

## 허혈성 뇌졸중 흰쥐에서 당귀미 열수추출물의 혈관신생인자 발현 조절을 통한 신경세포 보호작용에 대한 연구

박기호, 오태우, 박용기\*

동국대학교 한의과대학 본초학교실

### Neuroprotective effect of the water extract of *Angelicae Gigantis Radix Palva* in ischemic stroke rats

Ki-Ho Park, Taewoo Oh, Yong-Ki Park\*

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objective :** *Angelica Gigas* Nakai is a popular oriental medicine used for the treatment of vascular diseases. The aim of this study is to investigate neuroprotective effect of the water extract of *Anelicae Gigantis Radix Palva* (AG) in transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO)-induced ischemic rats via the regulation of angiogenesis-related molecules.

**Methods :** Sprague-Dawley rats were intraperitoneally administrated with AG water extract at doses of 10, 25, 50 mg/kg body weight after tMCAO (90 min occlusion). reperfusion for 24 hr infarction volumes were measured by 2,3,5-tetrazolium chloride (TTC) staining. Brain tissues were observed neuronal cell injuries by nissl staining, and also brain-blood barrier (BBB) permeability change by evans blue. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin-1 (Ang-1) and Tie-2 receptor protein in brain tissues was determined by western blot.

**Results :** AG water extract significantly reduced infarction volume in ischemic brains of rats, degradation of neuronal cell, BBB permeability and expression of VEGF protein dose-dependently. Ang-1 protein was increased dose-dependantly, not significantly.

**Conclusion :** This study suggests that AG water extract shows neuroprotective effect by preventing BBB breakdown, with regulating angiogenesis factor VEGF and Ang-1.

**Key words :** *Angelica gigas*, middle cerebral artery occlusion, brain-blood barrier, vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1

## 서 론

뇌졸중은 한국에서 단일질환으로서 사망률 1위를 차지하며<sup>1)</sup>, 의료비용 또한 가장 많이 지출되는 질환이다<sup>2)</sup>. 그 중에서도 특히 허혈성 뇌졸중은 뇌의 혈관이 좁아지거나 막혀서 산소나 영양분을 제대로 공급받지 못해 뇌가 손상되는 질환으로서 한국의 경우 약 80%의 환자가 허혈성 뇌졸중에 해당하는 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>.

현재 뇌졸중 치료는 뇌 허혈 초기에 좁아지거나 막힌 혈관을 넓혀서 다시 혈류를 개선시키기 위한 것으로 유로키나제와 같은

혈전용해제나 해파린과 같은 항응고제 및 아스피린과 같은 항혈소판제 등을 사용하고 있다<sup>4)</sup>. 그러나 뇌 조직은 한 번 손상되면 다시 재생되기 어렵고, 뇌졸중은 증상이 개선되었다 하더라도 뇌혈관의 손상이 그대로 남아 있는 상태로 재발하기 쉬워서 지속적인 위험인자 조절과 함께 평생 약물을 복용하게 된다. 한편 뇌에서의 일시적인 혈액공급 장애는 신경세포 손상으로 이어지기 때문에 최근에는 신경세포 사멸을 막을 수 있는 신경보호제 개발에 대한 관심이 높아지고 있으며, 혈액공급을 원활하게 하면서 뇌 세포사멸의 주요 경로인 흥분성 독성과 산화적 스트레스를 함께 차단하는 다중 약리효과를 갖는

\*교신저자 : 박용기. 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실.  
· Tel : 054-770-2661. · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr.  
· 접수 : 2012년 2월 10일 · 수정 : 2012년 3월 4일 · 채택 : 2012년 3월 16일

약물 개발에 대한 연구가 이루어지고 있다.

한편 뇌경색이 발생하면 뇌혈관장벽의 중요한 구성성분인 뇌혈관 기저막이 파괴되는데, 이는 뇌경색 발생 시에 동반되는 뇌부종과 출혈 전환의 일차적인 원인으로 생각된다<sup>5)</sup>. 뇌혈관 기저막의 파괴와 이로 인한 뇌혈관장벽의 붕괴에는 혈관내 피상장인자 및 그 수용체에 의한 신호 기작이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>.

