

熱多寒少湯이 kainic acid에 의해 유발된 mouse의 해마체 손상에 미치는 영향

金一煥* · 金敬堯*

Effects of Yuldahansotang after kainate administration in the mouse hippocampus area

Kim Il-hwan · Kim Kyung-yo

Department of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine,
Wonkwang University, Iksan, Korea

1. Purpose :

Systemic injection of kainic acid in experimental animals induces the limbic seizure and structural damages in hippocampus and amygdala which resembles the changes in human temporal lobe epilepsy.

The author performed this study to investigate the neuroprotective effects of Yuldahansotang, on the neurotoxicity induced by kainic acid in the hippocampus in rats.

2. Method :

Kainic acid was administered intraperitoneally. And feeding with Yuldahansotang for 3 weeks after kainic acid administration.

Seizure were induced in male mice (kainate 10-40 mg/kg i.p) and animals were sacrificed at various time-points after injection. The experimental animals were sacrificed at 1, 2, 3day and 1,

* 圓光大學校 韓醫科大學 四象醫學教室

3weeks while Yuldahansotang administrations.

Seizure were graded using a behavioral scale developed in our laboratory.

c-fos belong to immediate early genes(IEGs) known to have rapid and brief responses. And neuronal injury was assayed by examining DNA fragmentation using in situ nick translation histochemistry.

3. Results & Conclusion :

Seizure severity paralld kainate dosage.

At higher doses DNA fragmentation is seen mainly in hippocampus in area CA3, and variable in CA1, thalamus, amygdala within 24h, is maximal within 72h, and is large gene by 7days after administration of kainate. And we can't see the expression of DNA fragmentation and c-fos in the mice what feeded by Yuldahansotang after 7days from kainic acid administration.

It is consequently suggested that Yuldahansotang may attenuate the kainic acid-induced neuronal degeneration and increase the immunoreactivity of hippocampus in mouse.

Key words : Yuldahansotang, kainic acid, c-fos protein, DNA fragmentation

초 록

1. 연구목적

kainic acid를 실험동물에 주입할 경우 간질발작을 일으키고 변연계 특히 해마체 부위에서 조직의 손상이 일어나게 되는데 이는 사람에게 있어 측두엽성 간질에서 보이는 구조적 변화와 유사한 것이다. 본 실험은 신경독성 물질인 kainic acid로 마우스의 해마체에 손상을 유발하고 이 경우에 열다한소탕이 신경보호효과가 있는지의 여부를 알고자한 것이다.

2. 연구방법

kainic acid를 경구투여하고 열다한소탕을 3주일간 복용시키면서 각각 1, 2, 3일과 1주, 3주에 조직을 관찰하였다. 조직손상은 해마체의 CA1, CA3과 thalamus, amygdala 등에서 c-fos 와 DNA fragmentation의 출현 율로 지표를 삼았으며 광학현미경하에서 육안적 관찰을 병행하였다.

3. 결과 및 결론

kainic acid만을 투여한 대조 군에서는 실험 3주째에도 손상지표인 c-fos 와 DNA fragmentation이 발견되었으나 열다한소탕을 투여한 실험 군에서는 실험 약 3일 짜부터 손상지표의 발현이 줄어 7일째에는 나타나지 않음을 알 수 있었다. 또한 현미경 하의 육안적 관찰에서도 실험초기 많은 손상을 보였던 신경세포가 2주일 후 어느 정도 회복되는 것을 볼 수 있었다. 이로써 열다한소탕이 kainic acid로 유발된 실험동물의 해마체손상에 대하여 신경세포 보호 효과 및 손상 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

I. 緒 論

四象醫學은 심신균형을 추구하는 의학으로 체질적 治心正己를 바탕으로 하는 治心治病의 精神을 근본으로 삼고 있다. 四象醫學의 體質病證藥理는 선천적 장기의 大小에 따른 氣의 편재와 性情失調에 의해 발생한 病證의 상하적 편재현상을 表裏氣에 대한 升降緩速으로 조절하는 것이다. 이는 궁극적으로 體質의 正己를 확보하는 병증관리인 것이다. 四象醫學에서 보는 性情은 性氣와 情氣의 형태로 나타난다. 性氣란 나의 자율적인 의지와 관계없는 객관적인 외부 세계에 대한 인식능력으로 대동의 차원이며, 情氣는 나의 자율적 의지로 실행하는 인간사회생활에 대한 실행능력이므로 각립의 차원에서 설명하고 있다. 이러한 性氣의 불균형은 表氣에, 情氣의 불균형은 裏氣에 영향을 주어 四象人 體質病證의 表裏病證을 형성하게 된다.¹⁾

뇌의 중심부 아래에 위치하고 있는 변연계는 본능적 행동과 정서감정을 주재하는 기구로서 행동의 의욕, 학습, 기억과정에도 깊이 관여하는 곳으로 알려져 있다.²⁾ 이 구조물 가운데 해마체(hippocampus)는 기억, 특히 짧은 시간 동안의 기억에 관계가 있다고 알려져 있는데, 알쯔하이머 치매나 중풍 등의 뇌 손상이후에 발병하는 혈관성치매에 있어 바로 전의 일을 기억하지 못하는 것은 바로 이 해마체에 손상이 있기 때문이다.

