



Original Article / 원저

녹내장 동물모델에서 단풍나무 잎 열수 및 에탄올 추출물의 안압 및 신경세포 보호 효과

오태우^{1#}, 박광일^{2#}, 마진열^{1*}

¹한국한의학연구원 한의기술응용센터

²경상국립대학교 수의과대학

Intraocular Pressure and Neuroprotective Effect of water and ethanol extracts from Leaves of *Acer palmatum thumb.* of glaucoma in DBA2/J mice

Tae Woo Oh^{1#}, Kwang-Il Park^{2#} and Jin Yeul Ma^{1*}

¹Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM)

²Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

ABSTRACT

Objectives : This study was conducted to evaluate the Intraocular pressure (IOP) and retina neuroprotective effect of *Acer palmatum thumb.* extract in glaucoma of DBA2/J mice vivo model.

Methods : The amount of change in intraocular pressure(IOP) was measured every two weeks for 30 weeks in the DBA2/J glaucoma animal model. The increased IOP were regrouping into drug treatment groups. EW and EE (1, 2 mg/ml) extract was eye drop administered twice per day for 8 weeks. After administration of the extract, IOP was measured every 1 week at a fixed time for 8 weeks, and protein expression levels and serological changes related to retinal function were investigated.

Results : The DBA2/J mice were IOP increased as time dependent, resulting in damage to the retinal function protein related in glaucoma animal model. However, administration of extracts from Leaves of *Acer palmatum thumb.* prevented an increase IOP, increased for Brn3 α , PKC α , and OPN1SW. Additionally, the expression of Aterocyte maker, GFAP was decreased in DBA2/J mice.

© 2021 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusions : These results demonstrate that both IOP and age can be considered in studies using DBA/2J mice and suggest that the extracts from Leaves of *Acer palmatum* thumb. regulating of IOP and expression of proteins related to retinal function.

Key words : DBA/2J, Glaucoma, Intraocular pressure(IOP), Retina, *Acer palmatum* thumb.

I. 서론

녹내장의 정의는 눈 속에 있는 시신경이 점점 약해지면서 보는 시야가 좁아지는 병이다. 녹내장의 원인은 아직 확실하게 규명되지 않았으나, 여러 가지 위험 인자들 중에서 안압 상승과 연령이 가장 관련 높은 인자로 꼽힌다. 특히 안구의 안압 상승은 시신경 섬유를 압박하게 되고, 이는 신경세포 사멸을 유도하면서, 시신경 혈류장애 등으로 인해 신경 손상이 유발되어 그 결과로 인하여 시야장애를 초래하는 것으로 알려져 있다¹⁾.

세계보건기구(WHO)에 의하면, 녹내장 환자 수는 전 세계적으로 6천만명 이상으로 추정되며, 세계 인구의 0.5~4%의 발병율로, 시력상실을 초래하는 다양한 원인 중 두 번째 원인으로 자리매김하고 있다. 특히 시력상실 원인 중 44%가 녹내장으로 인하여 실명한다고 알려져 있으며, 급성 녹내장의 경우 안압이 급속도로 높아지는 현상으로, 이는 전체의 녹내장의 10% 정도를 차지한다²⁾. 최근 우리나라의 고령화 추세가 발 빠르게 진행되면서, 녹내장의 환자 수 또한 늘어나고 있는 추세이다. 국민건강보험공단에 따르면, 녹내장 진료환자 수는 2007년에서 2014년 사이 약 2배 이상 증가하였으며 (36만3천194명(2007년)→70만6천310명(2014년)), 특히 진료 환자 중 80% 이상이 40세 이상으로 나타났으며, 전체 고령화 인구 중 65세 이상에서 약 3.5%가 녹내장으로 진료를 받는 것으로 나타났다. 앞서 말한바와 같이 녹내장은 안과 질환 중 실명을 일으킬 수 있는 가장 대표적인 질환으로 세계 실명 원인의 15%를 차지할 정도이며³⁾, 녹내장에서의 시력 소실은 안압의 상승과 더불어 시신경 축삭의 손상 및 망막신경절세포사가 주된 원인으로, 안구 내 안압의 상승은 녹내장으로 인한 시력

상실을 가져올 수 있는 핵심적인 위험요인으로 지적되고 있다. 이러한 안압은 안방수의 압력을 의미하는데, 눈의 각막과 홍채 사이 및 홍채와 수정체 사이에 투명한 액체가 가득 채워져 있는데, 이를 안방수라고 하며, 림프와 비슷한 성질이 있으며, 후안방의 모양체 또는 홍채에서 분비되며, 생성된 안방수 대부분은 모양체 정맥으로 빠져나간다. 이러한 안방수 생성에 비하여 배출이 원활하지 않을 경우, 즉 안방수의 과다 생성이나 배출통로가 막히거나 좁아지게 되면, 안압이 증가하는데, 안압 상승의 대부분은 배출경로가 막히는 경우가 제일 많다. 안압이 높아지게 되면, 안구의 모든 부위에 압력이 가해지는데, 그 중 특히 가장 약한 부위인 시신경유두가 뒤로 밀리면서, 컵 모양이나 구부러진 모양으로 변형되며, 이러한 높은 안압이 오랫동안 지속되면 시력을 담당하는 시신경섬유가 손상이 되면서, 망막 수용기 세포가 영양분과 산소를 공급받지 못하여 망막 신경절 세포들의 세포사멸이 유도되고, 이로 인하여 결국에는 실명에 이르게 되는 것이다. 녹내장에 대한 치료방법으로는 녹내장의 종류에 따라 치료방법이 다른데, 크게는 안압을 하강시키는 목적으로 하는 약물을 사용하는 약물치료, 레이저 치료, 섬유주절제술 또는 녹내장 임플란트 삽입술 등의 외과적 수술 방법이 존재하고 있다. 안압하강에 대한 약물적 치료는 안구에 직접 약물을 점안하여 안압을 하강시키는 방법으로 녹내장 치료법에서 가장 우선적 치료방법으로 널리 쓰이고 있으며⁴⁾, 치료제 대부분은 점안제 제형으로, 안방수의 배출을 증가시키거나, 안방수의 생성을 저하시켜 안압을 낮추는 효과를 가지고 있다⁵⁾. 녹내장에 대한 치료효능을 평가하기 위한 동물모델로는 DBA/2J(D2)라고 명명된 TG 마우스를 사용하는데, 이는 Spontaneous glaucoma rodent model로서, *Tyrl1*, *Gpnmb* 유전

#These authors (TW Oh and KI Park) equally contributed to this work.

