

## 山茱萸 메탄올 추출물이 편측 경동맥 폐색으로 유도된 생쥐의 허혈성 뇌손상에 미치는 영향

최나리<sup>1#</sup>, 조성현<sup>1</sup>, 이세은<sup>2</sup>, 이민지<sup>3</sup>, 조수인<sup>1\*</sup>

1 : 부산대학교 한의학전문대학원 한의학과, 2 : 부산대학교 한의과학연구소,  
3 : 부산대학교 한의학전문대학원 한의과학과

### The protective effect of methanol extract of Corni Fructus on brain injury caused by unilateral common carotid artery occlusion in mice

Na Ri Choi<sup>1#</sup>, Sung Hyeon Jo<sup>1</sup>, Se-Eun Lee<sup>2</sup>, Min Ji Lee<sup>3</sup>, Suin Cho<sup>1\*</sup>

1 : Department of Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan, Gyeongnam, Republic of Korea  
2 : Research Institute for Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan, Gyeongnam, Republic of Korea  
3 : Department of Korean Medical Science, Pusan National University, Yangsan, Gyeongnam, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : This study was conducted to evaluate the effects of Corni Fructus, the dried fruits of *Cornus officinalis* Sieb., on unilateral common carotid artery occlusion (UCCAO) in mouse model.

**Methods** : The Corni Fructus used in the experiment was extracted with anhydrous methanol, then filtered and freeze-dried. C57BL/6 mice used in the experiments were conducted left UCCAO surgery to set up UCCAO rodent model for mice. The mice were divided into five groups for evaluate the effect of methanol extract of Corni Fructus (COM) on UCCAO induced ischemic brain injury. The expression levels of nitric oxide in cerebrum and serum, body weight change were measured. To determine the effect of UCCAO and COM administration on brain neurons, morphological changes of the cerebrum through a microscope was conducted. And western blot was performed to confirm the underlying mechanism of neuroprotective effect of COM administration.

**Results** : COM administered UCCAO groups (CO50, CO150, and CO500) had no significant effects on nitric oxide production in ipsilateral hemisphere proteins and sera. The CO500, 500 mg/kg COM administration, attenuated UCCAO-induced p38 inflammatory signaling pathway and inflammatory mediators such as iNOS and COX-2. The CO500 group showed resilient morphological changes of hippocampus neuronal cells about brain damage caused by decreased flow of blood. These group also showed decreased inflammation and cellular stress response in neuronal cells.

**Conclusions** : From these results, COM has a neuroprotective property via moderating inflammatory factors and cellular stress inducing factors in brain cells.

**Key words** : Corni Fructus, brain injury, unilateral common carotid artery occlusion, neuroprotection

## I. 서 론

저산소성 뇌손상은 혈류공급의 차단 및 혈중 산소농도의 저하로 인해 뇌에 산소공급이 차단되어 발생하는 뇌손상을 말한

\*Corresponding author : Suin Cho, Department of Korean Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University.  
· Tel : +82-51-510-8457 · E-mail : sicho@pusan.ac.kr

#First author : Na Ri Choi, Department of Korean Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University.  
· Tel : +82-10-8626-0508 · E-mail : nariring@gmail.com

· Received : 24 Oct 2019 · Revised : 11 Nov 2019 · Accepted : 25 Jan 2020

다. 뇌혈류 순환이 정체되면 전뇌허혈(global brain ischemia) 상태가 되는데 신경흥분독성(excitotoxicity), 산증(acidosis)과 재산화 손상(reoxygenation injury) 등의 세포 내 교란이 일어나, 내측 측두엽(medial temporal lobe), 해마(hippocampus), 기저핵(basal ganglia), 창백핵(globus pallidus) 및 뇌량(corpus callosum) 등의 구조적 손상을 일으킨다<sup>1-3</sup>). 저산소성 뇌손상이 일어나면 의식 저하, 보행 실조, 인지장애, 운동장애, 실명, 실인증, 경련과 사지마비 등이 나타난다<sup>4</sup>). 그 중 인지장애는 기억과 학습 등의 기능을 가진 해마가 뇌 혈류량 저하에 영향을 받아 나타나며, 주의집중과 집행기능의 저하 또한 일어날 수 있으며 임상적으로 알츠하이머병, 혈관성 치매 등이 이러한 증상들을 나타낼 수 있다<sup>5-7</sup>).

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 전체 치매 유병률의 약 50~70%이며, 혈관성 치매(vascular dementia, VaD)는 약 25%를 차지한다. 또한 VaD는 AD 다음으로 발병률이 높은 치매로 뇌혈관 질환에 의해 인지기능 장애가 후천적으로 발생하는 중후군이다<sup>9,10</sup>). VaD는 서양에서 보다 동양에서 더 많은 발생 빈도를 보여주고 있으며, 더욱이 AD 또한 혈관성 병인과 관련이 있다는 보고가 증가되면서 VaD에 대한 연구의 중요성이 더욱 증가되는 실정이다<sup>11</sup>). VaD는 주로 뇌졸중(stroke)과 같은 뇌혈관장애(cerebrovascular disorders, CVD)에 의해 일어난다. VaD의 위험요인으로는 고혈압, 당뇨병, 대사성 질환 및 대사중후군 등이 있다. CVD는 뇌로 공급되는 혈류량을 감소시키며, 저산소증(hypoxia와 anoxia)과 염증반응(inflammatory responses) 등이 동반되어 일어나게 되고 산화성 스트레스(oxidative stress)를 증가시킨다. 또한 혈관의 자율성 조절, 모세혈관의 기능저하와 해마 손상이 나타난다<sup>8</sup>).