포유류의 중추신경계통에 강력한 신경독성으로 작용하는 kainic acid(KA)의 투여는 변연계내의 해마체에서 특징적인 손상을 유발하므로 이와 관련된 중추신경계 질환의 실험동물모델 개발에 유용하게 사용되고 있다.³⁾ KA로 해마체 손상을 유발하면서 동시에 어떠한 약물을 투입하여 조직손상을 최소화하려는 연구로 신⁴⁾과 이⁵⁾는 R-PIA를, 오⁶⁾는 MK-801을 이용하여 유의한 효과를 얻어내었다. 그러나 이러한 실험에 아직 한의학적 처방이 이용되었다는 보고를 접하지 못하여 본 연구를 시도하게 되었으며 투여 약물은 宋¹⁾의 연구 결과 뇌혈관질환에 사상의학적 치료방법으로 많이 이용되고 있는 熱多寒少湯을 선택하였다.

본 실험에서 변연계 손상의 지표로 삼은 것은 두 가지인데 세포차원에서는 흥분성 아미노산의 일종인 c-fos protein의 발현을, DNA 수준에서는 DNA fragmentation의 발현 정도를 관찰하였다. KA 투여 후 熱多寒少湯을 지속적으로 복용시키면서 대조군과 비교하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 약물

1) 동 물

실험동물은 18-20g된 雄性 mouse를 사용하였고 각각의 실험동물은 12시간 light/dark cycle(light on at 7h) 조건과 55-65% 습도를 유지했으며, 실험과정동안 먹이는 자유롭게 먹도록 하였다. 실험동물의 마취에는 50mg/kg의 pentobarbital sodium(50mg/ml)을 이용하였다.

2) 약 물

본 실험에 사용한 熱多寒少湯의 처방내용은 『東醫壽世保元』⁷⁾에 의거하였으며, 약재는 圓光大學校 韓方病院에서 구입한 후 엄선하여 사용하였다. 처방의 1첩 분량은 다음과 같다.

Prescription of Yuldahansotang

| Herb | Scientific name | dose(g) |
|--------------|-----------------------------|---------|
| 葛根 | Radix Puerariae | 16.0 |
| 黃芩 | Radix Scutellariae | 8.0 |
| 藜本 | Radix Ligustici Tenuissimae | 8.0 |
| 蘿菔子 | Semen Raphani | 4.0 |
| 桔梗 | Radix Platycodi | 4.0 |
| 升麻 | Rhizoma Cimicifugae | 4.0 |
| 白芷 | Radix Angelicae Dahurica | 4.0 |
| Total amount | | 48.0 |

2. 檢液의 조제 및 투여

熱多寒少湯 4첩 분량을 1,500ml의 증류수와 함께 3,000ml 환저 플라스크에 넣고 冷刻器를 부착하

여 120분간 전탕한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 회전진공농축기로 감압 농축한 후 31.92g의 분말시료를 얻었다. 분말시료를 7.89g/ml의 약물로 만들어 7.89g/kg의 양을 매일 30%는 경구투여 하였고 70%는 먹이에 혼합하여 주었다.

3. kainic acid를 이용하여 seizures 및 조직손상 유발

seizure와 이에 따른 조직손상을 유발시키기 위해 KA(Nacacai Tesque, Inc. Kyoto, Japan)를 사용하였으며, KA는 10mM phosphate buffered saline(pH 7.2, 50mg/ml)으로 희석하고, 농도별(10, 20, 30, 40 mg/kg)로 복강 주사하였다. KA를 주입한 후 한시간 정도 동물의 행동학적 양상을 관찰하여 경련증상을 5단계로 나누어 분류하였다.

Grade 0 : no response.

Grade I : staring, front- or hind-limb pawing.

Grade II : staring, front- or hind-limb pawing, rearing, nodding.

Grade III : staring, pawing, rearing, nodding, jumping, wobbling, falling

Grade IV : status epilepticus or death

이중 Grade II와 III의 증상을 보인 동물만을 선택하여 熱多寒少湯을 투여하였다. 또한 熱多寒少湯 투여군의 회복기전을 알아보기 위해 약물을 먹인 후 1일, 2일, 3일, 1주, 2주, 3주된 동물의 뇌를 적출하여 조직의 염색을 실시하고 관찰하였다.

4. 조직고정 및 절편의 제작

실험동물을 0.9% saline으로 10분 정도 심장 관류시킨 후 0.1M Phosphate buffer(PB)에 4% paraformaldehyde를 녹인 고정액으로 심장관류고정을 시행하였다. 0.1M PB에 4% paraformaldehyde를 함유한 고정액으로 4℃에서 12-16시간 고정한 다음 냉동결정을 막기 위해 10%, 20%, 30% sucrose에 가라앉을 때까지 담근 후 cryostat (LEICA)를 이용하여 18 μ m 두께로 free floating 조직절편을 내어 실험을 수행하였다.

5. in situ nick translation

DNA의 절편화(fragmentation)된 모습을 보기 위해 조직들에 in situ nick translation histochemistry method를 사용하였다.