*Corresponding author : Jin Yeul Ma. Korean Medicine Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 70, Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu, 41062, Republic of Korea.

Tel : +82-53-940-3812, Fax : +82-53-940-3899, E-mail : jyama@kiom.re.kr

•Received : May 12, 2021 / Revised : May 14, 2021 / Accepted : May 16, 2021



자가 변형되어 있으며 연령이 증가함에 따라 안압이 서서히 상승하는 모델로서, 망막신경절세포 사멸, 시신경 위축, 시신경유두 함몰 등을 일으키는 동물모델이다. 이러한 망막 변화들은 연령이 증가함에 따라 발생률이 높아지고 정도가 심해진다^{6,7)}. 따라서 DBA/2J 마우스는 녹내장 설치류 모델 중 가장 공신력이 있는 모델로서, 본 실험에서도 효능평가를 위하여 사용되었다.

단풍나무(*Acer Plamatum Thunb*)는 대부분 높이 100m에 붉은 빛을 띤 갈색 나무로 잎은 서로 마주보는 모양으로 나고, 잎자루는 붉은색을 띠며 길이는 3~5 cm로, 그 형태는 가장자리에는 겹톱니가 보이며, 보통 5개에서 7개로 깊게 갈라진 손바닥과 비슷한 형태이다⁸⁾. 이러한 단풍나무는 동의보감 및 향약집성방에 풍고(楓膏)로 기재되어 있으며, 한방에서는 계조축(鷄爪槭)이라는 말로도 불린다. 성미는 차고, 맵고, 쓰며, 청열, 해독, 행기, 지통의 효능이 있어, 뿌리줄기와 가지는 무릎관절염으로 인한 통증에 물에 달여서 복용하고, 오가피와 배합을 통하여 골절상에 대하여 사용되었으며, 해독 및 소염작용에 대하여 그 효능이 있는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 또한, 잎은 안건연염의 치료에 사용하였으며, 민간에서는 단풍나무 수액을 응용하였으며, 그에 대한 효능으로는 비만 및 당뇨 예방, 혈당을 개선하는 것으로 알려져 있다. 이러한 단풍나무에 대한 기존 선행연구는 식물학적 분류¹⁰⁾ 외에 생리활성 성분에 대한 연구가 주를 이루고 있으며, 특히 골아세포 분화¹¹⁾ 및 항염^{12,13)}, 항균 활성¹⁴⁾, 항암 효과¹⁵⁾와 관련된 약리학적 연구가 보고되었다. 이에 본 연구에서는 단풍나무 잎 열수 및 에탄올 추출물에 대하여 안압 상승으로 인한 녹내장에 미치는 영향을 살펴보고자 DBA/2J 마우스에서 점안투여를 통하여 그 효능을 평가하였고, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

- 1) 단풍나무 잎 열수 추출물(EW) 및 에탄올 추출물(EE) 추출

단풍나무 잎 분쇄한 1500 g을 물 15 L에 넣고 1시간 동안 침출하였다. 그 후, 초고속 진공 추출기(Gyeongseo Extractor, COSMOS 660, Incheon, Korea)를 사용하여 3시간 동안 열수 추출을 진행하였으며, 추출물

에 대하여 동결건조하여 단풍나무 잎 열수 추출물 87.15 g 을 수득 하였으며, 수득율은 5.81%였다. 한편, 에탄올 추출물의 경우, 단풍나무 잎 분쇄물 1500 g을 15 L의 25% 에탄올에서 24시간 동안 실온으로 침출 추출하였다. 침출 추출된 추물을 감압 농축하여 동결건조를 진행하여 69.3 g의 에탄올 추출물을 획득하였으며, 수득율은 4.62%였다.

2) 실험동물

실험동물은 대조군으로 사용 할 12주령 C57BL/6J 마우스 (23~25 g, 중앙실험동물, 대한민국) 및 녹내장 동물모델인 DBA/2J 마우스 12주령을(Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) 공급받아 실험 당일 까지 고형사료 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±5%, 12시간의 light-dark cycle 환경에서 적응시킨 후 실험에 사용하며, 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 한국 한의학연구원 한의기술응용센터 동물실험윤리위원회(KIOM-DIACUC, D-17-019)의 규제에 따라 진행하였다.

2. 방법

1) 안압에 따른 분류

먼저, 약물에 대한 효능평가에 앞서, 안압상승에 따른 개체 분류를 위하여 정상군 (C57BL/6J, Control group) 군과 녹내장 동물모델(DBA/2J; D2)군으로 분류하여 2주에 한번씩 30주 동안 안압을 측정하였다. 안압측정은 마우스 및 랫드 등 설치류 동물의 안압을 정확히 측정할 수 있는 도구를 사용하였는데, 안압 측정 장비로 유명한 Icare 社의 제품 (Tonometer, Icare® TonoLab, Vantaa, Finland)을 이용하여 리바운드 측정원리를 기반으로 프로브가 각막과 순간적으로 접촉하는 방식으로 안압을 측정하였다. 5 percentile 이내로 측정된 값만을 채택하여 5번 측정 후 평균 값을 얻은 후, 그 값을 사용하였다.

2) 실험군 설정 및 안압 측정

단풍나무 잎 열수 추출물(EW) 및 에탄올 추출물(EE)에 대한 녹내장의 효능을 평가하기 위하여 안압이 상승한 6개월째부터 실험군을 설정하였다. 즉, 실험군 설정에서 정상군 (C57BL/6J, Control group) 및 녹내장 동물모델(DBA/2J; Vehicle)군 안압측정에서 안압상승군으로 분류 된 마우스를 실험군으로 분

류하였는데, 시험물질 (Eye drop; EW, EE: 1, 2 mg /20 μ l/1회) 및 대조 약물인 점안 안압하강제(Xalatan[®], 한방울/0.05 ml/1회)를 하루 2회 8주간 정해진 시간에 점안 투여하였다. 안압측정은 상기 기재된 실험 방법으로 매 1주 정해진 시간에 측정을 하였다.

