

## 桑白皮 메탄올 추출물 전처치가 일과성 허혈에 의한 생쥐의 뇌 손상에 미치는 영향

정병우<sup>1#</sup>, 임재유<sup>1</sup>, 이세은<sup>1</sup>, 이병호<sup>2</sup>, 임세현<sup>3</sup>, 임지연<sup>4</sup>, 조수인<sup>1\*</sup>

1 : 부산대학교 한의학전문대학원, 2 : 홍재한의원, 3 : 극동대학교 의료보건과학대학, 4 : 동국대학교 의과대학

### A study of the Mori Radicis Cortex pre-treatment on transient ischemic brain injury in mice

Byung-Woo Chung<sup>1#</sup>, Jae-Yu Lim<sup>1</sup>, Se-Eun Lee<sup>1</sup>, Byoung-ho Lee<sup>2</sup>, Sehyun Lim<sup>3</sup>,  
Chiyeon Lim<sup>4</sup>, Suin Cho<sup>1\*</sup>

1 : School of Korean Medicine, Pusan National University, 2 : Hongjae Korean Medicine Clinic,  
3 : School of Public Health, Far East University, 4 : College of Medicine, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objectives** : Mori Radicis Cortex (MRC), the root epidermis of *Morus alba* L., has been traditionally used to treat lung-related diseases in Korean Medicine. The common of MRC is Mulberry bark Morus bark, and its pharmaceutical properties and taste are known as sweet and cold, and it promotes urination and reduce edema by reducing heat from the lungs and soothe asthma. In the present study, anti-apoptotic mechanism of MRC in middle cerebral artery occlusion (MCAO) model in mice.

**Methods** : Two-hundred grams of MRC was extracted with methanol at room temperature for 5 days, and this was repeated one time. After filtration, the methanol was removed using vacuum evaporator, then stored at -20°C until use. C57BL/6 male mice were housed in an environment with controlled humidity, temperature, and light cycle. In order to determine beneficial effects of MRC on ischemia induced brain damage, infarct volume, neurological deficit scores, activities of several apoptosis-related proteins such as caspase-8, -9, Bcl-xL in MCAO-induced brains of mice were analyzed. Mice in MRC-treated groups were orally administered 30, 100, or 300 mg/kg of body weight for three consecutive days before commencing the MCAO procedure.

**Results** : Pre-treatment of MRC significantly reduced infarct volume in MCAO subjected mice applied with 300 mg/kg of MRC methanol extract, and MRC effectively inhibited Bcl-xL reduction and caspase-9 activation caused by MCAO-induced brain damage.

**Conclusions** : MRC showed neuro-protective effects by regulating apoptosis-related protein signals, and it can be a potential candidate for the therapy of ischemia-induced brain damage.

**Key words** : Mori Radicis Cortex, middle cerebral artery occlusion, cerebral blood flow.

\*Corresponding author : Suin Cho, Division of Pharmacology, School of Korean Medicine, Yangsan Campus of Pusan National University.

· Tel : +82-51-510-8457 · E-mail : sicho@pusan.ac.kr

#First author : Byung-Woo Chung, Department of Korean Medicine, School of Korean Medicine, Yangsan Campus of Pusan National University.

· Tel : +82-51-510-8457 · E-mail : jbw85ds@naver.com

· Received : 10 December 2016 · Revised : 28 December 2016 · Accepted : 15 January 2017

## I. 서 론

뇌졸중은 영구적인 장애를 남기는 주요 질병 중 하나로 재활 치료 또는 장기간의 요양을 필요로 하며, 환자 관리를 위한 의료비 부담이 큰 특징으로 인해 의료계의 주요 관심 질환 중 하나이다. 더구나 발생 연령은 점점 더 낮아지는 추세를 보이고 있는데, 식습관 및 생활 습관의 변화로 인해 비만, 고혈압, 당뇨 등과 같은 질병의 유병률이 높아짐으로 인해 뇌혈관 질환 또한 증가하는데 기인한 것으로 추정되며, 이러한 뇌졸중 환자의 약 80%가 허혈로 인한 뇌경색인 것으로 분석되고 있다.<sup>1,2)</sup>

허혈에 이은 재관류에 의해 유발되는 뇌 손상인 뇌경색은 뇌 혈관에서의 국소적인 혈행의 장애와 이로 인해 뇌 조직을 구성하는 세포들의 손상과 죽음을 일으키게 된다.<sup>3,4)</sup> 뇌경색 연구에 활용되는 동물 모델은 중대뇌동맥 혈관 내 폐쇄술과 색전술이 많이 이용 되는데, 이 중 중대뇌동맥 혈관 내 폐쇄술 (intraluminal middle cerebral artery occlusion model)은 뇌졸중 연구에서 가장 흔히 사용되는 방법으로 중대뇌동맥을 봉합용 필라멘트로 폐쇄시켜 중대뇌동맥으로 이동하는 혈류를 차단하는 방법인데, 영구적 또는 일시적으로 선택적 폐쇄가 가능하며 일시적 폐쇄 시 시간 선택이 가능하다는 장점이 있다. 또한 허혈 유발 60 분이 경과되면서 손상된 뇌조직의 경계 부위를 관찰할 수 있기 때문에 신경 보호에 관련된 약물들을 연구 하는데 많이 이용될 수 있는 장점으로 인해<sup>5,6)</sup> 본 연구에서 사용하게 되었다.