치매(dementia)는 후천적 뇌질환에 의한 다발성 인지장애가 일상생활의 장애를 일으키며 70여개의 원인들에 의해 유발되는 임상 증상이다<sup>13</sup>). 하지만 현재까지 치매의 발병원인과 기전은 명확히 밝혀지지 않았다. 최근까지 AD의 약물치료는 콜린성 가설(cholinergic hypothesis)을 근거<sup>14</sup>)로 한 대증치료제를 주로 사용했으나 제한적인 효과였고, VaD의 약물 치료 또한 콜린에스테라제 억제제(donepezil, rivastigmine 및 galantamine 등)와 비콜린성(memantine, nimodipine, hydergine 및 nicergoline 등) 약제가 사용되어 왔으나 효과가 명확하게 확인되지 않았다<sup>15</sup>). 이는 치매의 발병 기전이 복합적으로 작용하는 특성을 가지기 때문이다<sup>16</sup>). VaD에 대한 치료약물은 AD와는 달리 현재 공식적으로 승인된 약물이 없고, 일차적 치료방법으로는 혈관성 위험인자(risk factors)를 조절하는 데 국한되어 있다. 현재 VaD에 치료 목적으로 사용되고 있는 약물은 항응고제, 항혈소판제, 항산화제, 인지기능향진제, 치매의 행동심리증상(behavioral and psychological symptoms of dementia, BPSD) 치료제 및 뇌 대사촉진제 등이다. 이와 같은 약물들의 특징은 증상이 진행되는 것을 막거나 합병증 발생을 예방하기 위해 사용되고 있다. 따라서 현재 VaD 치료를 목적으로 사용할 수 있는 약물에 대한 연구가 시급한 실정이다<sup>12</sup>).

山茱萸(Corni Fructus, 산수유)는 동아시아 지역의 산지에 자생하는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽소교목인 산수유나무(*Cornus officinalis* Sieb.)의 열매이다. 산수유는

10~11월에 채집하여 양건(陽乾)한 뒤 씨를 제거하여 약용으로 사용하며, 민간을 비롯하여 한방에서 유뇨요빈(遺尿頻), 붕루대하(崩漏帶下), 양위유정(陽痿遺精) 및 내열소갈(內熱消渴) 등의 치료에 사용되었다. 최근 산수유와 산수유의 단일성분에 대한 연구로 항 당뇨효과<sup>17</sup>), 혈관이완작용<sup>18</sup>), 항 알레르기효과<sup>19</sup>) 및 항 전립선비대<sup>20</sup>) 등 다양한 효과가 보고되었다.

최근 발표된 치매에 관한 처방의 빈도 및 구성 약물의 경향성에 관한 연구에서 산수유가 포함된 처방인 육미지황탕과 산수유 단일 한약재가 모두 신경세포(*in vitro*) 및 동물실험(*in vivo*)에서 항치매 효과가 있음이 확인되었다<sup>21</sup>). 이 연구에서 제시한 육미지황탕은 인지 장애, 기억력 감퇴와 시력장애 등 연령 상관성 증후의 개선을 목적으로 널리 사용되어 왔는데<sup>22,23</sup>), 고혈압의 치료에 기존 약제와 육미지황탕을 병용하는 것이 유효하다는 사실이 밝혀지기도 하는 등 넓은 범위의 노인성 질환에 대한 효과 검토가 기대되는 처방이다<sup>24</sup>).

다른 여러 논문들에서도 육미지황탕이 acetylcholine esterase (AChE) 활성을 억제하는 작용을 바탕으로 치매의 증후 개선에 기여하였고<sup>25-28</sup>), 국외의 연구들에서도 육미지황탕이 말초콜린성 신경계를 활성화함으로써 기억 및 인지 기능을 향상시켰다는 결과들을 접할 수 있었다<sup>29,30</sup>). 또한 치매의 주된 원인요소인 amyloid- $\beta$  독성의 완화효과가 있다는 보고<sup>31</sup>)가 이루어지기도 하여, 기존의 선행 연구들과 함께 육미지황탕은 치매 병태의 개선에 효과가 있다는 것을 알 수 있다.

위와 같이 다양한 논문들의 결과를 토대로 육미지황탕은 전통적 한약처방 형태로서 치매 치료제 개발에 유의한 후보가 될 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

본 연구에서는 이전 연구와는 다른 동물 모델인 생쥐에 편측 경동맥 폐색을 유도하여 산수유를 단독으로 처리하여 그 효과를 확인하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 山茱萸 메탄올 추출물

실험에 사용된 山茱萸는 한국산으로, 광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입하여 부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부 실험실에 소량의 샘플을 보관(PNU-2017-0002)한 후 추출물을 만들었다. 추출을 위해 사용한 약제의 건조 중량은 총 500.04 g이었으며, 약 5L의 무수메탄올을 사용하여 2일간 실온에서 추출하였고 여과지(Whatman, No. 2, Tokyo Roshi Kaisha, Tokyo Japan)를 사용하여 여과하였다. 여과액은 회전증발농축기와 동결 건조기를 사용하여 산수유 메탄올 추출물의 파우더를 만들었다. 최종적으로 얻어진 추출물의 수율은 34.16%였다.