3) Western blot

약물 투여 8주 후 동물을 isoflurane으로 마취 후 안구를 적출한 후 망막을 분리하였다. 적출된 조직에 대하여 조직 손상 정도와 기능 변화를 위하여 관련 단백질의 발현을 Western blot으로 측정하였다. 먼저, 적출된 망막조직에 대하여 lysis buffer와 함께 homogenizer로 마쇄하여 이를 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 회수하여 단백질을 정량하였다. 각 샘플의 양이 20 μ g가 되도록 계산한 후, 각 용액에 4X sample buffer를 첨가하여 5분간 100°C로 가열하여 단백질을 분리하였다. 이를 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후 nitrocellulos membrane에 옮기고 5% skim milk에 30분간 실온에서 blocking하였다. 여기에 anti-Brn3a mAb (1:500, retinal ganglion cells), anti-PKCa mAb (1:500, bipolar cell marker), anti-OPN1SW mAb (1:1000, rods and cones cell marker), anti-GFAP mAb(1:1000, astrocyte marker), and anti- β -actin mAb (1:2000) 일차항체를 넣고 4°C, 교반기에서 하룻밤 반응시켰으며, 다시 2차 항체와 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 membrane을 ECL 용액 (Amersham, Buckinghamshire, England)으로 반응시키고 ChemiDocTM touch imaging system (BioRad, California, USA)를 이용하여 분석하였다.

4) 혈액마커 변화

약물 및 녹내장과 관련하여 혈청 내 여러 인자들의

변화를 살펴보기 위하여 혈액학적 마커를 분석하였다. 즉 마우스의 혈액은 실험 종료 후, 복대정맥에서 전혈을 채취하였고, 혈장을 분리하여 실험에 사용하였다. Aspartate Aminotransferase(AST), Alanine Aminotransferase(ALT), Alkaline Phosphatase(ALP), Lactate dehydrogenase (LDH)는 혈액생화학자동분석기기 (XL-200; ERBA Mannheim, Germany)를 이용하여 분석하였다.

5) 통계처리

모든 실험 결과는 GraphPadprism 5.0 통계 프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean \pm SD)로 계산하였으며 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA로 분석하였으며, 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, p<0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 평가하였다.

III. 결과

1. 정상군과 녹내장 동물모델에서의 안압변화

약물의 효능평가에 앞서, 정상군(C57BL/6J)과 녹내장 동물모델(DBA/2J)간 안압상승에 대하여 2주에 1번씩 30주 동안 안압을 측정된 결과, 26주차부터 안압의 상승이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 또한 30주가 되었을 때, 정상군 대비 50% 이상 증가한 것으로 나타났으며(Fig. 1B), 전체적인 전안부 관찰을 통하여 홍채가 길게 착색되어 있는 정상군에 비하여 녹내장 동물모델군에서는 홍채 색소의 소실이 보이며, 주변부 홍채의 투과성이 증가되어 있는 소견을 보였다(Fig. 1B). 이러한 녹내장 동물모델군에서 안압이 상승한 개체를 분류하여 약물 효능평가군으로 실험에 사용하였다.

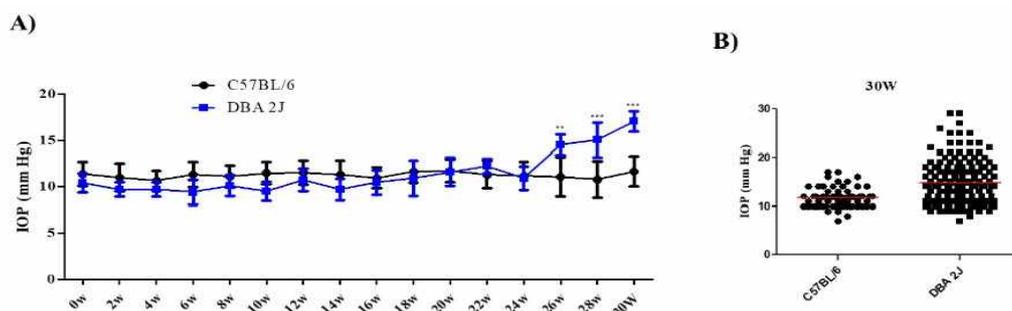


Fig. 1. The analysis of intraocular pressure (IOP). (A) The change of IOP level in DBA2/J mice. (B) The change of IOP at 30 week's. Error bars are represent \pm standard deviation of three different preparations with quadruplicate experiments. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. CTL group.

2. 단풍나무 잎 추출물에 대한 안압 보호 효과

안압 저하 효능을 평가하기 위하여 단풍나무 잎 열수 추출물(EW) 및 에탄올 추출물(EE)을 8주간 점안 투여를 통하여 그 효능을 평가하였다. 정상군(C57BL/6J, Control)의 경우, 주령이 증가함에도 불구하고 평균 안압이 일정하게 유지되고 있는 것을 확인할 수 있었으며(12 mmHg), 녹내장 동물모델군인 대조군(DBA/2J, vehicle)은 주령이 증가함에 따라 안압이 증가하는 것을 알 수 있었다. 한편 열수 추출물(EW)의 경우 모든 그룹에서 대조군에 비하여 안압이 정상군과 거의 비슷하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 특히, 마지막 8주차의 경우 Control군에서는 평균 안압이 11.6 ± 1.6 mmHg를 보여 정상 안압으로 유지되고 있었으며, Vehicle군에서는 정상

군에 비하여 평균 안압이 19.8 ± 3.1 mmHg로 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 또한 열수 추출물 1 mg/ml 및 2 mg/ml을 점안 한 투여군에서는 대조군에 비하여 11.7 ± 1.8 , 12.2 ± 2.1 mmHg로 안압이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2B). 반면, 대조약물 그룹에서도 평균 안압이 대조군에 비하여 11.5 ± 1.9 mmHg로 유의하게 감소하여 정상군과 비슷한 안압을 유지 하고 있는 것으로 확인되었다. 한편, 에탄올 추출물(EE)의 경우도 열수 추출물과 비슷한 양상으로 1 mg/mL 그룹에서는 11.6 ± 1.7 mmHg, 2 mg/mL 그룹에서는 12.2 ± 2.0 mmHg로 대조군에 비하여 안압이 유의하게 감소하는 것으로 확인되었다 (Fig 2C, D).

