



Original Article / 원저

丹參을 뇌졸중 동물모델에 적용하기 위한 기초적인 네트워크 약리학 분석

최명진^{1†}, 양원진^{1†}, 이병호², 조수인^{1*}

¹부산대학교 한의학전문대학원, ²인주한방병원

Basic network pharmacological analysis of *Salvia miltiorrhiza* root for further application to an animal stroke model

Choi Myeongjin^{1†}, Yang Wonjin^{1†}, Lee Byoung-ho², Cho Suin^{1*}

¹School of Korean Medicine, Pusan National University

²Inju Hospital of Korean Medicine

ABSTRACT

Objectives : The root of *Salvia miltiorrhiza*, known as 'Dansam (DS, 丹參)', is used for and treating cardiovascular diseases based on its efficacy of promoting blood circulation and breaking through a blood stasis. In this study, we would like to see if DS could be effectively used for stroke from the perspective of network pharmacology.

Methods : The analysis was conducted using Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) database to derive the main active compounds of DS and identify the mechanism of each compound acting on the human body. The networks between compounds, target protein and disease were expressed through Cytoscape. Protein-protein interaction (PPI) analysis was performed using STRING database.

Results : Fifty two active compounds of DS were identified by screening the ingredients of DS through TCMSP. Based on the networks of these compounds with target protein and disease, it can be said that DS might be effective for preventing and treating stroke. PPI result showed that adrenergic receptor has many interactions among proteins, indicating its significance in stroke pathway.

Conclusion : In this study, we derived target proteins and target diseases of DS that could be used in study of stroke. However, since it is uncertain if these targets can be controlled by DS extracts or not, we would like to confirm the results with further animal experiments.

Key words : *Salviae Miltiorrhizae Radix*, ischemic stroke, systems biology.

I. 서론

단삼(*Salvia miltiorrhiza*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본으로 뿌리를 丹蓼(단삼, *Salviae Miltiorrhiza Radix*)이라는 한약재로 사용하며, 단삼에는 涼血消癰, 除煩安神, 活血祛瘀의 효능이 있어¹⁾ 이로 인해 현대에 와서는 관상동맥질환을 포함한 심혈관질환의 예방 및 치료에 사용되고 있다²⁾. 이와 같이 단삼은 심혈관질환 계통의 질병에 있어 그 임상적 응용의 방법이 다양하나, 본 연구에서는 뇌졸중(stroke)에 효과적으로 사용될 수 있을지의 여부와 효과가 있다면 단삼이 작용하는 주요 타깃 단백질들을 확인하고자 한다.

뇌졸중은 뇌혈관이 막히거나 출혈이 발생함에 따라 중추신경계의 손상이 나타나는 신경학적 결손을 의미하는 질환으로, 전체 뇌졸중의 발생 중 약 85%가 허혈성 뇌졸중(ischemic stroke)인 뇌경색에 해당한다³⁾. 단삼의 활성성분인 tanshinone IIA, tanshinone IIB, salvianolic acid A, salvianolic acid B 등이 뇌졸중의 기전에 관여하는 것에 대해서는 이미 다양한 연구가 이루어진 바⁴⁻⁷⁾가 있다. 국내에서도 단삼의 항산화, 항염증 작용에 대한 여러 연구 결과가 보고된 바가 있고^{8,9)}, 그 외에도 세포자연사에 미치는 영향에 대한 연구^{10,11)}, 항혈전 효과에 대한 연구¹²⁾, 항암효과에 대한 연구^{13,14)} 등 다양한 연구가 진행된 것으로 보이나, 그에 비해 단삼 단일 약재 또는 특정 유효성분을 뇌졸중과 직접적으로 연관 지어 연구한 사례¹⁵⁻¹⁷⁾는 상대적으로 적은 것으로 나타났다.

네트워크 약리학(network pharmacology)은 비교적 최근에 사용되기 시작한 용어로, 기존의 one drug, one target의 패러다임에서 벗어나 multiple target으로의 전환에 입각하고 있으며, 이러한 특성을 바탕으로 한의약 연구에 응용될 수 있을 것으로 기대된다¹⁸⁾. 네트워크 약리학 연구의 수행은 중의학 데이터베

이스를 바탕으로 이루어지는데, 대표적인 데이터베이스는 Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP)¹⁹⁾으로 많은 네트워크 약리학 연구 방법을 수행한 중의학 논문에서 주로 사용하고 있다. 본 연구에서도 TCMSP 데이터베이스를 사용하여 분석을 진행하였으며, 이를 통해 단삼의 주요 활성 성분을 도출하고 각 성분들이 인체에 작용하는 주요 기전을 확인함으로써 단삼이 뇌경색 동물 모델에 활용되어 유의한 효과를 나타낼 경우 이에 관여할 것으로 예측되는 주요 기전을 도출하고자 하였다.

II. 연구 방법

1. 단삼의 성분-타깃 및 성분-질환 분석

TCMSP의 데이터를 통해 단삼을 구성하는 화합물을 확인하였으며, 각 화합물의 흡수, 분포, 대사, 배설 특성을 고려하여 경구생체이용률(OB, oral bioavailability), 약물유사성(DL, drug likeness), Caco-2 투과성, 혈액-뇌 장벽(BBB, blood-brain barrier)을 포함한 변수를 사용하여 잠재적 활성 화합물을 선별하였다. 상기한 매개변수에 대한 설명은 다음과 같다. OB는 경구 투여한 약물이 순환계에 도달하는 정도를 나타내며, DL은 기존 약물과 잠재적인 화합물이 얼마나 비슷한지를 나타내는 척도로 사용되고, Caco-2 투과성은 위장관에서 약물이 얼마나 흡수되는지를 나타내며, BBB는 혈액-뇌 장벽을 화합물이 통과하는 정도를 나타낸다. 본 연구에서는 위 매개변수들의 임계값을 $OB \geq 20\%$, $DL \geq 0.18$, $Caco-2 \geq 0$, $BBB \geq -0.3$ 으로 설정하고, 이에 따라 활성 화합물을 선별하였으며, Cytoscape (ver. 3.8.0)을 사용하여 선별한 화합물과 타깃 사이의 네트워크를 도식화하였다. 또한 TCMSP에서 단삼의 구성 화합물이 각각 작용하는 질환을 선별하여 위의 성분-타깃 분석과 같은 방식을

†These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author: Cho Suin. Division of Pharmacology, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yongsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea.
Tel : +82-51-510-8457, E-mail : sicho@pusan.ac.kr

•Received : December 8, 2020 / Revised : February 15, 2021 / Accepted : February 15, 2021

통해 성분-질환 네트워크를 도식화하였다.

