



Original Article / 원저

## 네트워크 약리학 분석을 통한 四君子湯의 뇌경색 억제 기전 예측

임지연<sup>1</sup>, 이병호<sup>2</sup>, 조수인<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>동국대학교 의과대학, <sup>2</sup>인주한방병원, <sup>3</sup>부산대학교 한의학전문대학원

## Prediction of cerebral infarction suppression mechanism of the Sagunja-Tang through network pharmacology analysis

Lim Chiyon<sup>1</sup>, Lee Byoung-ho<sup>2</sup>, Cho Suin<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Medicine, Dongguk University

<sup>2</sup>Inju Hospital of Korean Medicine

<sup>3</sup>School of Korean Medicine, Pusan National University

### ABSTRACT

**Objectives** : Sagunja-Tang is a famous prescription used in Korean medicine for the purpose of promoting vital energy, and there are few studies using Sagunja-Tang on cerebrovascular diseases yet. As previous studies confirmed that Sagunja-tang is highly likely to be used effectively for stroke, this study was intended to predict the mechanism through which Sagunja-tang would act effectively on stroke.

**Methods** : In this study, a network pharmacology analysis method was used, and oral bioavailability (OB), drug likeness (DL), Caco-2 and BBB permeability were utilized to select compounds with potential activity. For the values of each variable used in this study,  $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 0.18$ ,  $Caco-2 \geq 0$ , and  $BBB \geq 0.3$  were applied. Using the above variables, the relations between target genes and diseases that are presumed to be involved in the selected bioavailable compounds were constructed in a network format, and proteins thought to play a major role were identified.

**Results** : Among the compounds included in Sagunja-Tang, 26 bioavailable compounds were selected and it was confirmed that these compounds can be effectively used in cerebrovascular diseases such as Alzheimer's disease and stroke. These compounds are considered to act on proteins related in cell death and growth. The most important

mechanism of action was predicted to be apoptosis, and the protein that is thought to play the most key action in this mechanism was caspase-3.

**Conclusions :** In our future study, Sagunja-Tang will be used in an ischemic stroke mouse model, and the mechanism of action will be explored focusing on apoptosis and cell proliferation.

**Key words :** Donguibogam, ischemic stroke, neuroprotection, apoptosis.

## I. 서론

음식 문화 및 생활 습관의 변화로 인해 고혈압, 비만 및 당뇨병 등과 같은 질병을 앓는 환자들이 점점 늘어나고 있으며 이러한 기저 질환들로 인해 뇌졸중 등과 같은 뇌혈관 질환도 함께 증가하는 추세이다. 뇌졸중은 크게 뇌출혈과 뇌경색의 두 종류로 나눌 수 있으며 모두 영구적인 장애를 남기는 특징으로 인해 장기간의 재활 치료와 요양을 필요로 하며, 이로 인해 국가적인 의료비 부담이 점점 커지고 있어 앞으로 의료계에서도 예방과 새로운 치료 방법의 개발에 대해 관심을 가져야 할 필요가 있는 질환 중 하나이다<sup>1,2)</sup>.

뇌출혈과 뇌경색 중 뇌경색의 발병율이 훨씬 높아 뇌졸중 환자의 약 80% 정도가 뇌경색에 해당하는 것으로 보고되어 있으며, 뇌혈관에서의 허혈과 이를 뒤따르는 재관류에 의해 뇌조직 구성 세포들의 손상과 죽음으로 인해 뇌경색이 발생하게 된다<sup>1-4)</sup>. 뇌경색의 진행과 관련된 주요 기전 연구 또는 약물 개발을 위해 가장 많이 사용되는 전임상 동물 모델로는 중대뇌동맥 폐쇄술 (middle cerebral artery occlusion, MCAO)로, 뇌졸중의 주요 발생 부위가 중대뇌동맥이라는 점과 다양한 재료가 개발되어 있는 수술용 봉합사를 가공하여 혈관 내 삽입을 통해 중대뇌동맥을 흐르는 혈류를 차단하여 영구적 또는 일시적으로 폐쇄 시간 선택이 가능하여 여러 정도의 뇌경색을 유발할 수 있다는 장점이 있어<sup>5,6)</sup> 본 연구팀에서도 사용하고 있는 연구 모델이다. 최근 본 연구팀에서는 우리나라에서 가장 대표적인 임상 한의학 서적인 『東醫寶鑑(동의보감)』에 수록된 처방 중 풍증을 치료하는데 사용되었던 처방들을 분석하여 뇌경색 동물 모델에 적용하고자 시도하여 사용 빈도가 높았던 약재들의 활성이 비교적 높다는 것을 확인하고 있으며 이들 약물들의 조합에 의한 주요 처방도 도출하여 향후

전임상 연구 재료로 활용하고자 노력하고 있다<sup>7-9)</sup>.

본 연구팀의 선행 연구<sup>9)</sup>를 통해 『동의보감』 雜病篇 風門에 수록된 처방 89종을 분석하여 단미 약재로는 甘草(Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, 감초), 防風 등이, 처방으로는 羌活愈風湯, 祛風除濕湯 및 四君子湯(사군자탕) 등이 연구 재료로 적합하며, 이 중 단미 약재인 감초와 처방인 사군자탕을 후속 연구의 재료로 선정하고자 함을 보고한 바 있다.