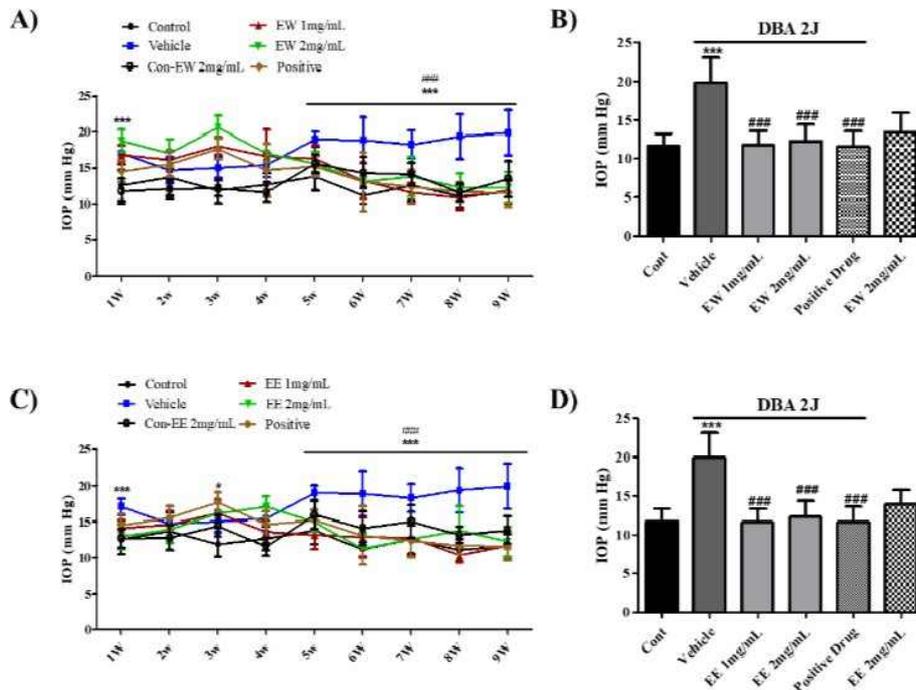


Fig. 2. The Effect of EW and EE extract on IOP levels in DBA2/J. The change of IOP with various concentration of EW extract (A,B) and EE extract (C,D) (1 and 2 mg/ml for 8 week. Values are represented as mean \pm SD. *** $p < 0.001$ vs. CTL ; ### $p < 0.001$ vs. Veh group.

3. 단풍나무 잎 추출물에 대한 망막 기능에 관련된 단백질 발현 변화에 대한 효과

안압이 상승한 녹내장 동물모델에서 단풍나무 잎의 열수 및 에탄올 추출물이 망막 기능에 관련된 단백질의 발현에 영향을 미쳤는지 확인하기 위하여 4주간 추출물을 점안 투여하여 단백질의 발현양을 살펴보았다(Fig 3A, 4A). 그 결과 망막신경세포를 나타내는 Brn3a의 경우 대조군에서 모두 감소한 것으로 나타났으며, 열수 추출물을 점안 투여한 그룹에서는 회복되는 경향이 보였으나, 농도 의존적이지는 않았다. 또한 대조약물군인 점안 안압하강제를 투여한 그룹에서도 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3B, 4B). 그리고 망막을 구성하는 신경세포의 한 종류인 쌍극세포(bipolar cell)을 나타내는 PKCa의 경우에는 모든 그룹에서 발현양이 크게 달라지지는 않았지만, 대조군에서 약간 감소하는 경향을 보였으며, 단풍나무 잎

열수 및 에탄올 추출물에서 유의성있게 회복되는 경향을 보였다(Fig. 3C, 4C). 또한 명암식별 및 세부시각, 색채를 담당하는 rod cell과 cones cell 마커인 OPN1SW의 경우 앞서 망막신경세포와 마찬가지로 대조군에서는 농도의존적으로 감소하는 경향을 보이다가 열수추출물을 점안 투여한 그룹에서는 발현양이 증가하는 것으로 나타났으며(Fig. 3D), 에탄올 추출물을 점안 투여한 그룹에서는 농도의존적으로 발현양이 증가함을 알 수 있었다. 하지만 대조약물군인 점안 안압하강제를 투여한 그룹보다는 뛰어난 효과를 가지지는 못한 것으로 알 수 있었다(Fig. 4D). 그리고 신경교세포 마커인 GFAP의 경우 대조군에서 발현양이 증가하였으며, 열수 및 에탄올 추출물을 점안 투여한 그룹에서는 발현양이 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3E, 4E).