참당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 예로부터 중국당귀(*A. sinensis* (Oliv.) Diels) 및 일당귀(*A. acutiloba* Kitag.)와 함께 당귀(當歸)라는 이름으로 血虛, 血滯로 인하여 생기는 모든 병증에 사용되어<sup>7)</sup>, 동의보감 처방 중 500회 이상, 방약합편 처방 중에 150회 이상 언급되어 감초, 생강과 함께 최다 빈용 약물에 속하는 한약재이다<sup>8)</sup>. 임상 응용에서 當歸身은 補血하고, 尾는 活血祛瘀하며, 全當歸는 補血和血한다고 하였으며, 酒炒하여 응용하면 活血作用을 증강한다고 알려져 있다<sup>7)</sup>. 참당귀의 실험연구 결과로서 참당귀 단독으로는 심혈관계에서의 혈관 확장 및 혈액응고 지연 효과, 신경계에서의 glutamate 독성에 대한 신경 보호 효과, 기억력 개선 효과, 통각 완화 효과, 육종, 혈액암, 전립선암, 흑색종 등의 암세포주에 대한 억제 효과, 면역 반응 조절 효과, hydrocortisone acetate에 의해 유발된 rat의 어혈 병태에 따른 조절작용 증가 효과, TNF- $\alpha$  와 NO 경로에 의한 염증의 억제 효과, 장내 세균총의 조절 효과, 골파괴 방지 효과, 고초균, 돼지 회충 등의 생장 억제 효과, streptozotocin에 의한 췌장 손상의 완화 효과 등이 보고되었으며<sup>8)</sup>, 다른 약재와의 조합으로서 복부대동맥 이완 효과<sup>9)</sup>, 탈모 억제 효과<sup>10)</sup> 등이 보고되었다. 특히 허혈성 뇌졸중에서 참당귀의 신경세포 보호 효과<sup>11-16)</sup> 및 성장세포 활성화 억제<sup>17)</sup>가 보고되었으나, 혈관계에 미치는 효과에 대한 보고는 이루어지지 않았다.

한편 참당귀의 성분으로는 decursin, decursinol angelate, umbelliferone, nodakenin, peucedanone, marmesin, demethylsuberosin, isoimperatorin 등이 있으며<sup>8)</sup>, 이 중 decursin과 decursinol angelate의 분포가 주근과 세근에서 차이가 있어 세근에서 decursin과 decursinol angelate의 함량이 유의하게 높음이 보고된 바 있다<sup>18)</sup>.

이를 바탕으로 본 연구에서는 活血祛瘀 효과가 우수하여 허혈성 뇌졸중에 유의한 효과가 있을 것으로 기대되는 당귀미의 열수추출물을 제조하여 중뇌대동맥폐쇄(transient middle cerebral artery occlusion)으로 허혈성 뇌졸중을 유발시킨 흰쥐에서의 뇌 신경보호효과와 작용기전을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용된 당귀미는 광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입하였으며, 동국대학교 본초학교실에서 감별하고 세척하여 이물을 제거하고 정선한 것을 사용하였다.

#### 2) 실험동물

실험동물은 하나상사(부산, 한국)에서 체중 260-280g의

Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 구입하여 사용하였으며, 모든 실험동물은 1주일 간 명암주기 각 12시간 환경에서 충분한 사료와 물을 공급하면서 순화시킨 후 모델제작에 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 당귀미 추출물 제조

당귀미 추출물을 제조하기 위하여 당귀미 200 g에 물 2 L를 넣고 3시간동안 가열하여 열수 추출하였으며, 추출액은 3겹 거어즈와 왓만 필터(Whatman No. 1)로 거른 후 진공회전농축기에서 농축하였다. 농축액은 다시 동결 건조하여 건조엑스를 수득하였으며 이때 수득율은 29.1%였다. 건조된 추출물은 냉장 보관하면서 실험 직전 멸균된 생리식염수에 완전히 용해시켜 사용하였다.

### 2) 허혈성 뇌졸중 동물 모델 제작

중뇌대동맥폐쇄(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)에 의한 허혈성 뇌졸중 흰쥐모델은 Longa 등<sup>19)</sup>의 방식을 다소 변형하여 시행하였다. 먼저 70% N<sub>2</sub>O와 30% O<sub>2</sub>의 혼합 기체에 5% Isoflurane을 넣어 가스 마취를 실시하였으며, 수술 도중에는 1~1.5% 농도로 마취 상태를 유지하였으며, 체온은 feedback-regulated heating pad로 수술 전 과정 내 37.0±0.5℃를 유지시켰다. 마취된 흰쥐의 전경부 중앙의 피부를 절개하고 경부의 근육층을 드러낸 후 좌측 총경동맥을 찾아 미주신경이 손상되지 않도록 조심스럽게 분리하였다. 총경동맥을 고정시킨 후 외경동맥과 내경동맥의 분지를 조심스럽게 분리하고 외경동맥을 차단한 후, 총경동맥의 혈류를 일시적으로 차단한 상태에서 총경동맥을 일부 절개하여 나일론 수술실(3-0 monofilament, Davis&Geck Carive Ltd., Dominica)을 진입시켜 내경동맥을 따라 25mm 가량 진행하여 중뇌대동맥이 폐쇄되도록 하였다. 나일론 수술실의 삽입부 끝은 약 0.35mm 크기로 둥글게 말았으며 진입한 실은 진입구로 일부가 나오게 한 상태로 혈관과 함께 고정하고 수술 부위를 봉합하였다. 혈류의 재개통을 위하여 90분 후 나일론 수술실을 조심스럽게 제거하여 혈류를 재개통시켰다. 재관류 24시간 후 흰쥐를 희생시키고 생리식염수를 이용하여 심장으로 관류한 후 두개골을 열어 뇌를 적출하였다.