본 연구의 재료로 사용된 桑白皮는 뽕나무과 Moraceae에 속한 낙엽교목인 뽕나무 *Morus alba* L. 및 동속 근연 식물의 뿌리 껍질로, 桑根白皮라고도 불리어진다. 桑白皮는 주로 겨울에 채취하여 껍질을 살짝 벗겨서 사용하는데 한약재로서 性味의 관점에서는 甘寒하며, 肺와 脾에 작용한다. 진해, 이뇨, 혈압 강하, 진정, 진통, 해열, 진경, 항균 등의 약리 작용이 보고되어 있는데 한의학에서의 효능은 瀉肺平喘, 行水消腫으로 많이 알려져 있다<sup>7)</sup>.

桑白皮의 활성에 관한 기존 연구자들의 발표로 신경 세포 보호<sup>8-13)</sup>, 천식이 유발된 마우스에서 면역 조절 효과<sup>14)</sup>, 비만 세포의 활성 억제<sup>15)</sup>, 급성 부종성 폐 손상에 대한 효과<sup>16)</sup> 등이 보고된 바 있으며, 이 중 桑白皮로부터 분리된 여러 물질들이 도파민, 활성 산소 또는 영양소 배제로 인해 발생할 수 있는 신경 세포의 사멸을 효과적으로 억제하였다는 연구 결과들은 본 연구와 밀접한 관계가 있는 보고들이다<sup>8-13)</sup>. 따라서 본 연구에서는 桑白皮 메탄올 추출물이 세포 수준이 아니라 동물 실험을 통해서도 뇌 세포에 대한 보호 작용을 나타내는지 확인하고자 생쥐를 대상으로 MCAO 모델을 적용하여 이에 대한 효과를 관찰한 결과를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 桑白皮 추출물

본 연구에 사용된 桑白皮는 시중 (광명생약, 한국)에서 규

격품을 구입하여 외부 형태 관찰을 통해 기원을 명확히 확인 하였으며, 감정 후 약재의 일부를 저온실에 보관하였다 (voucher specimen No. MA301). 메탄올 추출물 조제를 위해 桑白皮 200 g을 메탄올 1,000 ml에 넣고 5 일 동안 실온에 방치한 다음 상등액을 취하였으며, 다시 여과된 桑白皮 찌꺼기에 메탄올 1,000 ml을 가하여 재차 여과하였다. 2 회에 걸쳐 얻어진 상등액은 여과지로 걸러 감압 농축 및 동결 건조 과정을 거쳤으며, 최종적으로 얻어진 건조 추출물 (MCex)은 15 g을 실험에 사용하였으며 최종 수율은 7.5% 였다.

### 2. 동물

실험 동물은 22-25 g 내외의 6 주령 된 수컷 C57BL/6 (대한 바이오링크, 한국)를 구입하여 일주일 동안 실험실 환경에 적응 시킨 후 사용하였다. 실험 동물의 사용은 각각의 케이지에 3 마리씩 넣어 사육하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 정상군, 대조군, 3 가지 농도의 MCex 투여군으로 나누어 각 실험군 당 최소 11 마리의 동물을 배정하였다. 본 연구 과정은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻었으며 (PNU-2016-1087) 동물의 관리는 관련 규정을 준수하여 수행하였다.

### 3. 桑白皮 추출물의 투여

MCex를 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 다시 0.9% 생리 식염수에 희석한 후 0.45 um pore size의 syringe filter로 여과하여 3 일 동안 매일 1회씩 총 3 회 경구 투여하였다. 이때 MCex의 농도는 30, 100 및 300 mg/kg 이었다. 정상군과 대조군은 동량의 생리 식염수만을 경구로 투여하였는데, DMSO는 생리 식염수에 의해 20분의 1 이하로 희석하였으므로 두 실험군에서는 사용하지 않았다.

### 4. 동물 모델

대조군과 MCex 투여군은 MCAO 모델 제작을 위한 수술을 시행하였는데, 대체적인 수술 과정은 Koizumi 등의 수술 방법<sup>17)</sup>에 준하였으며 일부 변형하여 시행하였다. 마취를 유도하기 위해 70%의 N<sub>2</sub>O와 30%의 O<sub>2</sub>의 혼합 가스에 2%의 isofluorane 가스를 배합하여 흡입 마취를 시행하였다. 수술이 진행되는 동안 직장 체온계가 부착된 체온 유지용 담요를 이용해 동물의 체온이 36.5±0.5℃가 유지되도록 하였다. 동물의 가슴과 목 부위의 털을 clipper 등을 이용해 깨끗이 털을 제거한 다음 피부를 절개하고 좌측 총경동맥, 외경동맥 및 내경동맥의 분지를 확인한 후 주변의 결합 조직들을 조심스럽게 정리하여 시야를 확보하였다. 혈액의 흐름을 막기 위해 외경동맥과 총경동맥을 수술용 봉합사로 결찰한 후 내경동맥의 혈류를 일시 차단하였다. 이 상태에서 실리콘으로 코팅된 약 11 mm 길이의 나일론 봉합사 (8-0 monofilament, Ethicon, Scotland)를 내경동맥을 통해 좌측 중대뇌동맥의 기시부까지