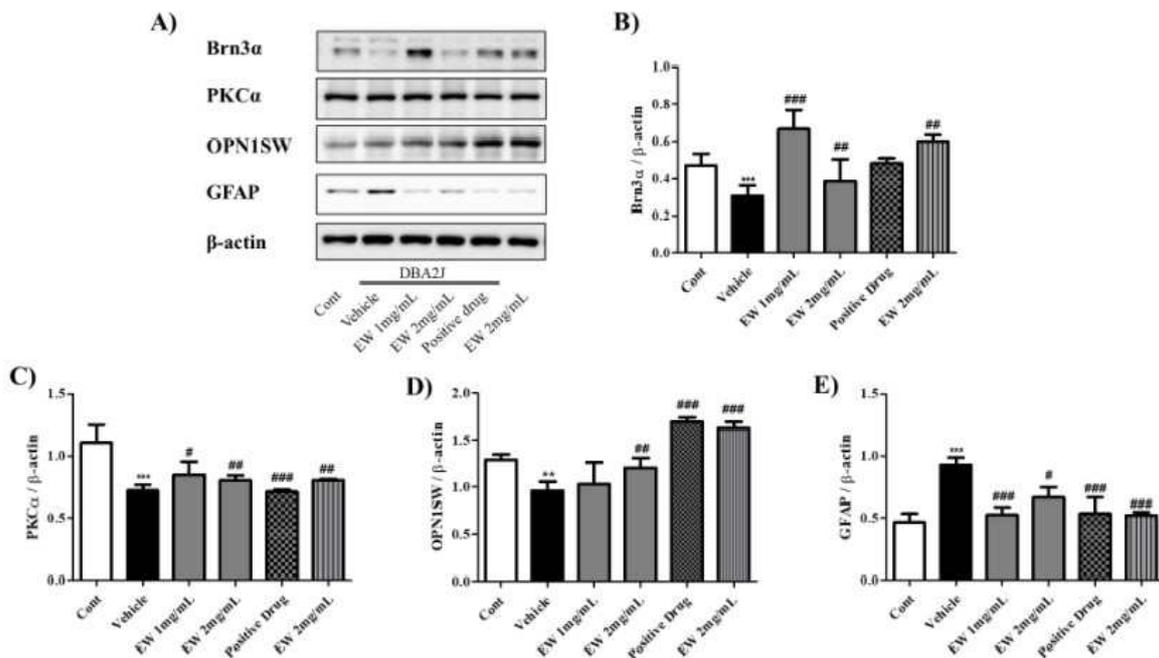


Fig. 3. The effect of EW extract on the changes of retinal function markers in DBA2/J mice. Each marker was EW extract administered by eye drop at dose of 1 and 2 mg/ml for 8 weeks(A). Expression of Brn3a (B), PKCa(C), OPN1SW(D) and GFAP(E) protein was determined by Western blot, respectively. Bar histogram shows changes the expression in the retina. Values are means±SD of three indifferent experiments. **p<0.01 and ***p<0.001 vs. CTL; #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs. vehicle group. EW, Leaves of Acer palmatum thumb water extract.

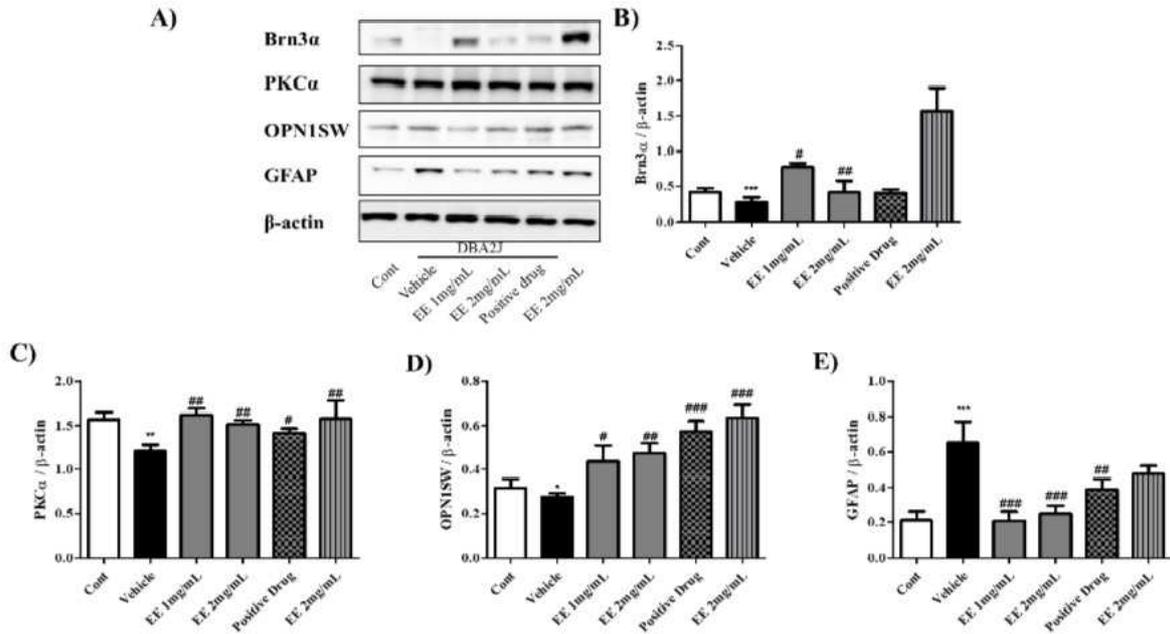


Fig. 4. The effect of EE extract on the changes of retinal function markers in DBA2/J mice. Each marker was EE extract administered by eye drop at dose of 1 and 2 mg/ml for 8 weeks(A). Expression of Brn3α (B), PKCα(C), OPN1SW(D) and GFAP(E) protein was determined by Western blot, respectively. Bar histogram shows changes the expression in the retina. Values are means±SD of three indifferent experiments. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 vs. CTL; #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs. vehicle group. EE, Leaves of *Acer palmatum* thumb ethanol extract.

4. 단풍나무 잎 추출물 및 녹내장 동물모델에서의 혈액학적 변화

단풍나무 잎은 일반적으로 자주 쓰이는 약재는 아니며, 이에 대한 독성 연구 역시, 크게 알려진 바는 없다. 이에 본 연구에서는 DBA2/J 마우스에서 단풍나무 잎 열수 및 에탄올 추출물에 대한 혈액학적 분석을 통하여 그 독성을 평가하였다. 그 결과 대조군

그룹에서 정상군에 비하여 간 손상의 정도의 지표를 나타내는 ALP, AST, ALT 및 LDH 효소가 증가한 것으로 나타났지만, 모두 정상범위 내에 있는 것으로 확인되었으며, 단풍나무 잎 열수 및 에탄올 추출물 그룹에서도 대조군 그룹보다 낮은 수치를 보여 정상범위 범주내 인 것으로 확인되었다(Fig. 5).

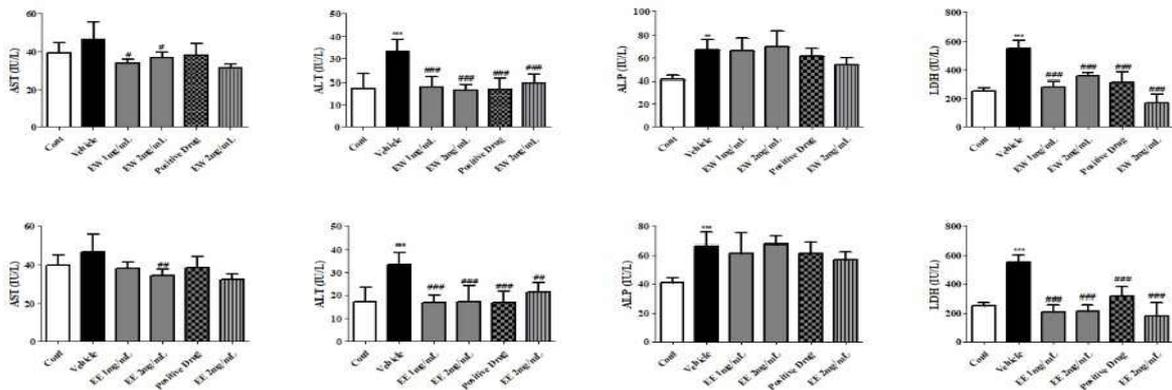


Fig. 5. The effect of EW (upper) and EE (lower) extract on the changes of serological markers in DBA/2J mice. Each marker was extract administered by eye drop at dose of 1 and 2 mg/ml for 8 weeks. Values are means±SD of three indifferent experiments. **p<0.01 and ***p<0.001 vs. CTL; #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 vs. vehicle group. EW, Leaves of Acer palmatum thumb water extract. EE, Leaves of Acer palmatum thumb ethanol extract.