조직들은 11 μ m 두께로 frozen 절편으로 자르고, 젤라틴 코팅된 슬라이드에 올렸다. 조직들은 4% paraformaldehyde에 10분 동안 고정시키고 나서 2X saline sodium citrate (SSC: 150mM NaCl, 15mM Na citrate, pH 7.0이 들어있는 1x SSC)용액으로 80℃에서 20 분간 반응시켰다. pronase (1 μ g/ml, Boehringer Mannheim)에 의해 상온에서 10분 동안 처리하고 나서 PBS 용액에 2% glycine을 넣어 30초동안 조직을 녹이는 반응을 수행하였다.

조직들은 50mM Tris-HCl(pH 7.5), 5mM MgCl₂, 10mM β -mercaptoethanol, 0.005% bovine serum albumin(BSA)가 들어있는 buffer A에 5분 동안 반응시키고 나서 5 μ g/ml DNA polymerase I (Promega), dCTP, dATP, dGTP (promega)의 각각 10 μ M, Biotin-21-dUTP

(Clontech)용액으로 상온에서 60분간 반응시켰다.

negative control은 DNA polymerase I을 빼고, positive control은 0.4 units/ml DNase I (Boehringer Mannheim)을 10mM Tris-HCl, 10mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1mM CaCl₂, 25mM KCl(pH 7.4)에서 DNA polymerase I에 반응하기 전에 15분 동안 반응시킨 것이다. PBS로 5분 동안 세척하고, 0.01% H₂O₂가 들어있는 PBS에서 15분간 반응시킨 후, 15분 동안 PBS에서 3번 세척하였다. 조직들은 상온에서 avidin-biotin-detection kit(Elite vector kit, Vector Lab. Inc, Burlingame CA, USA)를 1% BSA, 0.5% Tween-20이 들어있는 PBS에서 30 분간 반응하였다.

마지막으로 조직들을 0.05mg/ml diaminobenzidine, 10mM imidazole, 0.03% H₂O₂가 들어있는 PBS 용액으로 발색반응을 시킨 후 cresyl violet으로 대조염색을 수행했으며, 알코올 탈수를 거친 후 permount(Fisher)를 이용하여 조직을 고정시켰다.

6. c-fos의 발현 검색을 위한 면역세포 화학 염색법

c-fos protein을 염색하기 위해 avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex immunohistochemical technique (Vector Lab., Burlingame CA USA)을 이용하였으며, 여기에서 사용한 fos 단백질은 rabbit polyclonal antisera (Ab-5, Oncogene Science, USA)를 사용하였으며, 완충용액으로 0.1M phosphate-buffered saline(pH 7.4)를 사용하였다. 0.3% hydrogen peroxide에 의해 endogenous peroxidase activity

를 방지하였으며, 전처리로서 3% normal goat serum과 0.25% Triton-X100을 녹인 PBS에서 30분간 상온에서 반응을 시켰으며, 1차 항체인 c-fos를 1 : 1,000으로 희석하여 4°C에서 48시간 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 조직들은 0.1M PBS (pH 7.4)에서 30분 정도 씻어낸 후 2차 항체 반응을 한다. 2차 항체 반응은 Vectastain Universal Quick Kit(Vector Lab, Inc Burlingame CA USA)을 사용하여 2시간 상온에서 반응시켰다. 반응이 다 끝난 조직들은 1차 항체 반응시 사용하였던 완충용액으로 같은 방법으로 씻어낸 후 Vectastain Elite Kit를 이용하여 ABC(avidin-biotinylated horseradish peroxidase) 염색방법을 했으며, 0.4mg/ml diaminobezidine (DAB, Sigma)과 0.1% hydrogen peroxidase solution을 이용하여 발색반응을 하였으며, 0.1M PBS로 여러 번 세척한 후 70%, 80%, 90%, 95%(2번), 100% 알콜 탈수를 거친 후 canada balsam을 이용하여 조직을 슬라이드에 고정한다.

7. 데이터 분석

염색한 조직들은 광학현미경(OLYMPUS)하에서 배율을 10-200X로 분석하였으며, DNA fragmentation 조직들은 negative control과 positive control을 대조군을 만들어서 관찰하였으며, 각 부위별로 염색되어 있는 분포도를 image pro Plus(Version 4.0, Media cybernetics)를 이용하여 ScanJet 6200(Huwlett Packard사)의 scanning을 이용하여 photoshop 5.0에서 실험결과들을 정리하였다.

III. 실험성적

1. 실험동물의 임상조건

실험동물에 KA를 각각 농도별(10, 20, 30, 40 mg/kg)로 6마리씩 복강내 주입한 후 관찰하였다. 대개 약 15분~30분 이내에 비정상적인 행동들을 보이기 시작했고 1시간 정도 후에는 증상이 소실되었다. 실험동물의 행동, 즉 간질발작은 여러 가지 모습으로 나타났는데 그 정도의 심함에 따라 Grade 0 에서 Grade IV 단계까지 분류하여 아래와 같이 정리하였다.