천천히 삽입하여 중대뇌동맥이 폐쇄되도록 하였다. 중대뇌동맥 폐쇄는 국소 뇌혈류량이 20% 수준으로 감소되어 2 시간 동안 계속 유지가 된 것으로 기준을 정하였으며 뇌혈류량은 레이저 도플러 (moorVMS-LDF, Moor Instrument, UK)를 이용하여 측정하였다. 삽입된 필라멘트는 혈관과 함께 고정된 후 중대뇌동맥 폐쇄가 진행되는 2 시간 동안 방치한 후 다시 필라멘트를 조심스럽게 당겨서 제거하는 것으로 중대뇌동맥

으로 운행되는 혈액을 재관류 시켰으며 즉시 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나도록 하였다. 정상군은 sham operation을 시행하였는데 외경동맥과 총경동맥을 결찰하는 정도까지 진행한 후 절개된 근육과 피부를 봉합하였다.

약물의 투여, 허혈의 유발과 재관류, 실험 동물의 희생 등은 Fig. 1에서와 같이 시행하였다.

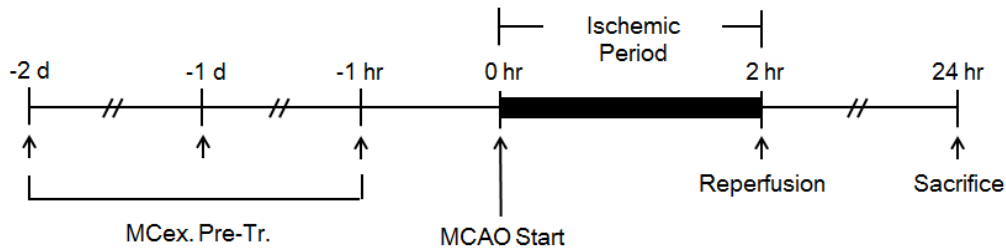


Fig. 1. Experimental design of MCAO model. Three concentrations of MCex was pre-treated 2 days, 1 day and 1 hour before MCAO, and mice were sacrificed 24 hours after the start of MCAO. MCAO was maintained for 2 hours. After mice were sacrificed, harvested brain slices were kept in deep freezer for protein assay, or stained with TTC solution for infarct measurement.

### 5. 뇌조직 손상 면적 측정

MCAO 시작으로부터 24 시간이 경과한 후 실험 동물을 CO<sub>2</sub> 가스로 안락사 시키고 단두하여 차가운 얼음 위에서 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 생쥐용 brain matrix (Kent Scientific, USA)를 이용하여 1 mm 두께로 절편 하였으며, 이를 2% 농도의 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 용액에 넣어 염색하였다. 이어서 10% 포르말린 용액에 최소 2 시간 이상 담근 후 꺼내어 CCD 카메라로 촬영한 후 각 절편의 뇌 경색 면적을 측정하고 이를 합산하여 전체 손상된 뇌 조직의 체적을 구하였다.

### 6. 신경행동학적 평가

뇌졸중 동물 모델에서 운동 능력의 손상을 가장 쉽게 확인하고 평가할 수 있기 때문에 자주 사용되는 측정 도구 중 하나이다. 본 연구에서는 MCAO가 적용된 24 시간 이후에 신경행동학적 평가를 시행하였으며, 손상의 정도는 아래와 같은 5 점 척도를 사용하였다.

- Grade 0 : 신경학적으로 아무런 이상 없음.
- Grade 1 : 자발적 운동이 원활하게 이루어지지만, 이환 측 앞발의 신전이 자유롭지 못하며 꼬리를 잡고 들었을 때 앞발이 원활하게 주변을 잡지 못함.
- Grade 2 : 자발적 운동은 비교적 용이하게 이루어지지만 꼬리를 잡고 들었을 때 오른쪽으로 몸이 틀어짐.
- Grade 3 : 오른쪽으로 보행이 치우쳐 이루어지며 꼬리를 자극했을 때 통각에 예민하게 반응함.
- Grade 4 : 자발적인 운동이 이루어지지 않으며 통각에 아주 예민하게 반응함.