IV. 고찰

녹내장은 시각 정보를 뇌로 전달하는 시신경에 병증이 생겨 시야 결손과 같은 기능적 변화가 이상이 생긴 질환이다. 예전에는 녹내장이라고 하면, 주로 안압이 상승된 경우를 포함하였지만 최근에는 안압이 정상인 녹내장이 흔하게 발견되면서 여러 가지 원인들이 복합적으로 작용하여 나타나는 것으로 알려져 있다. 특히 고령화와 높은 안압이외에 안압과는 별개로, 시신경 혈액순환의 이상 또는 시신경 주위 환경의 악화로 시야가 점차 좁아지는 진행성 시신경 병증까지 그 원인으로 대두되고 있다. 이러한 녹내장의 1차 목표는 안압약(점안제) 투여를 통한 안압 하강이 1차적 목적으로, 약물치료로도 안압이 하강되지 않아 시신경과 시야손상이 진행된다면 수술적 치료방법을 고려하게 된다. 이러한 점안제는 크게 안방수 생성을 줄이는 약물계열인 교감신경 억제제, 탄산탈수효소 억제제가 있으며, 안방수 배출을 증가시키는 약물인 프로스타글란딘 및 프로스타마이드 계열의 약제로 나뉘어지는데, 결국 점안제의 목적은 안압을 낮추어 시신경 및 시야 손상을 억제하는 것을 목적으로 한다⁴⁾. 녹내장은 시신경이 서서히 손상되는 만성질환이기에, 주변 시야가 먼저 손상되고 중심시력은 말기까지 보존되는 경우가 많아 질병 초기에는 자각 증상이 없기에 조기 진단이 중요하며, 이러한 녹내장에 대한 진단은 안압 측정, 중심 각막두께 측정, 전방각 검사, 시신경 검사, 시야검사 등을 하며, 필요하면 빛간섭 단층촬영기(OCT) 또는 주사 레이저 검안경(HRT)로 측정하여 진단하게 된다.

본 연구에서는 단풍나무잎 물과 에탄올 추출물에 대하여 안압 상승으로 인한 녹내장에 미치는 영향을 살펴보고자 DBA/2J 마우스에서 점안 투여를 통하여 그 효능을 평가하였다.

먼저 녹내장 동물모델에서의 안압 저하에 대한 효능을 알아보기 전에 정상군(C57BL/6J)과 녹내장 동물모델(DBA/2J)에 대하여 30주 동안 안압 상승을 살펴보았다. DBA/2J는 IOP의 상승이 자발적으로 발생

하는 것으로 유일하게 알려진 설치류로서, 월령이 증가함에 따라 안압상승 뿐만 아니라, 홍채 위축 및 홍채 전유착을 비롯하여, 색소의 분산, 망막 신경절 세포 사멸, 시신경의 위축을 비롯한 시신경 유두 함몰 및 내망막층의 감소 등이 진행하게 된다고 보고되어지고 있다^{6,7)}. 본 연구결과에서도 정상군(C57BL/6J)과 녹내장 동물모델(DBA/2J)간 26주차부터 안압의 상승이 유의하게 증가하는 것으로 나타났으며, 30주가 되었을 때 정상군 대비 대조군에서 안압이 50% 이상 증가한 것으로 나타났다.(Fig. 1).

녹내장의 치료기술은 최근 의료기술 및 진단기술의 발달과 함께 급속하게 발전되었다. 즉, 축동체와 경구용 탄산탈수효소 억제제만 존재하였던 치료기술이 안방수가 만들어지는 것을 차단하는 베타차단제의 점안 안압 하강제가 개발되기 시작했으며, 안방수 생성을 억제하는 국소 점안용 탄산탈수효소억제제인 dorzolamide를 시작으로, 안방수 배출을 증가시키는 역할을 하는 prostaglandin 계열의 다양한 제제들이 치료제로 개발되었으며, 더불어 이 두 가지의 기능을 동시에 가지는 혼합된 약제(combination drug)들이 개발되어 녹내장 치료제로 쓰여지고 있다¹⁶⁻²⁰⁾. 이와 같이 다양한 약리 기전을 가진 치료제가 존재하지만, 이들 모두 안방수를 만들지 못하게 하거나, 안방수의 배출을 증가시켜 결론적으로는 안압을 낮추는 치료제이다. 이전의 연구에서 9개월 된 DBA/2J 생쥐에서 안압이 중증도 및 고도로 안압이 상승한다고 보고하였으며, 녹내장 치료제인 timolol, Cosopt (베타차단제) 및 Xalacom (combination drug; 프로스타글란딘 유도체 및 베타차단제) 투여하여 안압 상승된 동반된 10개월차 모델에서 1개월 간 안압하강제를 투여하여 안압 및 망막신경세포 구성을 비교한 결과, 통계적으로 유의한 차이는 없었지만 안압 저하를 볼 수 있었으며, 망막신경절세포의 생존률 증가, 녹내장성 이차변성에서 중요한 인자로 알려진 일산화질소성 무축삭세포에 대한 발현을 감소시킬 수 있다고 보고하였다²¹⁾. 본 연구에서도 녹내장 치료제인 프로스타글란딘 계열의 라타노프로스트를 대조군으로 사용하여



단풍나무 잎 열수 및 에탄올 추출물과 비교를 하였다. 그 결과, 대조군에서는 주령이 증가함에 따라 안압의 상승도가 점점 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 단풍나무 잎 열수 및 에탄올 추출물에서는 농도의존적이지는 않지만, 정상군과 거의 유사하게 안압저하 현상을 보였으며, 대조약물군이 라타노프로스트를 처리한 그룹보다 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 특히 안압측정 마지막 날의 경우 대조군과 비교하였을 때, 유의적으로 안압이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

