

## 허혈성 뇌졸중 흰쥐에서 당귀의 부위에 따른 뇌신경보호효과 비교 연구

신용준<sup>1#</sup>, 박용기<sup>1,2\*</sup>

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 동국대학교 한방신약개발센터

### Effects of different parts of *Angelica gigas* Nakai on brain damages and neuronal death in transient middle artery occlusion/reperfusion-induced ischemic rats

Yong-Joon Shin<sup>1#</sup>, Yong-Ki Park<sup>1,2\*</sup>

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea  
2 : Korean Medicine R&D center, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objectives** : We compared with the effects of different parts (root head, root body and hairy root) of *Angelica gigas* Nakai (Angelicae Gigantis Radix, AG) with on middle cerebral artery occlusion(MCAO)-induced ischemic rats, and on LPS-induced inflammatory response in BV2 microglia.

**Methods** : The 30% ethanol and water extracts of different parts of AG were prepared. Each extract (50 and 100 mg/kg) was administrated intraperitoneally once in MCAO-induced ischemic rats. We measured infarction volumes by TTC staining, and investigated the expression of iNOS, Bax, Bcl-2 and caspase-3 by Western blot. BV2 cells were treated with each extract for 30 min, and then stimulated with LPS. The levels of NO was measured by Griess assay. The expression of iNOS, Cox-2 and proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6) were determined RT-PCR and Western blot. The phosphorylation of ERK1/2 and JNK MAPK was determined by Western blot.

**Results** : Among different parts of AG, the 30% ethanol and water extracts of hairy root significantly decreased infarction volume in ischemic brains and inhibited the expression of iNOS, bax and caspase-3. The extracts of hairy root significantly inhibited LPS-induced production of NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 in BV2 cells, and suppressed the expression of iNOS and COX-2. The hairy root extracts attenuated LPS-induced phosphorylation of ERK1/2 and JNK MAPK in BV2 cells.

**Conclusions** : Our results indicate that the root hairy of AG has a good neuroprotective and anti-inflammatory effects in ischemic stroke compared to other parts.

**Key words** : *Angelica gigas* Nakai, Angelicae Gigantis Radix, ischemic stroke, infarction, neuroprotection, microglia, inflammation

#### 서론

뇌졸중은 국내 단일질환으로는 사망률 1위 질환으로<sup>1)</sup> 의료비 지출이 가장 많은 질환이다. 특히 뇌혈관이 좁아지거나 막혀서 산소와 영양분을 제대로 공급받지 못해 뇌가 손상되는

허혈성 뇌졸중이 국내 뇌졸중 환자의 80%에 해당하는 것으로 보고되고 있다<sup>2)</sup>. 현재 뇌졸중의 양방 치료는 뇌 허혈 발생 초기에 좁아지거나 막힌 혈관을 넓혀서 다시 혈류를 개선시키는 것으로 유로키나제(urokinase)와 같은 혈전용해제나 헤파린(heparin)과 같은 항응고제 및 아스피린과 같은 항혈소판제

\*Corresponding author : Yong-Ki Park, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Gyeongju 707, Republic of Korea

· Tel : +82-54-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

#First author : Yong-Joon Shin, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Gyeongju 707, Republic of Korea

· Tel : +82-54-770-2647 · E-mail : hubbynme@daum.net

· Received : 15 October 2014 · Revised : 24 November 2014 · Accepted : 29 November 2014

등을 사용하고 있다<sup>3)</sup>. 그러나 뇌 조직은 한 번 손상되면 다시 재생되기 어렵고 뇌졸중은 증상이 개선되었다 하더라도 뇌혈관의 손상이 그대로 남아 재발하기 쉬워서 지속적인 위험인자 조절과 함께 평생 약물을 복용하게 된다. 한편 뇌에서의 일시적인 혈액공급 장애는 신경세포 손상으로 이어지기 때문에 최근에는 신경세포사멸을 막을 수 있는 신경보호제 개발에 대한 관심이 높아지고 있으며, 혈액공급을 원활하게 하면서 신경세포 사멸의 주요 경로인 흥분성 독성과 산화적 스트레스를 함께 차단하는 다중 약리효과를 갖는 새로운 약물 개발에 대한 연구가 이루어지고 있다<sup>4)</sup>.

한방임상에서는 뇌졸중 치료를 위해 청대(清代) 왕청임(王淸任)의 의림개작(醫林改錯)에 기록된 보양환오탕(補陽還五湯)이 다용되고 있으며 당귀는 보양환오탕의 구성약물로 활혈거어(活血祛瘀) 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 당귀는 산형과(繖形科, Umbelliferae)에 속하는 다년생 초본인 당귀(중국 당귀, *Angelica sinensis*(OLIV.)의 뿌리를 건조시킨 것으로 우리나라에서는 참당귀(토당귀, *A. gigas* Nakai)를 사용하고, 일본에서는 대화당귀(大和當歸), 일명 일당귀(*A. acutiloba* Kitag.)를 사용하고 있다. 당귀는 본초학적으로 보혈화혈(補血和血), 조경지통(調經止痛), 윤조활장(潤燥滑腸)하는 효능이 있어 월경부조(月經不調), 경폐복통(經閉腹痛), 징하결괴(癥瘕結聚), 붕루(崩漏), 혈허두통(血虛頭痛), 현운(眩暈), 위비(痿痺), 장조편난(腸燥便難), 용저창양(癰疽瘡瘍), 질타손상(跌打損傷)에 응용한다<sup>5)</sup>. 특히 혈허(血虛), 혈체(血滯)로 인하여 생기는 모든 병증에 사용되어<sup>5)</sup>, 동의보감 처방 중 500회 이상, 방약합편 처방 중에 150회 이상 언급됨으로써 감초, 생강과 함께 최다 빈용 약물에 속하는 한약재이다<sup>6)</sup>. 당귀의 약용부위별 효능으로는 당귀 신(身)은 보혈(補血)하고, 미(尾)는 활혈거어(活血祛瘀)하며, 전당귀(全當歸)는 보혈화혈(補血和血)하고, 주초(酒炒)하여 응용하면 활혈작용(活血作用)을 증강한다고 알려져 있다<sup>5)</sup>. 당귀는 경약전서<sup>7)</sup>에서 "당귀(當歸) 두지혈상행(頭止血上行), 신양혈중수(身養血中守), 미파혈하류(尾破血下流) 전활혈부주(全活血不走)"라고 하였고, 본초정의<sup>8)</sup>에서는 "당귀(當歸) 신주수(身主守) 보고유공(補固有功), 귀미주통(歸尾主通), 축어자험(逐瘀自驗), 이귀두병상행지성(而歸頭乘上行之性) 변혈익혈(便血瀉血) 붕중임대(崩中淋帶)"라고 하여 약용부위별로 효능을 각각 다르게 사용하는 것으로 기재하고 있다. 참당귀의 약리효과 연구로는 참당귀의 심혈관계에서 혈관 확장 및 혈액응고 지연 효과<sup>9)</sup>, 신경계에서의 glutamate 독성에 대한 신경 보호 효과<sup>10)</sup>, 기억력 개선 효과<sup>11)</sup>, 통각 완화 효과<sup>12)</sup>, 육종, 혈액암, 전립선암, 흑색종 등의 암세포주에 대한 억제 효과<sup>13,14)</sup>, 면역 반응 조절 효과<sup>15)</sup>, hydrocortisone acetate에 의해 유발된 rat의 어혈 병태에 따른 조혈작용 증가 효과<sup>16)</sup>, TNF- $\alpha$ 와 NO 경로에 의한 염증의 억제 효과<sup>17)</sup>, 장내 세균총의 조절 효과<sup>18)</sup>, 골파괴 방지 효과<sup>19)</sup>, 고초균, 돼지 회충 등의 성장 억제 효과<sup>20)</sup>, streptozotocin에 의한 췌장 손상의 완화 효과 등이 보고되었으며<sup>21)</sup>, 다른 약재와의 조합으로서 복부대동맥 이완 효과<sup>22)</sup>, 탈모 억제 효과<sup>23)</sup> 등이 보고되었다.