사군자탕은 人蔘(Ginseng Radix, 인삼), 白朮(Atractylodis Rhizoma Alba, 백출), 茯苓(Poria Sclerotium, 복령) 및 감초로 구성된 처방으로, 중국의 宋代에 출간된 太平惠民和劑局方(화제국방)에 처음 수록된 가장 대표적인 補氣劑로 補益을 주요 목적으로 하는 다양한 처방들에서 기본방으로 활용되고 있다<sup>10,11)</sup>. 현재 사군자탕 구성 약물 중 하나의 메탄올 추출물을 획득하여 생쥐의 MCAO 모델에 후처치하여 유의한 연구 결과를 얻었으며 현재 이 결과를 학술지에 투고하여 게재 가능 여부가 심사 중에 있다.

사군자탕을 뇌경색 동물 모델에 적용하여 유의한 결과를 얻었다 하더라도 다양한 물질들로 구성된 한약 처방의 특성으로 인해 어떠한 기전에 주요하게 작용하였는지를 확인하기는 쉽지 않다. 하지만 최근 중국을 중심으로 많은 복합 물질들의 활성을 예측하는데 사용되고 있는 네트워크 약리학 연구 방법을 사용하여 주요 타겟들을 미리 선정하여 연구 대상을 좁힐 수 있다면 한의학에서의 주요한 치료 도구인 약물의 사용에 관한 과학적 근거들을 비교적 용이하게 얻을 수 있을 것이라 생각된다. 따라서 본 연구에서는 전임상 연구를 수행하기 전에 사군자탕 구성 약재들로부터 약리활성을 가질 것으로 예측되는 물질들과 이들이 작용하는 타겟 유전자, 단백질 및 질병들을 분석하여 사군자탕이 뇌경색 모델에 효과적으로 사용될 수 있는 후보 처방인지, 그

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

•Received : November 20, 2022 / Revised : November 22, 2022 / Accepted : November 22, 2022

리고 유의한 결과를 얻을 수 있다면 어떤 작용 기전을 주로 관찰할 것인지 확인하여 보았다.

## II. 연구 방법

### 1. 네트워크 약리학 분석을 위한 데이터베이스

최근 여러 연구에서 사용되고 있는 데이터베이스 중 Traditional Chinese Medicine Systems pharmacology (TCMSP, <https://tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)에서 다양한 한약 자원들에 관한 자료들이 입력되어 있으므로 본 연구에서도 TCMSP를 활용하여 분석하였으며<sup>12)</sup>, 사군자탕 구성 약재에 포함되어 있는 각 화합물의 흡수(A), 분포(D), 대사(M), 배설(E) 특성(ADME)을 고려하여 oral bioavailability(OB), drug likeness(DL), Caco-2 및 BBB 투과성의 네 가지 변수를 활용하여 잠재적으로 활성이 기대되는 화합물을 선별하였다. 위 네 종류의 변수 중에서 OB는 경구 투여에 의해 약물이 체내에 전달되는 능력을, DL은 화합물이 기존에 활성이 있는 것으로 알려진 물질들과 일치하는 정도를, Caco-2 세포 투과성은 위장관에서 약물의 흡수율, BBB 투과성은 화합물이 혈관-뇌장벽을 투과하는 정도를 평가하는 지표로 활용될 수 있다. 본 연구에 사용된 각 변수들의 수치들은 OB ≥ 30%, DL ≥ 0.18, Caco-2 ≥ 0, BBB ≥ 0.3 을 적용하였다.

### 2. 사군자탕 구성 약재 기원 식물의 선정

사군자탕을 구성하는 약재 중 인삼은 *Panax ginseng* C. A. Meyer(인삼)의 뿌리이며, 복령은 *Poria cocos* Wolf(복령)의 균핵으로 우리나라와 중국에서 모두 동일한 기원 식물 1종을 사용하고 있으며 TCMSP에도 위의 약재에 대한 자료 값들이 입력되어 있다. 이에 비해 감초는 *Glycyrrhiza uralensis* Fischer(감초), *G. glabra* Linné(光果甘草) 또는 *G. inflata* Batal.(脹果甘草)의 뿌리 및 뿌리줄기에 해당하지만 TCMSP에서는 기원 식물에 대한 구분이 없이 감초의 영문 명칭인 licorice로만 입력되어 있어 이를 사용하였다. 백출은 *Atractylodes japonica* Koidz.(삼주) 또는 *A. macrocephala* Koidz.(큰꽃삼주)의 뿌리줄기인데 TCMSP에는 큰꽃삼주에 관한 입력 값만 존재하므로 이 자료를 활용하였다. 분석 대상 약재의 기원 식물의 종과 학명에 관한 정보는 한국한의학연구원에서 제공하고 있는 데이터베이스인 KIOM 한약표준자원은행<sup>13)</sup>을 활용하였다.

### 3. 사군자탕 구성 화합물이 작용하는 타겟 분석

ADME를 고려하여 TCMSP에서 선별된 각 화합물을 확인한 후 약재-성분 네트워크(herb-compound, H-C)를 구성하였으며, 이들 화합물이 작용하는 것으로 보고된 타겟 유전자 및 질환들을 구분하여 성분-타겟 유전자 네트워크(compound-target, C-T) 및 성분-질환 네트워크(compound-disease, C-D)를 각각 구성하였다. 전임상 연구에서 유용하게 활용될 수 있는 정보들은 주로 타겟 유전자와 단백질에 해당하므로 타겟 유전자에 해당하는 단백질들을 선별하여 STRING 데이터베이스에서<sup>14)</sup> 단백질 상호작용(protein-protein interaction, PPI) 네트워크를 구성하였으며 이러한 단백질들의 상호작용에서 주요한 역할을 할 것으로 예측되는 중심 단백질들도 확인하여 보았다. KEGG 데이터베이스를 활용하여<sup>15)</sup> 주요 작용 기전 중 대표적인 기전의 구체적인 작용 경로도 확인하여 향후 전임상 연구에서 효과적으로 활용할 수 있도록 하였다. 본 연구에서 네트워크의 구성은 open source 프로그램인 Cytoscape(version 3.8.2)으로 도식화 하여 전체적인 네트워크를 쉽게 파악할 수 있도록 하였다. 위와 같은 본 연구의 전체적인 구성에 관해서는 Figure 1에서 확인할 수 있다.