한편, Brn3a, PKCa 및 OPN1SW는 망막 세포의 주요 단백질이다. Brn3a는 전사 인자의 POU-IV 클래스 단백질 중 하나이며, 중추 신경계 (CNS)와 망막 신경절 세포에서 발현된다. 따라서 Brn3a는 망막 신경절 세포의 분화 및 유지에 중요한 역할을 하며, PKCa는 신호 전달 및 종료를 유도하여 간상 세포 기능을 조절하며 빛과 어둠에 대하여 조절하는 중요 인자로 작용한다²²⁾. OPN1SW는 망막에서 발견되며 두 가지 유형의 광 수용체, 즉 간상체와 원뿔을 포함하며, 정상적인 색각에 필수적으로 필요한 인자이다²³⁾. 따라서 이 이러한 단백질의 발현 수준은 망막 변성 마커로 사용되고 있으며, 또한 저자는 이전의 연구에서 단풍나무 잎의 에탄올 추출물이 N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)로 유도된 망막변성 동물모델에서 망막손상과 관련된 황반변성에 대하여 망막 신경세포 보호효과 및 망막 세포 사멸 억제 효과를 입증하였다²⁴⁾. 이에 본 연구에서도 망막 기능과 관련된 단백질의 발현양을 조사하였다. 그 결과 대조군에서 단백질의 발현을 조사한 결과 Brn3와 PKCa 및 OPN1SW가 망막 조직에서 감소했음을 확인하였으며, 단풍나무 잎 열수 및 에탄올 추출물군 의해 예방되는 것을 확인하였다. 또한, GFAP는 망막에 있는 성상 세포의 지표이며, 이러한 단백질의 증가 된 발현은 망막 변성 또는 손상의 지표로 알려져 있는데, 본 연구에서도 녹내장 동물모델군인 DBA2/J 동물모델에서 그 발현양이 증가하였다가 단풍나무 잎 열수 및 에탄올 추출물을 점안 투여한 그룹에서 그 발현양이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 그림 3, 4).

우리나라의 단풍나무과(Acerceae)는 외래종 포함 22종 20변종 6품종이 전국에 자생하고 있으며, 북반구의 온대지역을 중심으로 한국 전역 및 만주, 중국, 일본 등지에서 160 여종이 자생하고 있다⁷⁾. 그중 단

풍나무(*Acer palmatum* Thunb.)는 현화식물문 쌍떡잎식물강 무환자나무목 단풍나무과의 낙엽활엽교목으로, 한의학에서는 뿌리껍질과 가지를 계조축(鷄爪槭)이라 하며, 맛은 맵고 쓰며 성질은 따뜻하고, 청열해독(淸熱解毒), 행기止痛(行氣止痛)효능으로, 거풍습(祛風濕)하여 질타손상(跌打損傷), 관절통(關節痛), 골절(骨折) 등을 치료하는 것으로 알려져 있다. 하지만 일반적으로 쓰이는 약재는 아니며, 빈도 수 역시 현저히 적은 것 또한 사실이다. 현재 국민들은 한약재에 대해 보다 높은 안전성과 유효성을 요구하고 있는 상황이며, 식물 유래 약물에 의한 부작용 대부분이 간 독성으로 확인되면서²⁵⁾, 이에 본 연구에서는 DBA2/J 마우스에서 단풍나무 잎 열수 및 에탄올 추출물에 대한 혈액학적 분석을 통하여 간 독성을 평가하였다. 간 손상의 정도는 ALP, AST, ALT 및 LDH 등 여러 효소를 간 손상 지표로 사용되며²⁶⁾, 그 중 ALT 및 AST는 간, 신장, 뇌, 심장 등에 존재하는 효소로, 주로 간 세포 손상을 비롯하여 지방간, 알코올성 간염에 의해 활성이 증가하며²⁷⁾, ALP는 간세포의 담관에 존재하는 효소로서 이상지질혈증, 담즙산의 배설 장애로 간 세포가 손상이 되면 그 수치가 증가하는 것으로 알려져있으며, 이에 만성 간염을 비롯한 간 기능 검사 지표로 사용되어지고 있다²⁸⁾. 한편, LDH는 체내에서 당이 분해되어 에너지로 변환될 때 작용하는 효소 중 하나로서, 세포가 파괴되면 그 수치는 높아진다. 특히 혈중 LDH는 급성 및 만성 간염, 간암을 비롯한 악성종양, 빈혈과 같은 혈액학적 질환에서 높은 수치를 가지는 경우가 많아 간 질환, 혈액질환, 신장 질환 등에서 바이오 마커로 사용되고 있다²⁹⁾. 이러한 일반적으로 마우스의 혈청에 대한 효소반응의 정상적인 수치는 AST(23~66 IU/L), ALT(21~102 IU/L), ALP(20~156 IU/L), LDH(41~233 IU/L)의 수치를 가진다. 본 연구에서 간 독성에 대한 인자들은 조사해 본 결과 대조군 그룹에서 정상군에 비하여 모든 바이오마커가 증가하였지만, 마우스의 혈청 바이오 마커 기준치를 보았을 때, 모두 정상범위 내였으며, 단풍나무 잎 열수 및 에탄올 추출물 그룹에서도 대조군 그룹보다 낮은 수치를 보여 정상범위 범주내인 것으로 확인되었다(Fig. 5). 이는 단풍나무 잎 추출물이 효소활성에 대하여 여러 장기 조직에 독성을 유발하지 않는 것으로 사료된다. 하지만, 보다 더 심도깊고, 객관적인 안전성평가 자료 확보는 필수적으

로 필요한 것으로 판단된다.