따라서, 본 연구에서는 참당귀의 부위별 효과를 중뇌대동맥폐색(transient middle cerebral artery occlusion)으로 허혈성 뇌졸중이 유발된 흰쥐에서 뇌경색 억제 및 뇌 신경세포 보호효과를 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 약재

본 실험에서 사용된 당귀의 신(身), 두(頭), 미(尾)는 (주)광명당 제약(울산, 한국)에서 구입하였으며, 동국대학교 본초학과실에서 감별하고 정선한 것을 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco BRL, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA), fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL), penicillin/streptomycin(Gibco BRL), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma, St Louis, CA, USA), anti-iNOS monoclonal antibody(anti-iNOS mAb, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), anti-Cox-2 mAb(Cell signaling), goat anti-rabbit mAb(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), goat anti-mouse mAb(Santa Cruz Biotechnology), X-ray film(Kodak Co, Ltd., Tokyo, Japan), Pierce ECL Western blotting substrate(Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA), protein assay solution(BioRad Laboratories, Inc., Berkeley, CA, USA) 등이며, 본 실험에 사용된 기기로는 microplate reader(ASYS Group Asia Pte, Ltd., Hwaseong, Korea), thermal cycler(Bio-Rad Laboratories Inc), orbital shaker(Finemould Precision IN, Co, Gyeonggi-do, Korea), BioDoc It<sup>TM</sup> Imaging System(UVP, Cambridge, UK) 등을 사용하였다.

### 3. 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 체중이 260~280 g 내외의 8주령 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 (주)중앙실험동물(서울, 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 실험동물로 사용하였다. 모든 실험기간 동안 항온(22±2°C), 항습(55±5%)이 가능한 사육장에서 12시간 낮과 밤의 주기를 유지하는 환경에서 자유 섭식하도록 하였다. 구입 후 1주 동안 순화기간을 주었으며 일반 행동이상여부를 관찰하여 이상이 관찰되는 동물은 실험에 사용하지 않았다.

### 4. 세포 배양

마우스의 뇌신경교세포(microglia)인 BV2 세포는 경북대학교 의과대학으로부터 제공받았으며, 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 배양액으로 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 5. 약물 제조

당귀의 부위별 추출물을 제조하기 위하여 각 부위 200 g에 30% 에탄올 또는 물 2 L를 넣고 3시간동안 가열하여 추출하였으며, 추출액은 3겹 거즈와 왓만 필터(Whatman

No. 1)로 거른 후 진공회전증발농축기(rotary evaporator)에서 농축하였다. 농축액은 동결 건조기(freeze dryer)로 건조하여 건조엑스를 수득하였다. 이때 수득율(yield)은 당귀신, 당귀두, 당귀미 30% 에탄올 추출물이 각각 38.48%, 34.15%, 37.09%였으며, 당귀미의 물추출물은 29.1%였다. 건조된 추출물은 모두 냉장 보관하였으며 실험 직전 멸균된 생리식염수 또는 1x phosphate buffered saline(PBS)에 완전히 용해시켜 실험약물로 사용하였다.

## 6. 전뇌 허혈 동물모델 제작

일시적 중뇌대동맥폐쇄(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)와 재관류(re perfusion) 방법으로 허혈성 뇌졸중 동물모델을 제작하였다. 먼저 70% N<sub>2</sub>O와 30% O<sub>2</sub>의 혼합 기체에 5% isoflurane을 넣어 가스 마취를 실시하였으며, 수술 중에 1~1.5% 농도로 마취 상태를 유지하였고, 체온은 feedback-regulated heating pad를 이용하여 수술 과정 동안 37.0±0.5℃를 유지시켰다. 마취된 흰쥐의 전정부 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 삽입하여 중뇌대동맥이 폐쇄되도록 하였다. 나일론 수술실의 삽입부 끝은 약 0.35 mm 크기로 둥글게 말았으며 진입한 실은 진입구로 일부가 나오게 한 상태로 혈관과 함께 고정하고 수술 부위를 봉합하였다. 혈류의 재개통을 위하여 결찰(occlusion) 90분 후 나일론 수술실을 조심스럽게 제거하여 혈류를 재관류시켰다. 재관류 24시간 후 실험동물을 모두 희생시키고 생리식염수를 심장으로 관류한 후 두개골을 열어 뇌를 적출하였다.