2. STRING database를 활용한 상위 20% 활성 물질의 PPI network 분석

성분-타깃 네트워크에서 높은 연결빈도를 보였던 타깃 상위 20%를 선별하여, STRING database²⁰⁾를 활용하여 PPI network (Protein-protein interaction network)를 분석하였다. 또한 STRING database에서 Gene Ontology (GO) term 분석을 함께 수행하였는데, biological process (BP), molecular function (MF), cellular component (CC)에 대해 항목별 false discovery rate가 0.0001 미만인 값 중 상위 8개를 선별하여 정리하였다.

III. 결과

1. 단삼의 성분-타깃 및 성분-질환 네트워크 분석 결과

TCMSP를 사용하여 단삼의 활성 화합물을 선별한

결과 61종의 화합물을 확인할 수 있었으며(Table 1), 선별 과정에서 화합물의 흡수와 분포, 대사, 배설과 같은 특성을 고려한 변수로 OB, DL, Caco-2 투과성, BBB (OB \geq 20%, DL \geq 0.18, Caco-2 \geq 0, BBB \geq -0.3)를 적용하였다. 위 분석 결과를 바탕으로 성분-타깃 네트워크를 구성하여 Figure 1과 같은 결과를 얻을 수 있었는데, 단삼을 구성하는 61종의 화합물 중 52종이 107종의 타깃에 작용하는 것을 확인하였다. 상호작용이 없는 MOL007149, MOL007146, MOL007144, MOL007128, MOL007123, MOL007118, MIL007092, MOL007804, MOL006824는 결과에서 제외하였다. 화합물과 가장 많은 상호작용을 하는 타깃은 prostaglandin G/H synthase 2로 45종의 화합물에 영향을 받는 것으로 나타났으며, 그 외에 beta-2 adrenergic receptor가 35종, sodium channel protein type 5 subunit alpha가 34종, mu-type opioid receptor 5가 32종, neuronal acetylcholine receptor protein, alpha-7 chain이 31종의 화합물과 상호작용을 하는 것을 확인할 수 있었다.

Table 1. List of potentially bioactive compound of Dansam (DS) from TCMSP database.

Mol ID	Compound	MW	OB	Caco-2	BBB	DL
MOL001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone	280.34	38.75	0.96	0.39	0.36
MOL001659	Poriferasterol	412.77	43.83	1.44	1.03	0.76
MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	414.79	36.91	1.45	1.14	0.75
MOL001942	isoimperatorin	270.3	45.46	0.97	0.66	0.23
MOL002222	sugiol	300.48	36.11	1.14	0.7	0.28
MOL000263	oleanolic acid	456.78	29.02	0.59	0.07	0.76
MOL002651	Dehydrotanshinone II A	292.35	43.76	1.02	0.52	0.4
MOL006824	α -amyrin	426.8	39.51	1.37	1.2	0.76
MOL007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	298.41	33.77	1.19	0.8	0.29
MOL007038	Dehydromiltirone	280.39	24.57	1.14	0.74	0.26
MOL007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione	264.34	40.86	1.23	0.81	0.23
MOL007045	3 α -hydroxytanshinone II a	310.37	44.93	0.53	0.22	0.44
MOL007046	3beta-Hydroxytanshinone IIA	310.37	20.53	0.48	-0.13	0.45
MOL007049	4-methylenemiltirone	266.36	34.35	1.25	0.87	0.23
MOL007054	(4bS,8aS,10S)-10-hydroxy-2-isopropyl-4b,8,8-trimethyl-5,6,7,8a,9,10-hexahydrophenanthrene-3,4-dione	316.48	26.25	0.41	-0.06	0.31
MOL007058	formyltanshinone	290.28	73.44	0.54	-0.28	0.42
MOL007061	Methylenetanshinquinone	278.32	37.07	1.03	0.46	0.36
MOL007064	przewalskin b	330.46	110.32	0.34	0.22	0.44