## III. 결과

### 1. 사군자탕 구성 화합물 중 잠재적 활성 물질들 분석

인삼으로부터는 stigmasterol을 포함한 8종의 물질들, 백출로부터는  $\alpha$ -amyrin을 포함한 4종의 물질들, 복령으로부터는 ergosta-7,22E-dien-3beta-ol을 포함한 3종 물질들, 그리고 감초로부터는 inermine을 포함한 19종 물질들을 선정할 수 있었다(Table 1). 약재에 따라 sitosterol은 beta-sitosterol로, inermine은 inermine으로 표기되기도 하였는데 자주 사용되는 용어인 beta-sitosterol과 inermine으로 통일하여 이후 분석에 사용하였다. 복령에서 hederagenin도 beta-sitosterol과 분자량이 동일하고 타겟 유전자도 유사한 것으로 나타나 beta-sitosterol로 간주하였으며, 인삼에서 선별된 beta-sitosterol과 alexandrin\_qt은 동일한 분자량을 가지고 있으며 타겟 유전자의 종류도 beta-sitosterol의 타겟과 거의 유사하였으므로 beta-sitosterol로 통일하여 분석하였다. 감초에서 함께 선별된 두 성분인 icos-5-enoic acid와 gadelaidic acid에서 gadelaidic acid는 icos-5-enoic acid에 포함되므로 gadelaidic acid는 삭제하였으며,

2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol과 licoagrocarpin은 분자량이 동일하고 타겟 유전자도 거의 유사하였으므로 앞서서의 예와 같이 licoagrocarpin로 통일하였고, 1-methoxyphaseollidin, 3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin 및 3'-methoxyglabridin은 분자량이 동일하고 타겟 유전자도 거의 유사하므로 1-methoxyphaseollidin으로 통일하여 분석하였다.

이상의 내용에 근거하여 H-C 네트워크를 구성하였고, 감초로부터는 15종, 인삼으로부터는 7종, 백출로부터는 4종, 복령으로부터는 3종의 활성 물질들을 선별하였으며, 이 성분들 중 beta-sitosterol은 감초, 인삼 및 복령에, inermin은 감초와 인삼에 공통적으로 포함되어 있었다(Fig. 2).

## 2. C-T 및 C-D 네트워크의 구성

앞서 선별된 26종의 성분들을 대상으로 각기 성분들이 작용할 것으로 추측되는 타겟 유전자들을 선별하여 C-T 네트워크를 구성하여 보았다. 26종의 성분들 중 7-methoxy-2-methyl isoflavone이 43개의 타겟을 가지는 것으로 확인되었으며 그 다음으로 beta-sitosterol이 38개의 타겟을 가지는 것으로 나타났다. 각 성분들이 가지는 타겟들 중 중복되는 것을 삭제하면 모두 80개의 타겟이 선별되었으며 이 타겟들 중 가장 많은 성분들에 의해 조절되는 타겟은 prostaglandin G/H synthase 2로 모두 20개의 성분으로부터 영향을 받으며 그 다음으로 sodium channel protein type 5 subunit alpha로 15개의 성분과 연결됨을 알 수 있었다(Fig. 3). 26종의 성분들이 각기 작용할 것으로 기대되는 질환들을 대상으로 C-D 네트워크를 구성한 결과 7-methoxy-2-methyl isoflavone이 155종의 질병에, licoagrocarpin이 140종의 질병에 작용하는 것으로 나타나 가장 많은 질병에 적용될 수 있음을 확인하였고, 각 성분들이 작용할 것으로 추측되는 질환들 중 중복되는 것들을 제외하면 모두 210종의 질환이 선별되었으며 이 중 유방암에 작용할 것으로 기대되는 성분들이 23종, 알츠하이머병에 작용할 것으로 기대되는 성분들은 21종으로 높은 빈도를 보였다. 본 연구와 직접적인 관련이 있는 질환인 뇌졸중에 작용할 것으로 기대되는 물질은 20종으로 나타나 역시 많은 성분들이 포함되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

## 3. PPI 네트워크 구성과 gene ontology 분석

위에서 선별된 유전자들이 작용하는 단백질을 확인하여 STRING 데이터베이스를 활용하여 PPI 네트워크를 구성하여 보았으며, 그 결과 CASP3 단백질이 27개, JUN 단백질과 ESR1 단백질이 25개, PPARG 단백질이 23개의 주변 단백질들과 상호작용 한다는 것을 확인하였다(Fig. 5).

Gene ontology 분석 결과 biological process, molecular function, cellular component 항목에서 주요하게 작용할 것으로 추측되는 기전들을 확인하였으며 KEGG pathway 분석을 통해서도 주요 작용기전을 예측할 수 있었는데(Table 2), apoptosis와 관련된 기전이 상위에 나타난 KEGG pathway 분석 결과와 앞서 PPI 네트워크 분석 결과가 유사하게 나타나 다른 여러 기전들 보다는 apoptosis 기전에 작용하는 단백질들에 사군자탕 구성 성분들이 주요하게 작용할 수 있을 것으로 예측할 수 있으며 이에 작용하는 주요 단백질들은 Figure 6에서 확인할 수 있다.