## 7. 약물 투여

실험군은 허혈성 뇌졸중을 유발하지 않은 대조군(control), 허혈성 뇌졸중을 유발한 실험군(vehicle) 및 각 추출물을 투여한 약물 투여군으로 나누었으며, 대조군과 실험군은 추출물 대신 멸균된 생리식염수를 복강 투여하였다. 약물 투여군은 각 부위별 추출물 100 mg/kg과 200 mg/kg body weight 용량을 중뇌대동맥 폐쇄 90분 후 재관류 시키고 10분에 단회 복강 투여하였다.

## 8. 뇌경색 부피 측정

tMCAO에 의해 발생한 뇌경색의 부피를 측정하기 위해 각 군으로부터 뇌 조직을 적출한 후 뇌 형상틀(rat brain matrix, Harvard Bioscience, Inc., USA)에 넣어 2 mm 간격의 뇌 절편을 제작하였다. 만들어진 뇌 절편을 2% 2,3,5-tetrazolium chloride(TTC) 용액에 넣고 60℃에서 5분간 염색한 후 사진을 촬영하였으며, 붉게 염색되지 않는 손상부위의 면적과 염색된 정상 부위의 면적을 이미지 프로그램을 사용하여 측정하였다.

## 9. 세포독성 측정

BV2 세포에 대한 당귀 부위 별 추출물의 세포독성을 조사하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. 즉, BV2 세포(1×10<sup>5</sup> cell/ml)를 24-well plate에 분주하여 하룻밤 배양한 후 당귀 부위 별 추출물을 농도 별 처리하였다. 이를 24시간 배양한 후 MTT 용액(5 mg/ml)을 넣고 37℃ CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 반응시켰다. 이후 세포 배양액을 모두 제거하고 각 well에 DMSO를 넣어 10분간 반응시킴으로써 형성된 보라색의 formazan을 완전히 용해시켰다. 반응액의 발색 정도를 흡광도 측정기(microplate reader)를 이용하여 590 nm에서 측정하였으며, 세포생존율(cell viability, %)은 세포만 배양한 경우 세포생존율을 100%로 하여 약물 처리군의 생존율을 상대적으로 계산하였다.

## 10. Nitric oxide(NO) 측정

BV2 세포로부터 생성되는 NO의 농도를 측정하기 위해 Griess assay를 수행하였다. 즉, BV2 세포(1×10<sup>5</sup> cell/ml)를 24-well plate에 분주하여 하룻밤 배양한 후 당귀 부위 별 추출물을 농도 별 처리하여 30분간 배양하였다. 여기에 LPS(1 μg/ml)를 처리하여 24시간 배양한 후 세포배양액을 수거하였다. 세포배양액 100 μl에 1% sulfanilamide 용액 50 μl와 2.5% phosphoric acid에 녹인 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride 용액 50 μl씩 넣은 후 반응액의 발색 정도를 흡광도 측정기를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 세포배양액 내 NO의 농도는 nitrite 표준용액으로부터 도출된 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

## 11. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

BV2 세포에서 염증물질들의 유전자 발현을 조사하기 위해서 RT-PCR을 수행하였다. BV2 세포(1×10<sup>5</sup> cell/ml)를 6-well plate에 분주하여 하룻밤 배양한 후 당귀 부위 별 추출물을 농도 별 처리하여 30분간 배양하였다. 여기에 LPS(1 μg/ml)를 처리하여 5시간 배양한 후 세포를 수거하였다. 각 세포로부터 Trizol reagent를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 유전자 합성을 위해서 분리된 total RNA 1 μg에 0.5 mM deoxynucleotide triphosphate(dNTP), 2 μM oligo-dT primer, 1× reverse transcriptase buffer, 5 units AMV reverse transcriptase, 5 U RNase inhibitor(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)를 넣고 42℃에서 1시간 동안 반응시킴으로써 cDNA를 합성하였다. PCR을 위해 cDNA를 template(<1000 ng, 표1)로 각 유전자의 primers (forward, reverse; 10 μM)와 10X Standard Taq Reaction Buffer, 10 mM dNTPs, Taq DNA Polymerase (0.5 units/20 μl PCR) 등을 넣고 94℃ 30초, 58~62℃ 30초, 72℃ 40초를 30회 반복 수행하였다. 합성된 PCR product는 DNA loading dye(PhileKorea, Daejeon, Korea)로 염색하여 ethidium bromide (EtBr)가 함유된 1.5% agarose gel에 전기영동 한 후 UV 발광기를 이용하여 밴드 유무를 확인하였다.

Table 1. Primers for RT-PCR

Name		Sequences
iNOS	sense	5'-ATG TCC GAA GCA AAC ATC AC
	anti-sense	5'-TAA TGT CCA GGA AGT AGG TG-3'
Cox-2	sense	5'-CAG CAA ATC CTT GCT GTT CC-3'
	anti-sense	5'-TGG GCA AAG AAT GCA AAC ATC-3'
TNF- $\alpha$	sense	5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC-3'
	anti-sense	5'-TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT-3'
IL-1 $\beta$	sense	5'-ATG AGG ACA TGA GCA CCT TC-3'
	anti-sense	5'-CAT TGA GGT GGA GAG CTT TC-3'
IL-6	sense	5'-AGT TGC CTT CTT GGG ACT GAT-3'
	anti-sense	5'-TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC-3'
GAPDH	sense	5'-CTC GTG GAG TCT ACT GGT GT-3'
	anti-sense	5'-GTC ATC ATA CTT GGC AGG TT-3'