### 3) 약물 투여

실험군은 허혈성 뇌졸중을 유발하지 않고 준비수술과정만 시행한 대조군(control), 허혈성 뇌졸중 유발군(vehicle) 및 약물 투여군으로 나누었으며, 대조군과 유발군은 폐쇄 직후 멸균된 생리식염수를 복강 투여하였으며, 약물 투여군은 당귀미 추출물을 10, 25, 50 mg/kg 농도로 복강 투여하였다.

### 4) 뇌경색 부피 측정

중뇌대동맥폐쇄로 인해 발생한 뇌경색의 부피를 측정하기 위해서 각 군으로부터 적출한 뇌를 뇌 형상틀(rat brain matrix, Harvard Bioscience, Inc., USA)을 이용하여 2 mm 간격으로 관상절단하여 절편을 만든 후 2% 2,3,5-tetrazolium chloride (TTC) 시약을 사용하여 60℃에서 5분간 염색한 후 사진 촬영하고 손상된 면적을 ImageJ 프로그램을 사용하여 측정하였다.

5) 니슬 소체(Nissl body) 염색

중뇌대동맥폐쇄로 인한 허혈성 뇌졸중 뇌 조직에서의 신경 세포 손상 정도를 조사하기 위해서 뇌 조직을 파라핀 절편으로 제작한 후 니슬 염색을 수행하였다. 즉, 조직 절편을 자일렌에 3분 간 2번씩 담그고 100%, 90%, 70% 에탄올에 차례로 90초 씩 처리함으로써 함수하였다. 이를 cresyl violet 염색액으로 8분 간 염색한 후 증류수 및 70%, 90%, 100% 에탄올 순서대로 탈수하였으며, 자일렌으로 세척하여 Permount (Fisher Scientific, USA)로 봉입하여 커버글라스로 덮은 후 광학현미경으로 신경세포를 관찰하였다. 또한, 니슬 염색 후 병변부위 대뇌반구의 상응하는 부위에서 염색된 세포의 면적을 조사하여 응집도를 측정하였으며, 히스토그램을 그려 분포도를 나타내었다.

6) 뇌혈관장벽 손상을 측정

뇌혈관장벽 손상 정도를 평가하기 위해서 에반스 블루 (evans blue) 염색을 이용하여 에반스 블루가 뇌실질 안으로 유출되는 정도를 평가하였다. 즉, 모든 실험동물에 중뇌동맥 폐쇄를 유도한 후 재관류 18시간에 에반스 블루(2% in saline, 3 ml/kg) 를 하지의 대퇴정맥을 통해 주사하였다. 재관류 후 24시간이 지난 다음 실험동물을 희생시키고 뇌를 적출하여 뇌의 염색 정도를 확인하였다.

7) 뇌혈관장벽 관련 단백질 발현 측정

중뇌대동맥폐쇄로 인한 허혈성 손상에 따른 뇌혈관장벽 관련 단백질들의 발현 변화를 조사하기 위해서 western blot을 수행하였다. 즉, 뇌 조직을 적출한 후 lysis buffer와 함께 homogenizer로 마쇄하여 이를 4℃, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 회수하여 단백질을 정량하였다. 각 샘플의 양이 40µg가 되도록 계산한 후, 각 용액에 sample buffer를 첨가하여 5분간 100℃로 가열하여 단백질을 분리하였다. 이를 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후 nitrocellulos membrane에 옮기고 5% skim milk에 30분간 실온에서 blocking하였다. 여기에 rabbit anti-VEGF(SC-654, Santa Cruz biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), goat anti-ang-1(SC-6319, Santa Cruz), rabbit anti-tie-2(SC-9026, Santa Cruz) 일차항체를 넣고 4℃, 교반기에서 하룻밤 반응시켰으며, 다시 2차 항체와 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 membrane을 ECL 용액(Amersham, Buckinghamshire, England)으로 반응시키고 x-ray 필름에 감광시켜 결과를 확인하였다.

3. 통계 분석

모든 결과는 모든 개체 수에 대한 평균(mean)±표준오차 (standard deviation ; SD)로 나타내었으며, 통계 분석은 GraphPad Prism program을 이용하였다. 각 군의 비교는 independent t-test와 one-way ANOVA로 분석한 후, scheffe로 사후 검증하였고, p값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 뇌경색 부피의 감소 효과

중뇌대동맥 폐쇄로 뇌경색을 유발하여 24시간이 경과한 후

에 모든 동물을 희생하여 TTC 염색으로 뇌경색의 부피를 측정 한 결과, 허혈성 뇌졸중 유발군은 26.8±3.3%, 당귀미 추출물을 10, 25, 50 mg/kg를 투여한 군은 각각 25.8±3.7%, 25.1±2.7%, 20.0±7.9%로 측정되어 농도 의존적으로 뇌경색의 부피가 감소하였다(Fig 1).