### 2. 용액

메탄올은 덕산종합과학(동대문구, 서울, 대한민국)에서, N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, sulfanilamide, 4% paraformaldehyde (4% PFA)와 cresyl violet은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 동물

실험에서 사용한 phosphate buffered saline (PBS)는 Bio basic Inc. (Markham, Ontario, Canada)에서, 생리식염수는 중외제약(서초구, 서울, 대한민국)에서 구입하였다. BCA reagent와 albumin standard는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Tris는 Duchefa Biochemie (Netherlands)에서, Glycine은 LPS solution(대덕구, 대전, 대한민국)에서 구입하였다. 1차 항체인 p-ERK, p-JNK, p-p38, JNK와 p38은 Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA), ERK와  $\beta$ -actin은 Santa Cruz biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)에서 iNOS는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 1차 항체인 COX-2와 2차 항체들(Goat anti-rabbit IgG와 Goat anti-mouse IgG)은 Enzo life sciences Inc. (Farmingdale, NY, USA)를 사용하였다. ECL 용액인 West-Q chemiluminescent 기질은 GenDEPOT (Katy, TX, USA)을 사용하였다.

### 3. 실험동물 사용

실험에 사용된 동물은 C57BL/6 생쥐로 6주령 수컷(약 20 g 내외)을 사용하였고 샘타코 바이오 코리아(오산시, 경기도, 대한민국)에서 구입하였다. 일주일간 동물 사육실에서 적응을 시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험기간동안 일반 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 사육조건은 실내온도는 약 23℃, 습도는 약 50%를 유지하였고 동물의 관리는 부산대학교 윤리규정에 의거하여 수행하였다.

### 4. 편측 경동맥 폐색(UCCAO) 모델

생쥐의 좌측 UCCAO 수술을 진행하기 위해 70%:30% ( $N_2O:O_2$ )의 혼합 가스를 사용하여 1.5% 농도의 isoflurane이 되도록 설정하여 흡입 마취를 시행하였다. 마취가 된 생쥐의 체온을 유지시키기 위하여 직장체온계를 이용하여 체온이 유지( $36.5 \pm 0.5^\circ C$ )되도록 하였으며, 동물의 목 주변부를 clipper와 제모제를 이용하여 털을 제거한 다음 수술 주변부를 포비돈과 알콜로 소독하였다. 피부를 절개한 뒤 좌측 경동맥의 주변 결합조직(connective tissue)과 미주신경(vagus nerve)등을 조심스럽게 정리한 후 봉합사(4-0 filament, Ethicon, Scotland)로 좌측 경동맥을 결찰하였다. 결찰 이후 생쥐의 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나도록 하였다. 총 수술에 소요된 시간은 10분 이내였다.

### 5. UCCAO와 sham operation 및 산수유 메탄올 추출물(COM)의 경구투여

수술 및 시료의 경구 투여를 위해 총 5개의 군으로 나누었다. Sham, UCCAO 및 COM군으로 구분하였으며, COM군은 추출물의 수율, 체표면적과 임상용량 등을 고려하여 약물의 투여 농도(50, 150, 500 mg/kg)를 정하였고 그에 따라 CO50, CO150 및 CO500으로 구분하였으며, COM을 농도에 따라 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

### 6. 생쥐의 체중 측정

생쥐는 UCCAO 수술 일주일 전(6주령)에 측정하여 1주간 동물실에 적응을 시켰다. 수술 당일(7주령)에도 다시 체중을 측정하였고 2일 후(수술 후 두 번째 경구투여 시, 2<sup>nd</sup> O.A.)에 추가로 체중을 확인하였다. 이후 4주 동안(8-11주령) 매주 1번씩 체중을 확인하였다.

### 7. 산화질소 측정

생쥐의 대뇌 중 단백질 또는 체내 혈청 중 산화질소의 발현량은 Griess reagent를 사용하여 확인하였다. 그 과정을 간략히 설명하자면, Griess 시약[0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine와 5% phosphoric acid를 포함한 1% sulfanilamide]을 사용하여 대뇌의 단백질 또는 체내 혈청과 1:1의 양으로 암실에서 10분간 반응시켰다. 흡광도는 Multimode microplate reader (Tecan, Infinite M200, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

### 8. 뇌 신경세포에 대한 영향 확인

생쥐의 뇌를 생리식염수와 4% PFA로 관류시켜 고정시켰다. 이후 뇌를 sucrose로 탈수 시켜 동결 절편(20  $\mu m$ )을 얻었다. 각 균들의 절편들을 cresyl violet(0.1%) 시약으로 40℃에서 30분 염색하였다. 조직의 수분을 95, 100%의 에탄올과 xylene을 순서대로 넣어 탈수시킨 뒤 조직을 봉입하였다. 현미경을 통하여 대뇌의 형태학적인 변화를 관찰하였다.

### 9. 단백질 발현 변화

MAPK, iNOS와 COX-2 단백질 분석은 western blot을 통하여 분석되었다. 생쥐의 대뇌 부위를 단백질 추출용액(iNtRON, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea)을 사용하여 단백질을 추출하였다. 단백질은 15,871  $\times g$ 로 4℃에서 10분간 원심분리한 뒤 상층액을 사용하였으며 BCA 방법으로 단백질 정량을 하였다. 각 단백질(30  $\mu g$ )은 8-15% sodium-dodecyl sulfate(SDS) polyacrylamide gel을 사용하여 SDS polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 통해 분리되었으며 PVDF (Millipore, Darmstadt, Germany) membrane으로 이동하였다. Membrane은 1시간 동안 5% skim milk에서 blocking 하였으며, 이후 하루 동안 p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38, iNOS, COX-2와  $\beta$ -actin(1:1000)의 특이적인 1차 항체를 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 다음날 membrane을 TBST를 사용하여 3번 씻어낸 뒤, horse radish peroxidase이 접합된 goat anti-rabbit IgG, pAb(1:5000)와 horse radish peroxidase이 접합된 goat anti-mouse IgG pAb(1:3000)를 1시간 동안 상온에서 처리하였다. Membrane은 photosensitive luminescent analyzer system (LAS, Amersham Imager 600, UK)에 의해 enhanced chemiluminescence (ECL; GenDEPOT, Houston, TX, USA)에 반응시켜 해당 단백질 변화를 확인하였다. 또한 ImageJ 프로그램(NIH, Bethesda, MD, USA)를

이용하여 밴드를 정량하였다.