## 12. Western blot

BV2 세포에서 염증물질들의 단백질 발현을 조사하기 위해서 Western blot을 수행하였다. BV2 세포( $1 \times 10^5$  cell/ml)를 6-well plate에 분주하여 하룻밤 배양한 후 당귀 부위 별 추출물을 농도 별 처리하여 30분간 배양하였다. 여기에 LPS( $1 \mu\text{g/ml}$ )를 처리하여 5시간 배양한 후 세포를 수거하였다. 각 세포를  $1 \times$  PBS로 3회 씻은 후 lysis buffer(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF,  $1 \mu\text{g/ml}$  aprotinin)를 이용해서 완전히 용해시켰다. 한편 NF- $\kappa$ B의 세포 핵(nuclear)과 세포질(cytosol)에서의 발현 변화를 확인하기 위해서 수거된 세포를 NE-PER<sup>TM</sup> nuclear & cytoplasmic extraction kit(Pierce, IL, USA)를 이용하여 핵과 세포질을 분리하였다. 각 세포로부터 분리된 단백질의 농도를 protein assay 용액으로 정량한 후 30~50  $\mu\text{g}$  단백질을  $6 \times$  sample buffer(50% glycerol, 10% SDS, 1M Tris-HCl, pH 6.8, 2-mercaptoethanol, 1% BPB)와 섞어 12% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 겔의 단백질을 나일론 막(nylon membrane)으로 전이시킨 후 각 membrane내 단백질과 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 5% skim milk로 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응을 끝낸 membrane에 각 단백질에 대한 1차 항체와 4°C에서 하룻밤 반응시켰으며, 이를 0.05% Tween이 함유된 1x tris buffered saline(TBS)로 3회 세척하였다. 이를 다시 2차 항체인 anti-IgG conjugated HRP와 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.05% Tween이 포함된 1x TBS로 3회 세척하고 ECL 용액을 이용하여 x-ray film에 감광시킴으로써 단백질 밴드를 확인하였다.

## 13. 통계처리

모든 결과는 모든 개체 수에 대한 평균(mean)  $\pm$  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, P 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 뇌경색 부피 감소에 대한 효과

중뇌대동맥 폐쇄로 뇌경색이 유발된 뇌 조직의 뇌경색 발생에 대한 당귀 부위별 추출물의 억제효과를 비교하기 위해서 뇌 조직을 TTC 염색하였다. 그 결과, 허혈성 뇌졸중이 유발된 대조군(vehicle)에서는 뇌경색의 부피가  $26.8 \pm 3.3\%$ 로 측정되었으며, 당귀신의 30% 에탄올추출물을 50, 100 mg/kg 투여한 군에서는 각각  $25.8 \pm 3.7\%$ ,  $25.1 \pm 2.7\%$ , 당귀미의 30% 에탄올추출물을 투여한 군은  $24.5 \pm 2.5\%$ ,  $23.1 \pm 4.6\%$ , 당귀미의 30% 에탄올추출물을 투여한 군은  $20.1 \pm 2.7\%$ ,  $18.1 \pm 4.5\%$ , 당귀미의 물추출물을 투여한 군은  $17.8 \pm 2.7\%$ ,  $10 \pm 3.6\%$ 로 측정되었다. 따라서 뇌경색의 부피는 당귀미 30% 에탄올추출물과 물추출물 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 감소를 나타내었으며, 당귀미의 30% 에탄올추출물에서 보다 물추출물이 더 효과적으로 뇌경색의 부피를 감소시키는 것으로 나타났다(Fig 1).

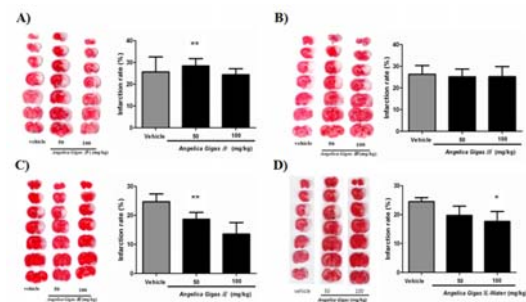


Fig. 1. Effects of different parts of *Angelica gigas* on the infarct volume in tMCAO-induced ischemic rats. The brain sections were stained with 2% TTC solution, and then infarct volumes were measured. (A,B,C) 30% ethanol extracts of the head, body, and root, respectively, and (D) water extracts of the root. Data is presented the percentage of hemisphere volumes (means  $\pm$  SD,  $n=10$  per a group). \* $P<0.05$  and \*\* $P<0.01$  compared to the vehicle.

### 2. 신경세포사멸유도 단백질 발현에 대한 억제 효과

중뇌대동맥 폐쇄로 뇌경색이 유발된 뇌 조직에서 신경세포 사멸에 대한 당귀 부위별 추출물의 억제효과를 비교하기 위해서 뇌 조직으로부터 단백질을 분리하여 Western blot을 수행하였다. 그 결과, 허혈성 뇌졸중이 유발된 대조군(vehicle)의 뇌 조직에서는 세포사멸유도 단백질인 Bax와 caspase-3의 발현이 현저히 증가되었으며, 세포생존유도 단백질인 Bcl-2의 발현은 현저히 감소되었다. 또한 허혈성 뇌졸중이 유발된 흰쥐에 당귀 부위 별 30% 추출물 및 당귀미 물추출물을 50과 100 mg/kg 용량으로 투여하였을 때 당귀미의 30% 에탄올추출물과 물추출물 투여군에서 Bax와 caspase-3의 발현이 감소되고, Bcl-2의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 한편 염증단백질인 iNOS의 발현에서도 당귀 부위 중 당귀미의 추출물들에서 현저히 억제되는 것으로 나타났다(Fig 2). 따라서 당귀의 부위 중 당귀미가 뇌 조직에서 허혈성 손상에 따른 신경세포의 사멸을 막고 생존을 증가시키며 염증을 억제하는데 가장 효과적인 것으로 나타났다.

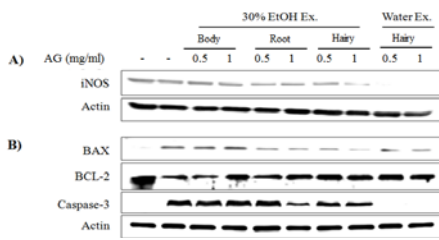


Fig. 2. Effects of different parts of *Angelica gigas* on the expression of iNOS, BAX, BCL-2 and Caspase-3 in the brain tissues of tMCAO-induced ischemic rats. Brain tissues were lysed for protein isolation, and the expression of each protein was determined by Western blot. AG, *Angelica gigas*.

### 3. 신경교세포에서의 세포독성 평가

BV2 세포에 대한 당귀 부위 별 30% 에탄올추출물과 물추출물의 세포독성 정도를 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 당귀신, 당귀두, 당귀미의 30% 에탄올추출물은 모두 1 mg/ml 농도까지 독성이 나타나지 않았으며, 당귀미의 물추출물에서도 1 mg/ml 농도까지 독성이 나타나지 않았다(Fig. 3). 따라서 이후 실험에서는 독성이 나타나지 않는 1 mg/ml 농도 이내에서 수행하였다.