이상의 결과들로 DBA2/J 녹내장 동물모델은 시간 의존적으로 안압이 상승된다는 것을 확인하였으며, 안압이 상승된 DBA2/J 녹내장 동물모델에서 단풍나무 잎의 열수 및 에탄올 추출물을 점안 투여함으로써 그 효능을 확인하였다. 단풍나무 잎의 열수 및 에탄올 추출물은 상승된 안압에 대하여 안압을 낮추었으며, 망막 기능에 관련된 단백질 발현에 영향을 미치면서 녹내장에 대하여 보호 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

V. 결론

본 연구에서는 안압이 상승된 DBA2/J 녹내장 동물 모델에서 단풍나무 잎의 열수 및 에탄올 추출물을 점안 투여 함으로써 녹내장의 보호효과를 확인하였다. 단풍나무 잎의 열수 및 에탄올 추출물은 안압이 상승된 동물모델에서 농도의존적으로 안압 저하 효능을 보였으며, 녹내장으로 인하여 활성화된 정상세포를 억제함으로써 발현양이 감소된 망막신경세포 및 광수용체, 간상세포에 대하여 발현양을 증가시킴으로써 그 기능을 회복하는 것으로 확인하였다. 하지만, 본 실험은 단순히 녹내장 동물모델에 대한 현상만을 확인한 것으로 이를 바탕으로 추후 동물모델에서 조직학적 병리 및 망막신경절 세포, 신경보호 치료기전에 대한 연구가 필요 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 주요사업 임상수요기반치료기술개발사업 (과제고유번호 KSN2021230)의 지원 의해 한국한의학연구원에서 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. Bull World Health Organ 2004;82:844-851.
2. Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. Br J Ophthalmol 1996;80:389-93.
3. Kim CS, Seong GJ, Lee NH, Song KC. Prevalence of primary open-angle glaucoma in central South Korea the Namil study. Ophthalmology 2011;118:1024-1130.
4. Lemij HG, Hoevenaars JG, van der Windt C, Baudouin C. Patient satisfaction with glaucoma therapy: reality or myth? Clin Ophthalmol 2015;9:785-93.
5. Chung DH, Hong KE, Park HYL. Risk Factors for Requiring Glaucoma Surgery in Steroid-induced Glaucoma. J Korean Ophthalmol Soc 2021;62(1):91-99.
6. John SWM, Smith RS, Savinova OV, et al. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. Invest Ophthalmol Vis sci 1998;39:951-62.
7. Anderson MG, Smith RS, Hawes NL, et al. Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. Nat Genet 2002;30:81-85.
8. Lee CB. Coloured flora of Korea. Hyangmunsa. 2003. pp 699-708.
9. Jeon HJ, Kwon HJ. Antioxidant effects and functional evaluation of *Gynura procumbens* extract as a collaboration material for cosmetics and functional food, Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology. 2014;12(4):499-507.
10. Chang CS, Giannasi DE. Foliar flavonoids of *Acer* sect. *palmata* series *palmata*, Systematic Botany. 1991;16(2):225-241.
11. Ha H, Shim KS, Kim T, An H, Lee CJ, Lee KJ, Ma JY. Water extract of *Acer tegmentosum* reduces bone destruction by inhibiting osteoclast differentiation and function, Molecules. 2014; 19(4):3940-3954.
12. Song NY, Lee KJ, Ma JY. Isolation and identificatino of phenol compounds from *Acer tegmentosum* and their anti-inflammatory activity, Korean Journal of Pharmacy. 2014; 45(1):93-100.
13. Kim S, Hur SJ, Kim KH, Gi KS, Whang WK. Antioxidant and anti-inflammatory compounds isolated from *Acer tegmentosum*, Journal of Medicinal Plants Research. 2012;6(23): 3971-3976.



14. An BS, Kang JH, Yang H, Yang MP, Jeung EB. Effects of *Acer okamotoanum* sap on the function of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes in vitro and in vivo, *Molecular Medicine Reports*. 2013;7(2):654-658.
15. González-Sarrias A, Li L, Seeram NP. Effects of Maple (*Acer*) plant part extracts on proliferation, apoptosis and cell cycle arrest of human tumorigenic and non-tumorigenic colon cells, *Phytotherapy. Research*. 2012;26(7):995-1002.
16. Weekers R, delmarcelle Y, Gustin J. Treatment of ocular hypertension by adrenalin and diverse sympathomimetic amines. *Am J Ophthalmol* 1955;40:666-72.
17. Zimmerman TJ, Kaufman HE. Timolol. A beta-adrenergic blocking agent for the treatment of glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1977;95:601-604.
18. Podos SM, Serle JB. Topically active carbonic anhydrase inhibitor for glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1991;109:38-40.
19. Carmas CB, Schumer RA, Marsk A, et al. Intraocular pressure reduction with PhXA34, a new prostaglandin analogue, in patients with ocular hypertension. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1733-1738.
20. Clineschmidt CM, Williams RD, Snyder E, Adamsons IA. A randomized trial in patients inadequately controlled with timolol alone comparing the dorzolamide-timolol combination to monotherapy with timolol or dorzolamide. *Ophthalmology* 1999;106:S17-24.
21. Park MH, Lee KM, Kwon JS, Moon JI. Changes in Retinal Neuronal Population in DBA/2J Mice with Topical Intraocular Pressure Lowering Drugs. *J Korean Ophthalmol Soc* 2005;46(12):2071-2080.
22. Ruether K, Feigenspan A, Pirngruber J, Leitges M, Baehr W, Strauss O. PKCa is essential for the proper activation and termination of rod bipolar cell response. *Invest Ophthalmol Visual Sci*. 2010;51:6051-6058.
23. Neitz J, Neitz M. The genetics of normal and defective color vision. *Vision Res*. 2011;51:633-651.
24. Oh TW, Do HJ, Kim KY, Park KI, Ma JY. Leaves of *Acer palmatum thumb.* Rescues N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-Induced retinal degeneration in mice. *Phytomedicine*. 2018;42:51-55.
25. Stricker B. Drug-induced Hepatic Injury. 2nd edn. Amsterdam: Elsevier; 1992:25-35.
26. Wu HJ, Chen KY, Shee BW, Chang HC, Huang YJ, Yang RS, Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. *World J Gastroenterol* 2004;10(18):2711-2714.
27. Kim HC, Nam CM, Jee SH, Han KH, Oh DK, Suh I. Normal serum aminotransferase concentration and risk of mortality from liver diseases: prospective cohort study. *BMJ* 2004;328(7446):983-988.
28. Ooi K, Shiraki K, Morishita Y, Nobori T. High-molecular intestinal alkaline phosphatase in chronic liver diseases. *J Clin Lab Anal* 2007;21(3):133-139.
29. Chan FKM, Moriwaki K, De RMJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol* 2013;979:65-70.