본 실험에서 Grade I의 현상은 일어나지 않았으며 20~30mg/kg의 KA를 주입한 동물들에서는 각각 Grade II와 Grade III 현상이 나타났다. 40mg/kg의 KA를 주입한 동물들은 약 30% 정도의 치사

Table 1. Seizure grade after administration of kainic acid at different doses.

| KA(mg/kg) | total animal number | seizure grade |
|-----------|---------------------|---------------|
| 10 | 6 | 0 |
| 20 | 4 | 0 |
| | 2 | II |
| 30 | 6 | III |
| 40 | 4 | III |
| | 2 | IV |

※ The succeeding five lines defines the grades for the severity of seizures

Grade 0 : no response

Grade I : rearing, front or hind pawing, staring

Grade II : rearing, staring, nodding, bilateral pawing

Grade III : rearing, staring, nodding, bilateral pawing, falling, jumping, wobbling

Grade IV : status epilepticus and death

울을 보였다(Grade IV). 10mg/kg의 KA는 주입한 실험동물에서는 거의 변화가 나타나지 않았으며 20 mg/kg의 KA를 주입했을 때부터 비정상적 행동들이 나타나기 시작하였다.(Table 1.)

2. seizure grade 와 DNA fragmentation 과의 관계

KA를 투여하지 않은 control 동물의 뇌 조직에서는 DNA fragmentation이 일어나지 않았다. 10 mg/kg의 KA를 주입한 동물에서는 seizure 현상이 없었으며, 뇌 조직에도 역시 별다른 변화가 없음을

알 수 있었다.

20mg/kg의 KA를 준 동물에서는 seizure Grade II 반응이 일어났으며, 또한 DNA fragmentation도 일어났다. 30mg/kg과 40mg/kg을 투여한 동물들은 Grade III 이상의 반응을 보였으며 모두 DNA fragmentation이 일어남을 알 수 있었다. DNA fragmentation은 해마체내의 CA3 영역에서 주로 관찰되었으나, CA1에도 약간 존재하였으며, 그밖에 dorsomedial이나 dorsolateral thalamus, nucleus reticularis, amygdala의 lateral nuclear complex나 V/VI층 내의 cortex 부위에 존재함을 알 수 있었다.(Table 2.)

Table 2. Seizure grade and distribution of DNA fragmentation after administration of kainic acid at different doses

| KA (mg/kg) | seizure grade | hippocampus | | | lateral amygdala | dorsal thalamus | cortex layer V / VI |
|---------------|------------------|-------------|-----|-----|---------------------|--------------------|------------------------|
| | | CA1 | CA2 | CA3 | | | |
| Control | 0 | - | - | - | - | - | - |
| | 0 | - | - | - | - | - | - |
| 10 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| 20 | II | - | - | + | - | - | - |
| | II | + | - | ++ | + | - | + |
| 30 | III | - | - | ++ | - | - | - |
| | III | - | - | + | - | - | - |
| 40 | III | + | - | ++ | - | - | + |
| | III | +++ | - | ++ | - | - | + |

※ The succeeding five lines defines the grades for the severity of seizures

Grade 0 : no response

Grade I : rearing, front or hind pawing, staring

Grade II : rearing, staring, nodding, bilateral pawing

Grade III : rearing, staring, nodding, bilateral pawing, falling, jumping, wobbling

Grade IV : status epilepticus and death

※ The succeeding lines defines each grade of DNA fragmentation

' - ' : No neurons positive

' + ' : 0 - 25% of neurons positive

' ++ ' : 25 - 50% of neurons positive

' +++ ' : 50 - 75% of neurons positive

3. seizure 유발 후 熱多寒少湯을 복용시킨 실험군의 DNA fragmentation 분포

Grade II와 Grade III의 경련을 일으킨 실험동물에 熱多寒少湯을 매일 복용시킨 후 날짜별로 2마리씩 희생하여 DNA fragmentation 변화를 관찰하였다.

그 결과 KA만 주입한 동물은 해마체의 CA3과 그밖에 thalamus, amygdala cortex 등의 neuron에 DNA fragmentation이 일어남을 알 수 있었고 특히 CA3영역은 3주일 후에도 계속 발현되고 있었다.(Table 3.) KA투여 후 熱多寒少湯을 복용시킨 동물 군은 대조군과 비교할 때 초기 2일 정도는 발현되는 정도에 별 차이가 없거나 오히려 더 많기도 하였으나 3일째부터는 그 수가 대조군보다 현저히 감소되어 CA3영역에 DNA fragmentation

이 검출되지 않음을 볼 수 있었다.(Table 4.)

4. Seizure 유발 후 熱多寒少湯을 복용시킨 실험군의 c-fos 발현

KA는 neuron 손상에 치명적인 역할을 하며 이에 따라 c-fos 발현율을 증가시키게 된다. KA 주입 후 날짜별로 3마리씩 희생하여 관찰한 결과 c-fos oncogene protein은 dendate gyrus의 granule cell과 amygdala내의 cell, cerebral cortex, 해마체의 CA1과 CA3의 pyramidal cells에 많이 발현됨을 알 수가 있었고 이러한 c-fos는 3주일 후에도 계속 검출되었다.(Table 5.) 반면에 熱多寒少湯을 투여한 실험군은 1주일 째 검사에서 c-fos가 발현되지 않았음을 볼 수 있었다.(Table 6.)