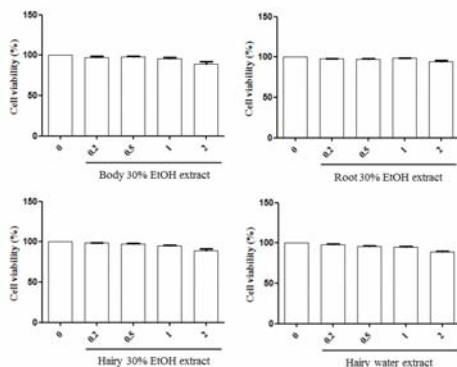


Fig. 3. Effects of different parts of *Angelica gigas* on the cell viability in BV2 cells. Cells were treated with each extracts with indicated concentrations for 24 h and then the cell viability was measured by MTT assay. Values are means±SD of three independent experiments.

### 4. 신경교세포에서의 NO 생성에 대한 억제 효과

LPS 자극에 의해 활성화된 BV2 세포로부터 다량 분비되는 염증물질인 NO에 대한 당귀 부위 별 30% 에탄올추출물 및 물추출물의 억제정도를 비교하기 위해 Griess assay를 수행하였다. 그 결과, 세포배양액 내 NO의 농도는 세포만 배양한 경우 매우 낮게 측정되었으며, LPS 자극에 의해 증가하는 것으로 나타났다. 또한 당귀신의 30% 에탄올추출물에서는 NO의 농도가 유의적으로 감소하지 않았으며, 당귀두와 당귀미의 30% 에탄올추출물 및 당귀미의 물추출물을 처리하였을 때 농도에 의존적으로 유의적으로 감소하였다(Fig. 4). 따라서 활성화된 신경교세포로부터 분비되는 NO는 당귀 부위 중 당귀미가 가장 효과적인 감소를 나타내었다.

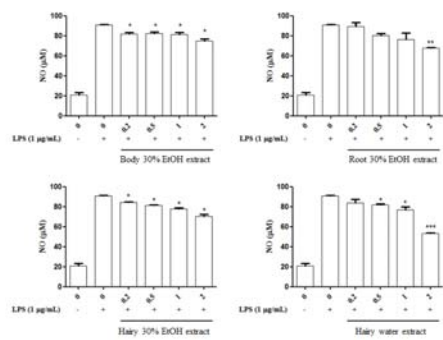


Fig. 4. Effects of different parts of *Angelica gigas* on LPS-induced NO production in BV2 cells. Cells were treated with each extracts with indicated concentrations for 30 min and then stimulated with LPS for 24 h. NO was determined in culture supernatant by Griess reagent. Data are means±SD of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  vs. LPS alone. AG, *Angelica gigas*.

### 5. 신경교세포에서의 iNOS 발현에 대한 억제 효과

LPS 자극에 의해 활성화된 BV2 세포로부터 다량 분비되는 NO의 합성효소인 iNOS 발현에 대한 당귀 부위 별 30% 에탄올추출물 및 물추출물의 억제정도를 비교하기 위해 RT-PCR과 Western blot을 수행하였다. 먼저 iNOS의 유전자 발현은 세포만 배양한 경우 매우 낮았으며, LPS 자극에 의해 증가되었고, 당귀의 부위 중 당귀미의 30% 에탄올추출물과 물추출물 처리군에서 억제되었으며 30% 에탄올추출물에서 보다 물추출물에서 더욱 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 5A). 한편 iNOS의 단백질 발현에서도 유전자 발현에서와 유사하게 당귀미의 30% 에탄올추출물과 물추출물 처리군에서 억제되었으며 물추출물이 30% 에탄올추출물 보다 더욱 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 5B). 따라서 활성화된 신경교세포로부터 유도되는 iNOS의 유전자와 단백질의 발현은 당귀미추출물에 의해 억제되고 이는 당귀미 물추출물이 iNOS의 발현 억제를 통해 NO의 합성과 분비를 감소시킴을 의미한다.

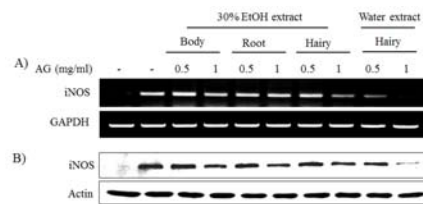


Fig. 5. Effects of different parts of *Angelica gigas* on LPS-induced iNOS expression in BV2 cells. Cells were treated with each extracts with indicated concentrations for 30 min and then stimulated with LPS for 3 h (for PCR) or 24 h (for Western blot). The expression of iNOS mRNA (A) and protein (B) was determined by RT-PCR and Western blot, respectively. AG, *Angelica gigas*.

### 6. 신경교세포에서의 Cox-2 발현에 대한 억제 효과

LPS 자극에 의해 활성화된 BV2 세포로부터 발현되는 염증단백질인 Cox-2 발현에 대한 당귀 부위 별 30% 에탄올추출물 및 물추출물의 억제정도를 비교하기 위해 RT-PCR과 Western blot을 수행하였다. 먼저 Cox-2의 유전자 발현은 세포만 배양한 경우 거의 나타나지 않았으며, LPS 자극에 의



해 현저히 증가되었고, 당귀의 부위 중 당귀미의 30% 에탄올추출물과 물추출물 처리에 의해 억제되었으며 물추출물이 30% 에탄올추출물에 비해 더욱 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 6A). 또한 Cox-2의 단백질 발현에서도 유전자 발현과 유사하게 당귀미의 30% 에탄올추출물과 물추출물 처리군에서 억제되었으며 물추출물이 30% 에탄올추출물 보다 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 6B). 따라서 활성화된 신경교세포로부터 발현되는 Cox-2의 억제효과는 당귀 부위 중 당귀미가 가장 효과적인 것으로 나타났다.

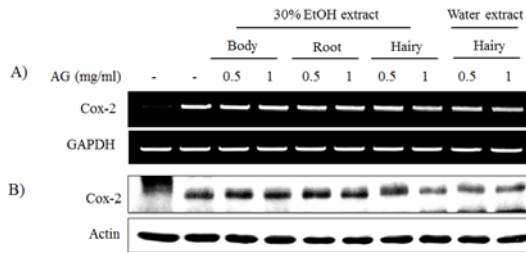


Fig. 6. Effects of different parts of *Angelica gigas* on LPS-induced Cox-2 expression in BV2 cells. Cells were treated with each extracts with indicated concentrations for 30 min and then stimulated with LPS for 3 h (for PCR) or 24 h (for Western blot). The expression of Cox-2 mRNA (A) and protein (B) was determined by RT-PCR and Western blot, respectively. AG, *Angelica gigas*.