## 10. 통계처리

통계 분석에 사용된 분석 프로그램은 SIGMAPLOT 12.0 버전 프로그램을 사용하여 그룹의 평균값 간 차이의 통계적 유의성을 결정하기 위해 일원분산분석방법(One-way analysis of variances)이 사용되었다. 모든 데이터는 평균±표준편차로 표현되었으며, 통계적 차이는 *P* 값이 5% 미만일 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## Ⅲ. 결 과

### 1. 체중 측정

생쥐의 체중은 각 군들의 적응기간 동안 증가하였으며, 수술 후 2일째 되는 날 유의하지는 않지만 감소하는 경향을 확인하였다. 이후 8주부터 11주째까지 각 군들의 생쥐의 체중은 점차적으로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1).

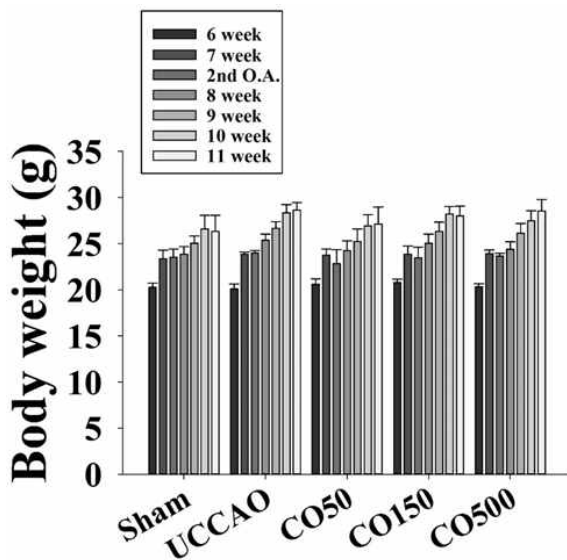


Fig. 1. Changes in mice body weight. Mice weight measured every week.

### 2. 산화질소 생성량 측정

생쥐의 산화질소 생성량을 측정하기 위해 Griess reagent를 사용한 결과, 뇌조직 내에서의 함량은 sham군이  $100.00 \pm 17.86\%$  일 때, UCCA0군은  $118.42 \pm 9.93\%$ , CO50군은  $100.11 \pm 10.30\%$ , CO150군은  $130.90 \pm 29.46\%$  그리고 CO500군은  $113.01 \pm 8.88\%$  였다(Fig. 2A). 또한 혈청에서 확인한 결과 sham군이  $100.00 \pm 38.96\%$  일 때, UCCA0군은  $69.10 \pm 15.29\%$ , CO50군은  $70.96 \pm 11.95\%$ , CO150군은  $69.54 \pm 2.72\%$  그리고 CO500군은  $74.08 \pm 3.36\%$ 로 확인되었다(Fig. 2B).

전체적으로 산화질소 생성량의 결과는 모든 실험군에서 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 2).

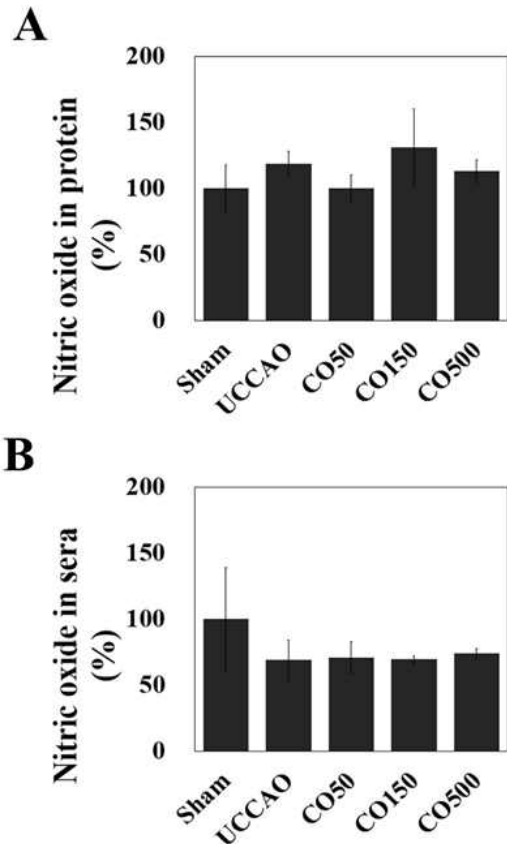


Fig. 2. Nitric oxide assay on mice protein and sera. NO production of mice protein and sera were measured using Griess reagent. Data are represented as the mean  $\pm$  STDEV of experiments.