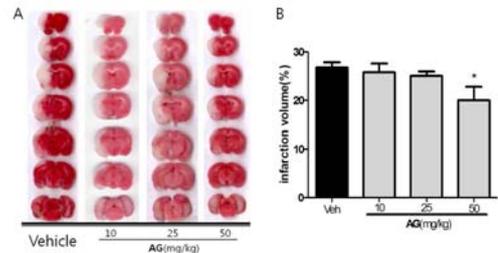


Fig. 1. Effect of Angelica gigas radix palva water extract on the infarct volume induced by middle cerebral artery occlusion in rats. Brain sections from rats subjected to 90 min occlusion and 24 h reperfusion. (A) The sections were stained with 2% TTC. (B) The infarct volumes in saline-treated vehicle group and Angelica gigas radix palva (AG) water extract (10, 25 and 50 mg/kg) treated group (n=9, respectively) are expressed as the percentage of hemisphere volumes and are presented as the means±SD. \*\*p<0.05 compared to the vehicle-treated group.

2. 신경세포에 대한 보호 효과

중뇌대동맥 폐쇄에 의해 허혈성 손상이 유발된 흰쥐의 뇌 조직에 대한 당귀미 추출물의 신경세포 보호효과를 확인하기 위해 허혈손상조직의 주변부(penumbra)에 cresyl violet 염색을 실시하여 신경세포의 형태적 변화와 니슬 소체(nissl body)의 분포를 조사하였다. 그 결과, 허혈성 뇌 손상이 유발된 대뇌 피질에서는 대조군의 정상적인 형태와 달리 신경세포의 형태가 유지되지 못하고 응축되었으며, 니슬 염색이 진하게 되면서 크고 불규칙한 모양을 보이는 신경세포들이 관찰되었다. 그러나 당귀미 추출물을 25, 50 mg/kg 농도로 투여하였을 때 니슬 소체의 분포 면적이 허혈성 뇌졸중 유발군에 비해 유의적으로 증가하고 형태 또한 정상적으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig 2).

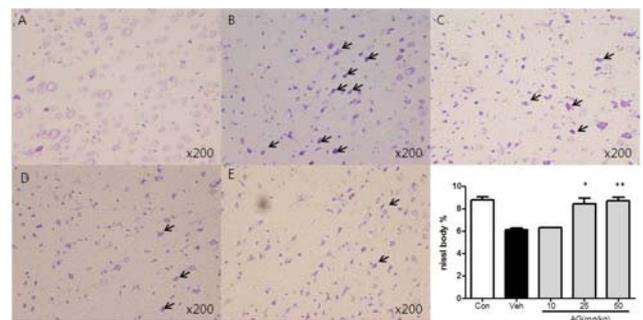


Fig. 2. Effect of Angelica gigas radix palva water extract on the neuronal cell injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. The sections were stained with cresyl violet. The cresyl violet-stained neuronal cells in saline-treated vehicle group and Angelica gigas radix palva (AG) water extract (10, 25 and 50 mg/kg) treated group (n=9, respectively) are expressed as the percentage of nissel body and are presented as the means±SD. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 compared to the vehicle-treated group. A, control group; B, vehicle group; C, AG 10 group; D, AG 25 group; E, AG 50 group.

### 3. 뇌혈관장벽에 대한 보호 효과

중뇌대동맥 폐쇄에 의해 허혈성 손상이 유발된 흰쥐의 뇌 조직 내 뇌혈관장벽 손상에 대한 당귀미 추출물의 보호효과를 확인하기 위해 evans blue 염색을 실시하였다. 그 결과 허혈성 뇌 손상이 유발된 대뇌는 뇌혈관장벽이 손상됨에 따라 evans blue에 의해 강하게 염색되었으며, 당귀미 추출물을 10, 25 and 50 mg/kg 농도로 투여한 군에서는 농도 의존적으로 염색의 강도가 약해지는 것을 확인하였다. (Fig 3).

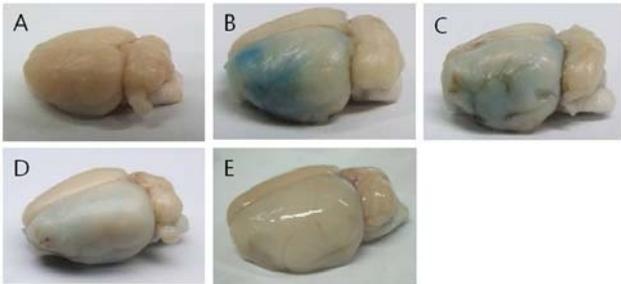


Fig. 3. Effect of *Angelica gigas radix palva* water extract on the brain-blood barrier permeability changes induced by middle cerebral artery occlusion in rats. The sections were stained with evans blue. A, control group ; B, vehicle group ; C, AG 10 group ; D, AG 25 group ; E, AG 50 group.