### 7. 뇌 조직 내 단백질 변화 측정

MCAO 시작으로부터 24 시간이 경과한 후 실험 동물을 CO<sub>2</sub> 가스로 안락사 시키고 단두하여 차가운 얼음 위에서 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌의 좌측 반구 중 penumbra로 추정되는 부위를 포함하는 주변 조직을 들어내어 lysis buffer (1% triton, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris, pH, 7.4)에 용해시킨 후, 원심분리기로 찌꺼기를 제거한 다음, 동량의 protein을 함유하도록 정량 분석하여 sample buffer에 다시 용해시켜 5분간 heating block에서 가열하여 변성을 유도하였다. 이후 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였으며, 이로 인해 분리된 단백질을 함유한 gel을 nitrocellulose membrane (Whatman, UK) 로 transfer 한 후 5% skim milk를 함유한 tris-buffer로 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이후 1 차 항체인 Bcl-xL, caspase-8, caspase-9을 1:1000, beta-actin을 1:2000으로 희석하여 4°C에서 12 시간 반응 시킨 후 2 차 항체인 goat anti-mouse 항체와 함께 2 시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이 membrane을 ECL kit (GenDEPOT, USA)을 이용하여 암실에서 필름을 이용하여 현상한 후 단백질 농도를 beta-actin과 비교하여 정량하였으며 이때 Image J (NIH, USA) 프로그램을 이용하였다.

### 8. 통계 분석

실험 결과는 평균 (MEAN) ± 표준 편차 (SD)로 나타내었으며, 각 그룹 사이의 통계적 유의성은 Kruskal-Wallis test를 사용하였고, 사후 검정은 Dunnett analysis를 이용하였다. 통계적 유의성 여부는 p값이 0.05 미만인 경우에 의미가 있는 것으로 판정하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 뇌 손상 면적과 신경행동학적 변화에 미치는 영향

Olfactory bulb 후부터 소뇌 바로 앞까지 1 mm 두께의 대뇌 조직 절편 10 개를 얻어 TTC 염색을 통해 손상된 면적을 얻었는데 (Fig. 2A) sham 수술군에서는 뇌경색이 관찰되지 않았으며 대조군에서는 비교적 넓은 범위의 손상이 나타났다. MCEx를 투여한 실험군의 경우 300 mg/kg 농도 투여군에서만 유의한 손상의 억제가 관찰되었다 (Fig. 2B).

신경행동학적 변화는 대조군의 경우 정상군에 비해 유의한 증가가 나타났으나 MCEx 투여군에서는 대조군에 비해 변화가 나타나지 않았다 (Fig. 3).

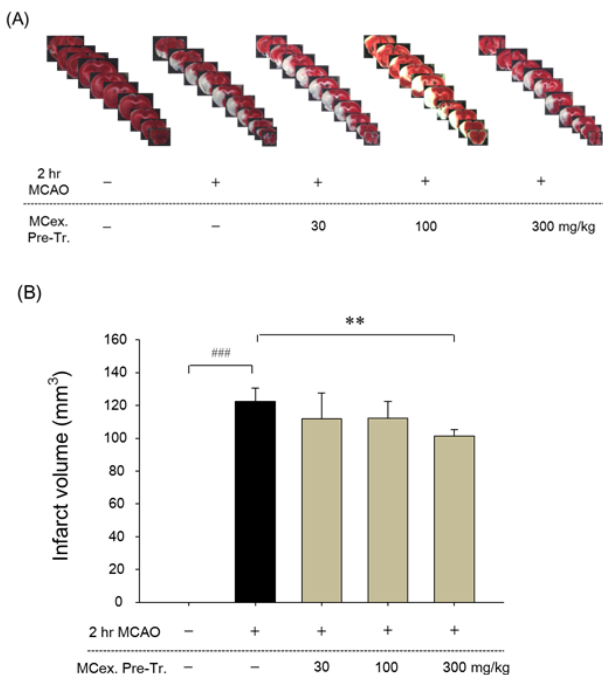


Fig. 2. Representative images of each group, and effects of MCEx on infarct volume. (A) Pale colored parts of each coronal slice indicate ischemic area of the brain. (B) Data are presented as the means±SD. ###p<0.001 vs. Normal (Sham) group mice, \*\*p<0.01 vs. Control (MCAO) group mice.

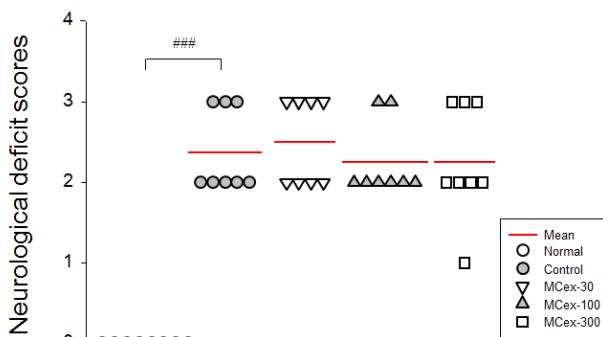


Fig. 3. Effects of MCEx on neurological deficit scores. MCEx pre-treatment showed no improvement on neuronal deficit scores. Data are presented as dot density plot and mean values. ###p<0.001 vs. Normal group mice.