### 7. 신경교세포에서의 염증성 사이토카인 발현에 대한 억제 효과

LPS 자극에 의해 활성화된 BV2 세포로부터 발현되는 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 발현에 대한 당귀 부위 별 30% 에탄올추출물 및 물추출물의 억제정도를 비교하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 세포만 배양한 경우 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 유전자의 발현은 모두 매우 낮았으며, LPS 자극에 의해 증가되었다. 또한 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 유전자 발현은 당귀미의 30% 에탄올추출물과 물추출물 처리에 의해 감소되었으며, IL-1 $\beta$ 의 발현은 영향을 받지 않았다. 따라서 활성화된 신경교세포로부터 발현되는 염증성 사이토카인의 발현 억제는 당귀 부위 중 당귀미가 가장 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 7).

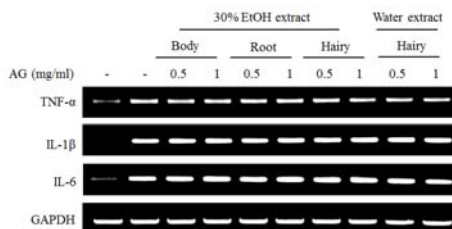


Fig. 7. Effects of different parts of *Angelica gigas* on LPS-induced Cox-2 expression in BV2 cells. Cells were treated with each extracts with indicated concentrations for 30 min and then stimulated with LPS for 3 h. The expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 mRNA was determined by RT-PCR. AG, *Angelica gigas*.

### 8. 신경교세포에서의 염증신호전달 경로에 대한 조절 효과

BV2 세포로부터 LPS 자극에 의해 활성화되는 염증신호전달 경로에 대한 당귀 부위 별 30% 에탄올추출물 및 물추출물의 억제효과를 비교하기 위해 ERK1/2와 JNK MAP kinase (MAPK) 분자들의 인산화를 Western blot 방법으로 확인하였다. 먼저, ERK1/2와 JNK MAPK의 인산화는 LPS 자극에 의해 증가되었으며 ERK1/2의 인산화는 당귀두와 당귀미의 30% 에탄올추출물에 의해 억제되었고, JNK의 인산화는 당귀두와 당귀미의 30% 에탄올추출물 및 당귀미의 물추출물에 의해 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 활성화된 신경교세포로부터 MAPK 분자들의 인산화는 당귀 부위 중 당귀미가 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 8).

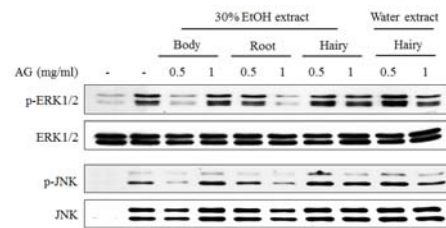


Fig. 8. Effects of different parts of *Angelica gigas* on LPS-induced phosphorylation of ERK1/2 and JNK MAPK in BV2 cells. Cells were treated with each extracts with indicated concentrations for 30 min and then stimulated with LPS for 15 min. The phosphorylation of ERK1/2 and JNK MAPK was determined by Western blot. AG, *Angelica gigas*.

## 고찰

현재 뇌졸중의 양방치료는 뇌 허혈 초기에 줄아지거나 막힌 혈관을 넓혀서 다시 혈류를 개선시키기 위한 것으로 혈전용해제(tPA)나 항응고제 및 항혈소판제 등을 사용하고 있다<sup>3)</sup>. 그러나 혈전용해제의 경우 뇌가 막힌 지 약 4시간 이내 투여해야 치료효과가 있으며, 뇌 조직은 한 번 손상되면 다시 재생되기 어렵고 현재 마땅한 치료제가 없는 실정이다. 따라서 최근에는 혈액공급을 원활하게 하면서 신경세포사멸의 주요 경로인 흥분성 독성이나 산화적 스트레스를 동시에 차단할 수 있는 다중약리기전의 약물개발 연구가 주목받고 있다.

당귀는 중풍 빈용처방 중 하나인 보양환오탕의 구성약물로써 본초학적으로 미(味)가 감신(甘辛)하고, 성(性)이 온(溫)하며, 감미(甘味)는 보(補)하고, 신미(辛味)는 산(散)하며, 온성(溫性)은 통기(通氣)하게 하여 보혈활혈(補血活血)하고 행기止痛(行氣止痛)하는 효능이 있어 심(心), 간(肝), 비(脾)의 삼경(三經)에 작용하여 모든 혈증(血證)을 치료하는 약재로 알려져 있다<sup>5)</sup>. 우리나라에서 당귀로 통용되는 약재는 참당귀(*Angelica gigas* N.)의 뿌리로서<sup>5)</sup> 지용성 성분인 coumarin 계열(decursin, decursinol angelate, umbelliferone, nodakenin, peucedanone, marmesin, demethylsuberosin, isoimperatorin), 수용성 성분인 polysaccharide 등의 성분을 함유하고 있다<sup>21)</sup>. 참당귀의 주요 성분인 decursin<sup>24,25)</sup>은 신경세포 보호효과가 뛰어난 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라<sup>26-28)</sup>, 혈액망막장벽(blood-retina barrier; BRB)과 인간 태줄혈관내피세포(human umbilical vascular endothelial cell line), 병아리의 배반막 혈관신생, 생쥐 암종에서 혈관내피세포성장인자인 VEGF receptor-2 기전을 억제하는 것으로 알려져 있다