## IV. 고찰

사군자탕은 補益의 효능이 있는 가장 대표적인 처방으로 인식된 때문인지 뇌졸중과 같은 중한 질병에 대한 전임상 연구에는 거의 활용되지 않았으며 저자들이 확인할 수 있었던 유일한 연구로 Yang 등이<sup>16)</sup> 흰쥐를 대상으로 MCAO 모델을 적용하여 matrix metalloproteinase 9을 조절하여 뇌손상을 줄여줄 수 있음을 보고한 바 있으나 apoptosis에 관여된 단편적이고 간접적인 기전만을 보고하였으므로 아직 뇌경색에 대한 사군자탕의 유효성과 작용 기전을 더욱 연구가 필요한 상태이다. 본 연구팀은 향후 생쥐를 대상으로 MCAO 모델을 적용하여 apoptosis 기전에 관여하는 다양한 단백질들과 유전자 발현을 탐색할 예정이며 본 연구에서 네트워크 약리학적 분석을 활용하여 사군자탕이 작용할 것으로 기대되는 기전을 apoptosis 및 cell survival에 관여하는 것으로 집중할 필요가 있다는 것을 확인하였다.

사군자탕의 구성 약재이면서 임상에서 널리 활용되고 있는 인삼의 경우 인삼, 홍삼 및 이들의 구성 성분을 재료로 뇌졸중에 효과적으로 사용될 수 있음이 다수 보고된 바 있고<sup>17-20)</sup>, 본 연구팀에서도 최근에 인삼과 홍삼 추출물을 전처치하여 MCAO 모델에 의한 생쥐의 뇌손상에 유의한 효과가 있었으며 홍삼에서의 효능이

더 컸음을 발표한 바 있다<sup>21)</sup>. Yu 등은<sup>22)</sup> 감초에서 분리된 성분들을 재료로 흰쥐의 MCAO 모델에 전치치 및 후치치를 함께 사용하여 유의한 효과가 있다고 보고하였고 본 연구팀에서도 감초 메탄올 추출물을 생쥐의 MCAO 모델에 전치치하여 유의한 결과를 확인한 바 있으나<sup>7-9)</sup> 아직 후치치에 의한 유의한 결과와 이에 관여하는 명확한 작용 기전에 대해서는 여전히 부족한 상태이다.

뇌졸중의 특성 상 예방적 약물 투여도 중요하기는 하지만 임상 현장에서 이러한 투여가 현실적으로 용이하지 않기 때문에 뇌졸중 이후에 한약 처방을 투여했을 경우에 유의한 효과가 있는지 확인하는 것이 중요하다. 따라서 본 연구팀에서는 여러 선행 연구들을 바탕으로 MCAO 모델을 확인한 후에 한약 처방 추출물을 후치치하여 뇌조직 구성 세포들의 손상 정도의 변화와 구체적인 작용기전을 지속적으로 탐색하여 발표하고자 하며 이를 통해 한의학에서 오랜 기간 동안 중풍 치료와 관련하여 축적된 임상 경험들과 자료들을 바탕으로 한약 처방 사용의 과학적 근거들을 발굴하고자 하였으며 이와 관련된 연구 중 하나로 본 연구를 수행하게 되었다. TCMSP 데이터베이스를 활용하여 사군자탕 구성 약물들로부터 26종의 활성 성분들을 선별할 수 있었고(Fig. 2) 이들 성분들이 뇌졸중에 유의하게 작용할 가능성도 확인하였다(Fig. 4). 또한 26종의 성분들이 작용할 것으로 예측되는 유전자들과 이러한 유전자들이 조절하는 단백질들을 확인하여(Fig. 3) 단백질 상호작용 네트워크를 구성하였으며(Fig. 5) 그 결과 CASP3, JUN, ESR1, PPARG 등과 같이 apoptosis, cell proliferation 및 metabolism에 관여하는 단백질들이 주된 역할을 하며 이들 단백질에 사군자탕이 작용할 수 있을 것으로 예측되었다<sup>23-29)</sup>.

PPI 네트워크 분석을 통해 가장 많은 상호작용을 하는 단백질은 CASP3이었으며(Fig. 5) 모두 27개의 단백질에 작용하는 것으로 확인되었다. CASP3는 caspase-3로 불리는 단백질로 다른 종류의 caspase들에 의해 활성화되며 세포 내에 존재하는 다른 단백질들을 분해하고 세포 사멸을 진행하는 역할을 하여 조직 구성 세포들의 성장과 사멸의 균형을 조절하는 기능을 하는데<sup>23,24)</sup> PPI 네트워크 상에서 CASP8, CASP9, BAX, BCL2, TGFB1, JUN, MAPK14, CDK2, PPARG, GSK3B 등과 같은 세포 사멸과 성장에 주요하게 관여하는 단백질들에<sup>25-29)</sup> 강하게 상호작용함을 알 수 있다

(Fig. 5). KEGG pathway 분석에서도 이러한 기전은 명확하게 확인할 수 있는데(Fig. 6), 허혈에 의한 뇌손상 기전에도 apoptosis가 관여하며<sup>3,4,6)</sup> 만약 이러한 기전을 조절할 수 있는 약물이 뇌에 치명적인 영향을 미치지 않고 작용할 수 있다면 앞으로 뇌졸중과 치매 등과 같은 질환에도 효과적으로 활용될 수 있을 것이다. C-D 네트워크 분석에서 알츠하이머병도 상위에 랭크됨을 알 수 있는데(Fig. 3) 이러한 결과들은 사군자탕을 재료로 다양한 뇌혈관 질환에 적용해 볼 수 있음을 나타낸다.