### 4. 뇌 혈관 관련 단백질 발현 조절 효과

중뇌대동맥 폐쇄에 의해 허혈성 손상이 유발된 흰쥐의 뇌 조직 내 뇌혈관형성 단백질들의 발현에 대한 당귀미 추출물의 조절효과를 확인하기 위해 western blot을 실시한 결과, VEGF의 발현은 대조군에 비해 뇌졸중 유발군에서 증가하였으며, 이는 당귀미 추출물의 투여 농도에 의존적으로 감소하였다(Fig. 4). 또한 tie-2의 발현은 대조군과 뇌졸중 유발군 간 차이는 없었으나 당귀미 추출물 투여에 의해 감소하였고, ang-1의 발현은 대조군에 비해 뇌졸중 유발군에서 현저히 감소된 반면 당귀미 추출물 투여군에서 유의한 변화는 없는 것으로 나타났다.

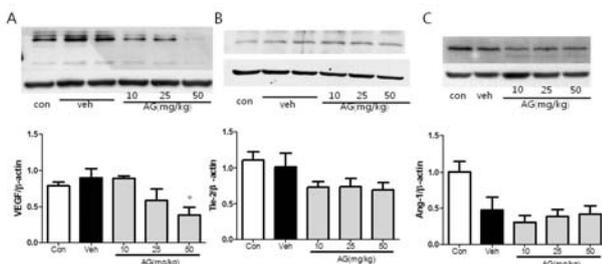


Fig. 4. Effect of *Angelica gigas radix palva* water extract on the expression of angiogenesis-related protein in middle cerebral artery occlusion-induced ischemic brains. VEGF(A), tie-2(B) and ang-1(C) are determined in ischemic brains by western blot. Data are presented as the means±SD. \*p<0.05 compared to the vehicle-treated group.

## 고찰

당귀는味が甘辛하고 性이溫하여 甘味는補하고, 辛味는散하고, 溫性은通氣게 하여 補血活血하며 行氣止痛하는 效能

이 있어 心 肝 脾 三經에 作用하여 모든 血證을 치료하는 약재로 알려져 있다<sup>7)</sup>. 우리나라에서 당귀로 통용되는 약재는 참당귀(*Angelica gigas* N.)의 근으로서<sup>20)</sup>, 성분으로 지용성 물질인 coumarin 계열과 수용성 물질인 polysaccharide이 있으며, coumarin 계열에는 decursin, decursinol angelate, umbelliferone, nodakenin, peucedanone, marmesin, demethylsuberosin, isoimperatorin 등의 성분이 포함되어 있는데 그 중 decursin과 decursinol angelate가 주요 활성 성분으로 이들은 측쇄인 (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CCHCOO<sup>-</sup>의 구조가 서로 다른 이성질체이다<sup>9)</sup>. 이 외에도 휘발성 방향 성분인 nonane, α-pinene, camphene, 2-methyloctane, lomatine, 2-furanmethanol, seselin, guaiacol, butyrolactone 등이 알려져 있다<sup>8)</sup>. 참당귀의 주요 성분인 decursin<sup>21)</sup>은 특히 신경세포 보호 효과가 알려져 있을 뿐만 아니라<sup>15)</sup> 혈액망막장벽 (blood-retina barrier ; BRB) 및 인간 태줄혈관내피세포 (human umbilical vascular endothelial cell line), 병아리의 배반막 혈관신생, 생쥐 암종에서 혈관내피세포성장인자인 VEGF Receptor-2 기전을 억제하는 것이 보고되었다<sup>22-23)</sup>. 이들 성분은 당귀의 세근 부위, 즉 당귀미에 더욱 집중되어 있어<sup>18)</sup> decursin의 작용이 당귀미의 약리 효과에 중요한 영향을 미친다고 추측할 수 있다.

일시적 중뇌대동맥 폐쇄(tMCAO)에 의한 허혈성 뇌손상 흰쥐모델은 급성 허혈성 뇌졸중의 실험동물모델로서 허혈 유발 후 중심부에서 신경세포들이 산발적으로 죽어 나가게 되며, 폐쇄 후 1시간이면 중심부(core)로부터 괴사가 일어나고 폐쇄 후 3시간이 경과하면 뇌경색이 시작되고, 24시간이 되면 뇌경색이 마무리되며, 3일이 되면 최대에 이르게 된다<sup>24)</sup>. 이때 뇌경색 중심부에서는 대부분 괴사성 세포사멸이 일어나고, 주변부(penumbra)는 지연성 세포사멸이 유발되는 것으로 알려져 있다. 또한 이 모델은 임상적으로 중풍환자의 병태와 유사하고, 행동양상이 비슷한 특징이 있어서 사람의 중풍 실험모델로 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 당귀미 추출물의 뇌신경 보호효과를 확인하기 위해 허혈성 손상으로 인한 뇌경색의 부피변화를 조사하였으며, 중뇌대동맥 폐쇄 후 현저히 증가하게 되는 뇌경색부피가 당귀미 추출물에 의해 유의적으로 감소됨으로써 당귀미 추출물이 뇌경색 억제에 효과가 있음을 확인하였다.