#### 2. 뇌 조직 손상과 관련된 단백질 변화에 미치는 영향

MCEx가 투여된 실험군은 모두 3 개의 그룹으로 나누어 각 그룹 별로 30, 100 및 300 mg/kg 농도로 3 일간 3 회 MCEx를 투여한 후 2 시간 동안 뇌 허혈을 통한 뇌경색을 유발하였다. 뇌 허혈 시작 24 시간 후에 동물을 희생시킨 후 penumbra 부위의 단백질 변화를 측정하여 세포 손상의 억제에 apoptosis 과정 중 어떠한 기전이 작용하는지 관찰하기 위해 western blot 을 실시하였다. 그 결과 MCAO에 의한 뇌 손상으로 인해 Bcl-xL 발현이 줄어들었으며, MCEx를 투여하였을 경우 농도가 높아짐에 따라 Bcl-xL 의 발현이 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였고, 대조군과 비교하였을 때, MCEx를 300 mg/kg 농도로 투여한 그룹에서 통계적으로 유의한 증가를 보였다 (Fig. 4).

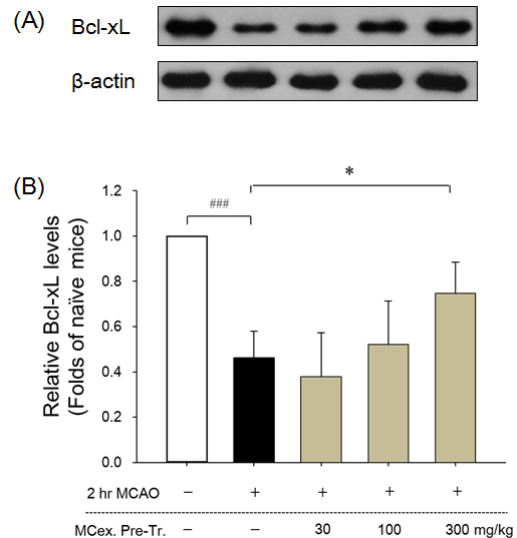


Fig. 4. Effects of MCEx on Bcl-xL signaling in the brains of MCAO-induced mice. (A) Expression of Bcl-xL was detected by western blotting, and administration of 300 mg/kg MCEx blocked the reduction of Bcl-xL signaling. Beta actin was used as a loading control. (B) Bars showing the protein ratio of Bcl-xL/beta actin. Data are presented as the means±SD. ###p<0.001 vs. Sham group mice, \*\*p<0.01 vs. MCAO group mice.

Bcl-xL의 하부 pathway에 관련된 단백질 중 하나인 caspase-9 단백질의 발현은 MCAO에 의해 증가하였으며, MCEx를 투여하였을 경우 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보이다가 300 mg/kg 농도에서 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 5).

Bcl-xL과 caspase-9은 세포 사멸에 관련된 intrinsic pathway에 속하는데 반해 caspase-8은 extrinsic pathway에 속하는 단백질이다. 본 연구에서는 MCAO에 의해 caspase-8이 유의하게 증가하였으며, 이러한 반응에 대해 MCEx 투여는 아무런 영향을 나타내지 않았다 (Fig. 6).

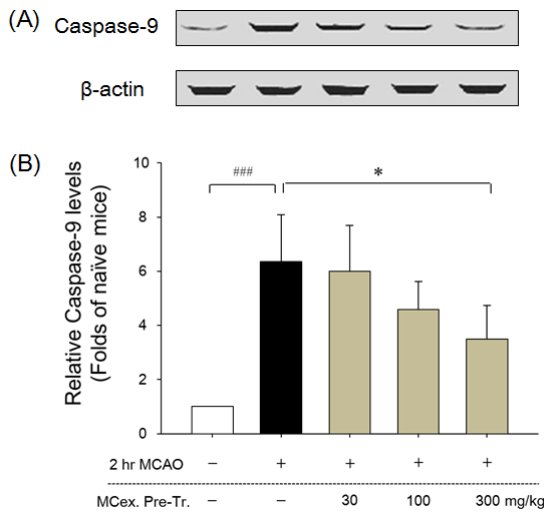


Fig. 5. Effects of MCex on caspase-9 signaling in the brains of MCAO-induced mice. (A) Expression of caspase-9 was detected by western blotting, and administration of 300 mg/kg MCex blocked the increase of caspase-9 signaling. Beta actin was used as a loading control. (B) Bars showing the protein ratio of caspase-9/beta actin. Data are presented as the means±SD. ###p(0.001 vs. Sham group mice, \*\*p(0.01 vs. MCAO group mice).