이상에서와 같이 본 연구팀에서는 사군자탕을 구성하는 약제들에 포함되어 있는 활성 성분들을 확인하였고 이러한 성분들이 작용할 수 있는 질환들과 타겟 유전자 및 단백질들을 확인하여 보았다. 이러한 연구 내용들을 바탕으로 향후 사군자탕을 MCAO 모델을 적용한 뇌경색 생쥐 모델에 사용하여 약리 활성과 작용기전을 확인할 예정이며 apoptosis 및 cell proliferation 중심으로 작용 기전을 탐색할 계획이다.

#### IV. 결론

사군자탕은 補氣를 목적으로 주로 사용되는 처방으로 한의학에서 중풍으로 일컬어지는 뇌졸중을 연구 모델로 활용한 예는 많지 않다. 본 연구팀의 선행 연구를 통해 사군자탕이 뇌졸중에도 효과적으로 사용될 수 있는 자원을 확인하였으며 본 연구에서는 타겟 단백질과 주요 작용 기전을 예측하여 연구를 효율적으로 수행하는 자료로 삼고자 하였다. 따라서 네트워크 약리학 분석을 통해 사군자탕 구성 약제들로부터 ADME를 고려하여 26종의 활성 성분들을 도출하였고 이 성분들이 작용할 것으로 예상되는 타겟 유전자와 단백질 및 질환들을 분석하여 사군자탕이 뇌경색과 같은 질환에도 유효할 가능성이 크다는 것을 확인하였고 타겟 단백질들의 주요 작용 기전은 세포의 성장과 사멸에 관여하는 기전이며 주로 apoptosis에 관여하는 단백질들을 주요 연구 대상으로 하는 것이 적합한 것으로 확인되었다.

#### 감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

## References

1. Poisson SN, Glidden D, Johnston SC, Fullerton HJ. Deaths from stroke in US young adults, 1989–2009. *Neurology*. 2014;83(23):2110–5.
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):2676–84.
4. Zhao P, Zhou R, Zhu XY, Hao YJ, Li N, Wang J, Niu Y, Sun T, Li YX, Yu JQ. Matrine attenuates focal cerebral ischemic injury by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in mice. *Int J Mol Med*. 2015;36(3):633–44.
5. Durukan A, Tatlisumak T. *Handbook of clinical neurology stroke, part 1 basic and epidemiological aspects*: New York: Elsevier; 2009.
6. Kim D. Animal models of stroke. *Brain & NeuroRehabilitation*. 2011;4(1):1–11.
7. Lee SE, Lim C, Lee M, Kim CH, Kim H, Lee B, Cho S. Assessing neuroprotective effects of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* extract using a transient middle cerebral artery occlusion mouse model. *J Vis Exp*. 2018;142. doi(142):10.3791/58454.
8. Lim C, Lim S, Lee B, Kim B, Cho S. Licorice pretreatment protects against brain damage induced by middle cerebral artery occlusion in mice. *J Med Food*. 2018;21(5):474–80.
9. Lim C, Lim S, Lee B, Cho S. Selection for preclinical study candidate through analysis of frequently used medications presented in Donguibogam Stroke chapter. *Herbal Formula Science*. 2022;30(3):165–74.
10. Lee SJ. Research trends on the effect of Sagunzatang and Samultang. *Proceed Daejeon Univ Inst Kor Med*. 2011;20(1):175–82.
11. Lee KG, Huang DS, Yu YB, Ma JY, Ha HK, Shin HK. A study on compositions, dosages and usages of Sagunjatang, Samultang, Palmultang, Sipjeondaebotang in literature. *J Korean Med Classics*. 2006;19(4):219–25.
12. Ru J, Li P, Wang J, Zhou W, Li B, Huang C, Li P, Guo Z, Tao W, Yang Y, Xu X, Li Y, Wang Y, Yang L. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines. *J Cheminform*. 2014;6:13. doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
13. KIOM. *Defining Dictionary for Medicinal Herbs*. Published on the Internet; <https://oasis.kiom.re.kr/herb/lib/hminfo/hbmcod/hbmcodList.do> (accessed 2022-11-02).
14. STRING. <https://string-db.org/> (accessed 2022-11-06).
15. KEGG. Available from: URL: <https://www.genome.jp/kegg/> (accessed 2022-11-06).
16. Yang P, Tian Y, Deng W, Cai X, Liu W, Li L, Huang H. Sijunzi decoction may decrease apoptosis via stabilization of the extracellular matrix following cerebral ischaemia-reperfusion in rats. *Exp Ther Med*. 2019;18(4):2805–12.
17. Liu L, Vollmer MK, Fernandez VM, Dweik Y, Kim H, Doré S. Korean red ginseng pretreatment protects against long-term sensorimotor deficits after ischemic stroke likely through Nrf2. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:74.
18. Ban JY, Kang SW, Lee JS, Chung JH, Ko YG, Choi HS. Korean red ginseng protects against neuronal damage induced by transient focal ischemia in rats. *Exp Ther Med*. 2012;3(4):693–8.
19. Zheng GQ, Cheng W, Wang Y, Wang XM, Zhao SZ, Zhou Y, Liu SJ, Wang XT. Ginseng total saponins enhance neurogenesis after focal cerebral ischemia. *J Ethnopharmacol*. 2011;133(2):724–8.
20. Tsutsumi YM, Tsutsumi R, Mawatari K, Nakaya Y, Kinoshita M, Tanaka K, Oshita S. Compound K, a metabolite of ginsenosides, induces cardiac protection mediated nitric oxide via Akt/PI3K pathway. *Life Sci*. 2011;88(15–16):725–9.
21. Jin M, Kim K, Lim C, Cho S, Kim YK. Neuroprotective effects of Korean white ginseng and red ginseng in an ischemic stroke mouse model. *J Ginseng Res*. 2022;46(2):275–82.
22. Yu XQ, Xue CC, Zhou ZW, Li CG, Du YM,