Table 3. Distribution of DNA fragmentation after kainic acid administration at different time points.

| Time point | animal number | hippocampus | | | lateral amygdala | dorsal thalamus | cortex layer V / VI | nucleus reticularis |
|------------|---------------|-------------|-----|-----|------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| | | CA1 | CA2 | CA3 | | | | |
| 24h(hour) | 1 | - | - | + | - | - | - | - |
| | 2 | - | - | ++ | - | - | - | + |
| 48h | 3 | - | - | ++ | + | - | - | - |
| | 4 | - | - | +++ | + | + | - | - |
| 72h | 5 | - | - | + | + | - | - | - |
| | 6 | - | - | ++ | + | - | - | - |
| 1w(week) | 7 | - | - | + | - | - | - | - |
| | 8 | - | - | + | - | - | - | - |
| 3w | 9 | - | - | + | - | - | - | - |
| | 10 | - | - | + | - | - | - | - |

※ The succeeding lines defines each grade of DNA fragmentation

' - ' : No neurons positive

' + ' : 0 - 25% of neurons positive

' ++ ' : 25 - 50% of neurons positive

' +++ ' : 50 -75% of neurons positive

- 熱多寒少湯이 kainic acid에 의해 유발된 mouse의 해마체 손상에 미치는 영향 -

Table 4. Distribution of DNA fragmentation by feeding with Yuldahansotang for 3 weeks after kainic acid administration.

| Time point | animal number | hippocampus | | | lateral amygdala | dorsal thalamus | cortex layer V / VI | nucleus reticularis |
|------------|---------------|-------------|-----|-----|------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| | | CA1 | CA2 | CA3 | | | | |
| 24h(hour) | 11 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 12 | - | - | ++ | + | ++ | + | + |
| 48h | 13 | - | - | + | + | - | - | - |
| | 14 | + | - | ++ | +++ | + | + | + |
| 72h | 15 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 16 | - | - | - | - | - | - | - |
| 1w(week) | 17 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 18 | - | - | - | - | - | - | - |
| 3w | 19 | - | - | - | - | - | - | - |
| | 20 | - | - | - | - | - | - | - |

※ The succeeding lines defines each grade of DNA fragmentation

' - ' : No neurons positive

' + ' : 0 - 25% of neurons positive

' ++ ' : 25 - 50% of neurons positive

' +++ ' : 50 - 75% of neurons positive

Table 5. c-fos expression after kainic acid administration at different time points.

| Time point | animal number | hippocampus | | dentate gyrus | amygdala | cortex layer V / VI |
|------------|---------------|-------------|-----|---------------|----------|---------------------|
| | | CA1 | CA3 | | | |
| 24h | 21 | ++ | +++ | - | - | - |
| | 22 | - | ++ | - | - | - |
| | 23 | - | + | - | + | - |
| 48h | 24 | +++ | + | + | + | - |
| | 25 | - | + | - | + | - |
| | 26 | - | + | - | - | - |
| 1w | 27 | +++ | ++ | - | - | + |
| | 28 | - | + | - | - | + |
| | 29 | - | + | - | - | + |
| 3w | 30 | ++ | ++ | - | - | + |
| | 31 | + | + | + | + | - |
| | 32 | + | + | + | + | - |

※ The succeeding lines defines each grade of c-fos staining

' - ' : No neurons positive

' + ' : 0 - 25% of neurons positive

' ++ ' : 25 - 50% of neurons positive

' +++ ' : 50 - 75% of neurons positive

Table 6. c-fos expression by feeding with Yuldahansotang for 3 weeks after kainic acid administration.

| Time point | animal number | hippocampus | | dentate gyrus | amygdala | cortex layer V / VI |
|------------|---------------|-------------|-----|---------------|----------|---------------------|
| | | CA1 | CA3 | | | |
| 24h | 33 | ++ | +++ | + | + | + |
| | 34 | - | ++ | - | - | - |
| | 35 | - | + | - | + | + |
| 48h | 36 | - | + | + | - | - |
| | 37 | - | + | - | - | - |
| | 38 | - | + | - | - | - |
| 1w | 39 | - | - | - | - | - |
| | 40 | - | - | - | - | - |
| | 41 | - | - | - | - | - |
| 3w | 42 | - | - | - | - | - |
| | 43 | - | - | - | - | - |
| | 44 | - | - | - | - | - |

※ The succeeding lines defines each grade of c-fos staining

' - ' : No neurons positive

' + ' : 0 - 25% of neurons positive

' ++ ' : 25 - 50% of neurons positive

' +++ ' : 50 -75% of neurons positive

5. 조직염색과 c-fos 면역세포 화학염색 소견

kainate에 의한 세포손상정도를 알아보기 위해

세포 염색한 결과 CA3, dentate gyrus, amygdala 부위의 핵이 손상되어 경계가 모호해져 있음을 볼 수 있었으며(fig. 1-A.), 熱多寒少湯을 2주일 복용한 후



Fig. 1. Staining in the CA3, dentate gyrus and amygdala regions.

a) 1 day after kainate administration (10x)

b) 2 weeks after Yuldahansotang administration.