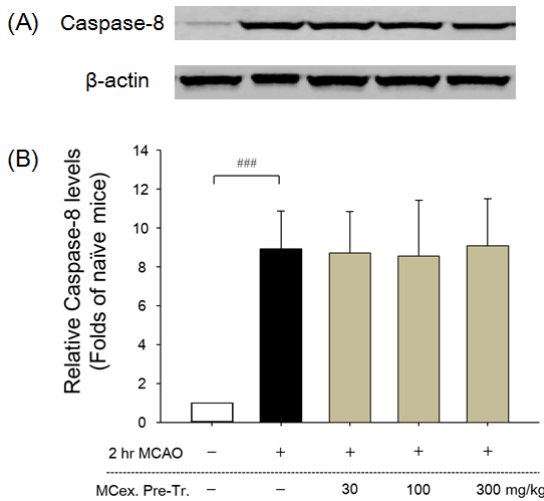


Fig. 6. Effects of MCex on caspase-8 signaling in the brains of MCAO-induced mice. (A) Expression of caspase-8 was detected by western blotting, and administration of MCex did not show any change on caspase-8 signaling. Beta actin was used as a loading control. (B) Bars showing the protein ratio of caspase-8/beta actin. Data are presented as the means±SD. ###p(0.001 vs. Sham group mice).

#### IV. 고 찰

뇌졸중은 한의학에서 中風의 범주에 속하는 질환 중 하나로, 뇌 조직을 구성하는 세포의 산화적 손상과 뇌신경계 염증의 발생이라는 과정을 거쳐 운동 및 언어 활동에 장애를 가져오며 심하게는 사망에 이르게 하는 등<sup>18,19</sup> 각종 후유증을 통해 환자 및 가족의 삶의 질을 떨어뜨리는 특징으로 인해 예방이 중요한 것으로 인식되어지고 있다. 그러나 만성 고혈압, 당뇨 및 고지혈증 등 뇌졸중을 일으키는 위험 인자들인 대사성 질환 유

병률의 증가로 인해 뇌졸중에 대한 예방 및 치료에 대한 중요성은 여전히 큰 것으로 보고되고 있다<sup>20,21</sup>. 또한 뇌졸중으로 인한 언어장애 및 운동장애는 뇌조직의 손상 정도와 깊은 상관성이 있기 때문에<sup>22</sup> 뇌졸중의 예방 및 치료 약물에 대한 연구는 여전히 절실히 필요한 것으로 생각된다.

뇌졸중의 종류 중에서 특히 허혈에 의한 손상인 뇌경색에 대한 약물의 효능을 연구하기 위해서는 인체에서와 유사한 병리적인 변화를 보이는 동물 모델이 필요한데, 중대뇌동맥 혈관 내 폐쇄술 (MCAO 모델)은 재연성이 좋으며 비교적 비침습적인 연구 방법으로 인식되어 많은 연구자들에 의해서 이용되고 있기 때문에<sup>5,6</sup> 본 연구에서도 MCAO 모델에 한약재 중 하나인 상백피 메탄을 추출물을 전처치하여 활성을 관찰하여 보았다.

桑白皮에 관한 한의계에서의 연구는 신경 세포 보호<sup>8-13</sup>와 면역 조절 작용<sup>14,15</sup>이 대표적인데, 신경 세포 수준에서 보호 효과가 보고되기는 했지만 동물 모델에서 이러한 활성을 연구한 논문은 아직 보고된 바 없었다. 이러한 경향은 桑白皮는 瀉肺平喘, 行水消腫 등이 주된 효능<sup>7</sup>이기 때문에 뇌혈관계에 관한 연구가 현재까지 거의 전무했던 것으로 추측된다.

본 연구에서는 MCex를 생쥐에게 3일간 투여한 후 중대뇌 동맥을 2 시간 동안 폐쇄한 경우에 뇌 조직 손상을 억제하는 것을 관찰한 결과 300 mg/kg 농도로 투여하였을 경우에 유의한 수준으로 뇌 조직 손상이 줄어드는 것을 확인하였다 (Fig. 2).

허혈로 인한 뇌졸중에 있어서 혈액을 공급받지 못하는 부위는 necrosis 및 apoptosis 등의 과정을 거쳐 손상이 진행되는 데 apoptosis가 진행되는 부분 중 일부는 치료 방법의 적합 여부에 따라 손상이 진행되거나 억제되기도 하는데 이러한 penumbra 부위 대한 작용의 여부가 치료제 탐색의 주요한 지표가 되기도 한다<sup>5,6,20,21</sup>.

Apoptosis의 과정에 Bcl-2 및 여러 caspase 단백질들이 주요한 조절작용을 하는데, 이 중 Bcl-2 단백질은 apoptosis를 유도하고 Bcl-xL 단백질은 apoptosis를 억제하는 각기 상반된 작용을 한다<sup>23,24</sup>. 본 연구에서는 각 실험군에서 penumbra로 추정되는 부위를 포함한 주변을 적출하여 Bcl-xL 농도를 측정하였는데, 그 결과 대조군과 비교해 MCex 300 mg/kg 투여군에서 유의한 증가를 보였다 (Fig. 4). 이러한 결과는 TTC 염색을 통한 손상 면적의 변화와도 상관성이 있었으며, apoptosis를 통한 세포 손상 과정 중 Bcl-xL 보다 하위 기전에도 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다. 이를 확인하기 위해 caspase-9 활성을 측정한 결과 대조군과 비교하였을 경우 MCex 300 mg/kg 투여군에서 유의한 감소를 보였다 (Fig. 5).