- Liang J, Zhou SF. In vitro and in vivo neuroprotective effect and mechanisms of glabridin, a major active isoflavan from *Glycyrrhiza glabra* (licorice). *Life Sci.* 2008;82(1-2):68-78.
23. Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, Lim DS, de Souza-Pinto NC, Hansford R, Kastan MB, Lazebnik YA, Hardwick JM. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem.* 1999;274(30):21155-61.
24. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5(6):10.1101/cshperspect.a008672.
25. Sawe N, Steinberg G, Zhao H. Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res.* 2008;86(8):1659-69.
26. Herceg Z, Wang ZQ. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res.* 2001; 477(1-2):97-110.
27. Gao X, Zhang H, Takahashi T, Hsieh J, Liao J, Steinberg GK, Zhao H. The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways. *J Neurochem.* 2008;105(3): 943-55.
28. Fu R, Shen Y, Zheng J. Association between common genetic variants in ESR1 and stroke risk: A systematic review and meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2019;28(11):104355.
29. Wnuk A, Przepiórska K, Pietrzak BA, Kajta M. Post-treatment with amorfrutin B evokes PPAR $\gamma$ -mediated neuroprotection against hypoxia and ischemia. *Biomedicines.* 2021;9(8):854.doi: 10.3390/biomedicines9080854.

Table 1. Bioavailable compounds of each medicinal herb which consists Sagunja-Tang.

Ginseng Radix						
Mol ID	Molecule Name	MW	OB (%)	Caco-2	BBB	DL
MOL000449	Stigmasterol	412.77	43.83	1.44	1	0.76
MOL000358	Beta-sitosterol	414.79	36.91	1.32	0.99	0.75
MOL003648	Inermin	284.28	65.83	0.91	0.36	0.54
MOL005308	Aposiopalamine	271.34	66.65	0.66	0.4	0.22
MOL005320	Arachidonate	304.52	45.57	1.27	0.58	0.2
MOL005321	Frutinone A	264.24	65.9	0.89	0.46	0.34
MOL005356	Girinimbin	263.36	61.22	1.72	1.22	0.31
MOL005399	Alexandrin_qt	414.79	36.91	1.3	0.88	0.75
Atractylodis Rhizoma Alba						
MOL000028	$\alpha$ -Amyrin	426.8	39.51	1.42	1.28	0.76
MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[ <i>a</i> ]phenanthren-3-ol	428.82	36.23	1.45	1.09	0.78
MOL000049	3 $\beta$ -Acetoxyatractylone	274.39	54.07	1.13	1.08	0.22
MOL000072	8 $\beta$ -Ethoxy atractylenolide III	276.41	35.95	1.08	1.12	0.21
Poria Sclerotium						
MOL000282	Ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	398.74	43.51	1.32	0.91	0.72
MOL000283	Ergosterol peroxide	430.74	40.36	0.84	0.34	0.81
MOL000296	Hederagenin	414.79	36.91	1.32	0.96	0.75
Glycyrrhizae Radix et Rhizoma						
MOL001484	Inermin	284.28	75.18	0.89	0.4	0.54
MOL002565	Medicarpin	270.3	49.22	1	0.53	0.34
MOL000359	Beta-sitosterol	414.79	36.91	1.32	0.87	0.75
MOL003896	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	266.31	42.56	1.16	0.56	0.2
MOL004806	Euchrenone	406.56	30.29	1.09	0.39	0.57
MOL004833	Phaseolinisoflavan	324.4	32.01	1.01	0.46	0.45
MOL004838	8-(6-Hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol	308.35	58.44	1	0.34	0.38
MOL004891	Shinpterocarpin	322.38	80.3	1.1	0.68	0.73
MOL004908	Glabridin	324.4	53.25	0.97	0.36	0.47
MOL004910	Glabranin	324.4	52.9	0.97	0.31	0.31
MOL004959	1-Methoxyphaseollidin	354.43	69.98	1.01	0.48	0.64
MOL004966	3'-Hydroxy-4'-O-Methylglabridin	354.43	43.71	1	0.73	0.57
MOL004974	3'-Methoxyglabridin	354.43	46.16	0.94	0.47	0.57
MOL004978	2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyranol[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	338.43	36.21	1.12	0.61	0.52
MOL004985	Icos-5-enoic acid	310.58	30.7	1.22	1.09	0.2
MOL004988	Kanzonol F	420.54	32.47	1.18	0.56	0.89
MOL004996	Gadelaidic acid	310.58	30.7	1.2	0.94	0.2
MOL005003	Licoagrocarpin	338.43	58.81	1.23	0.61	0.58
MOL005018	Xambioona	388.49	54.85	1.09	0.52	0.87