MOL007065	przewalskin c	330.51	20.34	1.07	0.69	0.35
MOL007069	przewaquinone c	296.34	55.74	0.42	-0.3	0.4
MOL007077	sclareol	308.56	43.67	0.84	0.51	0.21
MOL007079	tanshinaldehyde	308.35	52.47	0.57	-0.07	0.45
MOL007081	Danshenol B	354.48	57.95	0.53	0.11	0.56
MOL007082	Danshenol A	336.41	56.97	0.33	-0.01	0.52
MOL007084	Aethiopinone	296.44	21.02	1.26	0.9	0.21
MOL007085	Salvilenone	292.4	30.38	1.46	1.07	0.38
MOL007088	cryptotanshinone	296.39	52.34	0.95	0.51	0.4
MOL007091	dan-shexinkum b	280.34	21.67	0.83	0.18	0.26
MOL007092	dan-shexinkum c	252.28	22.71	0.75	0.03	0.21
MOL007093	dan-shexinkum d	336.41	38.88	0.67	-0.15	0.55
MOL007094	danshenspiroketallactone	282.36	50.43	0.88	0.51	0.31
MOL007098	deoxyneocryptotanshinone	298.41	49.4	0.85	0.24	0.29
MOL007099	dihydroisotanshinone I	278.32	20.91	0.92	0.2	0.36
MOL007100	dihydrotanshinolactone	266.31	38.68	1.26	0.81	0.32
MOL007101	dihydrotanshinone I	278.32	45.04	0.95	0.43	0.36
MOL007105	epidanshenspiroketallactone	284.38	68.27	0.9	0.61	0.31
MOL007107	C09092	286.5	36.07	1.63	1.54	0.25
MOL007108	isocryptotanshinone	296.39	54.98	0.93	0.34	0.39
MOL007111	Isotanshinone II	294.37	49.92	1.03	0.45	0.4
MOL007112	Isotanshinone I	276.3	29.72	1.01	0.19	0.36
MOL007115	manool	304.57	45.04	1.28	1.16	0.2
MOL007118	microstegiol	298.46	39.61	1.05	0.99	0.28
MOL007119	miltionone I	312.39	49.68	0.35	-0.11	0.32
MOL007120	miltionone II	312.39	71.03	0.62	0.03	0.44
MOL007121	miltipolone	300.43	36.56	0.5	0.17	0.37
MOL007122	Miltirone	282.41	38.76	1.23	0.87	0.25
MOL007123	miltirone II	272.32	44.95	0.04	-0.25	0.24
MOL007124	neocryptotanshinone ii	270.35	39.46	0.76	0.16	0.23
MOL007125	neocryptotanshinone	314.41	52.49	0.35	-0.13	0.32
MOL007126	przewalskin	272.42	25.18	1.24	0.98	0.28
MOL007127	1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[5,6-g]benzofuran-6,10,11-trione	280.29	34.72	0.5	-0.27	0.37
MOL007128	paramiltioic acid	332.43	25.92	0.05	-0.29	0.37
MOL007143	salvilenone I	270.4	32.43	1.13	0.77	0.23
MOL007144	salviol	302.5	24.31	0.95	0.42	0.28
MOL007145	salviolone	268.38	31.72	1.04	0.72	0.24
MOL007146	salvipisone	312.44	25.03	0.92	0.31	0.24
MOL007149	NSC 122421	300.48	34.49	1.08	0.63	0.28
MOL007153	Tanshilactone	264.29	25.11	1.26	0.75	0.32
MOL007154	tanshinone iia	294.37	49.89	1.05	0.7	0.4
MOL007156	tanshinone VI	296.34	45.64	0.48	-0.28	0.3
MOL007157	tanshinone i	276.3	29.27	1.05	0.53	0.36

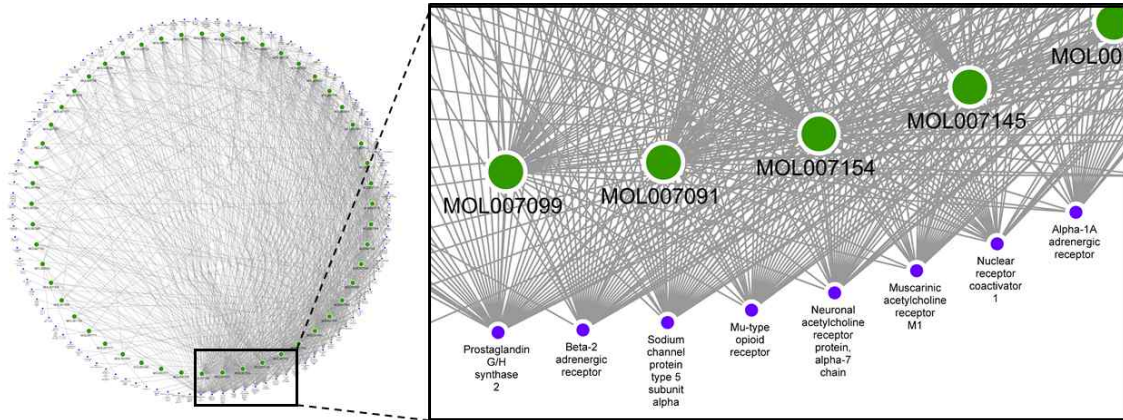


Fig. 1. Compound–target network of DS based on Table 1. Green circles (inner circles) represent the compounds, while purple circles (outer circles) delineate the target proteins. The left circle refers to the entire interactions of DS compound–target network. Important targets are enlarged in the right rectangle.

성분–질환 네트워크 분석을 수행한 결과 단삼의 구성 화합물이 작용하는 질환은 총 254개였으며(Fig. 2), 상호작용이 없는 10종의 물질들(MOL006824, MOL007084, MOL007092, MOL007115, MOL007118, MOL007123, MOL007128, MOL007144, MOL007146, MOL007149)은 이후 분석에서 제외하였다. 단삼의 구성 성분들이 가장 많이 작용하는 것으로 분석된 질환은 유방암(breast cancer)으로 49종의 화합물이, 두 번째로는 알츠하이머병(Alzheimer's Disease)

에 48종의 화합물이 작용하는 것으로 나타났다. 세 번째로는 47종의 화합물이 작용한 염증(inflammation) 관련 질환이 선별되었다. 염증 반응은 특정 질환이 아닌 다양한 질환에 나타나는 질병의 과정에 해당하므로, 순위가 낮은 다른 질환에 참고하는 분석 결과로 보아야 할 것이다. 화합물의 작용이 열 번째로 많았던 뇌졸중(stroke)의 경우, 뇌 손상 과정에 있어 염증 반응이 명확하게 나타나므로 질환의 치료에 단삼의 구성 화합물이 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