<sup>29,30)</sup>. 한편 당귀의 약용부위별 효능으로 당귀의 신(身)은 보혈(補血)하고, 미(尾)는 활혈거어(活血祛瘀)하며, 전당귀(全當歸)는 보혈화혈(補血和血)한다고 알려져 있다<sup>5)</sup>. 또한 당귀미는 decursin 등 주요 약리활성성분의 함유량이 당귀신에 비하여 높으며<sup>25)</sup>, 이는 동일한 중량의 약재를 사용할 때 decursin 등의 약리 효능이 당귀신에 비하여 당귀미에서 더욱 강하게 나타날 수 있음을 의미한다. 당귀의 품종별 약리효능에 대하여는 증약대사전<sup>31)</sup>에 우리나라 참당귀(*Angelica gigas Nakai*)는 토당귀(土當歸)라는 약명으로 실려 있는데 보혈하는 효능은 없으며 제풍화혈(除風和血)하는 효능만 있다고 하였다. 참당귀의 실험연구로는 허혈성 뇌졸중에서의 신경보호 효과<sup>10,11,26-28)</sup> 및 성장교세포 활성화 억제효과<sup>32)</sup>가 보고되었으며, 본 논문에서와 같은 부위별 약리효능에 대한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 보혈작용보다는 활혈작용 효과가 있는 것으로 알려진 참당귀의 부위별 효능을 비교해보기 위해 각 부위의 30% 에탄올추출물과 당귀미의 물추출물을 제조하여 중뇌대동맥폐색으로 허혈성 뇌졸중이 유발된 흰쥐에 투여한 후 뇌조직에서의 뇌경색 발생 및 신경세포사멸 억제 효능과 뇌 염증유발 주요 세포인 뇌신경교세포에서의 항염증 약리기전을 조사하였다.

일시적 중뇌대동맥 폐쇄(tMCAO)에 의한 허혈성 뇌손상 흰쥐모델은 급성 허혈성 뇌졸중의 실험동물모델로서 허혈 유발 후 뇌의 중심부에서 신경세포들이 산발적으로 죽어 나가게 되며, 폐색 후 1시간이면 중심부로부터 괴사가 일어나고, 3시간이 경과하면 뇌경색이 시작되며, 24시간이 되면 뇌경색이 마무리되어 3일째 최대에 이르게 된다<sup>4)</sup>. 이때 뇌경색 중심부에서는 대부분 괴사성 세포사멸이 일어나지만 주변부(penumbra)는 지연성 세포사멸이 유발되는 것으로 알려져 있다. 이 모델은 임상적으로 중풍환자의 병태생리와 유사하고 행동양상이 비슷한 특징이 있어서 사람의 중풍 실험모델로 널리 사용되고 있다. 또한 국소적 뇌경색이 유발되면 수 분 내에 내피 부종으로 인해 모세혈관 내경이 좁아지게 되며 무산소성 에너지 대사 산물인 젖산이 축적되는데 이는 혈관내피세포, 신경세포 및 신경아교세포의 세포부종을 초래함으로써 뇌경색을 유발하게 된다. 또한 뇌-혈관장벽(Blood-brain barrier)의 손상으로 관류장애에 따른 뇌혈관 손상과 신경세포 사멸로 이어지게 된다<sup>32)</sup>. 본 연구에서는 당귀의 부위 별 허혈성 뇌손상에 따른 신경보호효과를 확인하기 위해 일시적 중뇌대동맥 폐쇄에 의한 허혈성 뇌손상 흰쥐모델을 제작하였으며, 당귀 추출물들의 투여에 의한 뇌경색 부피 감소 및 신경세포사멸 억제효과를 비교하였다. 그 결과 당귀 부위 중 당귀미가 가장 효과적으로 뇌경색 부피를 감소시키고 신경세포사멸 단백질(Bax, caspase-3)의 발현과 염증 단백질(iNOS)의 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 다만, 당귀는 활혈작용을 증가시키기 위하여 주초(酒炒)하거나 술로 추출하는 것으로 문헌에 기재되어 있어 30% 에탄올 추출물로 실험하였으나, 물추출물에서도 유사한 효과가 있는 것을 확인하였다.

한편, 정상상태의 뇌에서는 astrocyte와 microglia와 같은 신경교세포들(glial cells)이 신경세포의 분화에 필요한 영양인자와 사이토카인을 미량 분비함으로써 뇌의 항상성을 유지하는데 기여하게 된다. 그러나 일단 물리적 뇌손상이나 감염, 염증반응 등의 자극에 의해 뇌혈관장벽이 손상을 받게 되면 이를 통해 외부의 면역세포들이 중추신경계로 침입하게 되고

신경교세포들이 활성화되어 NO, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등 각종 염증물질을 과도하게 생성함으로써 신경세포사멸이 촉진되게 된다<sup>33)</sup>. 특히 뇌의 염증반응은 뇌졸중을 포함하여 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환의 발병과도 밀접하게 연관되는데 microglia는 이러한 염증반응을 매개하는 대표적인 세포로서 뇌 손상 시에 활성화되어 NO, TNF- $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 등 각종 염증물질 및 염증성 사이토카인들을 분비함으로써 신경세포사멸의 원인으로 작용하게 된다<sup>34)</sup>. 한편 MAPK 분자들인 ERK1/2, p38 MAPK, JNK/SAPK, ERK5는 세포성장과 분화조절, 사이토카인과 스트레스에 대한 반응 조절에 중요하나 역할을 한다. 또한 microglia에서의 MAPK 분자들의 활성화는 NF- $\kappa$ B 경로 활성화를 통해 염증신호체계를 작동시킴으로써 염증물질과 염증성 사이토카인들의 합성을 유도하고, 염증반응에 따른 뇌 조직손상과 신경세포 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>35)</sup>. 따라서 microglia의 활성화를 어떻게 조절하는지 이해하고 활성화된 microglia로부터 분비되는 염증물질들을 억제시키는 것은 다양한 원인으로부터 발생한 뇌졸중에서의 신경세포 손상을 막는 유효한 치료방법이 될 수 있다. 본 연구에서 당귀의 부위 별 microglia의 활성화로부터 분비되는 각종 염증물질에 대한 억제효과를 비교한 결과 당귀미 추출물이 가장 효과적인 것으로 나타났으며 이는 당귀미 추출물의 microglia 활성억제를 통한 염증조절 효과가 허혈성 뇌졸중 동물에서의 뇌경색 부피 감소와 신경세포사멸 억제 효과와 연관된다는 것을 의미한다. 결론적으로 이와 같은 연구결과로부터 참당귀를 활혈거어 작용으로 사용할 때에는 당귀미 부분을 사용하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