### 3. 뇌세포 형태 변화 관찰

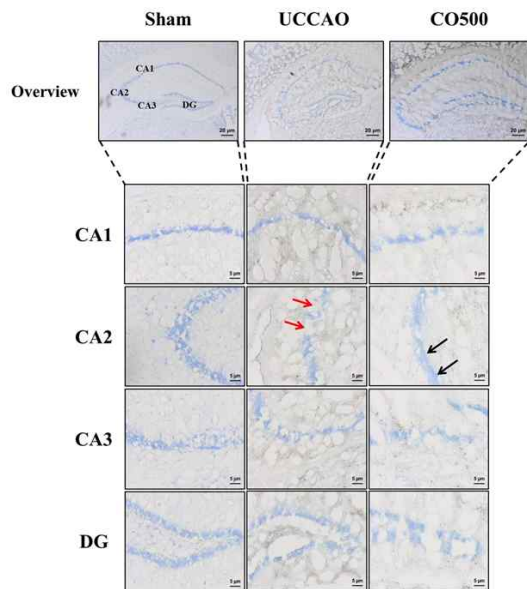


Fig. 3. Mouse brain tissue stained by cresyl violet. After sacrifice, the brain was extracted and frozen. Brain sections were obtained using cryostat and then stained with cresyl violet. Red arrows indicate shrunk cells. The thickness of the tissue is  $20 \mu\text{m}$ . The morphological changes were observed using a light microscope. Magnification (x100).

뇌 조직 절편을 cresyl violet으로 염색한 후, COM을 처리한 군에서 해마의 CA1, CA3 그리고 dentate gyrus(DG) 부분에서는 크게 세포의 형태학적인 변화가 확인되지 않았다. 그러나 CA2의 경우 UCCAO군에서 sham군과 비교하였을 때, 허혈 유도로 인해 신경세포의 손상이 발생하였고, CO500의 경우 UCCAO군보다 상대적으로 회복된 것을 확인하였다(Fig. 3).

#### 4. 단백질 변화 및 발현량 확인

단백질 변화 및 발현량을 확인하기 위해 western blot을 시행한 결과 Fig. 4A와 같은 결과를 얻었다. 먼저 ERK의 발현량은 sham군(1.00±0.34배)에 비해 CO500군(1.85±0.33배)에서 유의하게 증가하였다(Fig. 4B). JNK의 경우 모든 군에서 유의한 결과는 나타나지 않았다(Fig. 4C). p38의 결과는 sham군이 1.00±0.11배였을 때 UCCAO군이 1.29±0.07배로써 통계적으로 유의하게 증가하였고, CO500군(0.90±0.11배)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 4D).

iNOS 단백질의 결과는 sham군이 1.00±0.48배였을 때 UCCAO군이 2.11±0.13배로써 통계적으로 유의하게 증가하였고, CO500군(1.61±0.13배)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 4E). COX-2 단백질 발현 비율은 sham군(1.00±0.17배)보다

UCCAO군(1.84±0.44배)에서 유의한 증가가 확인되었으며, CO500군(0.90±0.26배)에서 유의하게 감소하였다(Fig. 4F).

### IV. 고찰

뇌에 혈액 공급이 차단되면 뇌세포의 산화적손상과 염증 발생이라는 과정을 거쳐 운동 및 언어기능에 장애를 가져오며 심하게는 사망에 이르게 된다<sup>32-36</sup>. 이러한 장애들의 정도는 뇌조직의 손상 정도와 깊은 상관성<sup>37</sup>이 있으며 이로 인한 사회적 및 경제적 비용 소모가 대단히 크기 때문에 뇌손상 예방 및 치료 약물에 대한 연구는 시급한 것으로 생각된다.

뇌혈류 차단에 따른 약물의 효능을 연구하기 위해서 병리적인 변화를 보이는 동물 모델이 필요한데 생쥐에 UCCAO를 유도하면 sham에 비해 혈류의 흐름은 약 60~80%로 줄어들고 만성적인 대뇌 허혈이 유도되며<sup>38</sup>, 양측 해마는 비대칭적인 변화가 관찰되는 것으로 보고되고 있다<sup>39</sup>. 따라서 본 연구에서는 산수유 메탄올 추출물의 효과를 확인해보기 위해 UCCAO 모델을 사용하였다.

본 연구의 예비연구를 통해 편측 경동맥을 완전히 폐색한 후 COM을 여러 농도로 생쥐에게 3주간 투여 하고 뇌 조직의 변화를 관찰하여 일부 농도에서 유의한 수준으로 뇌 조직 손