Caspase 단백질 중 caspase-8과 caspase-9는 initiator caspases라고도 불리는데 이는 위의 두 단백질들이 세포 사멸에 직접 관여하는 또 다른 caspase 단백질들인 caspase-3, -6 그리고 -7 등을 활성화시키기 때문인데 caspase-8은 extrinsic pathway, caspase-9은 intrinsic pathway에 작용한다<sup>25,26</sup>. 본 연구에서 caspase-8의 활성도 측정하였지만 MCex 투여는 활성에 영향을 나타나지 않았다(Fig. 6). 최근 여러 연구자들에 의해 허혈/재관류에 의한 뇌 조직 손상이



caspase-3 단백질 억제에 의해서 개선될 수 있음이 보고되고 있는데<sup>27,28)</sup>, 본 연구에서는 caspase-3의 활성을 직접 측정하지는 않았지만 상위 신호인 Bcl-xL 및 caspase-9 활성 연구를 통해 MCex 투여가 뇌 조직 손상을 억제할 수 있음을 확인하였다.

따라서 본 연구의 결과는 Fig. 7과 같이 도식화 할 수 있는데, MCex를 적정 농도로 투여하게 되면 apoptosis의 intrinsic pathway에 관여하는 단백질들을 조절함으로써 허혈/재관류에 의한 뇌 조직 손상을 억제할 수 있다는 것을 확인하였다.

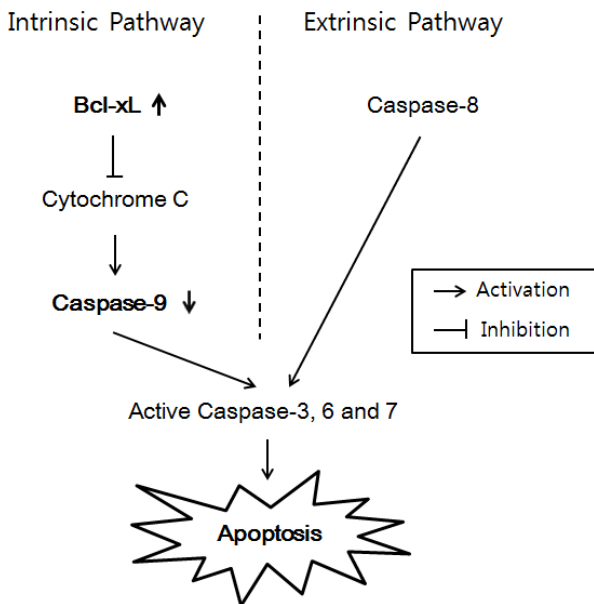


Fig. 7. Schematic image of anti-apoptotic action mechanism of MCex in MCAO mice model. Thickened short arrows indicate predicted effects of MCex on ischemia/reperfusion induced brain damage.

## V. 결 론

뇌졸중에 대한 桑白皮 메탄올 추출물 (MCex)의 효능을 연구하기 위해 생쥐를 대상으로 3 일 동안 추출물을 투여한 후 중대뇌동맥을 2 시간 동안 폐쇄하여 뇌경색을 유발하고 뇌경색의 크기와 신경행동학적 변화, 뇌 신경 세포의 자연사 기전과 관련된 인자들인 Bcl-xL, caspase-8 및 caspase-9 발현의 변화를 관찰하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. MCex는 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌 조직 손상을 300 mg/kg 농도에서 유의하게 감소시켰다.
2. MCex는 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 신경행동학적 변화에는 영향을 나타내지 않았다.
3. MCex는 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 Bcl-xL 발현 감소를 유의하게 억제하였으며, 이러한 과정을 통해 하위 기전인 caspase-9 발현 증가를 억제하였다.

