가미보양환오탕(mBHT)과 주요 구성약재인 黃芪, 丹蔘 추출물의 허혈성 뇌졸중 흰쥐 에서의 뇌경색 억제 및 뇌신경보호 효과를 조사하였다.

1. mBHT는 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 의해 유발되는 뇌경색 발생을 유의적으로 감소시켰으며, 이는 황기 및 단삼 보다 더 효과적인 것으로 나타났다.

2. mBHT는 후기 큰 경색 유도에 관여하는 iNOS의 발현을 유의적으로 억제하였으며, 이는 황기, 단삼 보다 더 효과적인 것으로 나타났다.

3. mBHT 및 황기, 단삼 추출물은 모두 eNOS의 발현을 증가시켰으며, 황기추출물이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

4. mBHT 및 황기, 단삼 추출물은 모두 nNOS의 발현을 감소시켰으며, 단삼추출물이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

5. mBHT 및 황기, 단삼 추출물은 모두 VEGF와 HIF-1α 의 발현을 증가시켰으며, 황기추출물이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

6. mBHT 및 황기, 단삼 추출물은 모두 caspase-3

와 PARP의 활성을 억제하였다.

따라서 허혈성 뇌졸중에서 복합약물인 mBHT는 구성약재인 黃芪, 丹蔘에 비해 뇌경색발생을 효과적으로 감소시켰으며, 黃芪, 丹蔘과 더불어 혈관신생, 염증억제 및 신경세포사멸유도인자들의 활성을 조절함으로써 뇌신경을 보호하는 것으로 나타났으며 이는 mBHT가 사람의 허혈성 뇌졸중을 개선시킬 수 있는 한약제제로 개발되어질 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부의 한의약선도기술개발사업(B070044)의 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Cucchiara B, Ross M. Transient ischemic attack: risk stratification and treatment. Ann Emereg Med 2008;52:S27-39.
2. Lee JC, Kim WK. Aging and Stroke. Kor J Gerontol 2006;16:11-16.
3. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. 2007;184: 53-68.
4. Kim JH, Park CO, Hyun DK, Ha YS. Correlation between Activity of Nitric Oxide Synthases and Apoptotic Change in the Closed Head Injury Animal Model. J Korean Neurosurg Soc 2002;32:142-148.
5. Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH. Nitric oxide synthase regu-latory sites ; Phosphorylation by cyclic AMP-dependent proteinkinase, protein kinase,calcium /calmodulin protein kinase ; id-entification of flavin and calmodulin binding sites. J Biol Chem 1992;16:10976-10982.
6. Ignarro L, Murad F. Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. Advances in Pharmacology, 1995;34:511-516.
7. Knowles RG, Salter M, Brooks SL, Moncada S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. 1990;172:1042-1048.
8. Beckman JS, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol. 1996;271: C1424-1437.
9. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. Pharmacol Rev. 2009;61:62-97.
10. Sawada N, Liao JK., Moskowitz MA. Targeting eNOS and beyond: emerging heterogeneity of the role of endothelial Rho proteins in stroke protection. Expert Rev Neurother. 2009;9:1171-1186.
11. Chung HY, Park JN, Kim YJ, Kye IS, Lee JY, Kim KW. Molecular Mechanism of Vascular Development and Aging. Kor J Gerontol. 2002;12:15-30.
12. Won, S. J., Kim, D. Y., Gwang, B.J. 2002. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. J Biochem and Molecular bio. 35(1):67-86.
13. Lafuente JV, Argandona EG, Mitre B. VEGFR-2 expression in brain injury: its distribution related to brain-blood barrier markers. 2006;113:487-496.
14. Cheon YS, Kim SH. The effect of Boyangwhanotang and Kami-Boyang whanohtang on intravascular coagulation induced by endotoxin in rats. J of oriental medical pathology 2003;8:157-176.
15. Choi EJ. The effects of Boyanghwno-tang extraction on reversible forebrain ischemia in Mongolian gerbil. Ph. D. Thesis, Dongguk University, Kyeonju, Korea, 1999.
16. Jang HN. Study on the selective priming of Th1 and suppression of Th2-type immune response flowing oral administration of Korean traditional medicine. MD. Thesis, Chonbuk National University, Jenonju, South Korea, 2003.
17. Kim NY. Effect of Boyanghwanohtang extract on the blood pressure and regional cerebral blood flow in rats. Ph. D. Thesis, Wonkwang University, Iksan, South Korea, 1985.
18. Kim YH. Regulation of immune response

by Bo-yang-hwan-oh-tang used for improvement of blood stasis. MD. Thesis, Jeonju University, Jenonju, South Korea, 2002.
19. Soul IC, Kim BT. Effects of Kamiboyanghwanotang(KBHT) on hyperlipidemia, thrombosis, thrombosis, hyperviscosity, hypertension and brain damage. J of Korean Oriental Chronic Disease 1998;4: 133-162.
20. Tak ES. Effects of Bo Yang Hwan Oh Tang on experimental thrombosis. MD. Thesis, Dongguk University, Kyeonju, South Korea, 1990.
21. 김영석. 임상중풍학. 서울, 서원당, 1997:303-308.
22. 왕청임. 의림개착. 대북, 대련국풍출판사, 1975: 40-44.
23. 남경중의학원, 중의방제대사전, 북경, 인민위생출판사, 1995:891.
24. 신민교, 임상본초학, 서울, 영림사, 1986:169-171, 221-223, 249-250, 300-301, 464-468, 662-663.
25. 신길구, 신씨본초학, 서울, 수문사, 1988:9-12, 80-84, 448-450, 521-522, 554-556, 562-564, 600-603.
26. 김창민, 중약대사전, 서울, 정담, 1998:592-599, 1159-1168, 1353-1358, 4839-4845, 5258-5265, 6357-6362, 6460-6471.
27. Bendek A, Moricz K, Juranyi Z, Gigler G, Levay G, Harsing LG Jr, Matyus P, Szenasi P, Albert M. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats Brain Research 2006;111:159-165.
28. Naka M, Nanbu T, Kobayashi K, Kamanaka Y, Komeno M, Yanase R, Fukutomi T, Fujimura S, Seo HG, Fujiwara N, Ohuchida S, Suzuki K, Kondo K, A potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ONO-1714, a cyclic amidine derivative. 2000; 270:663-667.
29. Bae MK, Kwon YW, Kim MS, Bae SK, Bae MH, Lee YM, Kim YJ, Kim KW. Identification of genes differentially expressed by hypoxia in hepatocellular carcinoma cells. 1998;243:158-162.
30. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Science 1989;246: 1306-1309.
31. Yao X, Miao W, Li M, Wang M, Ma J, Wang Y, Miao L, Feng H. Protective effect of albumin on VEGF and brain edema in acute ischemia in rats. Neurosci Lett. 2010;472:179-183.
32. Krupinski J, Ferrer I, Barrachina M, Secades JJ, Mercadal J, Lozano R. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in the rat. Neuropharmacology. 2002;42:846-854.