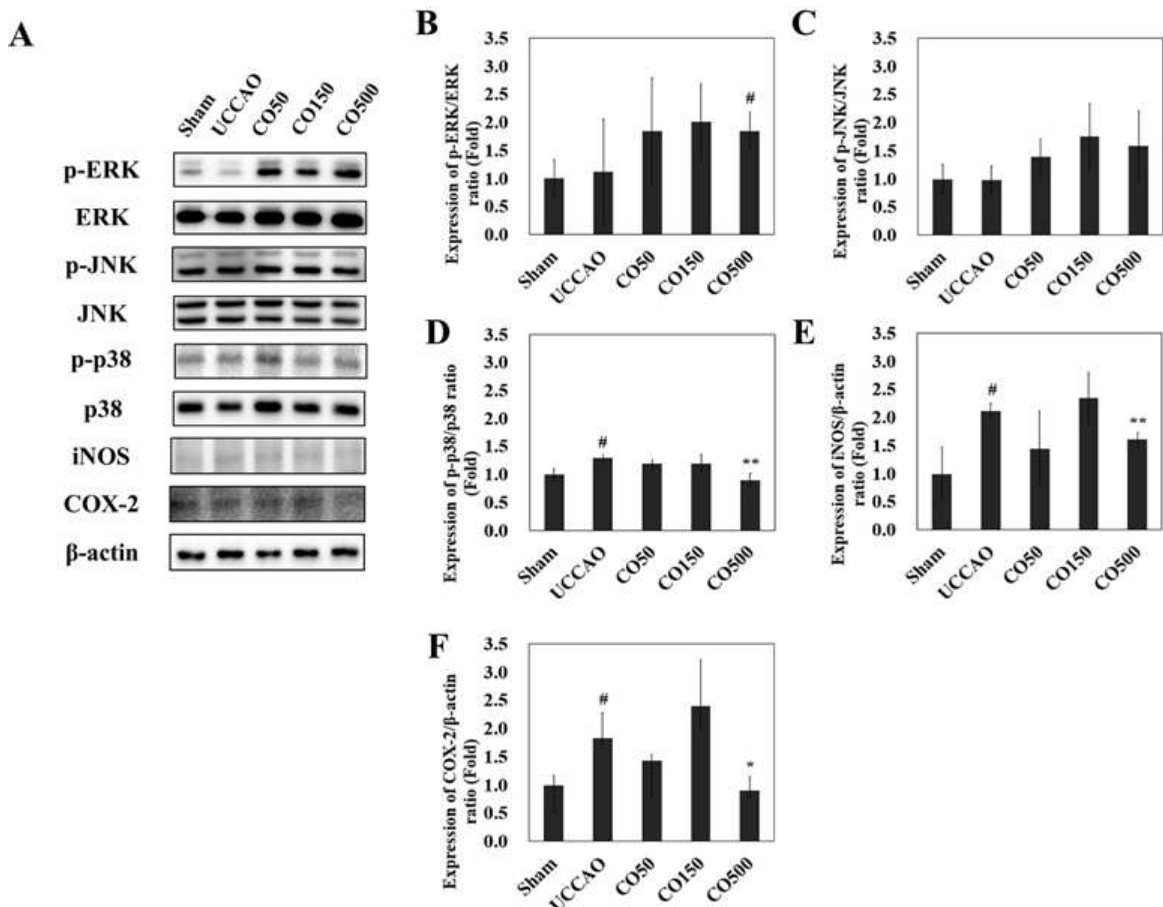


Fig. 4. Expression of MAPK, iNOS and COX-2 from hemisphere of mice. A, the protein expressions of ERK, JNK, p38, iNOS, COX-2 and β-actin in protein from mice hemisphere treated with COM were determined by western blot. B-F, quantification of protein expression levels of hemisphere. Data are represented as the mean ± STDEV of experiments. <sup>#</sup>*p* < 0.05 vs. Sham. <sup>\*</sup>*p* < 0.05 vs. UCCAO, <sup>\*\*</sup>*p* < 0.01 vs. UCCAO.

상이 줄어드는 것을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 다른 연구자들의 선행 연구<sup>21-24)</sup>와도 부합하는 것으로 판단하여 본 연구를 수행하게 되었다.

본 연구를 통해서 기억에 관여하는 해마의 세포 형태학적인 면을 관찰한 결과 산수유가 손상된 해마 CA2 부위의 세포 활성화에 효과를 나타냈다(Fig. 3).

MAPK의 종류에는 ERK, JNK, p38가 있으며 염증, 스트레스 세포의 성장, 세포의 발달, 분화와 죽음에 연관이 있다<sup>40)</sup>. 그중 ERK 단백질은 세포의 이동, 증식, 분화, 세포노화, 세포자살과 연관이 있으며 암, 심혈관계, 신경계 그리고 다른 시스템들과도 연결되어 있다<sup>41)</sup>. ERK 단백질의 인산화는 뇌의 혈류 흐름과 관계가 있으며<sup>42,43)</sup>, p38 단백질은 염증, 스트레스 반응, 과다증식과 연관이 있다<sup>44)</sup>.

Sham과 UCCAO의 그룹간의 차이는 ERK와 JNK의 신호 전달에는 영향을 주지 않았지만(Fig. 4A-C), ERK의 결과에서 보아 Sham과 CO500를 비교하면 CO500 그룹에서 유의한 증가를 보였다(Fig. 4A 및 4B). 이러한 결과는 COM이 세포의 이동, 증식, 분화 등에 영향을 주며, 뇌로 가는 혈류의 흐름을 증가시킨 것으로 추정할 수 있는 근거가 될 수 있다.

Sham과 UCCAO의 그룹은 p38 단백질에서는 통계적으로 유의미한 증가가 나타났으며, UCCAO 유도 후 CO500에서 p38 단백질의 유의한 감소가 나타났다(Fig. 4A 및 4D). 이는 CO500이 염증을 줄이고 세포 내 스트레스와 세포죽음을 막았다고 할 수 있다.

위의 결과들을 종합하면 CO500은 뇌 세포에 크게 영향을 주지는 않았지만 UCCAO 유도 후 COM을 경구 투여 시 혈류 흐름 개선 효과와 세포내 스트레스가 감소하는 것으로 해석되어진다.

해마 CA1 부위의 세포들은 hypoxia에 취약하고 CA3의 세포들은 CA1보다 hypoxia에 저항성을 가지고 있다<sup>45)</sup>. 대뇌의 염증이 발생하면, IL-1 $\beta$ , iNOS와 COX-2 등의 염증 관련 인자가 증가하며 그 결과로 CA 부위에서 세포사멸이 일어난다고 알려져 있다<sup>46,47)</sup>.

iNOS와 COX-2의 결과에서 보듯 Sham과 UCCAO의 그룹간의 차이는 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 이는 대뇌의 단백질에서 염증반응이 일어났다는 것을 알 수 있었고, CO500의 그룹에서 유의하게 감소함을 확인(Fig. 4A, 4E 및 4F)하였으므로, 산수유 메탄올 추출물은 뇌의 염증반응을 억제함으로써 허혈에 의한 뇌손상을 감소시키는 것으로 확인되었다.