4. MCex는 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 caspase-8 발현의 증가에는 영향을 나타내지 않았다.

## 감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업 (2년)에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

1. Poisson SN, Glidden D, Johnston SC, Fullerton HJ. Deaths from stroke in US young adults, 1989–2009. *Neurology*. 2014;83(23):2110–2115.
2. Bejot Y, Delpont B, Giroud M. Rising stroke incidence in young adults: More epidemiological evidence, more questions to be answered. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(5):10.1161/JAHA.116.003661.
3. Hadadha M, Vakili A, Bandegi AR. Effect of the inhibition of hydrogen sulfide synthesis on ischemic injury and oxidative stress biomarkers in a transient model of focal cerebral ischemia in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2015;24(12):2676–2684.
4. Zhao P, Zhou R, Zhu XY. Matrine attenuates focal cerebral ischemic injury by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in mice. *Int J Mol Med*. 2015;36(3):633–644.
5. Durukan A, Tatlisumak T. *Handbook of clinical neurology stroke, part 1 basic and epidemiological aspects*. New York: Elsevier; 2009:1–464.
6. Kim D. Animal models of stroke. *Brain & Neurorehabilitation*. 2011;4(1):1–11.
7. Park J. Mori Radicis Cortex. *The GOSHIGYE, a monthly law journal*. 2010;55(12):85–86.
8. Ham A, Lee HJ, Hong SS, Lee D, Mar W. Moracenin D from Mori Cortex Radicis protects SH-SY5Y cells against dopamine-induced cell death by regulating nurr1 and alpha-synuclein expression. *Phytother Res*. 2012;26(4):620–624.
9. Jung JW, Ko WM, Park JH, Seo KH, Oh EJ, Lee DY, Lee DS, Kim YC, Lim DW, Han D, Baek NI. Isoprenylated flavonoids from the root bark of *Morus alba* and their hepatoprotective and neuroprotective activities. *Arch Pharm Res*. 2015;38:2066–2075.
10. Lee HJ, Lyu da H, Koo U, Lee SJ, Hong SS, Kim K, Kim KH, Lee D, Mar W. Inhibitory effect of 2-arylbenzofurans from the Mori Cortex Radicis (Moraceae) on oxygen glucose deprivation (OGD)-

- induced cell death of SH-SY5Y cells. Arch Pharm Res. 2011;34(8):1373-1380.
11. Lee HJ, Lyu da H, Koo U, Nam KW, Hong SS, Kim KO, Kim KH, Lee D, Mar W. Protection of prenylated flavonoids from Mori Cortex Radicis (Moraceae) against nitric oxide-induced cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. Arch Pharm Res. 2012;35(1):163-170.
  12. Kong SY, Park MH, Lee M, Kim JO, Lee HR, Han BW, Svendsen CN, Sung SH, Kim HJ, Kuwanon V inhibits proliferation, promotes cell survival and increases Neurogenesis of neural stem cells. PLOS ONE. 2015;10:e0118188.
  13. Wang CP, Zhang LZ, Li GC, Shi YW, Li JL, Zhang XC, Wang ZW, Ding F, Liang XM. Mulberroside a protects against ischemic impairment in primary culture of rat cortical neurons after oxygen-glucose deprivation followed by reperfusion. J Neurosci Res. 2014;92:944-954.
  14. Kang SY, Woo EL, Park YK. Effect of the 70% ethanol extract of Mori Cortex Radicis on ovalbumin-induced allergic asthma in mice. The Korea Journal of Herbology. 2014;29(4):1-8.
  15. Lee KJ, Kim BK, Gil KJ. Suppressive effects of *Morus alba* Linne root bark (MRAL) on activation of MC/9 mast cells. The Korea Journal of Herbology. 2013;28(1):33-42.
  16. Cho HK. Mori cortex decreases the acute edematous lung injury induced by skin burn. The Korea Journal of Herbology. 2003;18(3):195-202.
  17. Koizumi JI, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn J Stroke. 1986;8:1-8.
  18. Roth S, Liesz A. Stroke research at the crossroads - where are we heading? Swiss Med Wkly. 2016;146:w14329.
  19. Chamorro A, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: Targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. Lancet Neurol. 2016;15(8):869-881.
  20. Alberts MJ, Ovbiagele B. Current strategies for ischemic stroke prevention: Role of multimodal combination therapies. J Neurol. 2007;254(10):1414-1426.
  21. Pinto A, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Fernandez P, Licata G. Cerebrovascular risk factors and clinical classification of strokes. Semin Vasc Med. 2004;4(3):287-303.
  22. Barlow SJ. Identifying the brain regions associated with acute spasticity in patients diagnosed with an ischemic stroke. Somatosens Mot Res. 2016:1-8.
  23. Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. Oncogene. 1998;17(25):3207-3213.
  24. Wu Y, Tang L. Bcl-2 family proteins regulate apoptosis and epithelial to mesenchymal transition by calcium signals. Curr Pharm Des. 2016.
  25. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7(4):10.1101/cshperspect.a026716.
  26. Sun Y, Xu Y, Geng L. Caspase-3 inhibitor prevents the apoptosis of brain tissue in rats with acute cerebral infarction. Exp Ther Med. 2015;10(1):133-138.
  27. Wen XR, Fu YY, Liu HZ, Wu J, Shao XP, Zhang XB, Tang M, Shi Y, Ma K, Zhang F, Wang YW, Tang H, Han D, Zhang P, Wang SL, Xu Z, Song YJ. Neuroprotection of sevoflurane against ischemia/reperfusion-induced brain injury through inhibiting JNK3/caspase-3 by enhancing akt signaling pathway. Mol Neurobiol. 2016;53(3):1661-1671.
  28. Yang PS, Lin PY, Chang CC, Yu MC, Yen TL, Lan CC, Jayakumar T, Yang CH. *Antrodia camphorata* potentiates neuroprotection against cerebral ischemia in rats via downregulation of iNOS/HO-1/bax and activated caspase-3 and inhibition of hydroxyl radical formation. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;Article ID 232789.