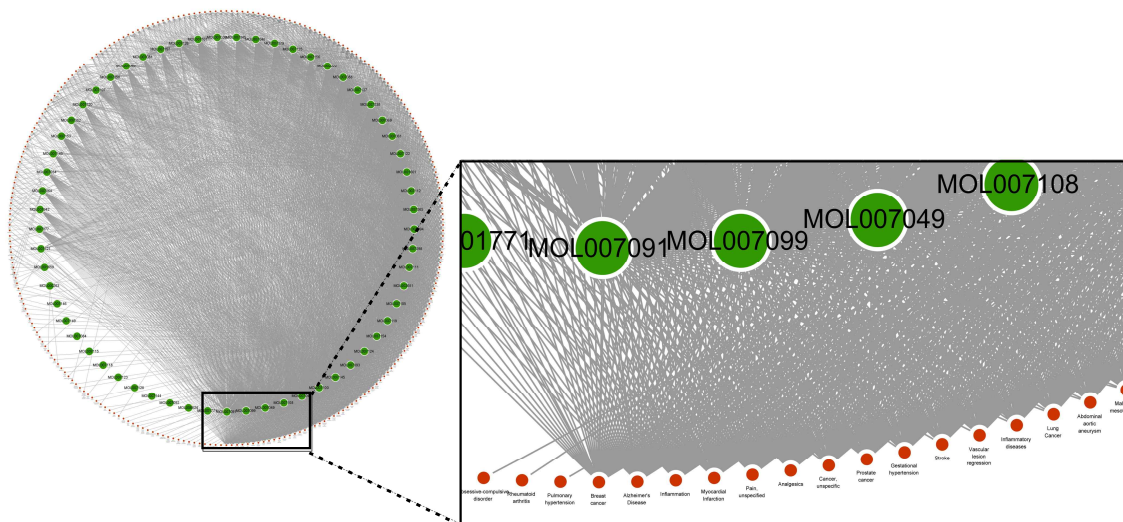


Fig. 2. Compound–disease network of DS. Green circles (inner circles) stand for the compounds, while red circles (outer circles) refer to the diseases. The left circle refers to the entire interactions of DS compound–disease network. Important diseases are enlarged in the right rectangle.

위의 성분-질환 네트워크 분석 결과 중 뇌질환과 관련이 있는 질환을 선별한 결과, 총 52종의 질환이 선별되었는데(Table 2), 이를 통해 알츠하이머병, 뇌수막종(meningioma), 뇌졸중 및 혈관 병변(vascular

lesion regression) 등이 상위를 차지하고 있음을 확인하였으며, 이를 통해 퇴행성 뇌질환에 단삼이 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

Table 2. Selected 52 diseases related to brain disease.

Target gene	Nodes	Target gene	Nodes
Prostaglandin G/H synthase 2	45	Alpha-1B adrenergic receptor	24
Beta-2 adrenergic receptor	35	Delta-type opioid receptor	24
Sodium channel protein type 5 subunit alpha	34	Dopamine D1 receptor	24
Mu-type opioid receptor	32	Carbonic anhydrase II	22
Muscarinic acetylcholine receptor M1	31	Muscarinic acetylcholine receptor M2	22
Neuronal acetylcholine receptor protein, alpha-7 chain	31	Nuclear receptor coactivator 2	22
Alpha-1A adrenergic receptor	29	Androgen receptor	20
Nuclear receptor coactivator 1	29	Estrogen receptor	20
Muscarinic acetylcholine receptor M3	28	Thrombin	20
Retinoic acid receptor RXR-alpha	28	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1	19
Prostaglandin G/H synthase 1	27	Alpha-1D adrenergic receptor	18
Muscarinic acetylcholine receptor M5	25	Muscarinic acetylcholine receptor M4	18
Acetylcholinesterase	24		

2. STRING database를 이용한 PPI network 및 GO 분석 결과

성분-타겟 네트워크에서 높은 상호작용의 빈도를 보였던 타겟의 상위 약 20%에 해당하는 타겟을 선별하여(Table 3), STRING database를 통해 PPI network (protein-protein interaction network)의 분석을 시행하였다(Fig. 3). 그 중 6위에 해당하는 neuronal acetylcholine receptor protein, alpha-7 chain과 23위에 해당하는 thrombin은 STRING database에서

일치하는 단백질을 찾지 못해, 24위에 해당하는 gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1와 25위에 해당하는 alpha-1D adrenergic receptor를 추가하여 분석을 시행하였다. 그 결과, muscarinic acetylcholine receptor M1, alpha-1B adrenergic receptor, alpha-1D adrenergic receptor, beta-2 adrenergic receptor와 같은 단백질들이 중심 작용을 하는 것으로 나타났다.

Table 3. List of targets with top 20% frequency of interaction at compound-target network.

Disease	Interaction	Disease	Interaction	Disease	Interaction
Alzheimer's Disease	48	Migraine	24	Attention-deficit hyperactivity disorder	5
Inflammation	47	Motor neurone disease	24	Delusional disorder	5
Meningioma	45	Parkinson Disease	24	Disabling peak-dose dyskinesias	5
Stroke	45	Shy-Drager syndrome	24	Gilles de la Tourette's disorder	5
Vascular lesion regression	45	Brain injury	23	Neuroleptic malignant syndrome	5
Cognitive deficits	36	Tremor, unspecified	22	Neurological diseases	5

Multiple Sclerosis	36	Cocaine dependence	20	Psychiatric illness	5
Anxiety disorder, unspecified	35	Gliomas	20	Dementia	2
Depression	35	Neurodegenerative diseases	20	Brain ischemia	1
Parkinson's disease	35	Insomnia	19	Central nervous system diseases	1
Schizophrenia	35	Manic disorder	18	Delirium	1
Epileptic seizures	34	Neurologic and psychiatric diseases	18	Disorders of initiating and maintaining sleep [insomnias]	1
Refractory partial epilepsy	34	Adrenocorticotropic hormone-secreting pituitary tumors	10	Hypothalamic-pituitary ACTH function	1
Neuropsychiatric disorders	31	Bipolar Affective Disorder	9	Mood [affective] disorders	1
Ischemia	27	Ischemia reperfusion injuries	6	Motor disorder	1
Thrombosis	25	Major Depressive Disorder	6	Obsessive-compulsive disorder	1
Hypoxic-ischemic encephalopathy	24	Vascular disease	6	Tardive dyskinesia	1