의 사진에서는 손상부위 세포가 어느 정도 회복되어 신경세포의 핵이 잘 나타나고 있음을 화살표 부위에서 관찰할 수 있었다.(fig. 1-B) 또한 kainate를 주고 하루가 지난 뒤의 사진에서는 주로 CA3, CA2, CA1, dentate gyrus, amygdala부위에서 c-fos 단백질이 다수가 발현되어 있었고,(fig. 2-A, 3-A) 熱多寒少湯을 복용한 실험동물에서는 시간이 지남에 따라 동일 영역에 c-fos 단백질의 발현 숫자가 점차 줄어들고 있음이 관찰되었다.(fig. 2-B, 3-B)

Fig. 2. c-fos. immunostaining in the CA3.

- a) 1 day after kainate administration (20x)
- b) 2 weeks after Yuldahansotang administration.

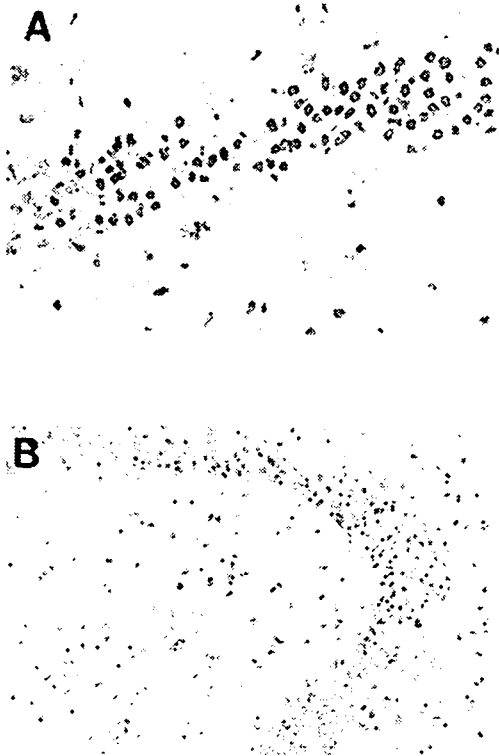
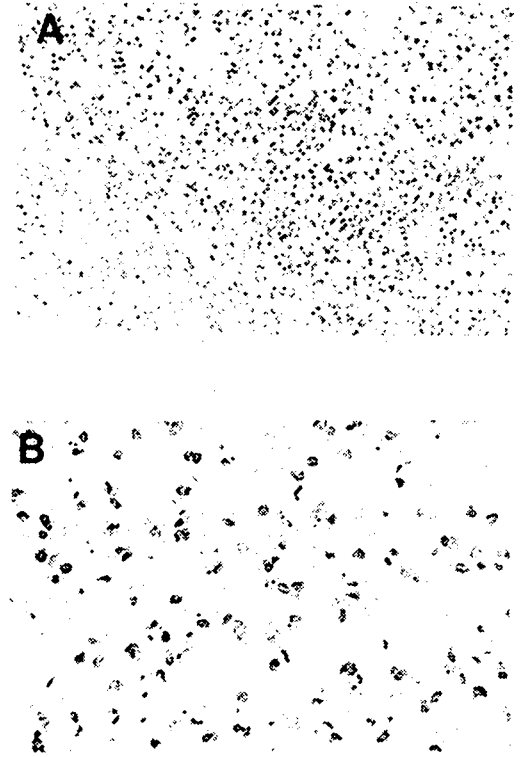


Fig. 3. c-fos. immunostaining in the dentate gyrus and amygdala.

- a) 1 day after kainate administration (10x)
- b) 2 weeks after Yuldahansotang administration. (10x)



IV. 고 찰

본 실험은 포유류의 중추신경계통에 강력한 신경독성으로 작용하는 kainic acid를 투여하여 실험동물의 변연계를 손상시킨 다음 熱多寒少湯을 투여하여 변화를 관찰한 연구이다.

KA는 일본에서 민간요법으로 구충제로 사용되던 해초류의 일종인 diginea simplex에서 추출되었으며 glutamate에 비하여 훨씬 강력한 흥분성을 지닌 것으로 알려져 있다.⁸⁾ 실험동물에서 kainic

acid의 투여는 선조체와 해마체에서 특징적인 손상을 유발하므로 이와 관련된 중추신경계 질환의 실험 동물모델 개발에 유용하게 사용되고 있다.⁹⁾ 또한 임상적인 간질에서 많은 비중을 차지하는 부분간질(partial seizure)의 일종인 측두엽 간질(temporal lobe epilepsy)의 경우 해마에서 신경세포의 소실 및 신경교세포의 증가가 유발되는 해마경화증(hippocampal sclerosis)의 소견이 특징적으로 관찰되며¹⁰⁾ 실험동물에서 이러한 형태학적 손상 등의 병변은 역시 kainic acid의 국소적 또는 전신적 투여에 의하여 유발시킬 수 있다.