## 결론

본 연구에서는 참당귀의 부위 별 허혈성 뇌졸중에서의 신경보호 및 염증억제 효과를 중뇌대동맥폐쇄(tMCAO)-유도 허혈성 뇌졸중 흰쥐 동물모델과 LPS-유도 BV-2 microglia 활성화 세포모델에서 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 참당귀 부위 중 당귀미는 허혈성 뇌졸중 흰쥐에서 뇌경색의 부피를 유의적으로 감소시켰으며, 뇌조직에서 Bax와 Caspase-3의 발현을 억제하고, Bcl-2의 발현을 증가시킴으로써 신경세포를 보호하는 것으로 나타났다.
2. 참당귀 부위 중 당귀미는 BV2 세포에서 LPS 자극에 의해 분비되는 NO를 유의적으로 감소시켰으며, TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS, Cox-2의 발현을 감소시킴으로써 염증물질 분비 억제효과를 나타내었다.
3. 참당귀 부위 중 당귀미는 BV2 세포에서 LPS 자극에 의해 활성화되는 ERK1/2와 JNK MAPK 분자들의 발현을 감소시킴으로써 염증신호전달체계의 작동을 억제하는 것으로 나타났다.

따라서 참당귀 부위 중에서는 당귀미가 허혈성 뇌손상에 따른 뇌경색의 발생과 신경세포사멸을 억제하고, microglia의

활성화에 따른 염증물질분비를 감소시킴으로써 허혈성 뇌졸중 개선에 가장 효과적인 것으로 나타났다.

## References

- Causes of Death Statistics, Statistics Korea, 2011.
- National Health Insurance Statistical Yearbook, National Health Insurance Corporation, Health Insurance Review & Assessment Service, 2011.
- 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.
- Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW. Very delayed infarctoin after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 ; 16(2) : 195-201.
- Professors of herbology in colleges of oriental medicine. *Herbology.* Seoul : Yeonglimsa, 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.
- Jang GB. Gyeong-Ak-jeon-Seo. Seoul : Dae-Seong Munhwasa, 1998 : 356.
- An Sy, Kim SI by edited translation. Jang Sui. medical herbs justice(Bonchojeongui). Seoul : Cheong-Hong publishing company, 2009 : 375.
- Kim HH, Lee JH, Lee JH, Ahn DK, Park SK. Vasodilation effect of the water extract of three *Angelica* species and four-substance decoctions in rat thoracic aorta. *Korean J Herbology.* 2001 ; 16(2) : 29-34.
- 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.
- 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. *Korean J Herbology.* 2003 ; 18(4) : 25-35.
- Choi SS, Han KJ, Lee HK, Han EJ, Suh HW. Antinociceptive profiles of crude extract from roots of *Angelica gigas* Nakai in various pain models. *Biol Pharm Bull.* 2003 ; 26(9) : 1283-8.
- Guo J, Jiang C, Wang Z, Lee HJ, Hu H, Malewicz B, Lee HJ, Lee JH, Baek NI, Jeong JH, Kim DK, Kang KS, Kim SH, Lu J. A novel class of pyranocoumarin anti-androgen receptor signaling compounds. *Mol Cancer Ther.* 2007 ; 6(3) : 907-17.
- Ahn KS, Sim WS, Lee IK, Seu YB, Kim IH. Decursinol angelate: a cytotoxic and protein kinase C activating agent from the root of *Angelica gigas*. *Planta Med.* 1997 ; 63(4) : 360-1.
- Han SB, Kim YH, Lee CW, Park SM, Lee HY, Ahn KS, Kim IH, Kim HM. Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacolo.* 1998 ; 40(1) : 39-48.
- Song SH, Seo BI, Kim HK, Park JH. The effects of *Angelicae gigantis radix*, *Angelicae acutilobae radix* and *Angelicae sinensis radix* extract on hydrocortisone acetate-induced model of blood stasis. *Korean J Herbology.* 2004 ; 19(1) : 13-21.
- Shin S, Jeon JH, Park D, Jang JY, Joo SS, Hwang BY, Choe SY, Kim YB. Anti-inflammatory effects of an ethanol extract of *Angelica gigas* in a carrageenan-air pouch inflammation model. *Exp Anim.* 2009 ; 58(4) : 431-6.
- Kim JD, Kim MY, Ahn CB, Seo HJ, Kim BJ, Seo JK, Kim JS, Kong JY. The growth promotion effect of useful enterobacteria *Bifidobacterium adolescentis* KCTC 3216 by combination of natural products bearing antioxidative capacity. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 2002 ; 17(4) : 388-95.
- Deng S, Wang Y, Inui T, Chen SN, Farnsworth NR, Cho S, Franzblau SG, Pauli GF. Anti-TB polyynes from the roots of *Angelica sinensis*. *Phytother Res.* 2008 ; 22(7) : 878-82.
- Lee S, Shin DS, Kim JS, Oh KB, Kang SS. Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. *Arch Pharm Res.* 2003 ; 26(6) : 449-52.
- 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* spicies 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.
- 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.
25. Ryu KS, Hong ND, Kim NJ, Kong YY. Studies on the Coumarin Constituents of the Root of *Angelica gigas* Nakai -Isolation of decursinol angelate and assay of decursinol angelate and decursin. Kor J Pharmacogn. 1990 ; 21(1) : 64-8.
  26. 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.
  27. Kang SY, Lee KY, Sung SH, Kim YC. Four new neuroprotective dihydropyranocoumarins from *Angelica gigas*. J Nat Prod. 2005 ; 68(1) : 56-9.
  28. Kang SY, Kim YC. Neuroprotective Coumarins from the Root of *Angelica gigas*: Structure-Activity Relationships. Arch Pharm Res. 2007 ; 30(11) : 1368-73.
  29. 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.
  30. 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(9) : 1559-67.
  31. Kim CM, Shin MG, Lee GS, Ahn DG by edited translation. Kangsosinghakwon, complete translation of chinese medicine Unabridged Dictionary. Seoul : Jeong-Dam publishing company. 1998 : 5688-9.
  32. 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.
  33. Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. J Neurosci. 1999 ; 19(9) : 3440-7.
  34. Gonzalez-Scarano F, Baultuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative disease. Annual Rev Neurosci. 1999 ; 22 : 219-40.
  35. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. Biochim Biophys Acta. 2010 ; 1802(4) : 396-405.