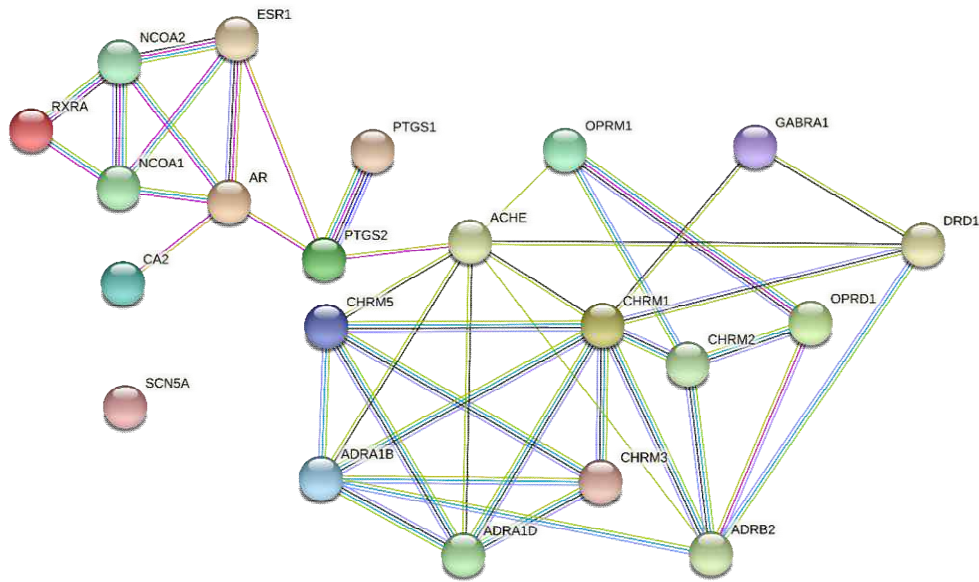


Fig. 3. PPI network constructed using STRING database. The edge between proteins means that the two sides are known or predicted to have interaction.

PPI network 분석 결과를 바탕으로 GO 분석을 통해 BP, MF, CC에 주로 작용하는 경로를 분석한 결과는 Table. 4, 5, 6과 같다. BP에 주로 관여한 경로는 phospholipase C-activating G protein-coupled receptor signaling pathway, adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway, cellular response to endogenous stimulus 등

이었으며, MF에 주로 관여한 경로는 G protein-coupled amine receptor activity, signaling receptor activity, neurotransmitter receptor activity 등이었고, CC에 주로 관여한 경로는 plasma membrane region, integral component of plasma membrane, plasma membrane 등인 것으로 나타났다. 이들을 종합하여 그래프로 나타낸 결과는 Figure 4와 같다.

Table 4. GO analysis about biological process.

GO term	Description	False Discovery Rate
GO:0008227	G protein-coupled amine receptor activity	2.42E-11
GO:0038023	signaling receptor activity	1.08E-09
GO:0030594	neurotransmitter receptor activity	1.18E-09
GO:0016907	G protein-coupled acetylcholine receptor activity	5.69E-09
GO:0099528	G protein-coupled neurotransmitter receptor activity	2.40E-08
GO:0004930	G protein-coupled receptor activity	1.42E-07
GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity	3.08E-07
GO:0004935	adrenergic receptor activity	7.00E-06

Table 5. GO analysis about molecular function.

GO term	Description	False Discovery Rate
GO:0098590	plasma membrane region	7.84E-10
GO:0005887	integral component of plasma membrane	8.06E-07
GO:0005886	plasma membrane	9.21E-07
GO:0045211	postsynaptic membrane	4.08E-06
GO:0098794	postsynapse	5.53E-06
GO:0045202	synapse	2.72E-05
GO:0043679	axon terminus	5.74E-05
GO:0030054	cell junction	7.81E-05

Table 6. GO analysis about cellular component.

GO term	Description	False Discovery Rate
GO:0007200	phospholipase C-activating G protein-coupled receptor signaling pathway	2.29E-14
GO:0007188	adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway	1.61E-12
GO:0071495	cellular response to endogenous stimulus	3.36E-12
GO:0007267	cell-cell signaling	4.80E-11
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	5.31E-11
GO:0006940	regulation of smooth muscle contraction	8.18E-11
GO:0071242	cellular response to ammonium ion	8.18E-11
GO:0008015	blood circulation	3.12E-10