이와 같이 KA로 해마체 손상을 유발한 후 어떠한 약물을 투입하거나 또는 KA 투여 전 처치를 통하여 조직손상을 최소화하려는 연구가 최근 많이 이루어지고 있으나⁴⁻⁶⁾ 이러한 실험에 아직 한의학적 처방이 이용된 경우는 없기에 본 연구를 시도하게 되었다.

흔히 中風이라고 하는 뇌혈관질환이나 치매, 파킨슨병 등의 뇌신경의 퇴행성 병변들은 한의학적 치료로 우수한 효과를 보이고 있다. 이러한 질병들은 노년기에 주로 나타나는 질환으로 환자의 평소 습관이나 정신적, 신체적인 불균형이 평생을 두고 쌓인 끝에 발생하므로 환자의 체질적 소인이 깊이 작용하는 병변들이라고 볼 수 있다. 四象體質醫學에서는 四象인의 질병은 性情의 편급과 이에 따른 陰陽升降聚散의 불균형에서 온다고 보고 있다. 그러므로 이와 같은 노년기 질환들의 원인도 평소 체질적 섭생과 성정의 불균형에 의해 나오는 만성적 요인에서 그 원인을 찾고 있으며, 中風의 경우 전구증상에서 발병되기까지의 진행과정도 체질적인 특징이 뚜렷하게 나타난다고 보고 있다. 宋은 사상의학적 중풍관리의 임상적 연구에서¹⁾ 중풍환자의 체질을 분류하고 사상처방을 투여하여 좋은 결과를 얻었으며 황은 치매

치료에 대한 한의학적 접근방법¹¹⁾에서 체질을 구분하고 사상처방을 이용함으로써 유의한 결과를 얻을 수 있었다고 밝히고 있다. 이에 따라 본 실험에서도 사상처방의 투여가 KA투여로 유발된 해마체나 기타 변연계의 손상을 줄여줄 수 있을 것이란 점에 착안하였는데 투여 약물은 宋의 연구 결과 太陰人の 뇌혈관질환에 많이 이용되고 있는 熱多寒少湯을 선택하였다.

熱多寒少湯은 李濟馬의 『東醫壽世保元』⁷⁾에 기재되어 있는 太陰人 新正 24方 중의 하나로 처방의 구성은 葛根, 黃芩, 藁本, 蘿藦子, 桔梗, 升麻, 白芷로 구성되어 있다.

『東武遺稿』¹²⁾를 보면 “肺之病 閹氣多而開氣少 故其藥宜通 而不塞也”라 하여 牛黃, 熊膽, 麝香, 麻黃, 杏仁, 山藥, 桔梗, 黃芩, 皂角刺 같은 太陰人 약들은 通力이 강하므로 肺의 병을 다스리는데 吉한 약이라고 하였으며 또 “藥物之性 厚馨者 歸於肺 厚臭者 歸於脾 厚沃者 歸於肝 厚味者 歸於腎”이라 하였는데 여기서 厚馨하다는 것은 향기가 가장 가볍고 멀리까지 가는 것을 말하며 熱多寒少湯의 약물 중 藁本과 白芷가 이에 해당한다고 볼 수 있다.

熱多寒少湯의 전체적인 약성은 서늘하여 太陰人の 肝燥熱을 푸는데 도움이 된다. 이 처방중의 葛根은 陽明經의 邪를 升散시켜 胃氣를 動하게 하고 止渴生津하며, 辛涼解肌, 透疹止瀉하고, 黃芩은 肺熱을 清하며 陽明經 이외에 있는 實火와 濕熱을 瀉하고, 藁本은 祛風寒濕하고 發散風寒하여 治頭項顛頂痛하고, 桔梗은 表散寒邪하고 胸膈心經之滯를 開하며, 升麻는 發表의 효력은 약하지만 升提陽氣하는 효력이 강하며, 白芷는 祛風解表하면서 通竅之滯하는 상승력이 강하다.¹³⁾ 이상의 약효를 보면 葛根과 黃芩은 肝燥熱을 해소하는 清熱의 기능이 강하고, 藁本, 桔梗, 升麻, 白芷는 肺의 呼散之氣를 길러주는 發散과 上

류의 기능이 강함을 알 수 있다.¹⁴⁾ 결과적으로 熱多寒少湯은 肝燥熱을 풀어 肺燥를 해소하고자 하는 처방인 것이다.

본 실험은 뇌신경의 손상, 특히 해마체를 포함하는 변연계 영역의 신경세포를 대상으로 하였다. 변연계는 해마(hippocampus) 시상핵(thalamic nucleus) 이상엽(pyramiform lobe) 대상회(cingulate gyrus) 등으로 되어있고, 피질하핵군으로는 편도핵(amygdaloid nucleus) 중격핵(septal nucleus) 시상하부(hypothalamus) 시상상부(epithalamus) 후뇌 일부 및 시상의 여러 핵과 기저핵(basal ganglia)의 일부가 포함되며 변연피질에 의하여 둘러싸여 있다.²⁾

신경계통을 구성하고 있는 신경조직은 물리적, 화학적인 여러 자극에 의하여 쉽게 손상을 받을 수 있으며, 한번 손상을 받은 신경세포는 대부분의 경우 재생이 불가능하다고 알려져 있다. 특히 뇌의 신경조직은 손상된 부위에 따라 여러 가지 증상이 나타날 수 있는데 그 중에 변연계의 손상은 근래에 평균 수명이 고령화 되어감에 따라 점차 그 숫자가 늘고 있는 치매와도 관련이 깊다.