뇌혈관은 다른 일반적인 혈관과는 다르게 선택적 투과성을 지니도록 뇌혈관장벽이라는 특이한 구조로 되어 있어서 정상 세포, 신경세포와 지속적인 상호작용을 하게 되며, 뇌혈관신생 (brain angiogenesis)과 뇌혈관장벽형성(barriergenesi) 과정을 통해 형성된다. 뇌혈관의 발생기전으로는 subnentricular zone(SVZ)에서 미분화신경교세포(neuroglial progenitor)가 대뇌피질이 될 영역으로 증식하면서 이동하게 되어 다량의 산소를 소모하게 되면서 뇌 조직 내 저산소(hypoxia) 상태가 유도되고, 이때 신속한 산소공급을 위해 VEGF와 같은 neuroglia-derived factor들이 분비됨으로써 pia vessel에서 저산소상태에 있는 뇌조직으로 혈관신생이 유도되는 것으로 보고 있다. 이때 형성되는 혈관이 신경교세포 사이로 뻗어나가면서 뇌조직과 신경세포에 산소와 영양분을 공급하게 된다.

VEGF는 매우 강력한 혈관신생인자이자 투과성인자로서 혈관신생과정 중 혈관내피세포의 생존, 이동, 증식 등의 단계를

촉진하게 되며 일반적으로 신경세포의 생존에 긍정적인 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다<sup>25)</sup>. 신경세포에서 나온 VEGF는 혈관내피세포의 VEGF 수용체와 상호작용하며, 대뇌피질화가 이루어지는 동안 perivascular plexus로부터 모세혈관들이 안쪽으로 성장할 수 있도록 유도한다. 이들의 발현양상은 저산소에 의해서 유도된 혈관신생과 대뇌 피질의 혈관구조의 유지와 관련이 있는 것으로 보고 있다.

한편, 뇌혈관장벽의 구조는 tight junction 단백질인 occludin, claudin, junctional adhesion molecule, VE-cadherin을 포함하는 막 단백질과 zonula occludens(ZO)과 같은 보조단백질로 이루어져 있으며, 이들 단백질 간 상호작용에 의해 혈관관문의 투과성이 조절되게 된다. 또한 이들은 뇌혈관장벽의 투과성을 낮추고, 특정 transporter system을 이용하여 여러 분자들의 교환을 제한하게 되며, central nervous system(CNS)의 항상성을 조절하고, 외부 환경으로부터 CNS를 보호하게 된다. 허혈성 뇌졸중에서 신경세포 및 신경교세포로부터 방출되는 VEGF는 혈관내피세포에 존재하는 VEGF receptor에 결합하여 Protein Kinase C 경로를 활성화시켜 이들 단백질을 인산화시켜 뇌혈관장벽의 투과도를 높이고, 그 결과로서 혈장성분의 유출이 일어나 부종과 출혈을 증가시키게 된다<sup>26)</sup>. VEGF의 이러한 뇌혈관장벽 투과도 증가 작용은 세포 외 기질 내에 존재하는 분해 단백질인 matrix metalloproteinase-9와 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있는 한편<sup>27)</sup>, angiopoietin-1과 그 수용체인 Tie-2 경로에 의해 억제되어, 두 경로가 동시에 활성화될 경우 혈관신생은 일어나지만 뇌혈관장벽의 약화는 억제되는 것으로 알려져 있다.<sup>26)</sup>

혈관신생에는 angiopoietin-1과 angiopoietin-2의 작용이 중요하며, 이 두 단백질은 혈관 리모델링에 관여하게 되는데 angiopoietin-1은 주로 성숙한 혈관을 안정화시키는 역할을 하며, angiopoietin-2는 혈관신생이 일어나는 모세혈관 끝에서 허혈이 유도되어 일어나는 혈관신생에서 주로 관여함으로써 혈관내피세포가 가소성을 갖도록 하는 역할을 한다<sup>28)</sup>. 또한 이들은 세포 생존 신호인 PI3 kinase와 Akt 기전을 활성화시킴으로써 혈관 내피세포에 생존신호를 주거나 혈관의 투과성을 조절하게 되는데 angiopoietin-1은 혈관 투과성을 감소시키고, angiopoietin-2는 혈관신생에 관여하는 부위에서 높은 농도로 존재하면서 내피세포에 강한 신호를 주게 된다. 한편 angiopoietin-1은 혈관에 작용하여 염증반응을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 즉 염증반응으로 혈관 내피세포에 ICAM, VCAM-1, E-selectin 등이 발현되면서 염증세포들이 침윤되면 angiopoietin-1이 이러한 부착분자들의 혈관 내피세포에서의 발현을 억제시킴으로써 염증반응을 차단하게 된다<sup>29)</sup>. 당귀미 추출물의 BBB의 투과도 변화를 Evans 블루 염색으로 확인하고 그에 관련된 인자인 VEGF와 Angiopoietin-1, Tie-2 수용체의 발현 변화를 조사한 결과 당귀미 추출물은 뇌혈관장벽의 투과도를 농도 의존적으로 낮추었으며, 뇌 내 VEGF의 발현량은 유의하게 감소하였다. 또한 Angiopoietin-1의 발현은 유의하게 변화하지는 않았으나 농도에 따라 증가하는 경향성을 나타내었다. 이는 당귀미 추출물이 허혈성 손상에 따른 VEGF, Angiopoietin-1 등 혈관형성인자의 발현을 조절하여 혈관뇌장벽의 붕괴를 막음으로써