## V. 결 론

편측 경동맥 폐색으로 유도된 허혈성 뇌손상에 산수유가 미치는 영향을 실험적으로 증명하기 위해서 폐색이 유도된 생쥐에 산수유 메탄올 추출물을 경구 투여한 후 뇌 조직을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 전 그룹의 대뇌 단백질과 혈청에서는 산화질소 생성량에 대해서 유의한 결과가 나타나지 않았다.

2. 산수유는 뇌손상에 대한 해마의 형태학적 변화를 통해 조직 손상에 대한 회복효과를 나타내었다.
3. 염증억제 및 신경세포사멸 유도인자들의 활성을 조절함으로써 뇌신경 세포의 개선 효과를 나타내었다.

따라서 산수유 메탄올 추출물은 뇌손상을 개선시킬 수 있음을 의미하고 추후 뇌 질환들의 치료 및 예방을 위한 한약제제로 개발되어질 수 있을 것이다.

## References

1. Greer DM. Mechanisms of injury in hypoxic-ischemic encephalopathy : implications to therapy. *Semin Neurol*. 2006;26:373-379.
2. Hopkins RO, Tate DF, Bigler ED. Anoxic versus traumatic brain injury: amount of tissue loss, not etiology, alters cognitive and emotional function. *Neuropsychology*. 2005;19:233-242.
3. Hopkins RO, Bigler ED. Neuroimaging of anoxic injury: implications for neurorehabilitation. *Neuro-Rehabilitation*. 2012;31:319-329.
4. Lu-Emerson C, Khot S. Neurological sequelae of hypoxicischemic brain injury. *NeuroRehabilitation*. 2010;26:35-45.
5. Fitzgerald A, Aditya H, Prior A, McNeill E, Pentland B. Anoxic brain injury: Clinical patterns and functional outcomes. A study of 93 cases. *Brain Inj*. 2010;24:1311-1323.
6. Moulart VR, Verbunt JA, van Heugten CM, Wade DT. Cognitive impairments in survivors of out-of-hospital cardiac arrest: a systematic review. *Resuscitation*. 2009;80:297-305.
7. Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin*. 2006;24:1-21.
8. Venkat P, Chopp M, Chen J. Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp Neurol*. 2015;272:97-108.
9. Kim YH, Kim LW, Chung DO. Pharmacotherapy of Vascular Dementia. *J Korean Geriatr Psychiatry*. 1999;3(2):199-128.
10. Shibayama H, Kasahara Y, Kobayashi H. Prevalence of dementia in a Japanese elderly population. *Acta Psychiatr Scand*. 1986;74(2):144-151.
11. Skoog I. Vascular aspects in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2000;59:37-43.
12. Lee JH. Treatment of Vascular Dementia: A comprehensive Review. *J Korea Neurol Assoc*. 2003;21(5):445-454.
13. Mayeux R, Ottman R, Tang MX, Noboa-Bauza L,