**Table 2. Biological processes and signaling pathways associated with the targets of Sagunja-Tang**

Biological	Process	
GO-term	Description	FDR
GO:1904017	Cellular response to thyroglobulin triiodothyronine	0.0024
GO:0007197	Adenylate cyclase-inhibiting g protein-coupled acetylcholine receptor signaling pathway	1.12E-09
GO:0060748	Tertiary branching involved in mammary gland duct morphogenesis	0.0037
GO:0032227	Negative regulation of synaptic transmission, dopaminergic	0.0037
GO:0007207	Phospholipase c-activating g protein-coupled acetylcholine receptor signaling pathway	0.0037
Molecular	Function	
GO:0004666	Prostaglandin-endoperoxide synthase activity	0.0047
GO:0051380	Norepinephrine binding	0.00019
GO:0016907	G protein-coupled acetylcholine receptor activity	9.69E-08
GO:0005334	Norepinephrine:sodium symporter activity	0.0068
GO:0004939	Beta-adrenergic receptor activity	0.0068
Cellular	Component	
GO:0097124	Cyclin a2-cdk2 complex	0.004
GO:0097444	Spine apparatus	0.0058
GO:0044294	Dendritic growth cone	0.018
GO:0031264	Death-inducing signaling complex	0.018
GO:0098981	Cholinergic synapse	0.0199
KEGG Pathways		
Pathway	Description	FDR
hsa04215	Apoptosis - multiple species	8.23E-08
hsa05216	Thyroid cancer	3.41E-06
hsa00360	Phenylalanine metabolism	0.0063
hsa05222	Small cell lung cancer	2.02E-10
hsa05030	Cocaine addiction	1.08E-05

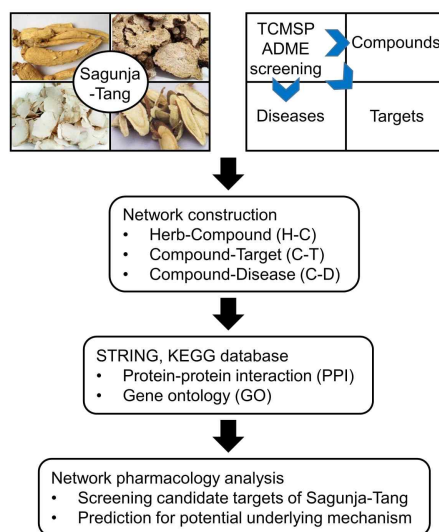


Fig. 1. A schematic diagram of pharmacological network analysis of the potential pharmacological mechanisms of Sagunja-Tang.

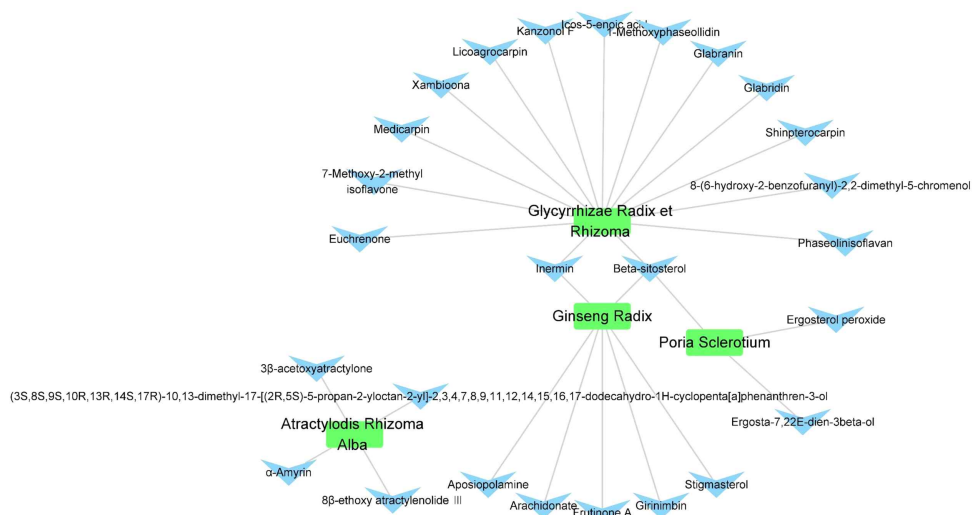


Fig. 2. The herbal medicine-bioavailable compound network of Sagunja-Tang. Green nodes are herbal medicines; blue nodes are bioavailable compounds.