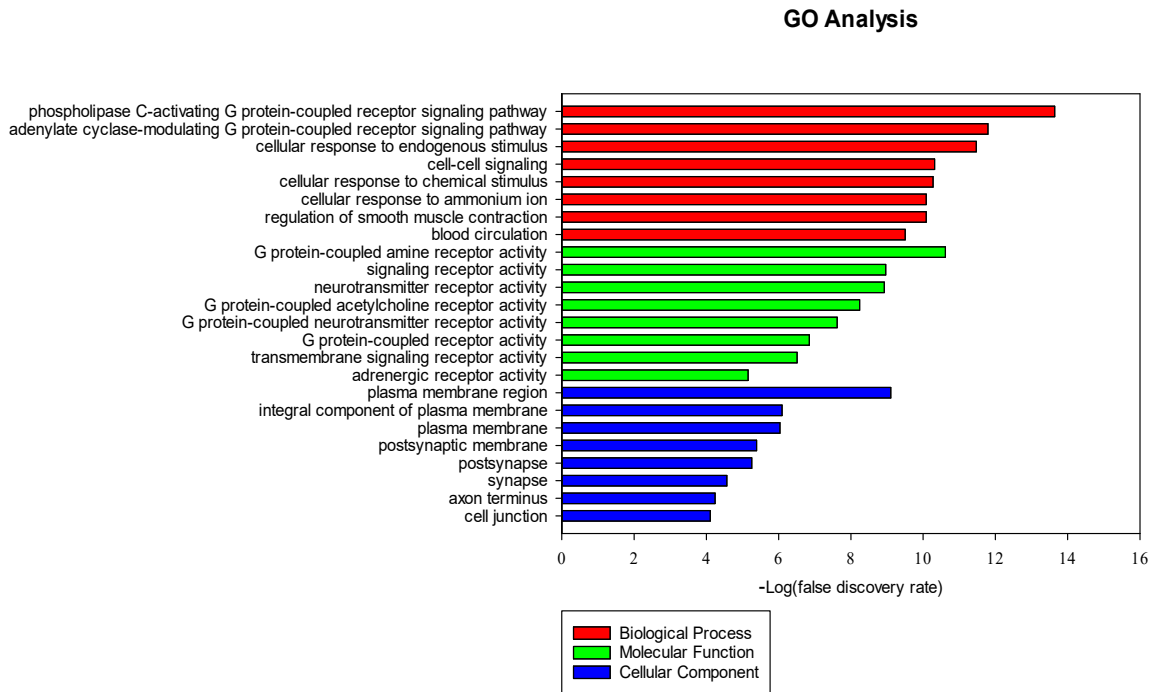


Fig. 4. GO term enrichment analysis about BP, MF, CC. GO categories for each function were classified by descending order of value, based on the false discovery rate.

IV. 고찰

단삼은 혈액순환을 촉진하고 어혈을 제거하는 등의 효능²¹⁾이 있어 한의학에서 혈행 장애와 관련된 여러 질환들에 사용하여 왔는데, 이러한 혈행의 장애는 현대의학에서 뇌졸중 특히 뇌경색과 그 의미가 통하는 것으로 유추된다. 따라서 본 연구팀에서는 향후 뇌경색 동물 모델에 활용하여 여러 한약재의 효능과 작용기전을 연구할 계획인데 본 연구에서는 단삼을 뇌경색 동물 모델에 적용했을 경우 유의한 결과를 나타낼 수 있을지와 분석에 활용할 타깃을 예측하기 위해 중의학 데이터베이스인 TCMSP를 활용하여 분석을 진행하였다.

단삼에 관한 선행연구들 중 Sun 등²²⁾은 단삼의 추출물이 흰쥐의 허혈성 급성 심근경색에 항산화 작용을 하여 손상을 억제한다는 것을 보고하였고, Ling 등²³⁾은 단삼 제제가 TNF α 에 의해 유도된 심근 세포의 손상을 억제하며 이러한 과정에 angiotensin II에 의한 콜라겐 합성의 감소가 관여함을 보고하였으며, Fei 등²⁴⁾은 대뇌 허혈을 일으킨 흰쥐에 단삼 추출물

을 투여한 결과 혈소판 응집이 억제되었다고 보고한 바가 있다. 단삼과 관련된 다른 연구자들의 보고 중 본 연구와 관련이 깊은 사례로는 단삼의 salvianolic acid B 성분이 대뇌 허혈을 일으킨 흰쥐의 뇌세포에 작용하여 항산화 효소의 생성에 관여하는 기전을 통해 손상을 억제하였다는 연구²⁵⁾가 있었는데, 약리 활성에 관여하는 특정 성분의 기전만을 보고하였을 뿐 다양한 작용기전에 대한 연구는 미흡한 것으로 판단되었다. 또한 Zhou 등의 연구²⁶⁾에서는 단삼 추출물이 허혈로 인한 심장 질환을, Feng 등의 연구²⁷⁾에서는 단삼의 salvianolic acid A 성분이 OGD (Oxygen-glucose deprivation) 조건에서의 뇌세포 손상을 억제하는 것으로 보고된 바가 있다. 이러한 연구 모델들이 본 연구팀에서 향후 수행하고자 하는 뇌경색 모델과 유사한 병리적 과정을 거치기 때문에, 단삼이 뇌경색에도 유효하게 작용할 것이라 추측하여 분석에 사용하였다.

향후 본 연구팀에서는 생쥐의 중대뇌동맥(middle Cerebral Artery, MCA) 혈류를 차단하여 뇌경색을 유발한 후 단삼 추출물의 활성을 연구할 계획인데,

MCA의 기시부에 혈류 차단을 위한 필라멘트를 삽입하는 모델을²⁸⁾을 사용할 예정으로 이 모델은 다른 뇌경색 동물 모델에 비해 재연성이 높다는 장점²⁹⁾이 있으며 허혈의 시간을 달리함으로써 뇌경색의 양을 조절할 수 있는 등의 장점이 있는데, 향후 연구에서는 90분 동안 허혈을 유발하여 뇌경색을 유도한 마우스에 단삼 추출물을 전처치 및 후처치하여 그 효과와 작용 기전을 관찰할 예정이다.