- Marder K, Gurland B, Stern Y. Genetic susceptibility and head injury as risk factors for Alzheimer's disease among community-dwelling elderly persons and their first-degree relatives. *Ann Neurol*. 1993;33:494-501.
14. Roberson MR, Kolasa K, Parsons DS, Harrell LE. Cholinergic denervation and sympathetic ingrowth result in persistent changes in hippocampal muscarinic receptors. *Neuroscience*. 1997;80:413-418.
  15. Man SC, Chan KW, Lu JH, Durairajan SS, Liu LF, Li M. Systemic review on the efficacy and safety of herbal medicines for vascular dementia. *Evi-Based Com and Alt Med*. 2012;2012:426215.
  16. Han SH. Novel pharmacotherapies for Alzheimer's disease. *J Korean Med Assoc*. 2009;52(11):1059-1068.
  17. Ma W, Wang KJ, Cheng CS, Yan GQ, Lu WL, Ge JF, Cheng YX, Li N. Bioactive compounds from *Cornus officinalis* fruits and their effects on diabetic nephropathy. *J Ethnopharmacol*. 2014; 153(3):840-845.
  18. Kang DG, Choi DH. Endothelial NO/cGMP-dependent vascular relaxation of cornuside isolated from the fruit of *Cornus officinalis*. *Planta Med*. 2007;73 (14):1436-1440.
  19. Kim SH, Kim BK, Lee YC. Effects of Corni fructus on ovalbumin-induced airway inflammation and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic asthma. *J Inflamm (Lond)*. 2012;9(1):9.
  20. Hwang BH, Kwon DH, Choi EO, Kim MY, Ahn KI, Ji SY, Kim JS, Kim KI, Park NJ, Kim BH, Kim GY, Hong SH, Park C, Jeong JS, Choi YH. Corni Fructus attenuates testosterone-induced benign prostatic hyperplasia by suppressing 5 $\alpha$ -reductase and androgen receptor expression in rats. *Nutr Res Pract*. 2018; 12(5):378-386.
  21. Jo HG, Kang HJ, Go YJ, Park JW, Park SG, Jung PS, Lee SY, Sul JU, Jung MY, Moon YH. Tendency of Korean herbal medicine prescriptions used for dementia in Korean experimental researches - Mainly about domestic dissertations for a degree - *J Korean Medicine Rehabilitation*. 24(4):2288-4114.
  22. May BH, Lu C, Bennett L, Hugel HM, Xue CC. Evaluating the traditional Chinese literature for herbal formulae and individual herbs used for age-related dementia and memory impairment. *Biogerontology*. 2012;13(3):299-312.
  23. Sangha JS, Sun X, Wally OS, Zhang K, Ji X, Wang Z, et al. Liuwei Dihuang (LWDH), a traditional Chinese medicinal formula, protects against  $\beta$ -amyloid toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2012;7(8):e43990.
  24. Wang J, Yao K, Yang X, Liu W, Feng B, Ma J, Du X, Wang P, Xiong X. Chinese patent medicine liu wei di huang wan combined with antihypertensive drugs, a new integrative medicine therapy, for the treatment of essential hypertension: a systematic review of randomized controlled trials. *Evid-Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:714805.
  25. Choi BM. Effect of YkJeungJiHwangTang (YJHT) on inhibitions of impairment of learning and memory and acetylcholinesterase in amnesia mice. Graduate School of Daejeon University. 2001.
  26. Song HS. Effect on anti-Alzheimer's disease by Jeonmaedan in CT-105 overexpressed SK-N-SH cell Lines. Graduate School of Daeguhaany University. 2003.
  27. Kim KH. The effects of Yukmijihwang-tang (UJT) on Dementia induced by focal brain ischemic injury in rats. Graduate School of Dongshin University. 2005.
  28. Lee KY. The anti-dementia effects of Kukijihwang-tang on improvement memory retention and suppression of ChAT and AchE activities in rat cerebrum. Graduate School of Kyunghee University. 2005.
  29. Wu CR, Lin LW, Wang WH, Hsieh MT. The ameliorating effects of LiuWei Dihuang Wang on cycloheximide-induced impairment of passive avoidance performance in rats. *J Ethnopharmacol*. 2007;113(1):79-84.
  30. Hsieh MT, Cheng SJ, Lin LW, Wang WH, Wu CR. The ameliorating effects of acute and chronic administration of LiuWei Dihuang Wang on learning performance in rodents. *Biol Pharm Bull*. 2003;26(2):156-61.
  31. Sangha JS, Sun X, Wally OS, Zhang K, Ji X, Wang Z, Wang Y, Zidichouski J, Prithiviraj B, Zhang J. Liuwei Dihuang (LWDH), a traditional Chinese medicinal formula, protects against  $\beta$ -amyloid toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2012;7(8): e43990.
  32. Roth S, Liesz A. Stroke research at the crossroads - where are we heading? *Swiss Med Wkly*. 2016;146:w14329.
  33. 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.
  34. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: a review of population-based

- studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol*. 2003; 2:43–53.
35. Kim YS. Integrated clinical approach to stroke. Seoul: Seowondang. 1997:303–8,317–29.
36. Cucchiara B, Ross M. Transient ischemic attack: risk stratification and treatment. *Ann Emerg Med*. 2008;52:S27–39.
37. Barlow SJ. Identifying the brain regions associated with acute spasticity in patients diagnosed with an ischemic stroke. *Somatosens Mot Res*. 2016;33(2): 104–111.
38. Shino A, Tajima Y, Takuwa H, Masamoto K, Taniguchi J, Wakizaka H, Kokuryo D, Urushihata T, Aoki I, Kanno I, Tomita Y, Suzuki N, Ikoma Y, Ito H. Long-term effects of cerebral hypoperfusion on neural density and function using misery perfusion animal model. *Sci Rep* 2016;6:25072.
39. Zuloaga KL, Zhang W, Yeiser LA, Stewart B, Kukino A, Nie X, Roese NE, Grafe MR, Pike MM, Raber J, Alkayed NJ. Neurobehavioral and imaging correlates of hippocampal atrophy in a mouse model of vascular cognitive impairment. *Transl Stroke Res*. 2015;6(5):390–398.
40. Zhang Y, Pizzute T, Pei M. A review of crosstalk between MAPK and Wnt signals and its impact on cartilage regeneration. *Cell Tissue Res*. 2014;358 (3):633–649.
41. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res*. 2015;35(6):600–604.
42. Zhou J, Du T, Li B, Rong Y, Verkhatsky A, Peng L: Crosstalk Between MAPK/ERK and PI3K/AKT Signal Pathways During Brain Ischemia/Reperfusion. *ASN Neuro* 2015, 7(5).
43. Liu R, Tang JC, Pan MX, Zhuang Y, Zhang Y, Liao HB, Zhao D, Lei Y, Lei RX, Wang S, Liu AC, Qin XP, Chen J, Zhang ZF, Wan Q. ERK 1/2 activation mediates the neuroprotective effect of BpV(pic) in focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neurochem Res*. 2018;43(7):1424–1438.
44. Yang S, Zhou G, Liu H, Zhang B, Li J, Cui R, Du Y. Protective effects of p38 MAPK inhibitor SB202190 against hippocampal apoptosis and spatial learning and memory deficits in a rat model of vascular dementia. *Biomed Res Int*. 2013;2013: 215798.
45. Schmidt-Kastner R: Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia. *Neuroscience* 2015, 309:259–279.
46. Spencer SJ, Mouihate A, Pittman QJ. Peripheral inflammation exacerbates damage after global ischemia independently of temperature and acute brain inflammation. *Stroke*. 2007;38(5):1570–1577.
47. Vargas-Restrepo F, Sabogal-Guaqueta AM, Cardona-Gomez GP. Quercetin ameliorates inflammation in CA1 hippocampal region in aged triple transgenic Alzheimer s disease mice model. *Biomedica*. 2018; 38:69–76.