신경세포를 보호할 수 있음을 의미한다.

당귀미는 decursin 등 주요 약리 성분의 농도가 당귀신에 비하여 높으며<sup>18)</sup>, 이는 동일한 증량의 약제를 사용할 때 decursin 등의 약리 효능이 당귀신에 비하여 당귀미에서 더욱 강하게 나타날 수 있음을 나타낸다. 당귀미 추출물의 주요 성분인 decursin은 혈관형성에 가장 강력한 인자로 작용하는 것으로 생각되는 VEGF와 VEGFR-2 경로를 유의적으로 차단하며<sup>22-23)</sup>, 특히 본 실험에서 당귀미 추출물은 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈성 뇌손상 유발 흰쥐의 뇌 조직에서 VEGF의 발현을 직접적으로 감소시켰다. 그러나 참당귀 추출물 또는 성분이 혈관계에 미치는 영향을 조사한 기존 논문에서 참당귀는 피내 스펀지 봉입에 의한 혈관신생을 유의하게 촉진하는 것으로 보고되었다<sup>30)</sup>. 이러한 차이는 참당귀가 기존에 알려진 VEGF와 VEGFR-2 경로가 아닌 다른 경로를 통하여 혈관신생을 유도하는 작용을 하기 때문이라고 사료된다. 또한 당귀신과 당귀미에서 나타나는 補血과 破血의 작용이 decursin 등의 농도 차이에 기인한 VEGF의 조직 내 농도 변화에 의하여 나타나는 것으로 생각되는 바 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

## 결 론

당귀미 추출물의 허혈성 뇌졸중 흰쥐에서의 신경 보호 효과와 그 기전을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 당귀미 추출물은 중뇌대동맥 폐쇄 후 재관류에 의해 유도되는 허혈성 뇌 손상에 따른 뇌경색의 발생을 유의적으로 감소시켰다.
2. 당귀미 추출물은 허혈성 손상에 따른 뇌 신경 세포의 손상을 유의적으로 억제시켰다.
3. 당귀미 추출물은 중뇌대동맥 폐쇄 후 재관류에 의해 유발되는 뇌경색에 의한 뇌혈관장벽의 투과도를 유의적으로 감소시켰다.
4. 당귀미 추출물은 중뇌대동맥 폐쇄 후 재관류에 의해 유발되는 뇌경색에 의한 VEGF 단백질의 발현을 유의적으로 감소시켰다.