TCMSP를 활용하여 성분-타깃 네트워크를 분석한 결과 61개의 화합물이 선별되었으며(Table 1) 이러한 화합물들이 주로 작용하는 타깃에는 prostaglandin G/H synthase 2, beta-2 adrenergic receptor, sodium channel protein type 5 subunit alpha, mu-type opioid receptor 5, neuronal acetylcholine receptor protein, alpha-7 chain 등이 있었다(Fig. 1). 위의 화합물들이 작용하는 254종의 질환들을 분석하여(Fig. 2) 뇌질환과 관련된 것을 선별한 결과(Table 2), 퇴행성 뇌질환이 주요 타깃 질환이 될 수 있음을 확인하였다. 또한 염증 반응의 개선에도 단삼이 효과적으로 활용될 수 있었으므로, 허혈 이후 염증 반응으로 인한 뇌부종³⁰⁾과 뇌경색의 발생³¹⁾을 억제하여 뇌경색에 효과적으로 작용될 수 있을 것이라는 것을 알 수 있다. 향후 본 연구팀의 동물 모델을 이용한 실험에서 단삼의 뇌경색 억제 작용이 나타났을 때, 그 작용 기전을 확인하기 위해 PPI network의 분석 결과를 참고하고자 하였으며, 실제로 String Database를 통한 분석 결과 Figure 3에 나타난 단백질들이 주요 분석 대상이 될 수 있음을 알 수 있었다. 이 중 중심 역할을 하는 단백질에는 muscarinic acetylcholine receptor M1, alpha-1B adrenergic receptor, alpha-1D adrenergic receptor, beta-2 adrenergic receptor 등이 있었다. muscarinic acetylcholine receptor M1은 인지 기능을 조절하여 알츠하이머병의 치료에 중요한 역할을 한다고 보고된 바가 있다³²⁾. Adrenergic receptor의 경우 길항작용을 통해 활성을 억제했을 시 신경보호가 유도되어 급성 허혈성 뇌졸중의 회복이 촉진되며³³⁾, 허혈성 뇌졸중의 발생 후 활성이 증가하면 뇌졸중이 악화될 수 있다고 보고된 바³⁴⁾가 있다. 또한 허혈성 뇌졸중 동물 모델에서 beta-2 adrenergic receptor를 차단했을 시 항염증 효과를 나타냈다는 보고³⁵⁾와 단삼의 salvanolic acid A 성분이 beta-2 adrenergic receptor로 야기된 심장의

섬유화를 억제한다는 보고³⁶⁾가 있었는데, 이러한 연구 결과는 단삼이 beta-2 adrenergic receptor에 길항적으로 작용하여 뇌졸중의 치료에 사용될 수 있음을 보여준다. 따라서 향후 동물 모델을 사용한 연구를 수행하는 과정에서 adrenergic receptor를 중심으로 작용 기전을 확인할 필요가 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구팀에서는 동물 모델을 사용하여 단삼의 뇌경색 억제 효과를 확인하기에 앞서, 우선적으로 단삼의 타깃 단백질과 그 작용 기전을 예측하기 위해 중의약 데이터베이스를 활용한 성분-타깃 및 성분-질환 네트워크의 분석을 수행하였으며, 분석 결과를 통해 선별한 주요 타깃 단백질을 대상으로 단백질 상호작용 네트워크의 분석을 수행하였다. 그 결과 단삼의 구성 화합물 61종 중 뇌경색의 증상을 억제하는데 관여하는 화합물 52종이 확인되었으며, 이에 의해 조절되는 타깃 단백질은 107종, 작용하는 대상 질환은 254종인 것으로 나타났다. 특히 동물 연구를 통해 중점적으로 탐색되어야 할 타깃 단백질은 alpha-1B adrenergic receptor, alpha-1D adrenergic receptor, beta-2 adrenergic receptor 등인 것으로 나타났는데, 이러한 adrenergic receptor의 활성을 억제하는 것이 허혈성 뇌졸중의 치료에 있어 중요한 기전인 것을 선행 연구 사례를 통해 확인할 수 있었다. 이렇듯 본 연구에서는 뇌경색 연구에 사용될 수 있는 타깃 단백질과 타깃 질환들을 도출하였으나, 실제 동물 연구에서도 이러한 타깃이 단삼 추출물에 의해 조절될 수 있을지는 알 수 없기 때문에, 향후 동물 실험을 통해 그 결과를 확인하고자 한다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

1. Korea Pharmaceutical Information Center. Accessed November 9, 2020, available from:URL:



- <https://www.health.kr/researchInfo/herbalMedicine1.asp>.
2. Li M, Chen J, Peng Y, Wu Q, Xiao P. Investigation of Danshen and related medicinal plants in China. *J Ethnopharmacol.* 2008;120(3):419–26.
 3. Pandya RS, Mao L, Zhou H, Zhou S, Zeng J, Popp AJ, Wang X. Central nervous system agents for ischemic stroke: neuroprotection mechanisms. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2011;11(2):81–97.
 4. Lam BYH, Lo ACY, Sun X, Luo HW, Chung SK, Sucher NJ. Neuroprotective effects of tanshinones in transient focal cerebral ischemia in mice. *Phytomedicine.* 2003;10(4): 286–91.
 5. Yu X, Lin S, Zhou Z, Chen X, Liang J, Duan W, Yu X, Wen J, Chowbay B, Li C, Sheu F, Chan E, Zhou S. Tanshinone IIB, a primary active constituent from *Salvia miltiorrhiza*, exhibits neuro-protective activity in experimentally stroked rats. *Neurosci Lett.* 2007;417(3):261–5.
 6. Chien M, Chuang C, Chern C, Liou K, Liu D, Hou Y, Shen Y. Salvianolic acid A alleviates ischemic brain injury through the inhibition of inflammation and apoptosis and the promotion of neurogenesis in mice. *Free Radic Biol Med.* 2016;99:508–19.
 7. Fan Y, Luo Q, Wei J, Lin R, Lin L, Li Y, Chen Z, Lin W, Chen Q. Mechanism of salvianolic acid B neuroprotection against ischemia/ reperfusion induced cerebral injury. *Brain Res.* 2018;1679:125–33.
 8. Lee SE, Cho SI. Anti-inflammatory effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* extract on RAW264.7 cell via anti-oxidative activities. *Kor J Herbol.* 2015;30(4):89–94.
 9. Kim GH, Hong KK, Cho HB, Choi CM, Kim SB. Anti-inflammatory effects of *Salvia miltiorrhiza* Water extract in RAW 264.7 Cells and mouse induced by Lipopolysaccharide. *J Korean Obstet Gynecol.* 2019;32(2):1–17.
 10. Lee HG, Kim YS. Effects of *Salvia Miltiorrhiza Radix* on Neuronal Apoptosis following Intracerebral Hemorrhage of Rats. *Kor J Herbol.* 2012;27(3):89–94.
 11. Jeong SI, Lee JW, Jang SI. Effects of Tanshinone IIA from *Salvia Miltiorrhiza* Bunge on Induction of Apoptosis and Inhibition of Adipogenesis in 3T3–L1 Cells. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2009;23(6):1409–15.
 12. Yang SA, Im NK, Lee IS. Effects of Methanolic Extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on in vitro Antithrombotic and Antioxidative Activities. *Korean J Food SCI Technol.* 2007;39(1):83–7.
 13. Shon YH, Cho HJ, Kim MK, Jung EJ, Nam KS. Effect of Ethanol Extract from *Salvia miltiorrhiza* on Chemoprevention and Metastasis of Breast Cancer. *Kor J Pharmacogn* 2007; 38(1):62–6.
 14. Lee HJ, Hong SH, Kim SH. Anti-angiogenic Effect of Cryptotanshinone through Inhibition of HIF-1alpha and STAT3 in Prostate Cancer Cells. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2012;26(4):437–40.
 15. Son HY, Park YK. Neuroprotective effect of modified Boyanghwan–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.
 16. Kim SJ, Jeong HJ, Moon PD, Lee KM, Moon BS, Hyung NY, An NH, Hong SH, Um JY, Kim HM. Effect of Danchunwhangagam on LPS or DFX-induced cytokine production in peripheral mononuclear cells of cerebral infarction patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2005;27(4):683–96.
 17. Park CH, Kim YS. Effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* on Blood–Brain Barrier Impairment of ICH–Induced Rats. *Kor J Herbol.* 2014;29(1):19–26.
 18. Han SY, Kim YK. New Approach for Herbal Formula Research: Network Pharmacology. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2016;30(6):385–96.
 19. Lab of Systems Pharmacology. TCMSP: Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology

- Database and Analysis Platform. Accessed October 5, 2020, available from:URL:http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php.
20. STRING: Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins. Accessed October 24, 2020, available from:URL:https://string-db.org.
21. MEIm X, Cao Y, Che Y, Li J, Shang Z, Zhao W, Qiao Y, Zhang J. Danshen: a phytochemical and pharmacological overview. *Chin J Nat Med.* 2019;17(1):59–80.
22. Sun J, Huang SH, Tan BK, Whiteman M, Zhu YC, Wu YJ, Ng Y, Duan W, Zhu YZ. Effects of purified herbal extract of *Salvia miltiorrhiza* on ischemic rat myocardium after acute myocardial infarction. *Life Sci.* 2005;76(24): 2849–60.
23. Ling S, Luo R, Dai A, Guo Z, Guo R, Komesaroff PA. A pharmaceutical preparation of *Salvia miltiorrhiza* protects cardiac myocytes from tumor necrosis factor–induced apoptosis and reduces angiotensin II–stimulated collagen synthesis in fibroblasts. *Phytomedicine.* 2009;16(1):56–64.
24. Fei Y, Wang S, Yang L, Qiu Y, Li Y, Liu W, Xi T, Fang W, Li Y. *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen) extract attenuates permanent cerebral ischemia through inhibiting platelet activation in rats. *J Ethnopharmacol.* 2017; 207:57–66.
25. Lv H, Wang L, Shen J, Hao S, Ming A, Wang X, Su F, Zhang Z. Salvianolic acid B attenuates apoptosis and inflammation via SIRT1 activation in experimental stroke rats. *Brain Res Bull.* 2015;115:30–6.
26. Zhou R, He L, Li Y, Shen Y, Chao R, Du J. Cardioprotective effect of water and ethanol extract of *Salvia miltiorrhiza* in an experimental model of myocardial infarction. *J Ethnopharmacol.* 2012;139(2):440–6.
27. Feng S, Geng J, Sun R, Huang J, Tan Z, Yan C, AA J, Wang G. Protective Effect of Salvianolic Acid A on Brain Endothelial Cells after Treatment with Deprivation and Reperfusion of Oxygen–glucose. *Chin Herb Med.* 2017;9(4):335–43.
28. Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. 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.
29. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3445–54.
30. Cai M, Yu Z, Wang L, Song X, Zhang J, Zhang Z, Zhang W, Li W, Xiang J, Cai D. Tongxinluo reduces brain edema and inhibits post–ischemic inflammation after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Ethnopharmacol.* 2016;181:136–45.
31. Mo Z, Tang C, Li H, Lei J, Zhu L, Kou L, Li H, Luo S, Li C, Chen W, Zhang L. Eicosapentaenoic acid prevents inflammation induced by acute cerebral infarction through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Life Sci.* 2020;242:117133.
32. Shirey JK, Brady AE, Jones PJ, Davis AA, Bridges TM, Kennedy JP, Jadhav SB, Menon UN, Xiang J, Watson ML, Christian EP, Doherty JJ, Quirk MC, Snyder DH, Lah JJ, Levey AI, Nicolle MM, Lindsley CW, Conn PJ. A selective allosteric potentiator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor increases activity of medial prefrontal cortical neurons and restores impairments in reversal learning. *J Neurosci.* 2009;29(45):14271–86.
33. Monai H, Wang X, Yahagi K, Lou N, Mestre H, Xu Q, Abe Y, Yasui M, Iwai Y, Nedergaard M, Hirase H. Adrenergic receptor antagonism induces neuroprotection and facilitates recovery from acute ischemic stroke. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116(22):11010–9.
- neuroinflammatory response following ischemic stroke and increases stroke size. *J Neuroinflammation.* 2019 May 28;16(1):112–4.

35. Lin SY, Wang YY, Chang CY, Wu CC, Chen WY, Kuan YH, Liao SL, Chen CJ. Effects of β -Adrenergic Blockade on Metabolic and Inflammatory Responses in a Rat Model of Ischemic Stroke. *Cells*. 2020;9(6):1373. doi: 10.3390/cells9061373.
36. Lu H, Tian A, Wu J, Yang C, Xing R, Jia P, Yang L, Zhang Y, Zheng X, Li Z. Danshensu inhibits β -adrenergic receptors-mediated cardiac fibrosis by ROS/p38 MAPK axis. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(6):961-7.