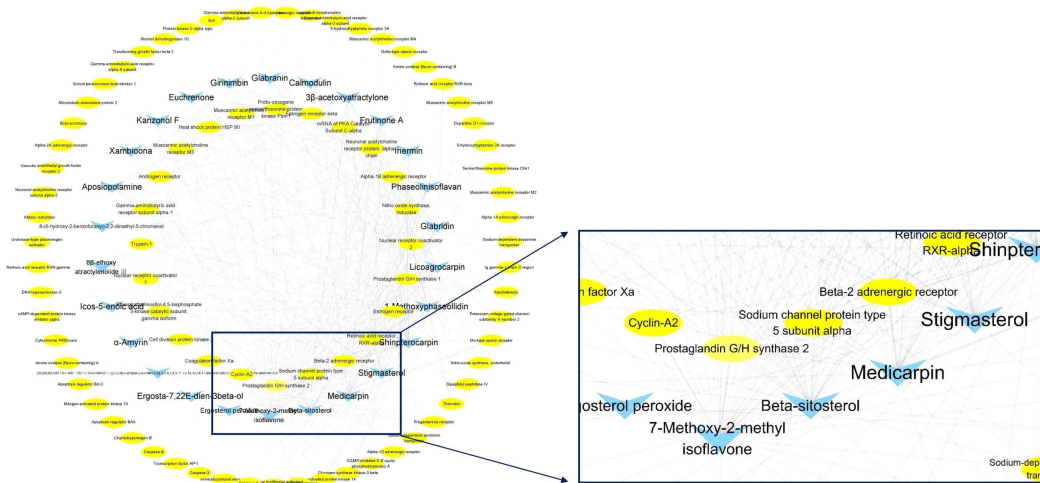


Fig. 3. The bioavailable compound-target gene network of Sagunja-Tang. Blue nodes are bioavailable compounds; green nodes are target genes. Target genes with many edges to the compounds were placed inside.

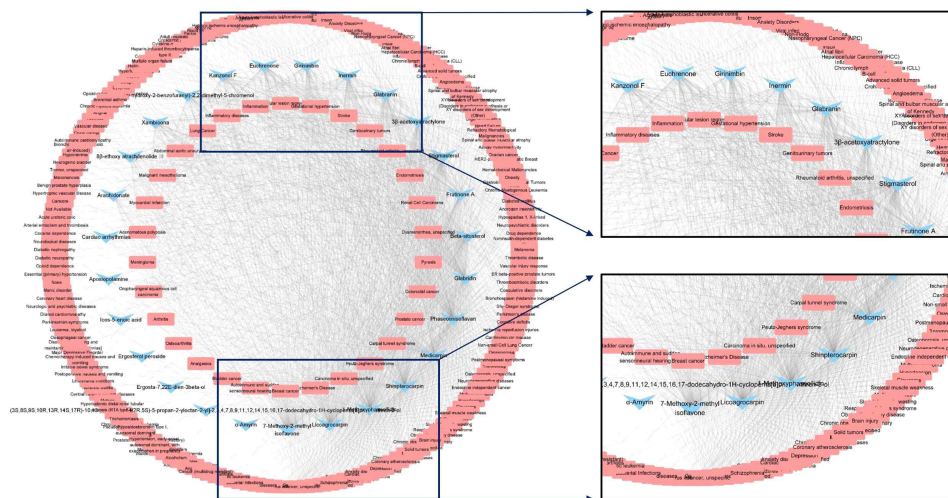


Fig. 4. The bioavailable compound-related disease network of Sagunja-Tang. Blue nodes are bioavailable compounds; red nodes are related diseases. Related diseases with many edges to the compounds were placed inside.

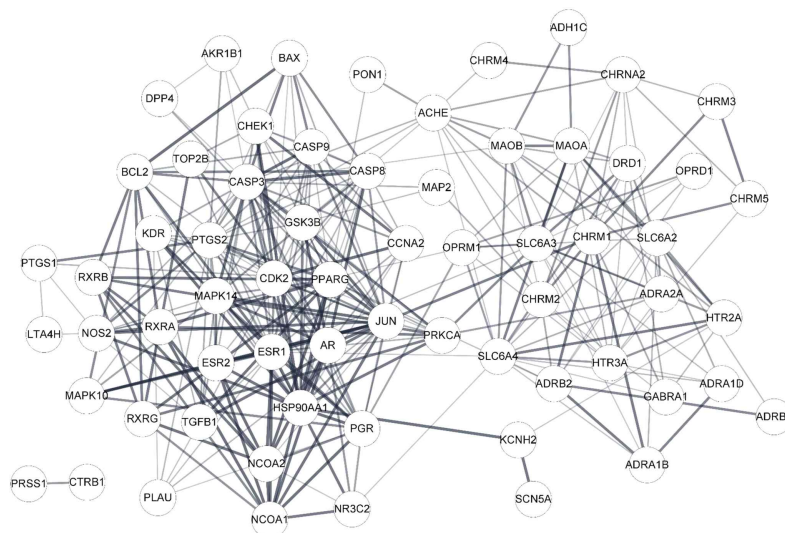


Fig. 5. The protein-protein interaction network for the potential targets of Sagunja-Tang. Nodes are target proteins. The thickness of the edge indicates the strength of interaction.

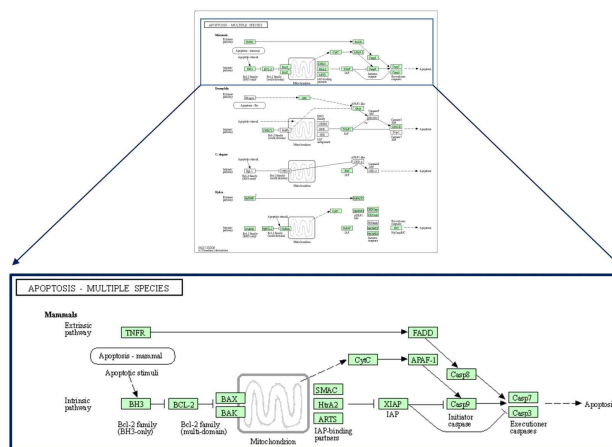


Fig. 6. The targets of Sagunja-Tang mapped on the apoptosis pathway (hsa04215). Through KEGG analysis, it was confirmed that Sagunja-tang could be involved in apoptosis in several species. The enlarged rectangle box presented below shows the main mechanisms action of Sagunja-Tang in mammals.