따라서 당귀미 물추출물은 뇌 혈관 내피세포의 성장인자 발현 조절을 통해 허혈성 손상에 따른 뇌혈관장벽의 투과성 증가를 억제시킴으로써 뇌 신경세포를 보호하고 뇌경색의 발생을 막아줄 수 있는 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업(B100049) 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 2010 Causes of Death Statistics. 2011. Statistics Korea.
- 2010 National Health Insurance Statistical Yearbook. 2011. National Health Insurance Corporation, Health Insurance Review & Assessment Service.
- Son HY, Park YK. Neuroprotective effect of modified Boyanghwano-Tang and the major medicinal plants, Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix on ischemic stroke in rats. *Kor. J. Herbology* 2010 ; 25(2) : 71-9.
- Kim YS, Park DW, Lee JY. Treatment of Brain Disease I, Analysis about technology development of Treatment and Business strategies, 2005 Issue Analysis for Commercialization of promising items. Korea Institute of Science and Technology Information. 2005 : 46-7.
- Lee KY, Kim EH, Kim GH, Heo JH, Lee BI, Sunwoo IN. Effect of Brain Hypothermia on Ischemic Injury and Matrix Metalloproteinase Activity in Focal Cerebral Ischemia. *J Korean Neurol Assoc* 2003 ; 21(4) : 378-86.
- Harhaj NS, Felinski EA, Wolpert EB, Sundstrom JM, Gardner TW, Antonetti DA. VEGF Activation of Protein Kinase C Stimulates Occludin Phosphorylation and contributes to Endothelial Permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 ; 47(11) : 5106-15.
- Professors of herbology in colleges of oriental medicine. *Herbology*. Yeonglimsa : Seoul. 2004 : 632-4.
- Kim SA, Oh HK, Kim JY, Hong JW, Cho SI. A Review of Pharmacological Effects of *Angelica gigas*, *Angelica sinensis*, *Angelica acutiloba* and their Bioactive Compounds. *J Korean Oriental Med* 2011 ; 32(4) : 1-24.
- Kim HH, Lee JH, Lee JH, Ann DK, Park SK. Vasodilation effect of the water extract of three angelica species and four-substance decoctions in rat thoracic aorta. *Kor. J. Herbology*. 2011 ; 16(2) : 29-34.
- Lee YG, Kim JK. The study of the oriental medicine extract on the hair growth effect : I. The effect of the mixture extract of *Polygoni multiflori Radix*, *Angelicae gigantis Radix* and *Lycii Fructus* on the hair growth. *Kor. J. Herbology* 2004 ; 19(2) : 83-90.
- Jeon YI, Park CS, Park CG. An Experimental Study of Effect on Brain Damage and Neuroprotective Effect of *Angelicae Gigantis Radix* extract against Cerebral Ischemia in Rats. *Kor. J. Herbology* 2003 ; 18(4) : 25-35.
- Kang SY, Kim YC. Decursinol and decursin protect primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. *J Pharm Pharmacol*. 2007 ; 59(6) : 863-70.
- Kwon JM, Moon YG, Kim YS, Jung JY, Ha YL, Yang JK. Effects of Extraction Methods of Medicinal Plants on Human Growth of Neuroblastoma SK-N-SH Cells. *J Life Sci* 2011 ; 21(8) : 1190-8.
- Kang SY, Lee KY, Sung SH, Kim YC. Four new neuroprotective dihydropyranocoumarins from *Angelica gigas*. *J Nat Prod*. 2005 ; 68(1) : 56-9.
- Kang SY, Kim YC. Neuroprotective Coumarins from the Root of *Angelica gigas* : Structure-Activity Relationships. *Arch Pharm Res*. 2007 ; 30(11) : 1368-73.
- Kim YO, Ha NN, Boo YM, Park SY, Park JY, Yu YB, Shin JS, An DK, Kim H. Neuroprotective effect of *Angelica gigas* Extracts on the brain ischemia induced by four-vessel occlusion in rats. *Kor. J. Herbology* 2002 ; 17(2) : 151-7.
- Song BK, Jeon YC, Kim SA, Shim AN, Seong KM, Lee EJ. The Effect of Intravenous Injection of the Water Extract of *Angelica gigas* Nakai on Gliosis in the Middle Cerebral Artery Occlusion Rats. *J pharmacopuncture*, 2011 ; 14(3) : 5-17.
- Ahn SD, Shin KH. Study on the Constituents of *Angelica gigas* root cultivated by short-time growing seeding. *Korean J Plant Res* 1996 ; 9(2) : 197-201.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989 ; 20 : 84-91.
- The 9th Korean Pharmacopeia. Korea Food & Drug Administration. 2011 : 916-7.
- Ahn MJ, Lee MK, Kim YC, Sung SH. The simultaneous determination of coumarins in *Angelica gigas* root by high performance liquid chromatography-diode array detector coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008 ; 46 : 258-66.
- Jung MH, Lee SH, Ahn EM, Lee YM. Decursin and decursinol angelate inhibit VEGF-induced angiogenesis via suppression of the VEGFR-2-signaling pathway. *Carcinogenesis* 2009 ; 30(4) : 655-61.
- Kim JH, Kim JH, Lee YM, Ahn EM, Kim KY, Yu YS. Decursin inhibits VEGF-mediated inner blood-retinal barrier breakdown by suppression of VEGFR-2 activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009 ; 29 : 1559-567.
- Cechetto DF. Experimental cerebral ischemic

- lesions and autonomic and cardiac effects in cats and rats. *Stroke* 1993 ; 24 : 16-9
25. Sun FY, Gu X. Molecular and Cellular Mechanisms of Neuroprotection by Vascular Endothelial Growth Factor. *J Neurosci Res* 2005 ; 79 : 180-4.
  26. Hansen TM, Moss AJ, Brindle NPJ. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietins in Neurovascular Regeneration and Protection Following Stroke. *Curr Neurovasc Res*. 2008 ; 5 : 236-45.
  27. Valable S, Montaner J, Bellail A, Berezowski V, Brillault J, Cecchelli R, Divoux D, MacKenzie ET, Bernaudin M, Roussel S, Petit E. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia : both effects decreased by Ang-1. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005 ; 25 : 1491-504.
  28. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Weigand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000 ; 407 : 242-8.
  29. Zhang Z, Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia. *Trands Cardiovasc Med*. 2002 ; 12(2) : 62-66.
  30. Oh HS, Kim HH, Ahn DK, Choi HY. Comparative studies on the angiogenic activity of water extract of *Angelica Gigantis Radix*, *Angelica Sinensis Radix* and *Angelica Radix*. *Kor. J. Herbology* 2001 ; 16(2) : 19-27.