Kainate 수용체는 해마의 CA3 영역의 투명층(stratum lucidum), 대뇌피질의 심층, 선조체, 시상의 망상핵(reticular nucleus of thalamus), 편도핵 및 소뇌의 과립세포층에 고밀도로 존재하며 특히 CA3 pyramidal cell은 KA독성에 대해 치명적인 손실을 받게 된다.¹⁵⁾ 이는 CA3 내의 mossy fiber terminal이 KA에 대한 high-affinity binding site를 가지고 있기 때문이라고 볼 수 있다.¹⁶⁾

kainic acid에 의한 해마의 손상에 관련된 보고로서 Sperk등¹⁷⁾은 흰쥐에 체중 kg당 10mg의 kainic acid를 피하 투여한 결과 wet dog shake

현상과 지속적인 근강직간대성경련이 유발되었고 해마, 이상피질 및 편도핵 등에서 kainic acid 투여 후 3시간에 신경세포의 위축과 핵응축(pyknosis) 등이 관찰되고 24시간 후에는 신경세포와 회돌기교세포의 소실, 탈수초화, 정상교세포의 증식, 정맥주위의 출혈, 혈관의 증식 등이 유발되었으며 이러한 손상은 해마의 CA1과 CA2 지역에서 특히 현저하였다고 하였다. Nadler 등³⁾은 여러 용량의 kainic acid를 흰쥐의 뇌실 내에 투여한 결과 해마의 CA3 및 CA4 영역이 소량 투여에서도 손상된 반면 치상회의 과립세포들은 치사량 이상의 투여에도 손상이 잘 일어나지 않는다고 하였다.

본 연구에서도 kainic acid의 전신적 투여는 해마의 CA1 및 CA3 구역의 pyramidal cell에서 심한 손상을 유발하였다. kainic acid 투여 후 24시간 경과 시에 CA1 구역에서는 pyramidal cell이 대부분 소실되어 있었으며 CA3 구역의 경우에는 pyramidal cell이 많이 소실되어 있었고 대부분의 잔여세포에서 위축 및 핵응축 소견을 나타내었다. 1주일 후에는 CA1 구역의 경우 24시간 경과 시와 비슷한 소견을 나타내었으나 CA3 구역에서는 세포의 괴사가 더욱 진행되어 대부분의 세포가 소실되고 신경교세포가 증식되었다. 반면 CA2 구역의 pyramidal cell 및 치상회의 과립세포는 24시간 경과 시에는 핵응축 및 세포질의 위축소견을 나타내었고 1주 경과 시에 CA2 구역은 정상적인 형태를 나타내었으며 치상회의 과립세포층에서는 세포의 감소 및 세포질위축의 소견을 나타내었다. 이상의 소견으로 보아 해마의 CA1 구역은 초기에 가장 심한 손상을 나타내며 CA3 구역은 초기 24시간보다는 날씨가 갈수록 점점 심한 손상을 입게됨을 알 수 있었고 CA2 및 치상회에서는 그리 심한 손상은 유발되지 않음을 알 수 있었다.

실험동물들은 약물투여 약 15-30분만에 발작을 시작하였는데 머리를 계속 끄덕끄덕하거나 부르르 떨거나 하였으며(Grade II), 펄쩍펄쩍 뛰어오르거나 뒤집어지기도 하고 한쪽 방향으로만 끊임없이 빙빙 돌기도 하였으며(Grade III), 주입된 용량이 40mg/kg일 경우 약 30%의 동물에서 전신경련을 일으키며 사망하였다(Grade IV). 이러한 발작은 KA 주입 후 약 1시간이 지나면서부터는 소실되었으며 본 실험에서 Grade I 수준의 경련은 관찰되지 않았다.

본 연구에서는 kainic acid의 신경독성과 한약에 의한 보호효과를 c-fos protein과 DNA fragmentation의 발현정도를 지표로 판단하였고 일정 기간마다 뇌조직을 떼어내어 현미경상에서 육안적인 비교를 시행하였다. 뇌의 신경조직이 어떠한 원인으로 손상되거나 퇴행성 변화를 보이는 과정은 흥분성 아미노산(excitatory amino acid)에 의하여 매개되는 것으로 최근의 많은 연구에 의하여 보고되고 있다. 흥분성 아미노산에는 glutamate와 aspartate가 있는데, 이들은 대뇌피질기원섬유(corticofugal fiber)와 시상의 많은 신경원에서 신경전달물질(neurotransmitter)로 작용한다고 알려져 있었으나,¹⁸⁾ 최근에는 발달, 학습, 기억 그리고 신경조직의 병변의 측면에서 많은 연구가 이루어지고 있으며,¹⁹⁾ 기저핵의 신경원이 분화하는데 관여한다고 보고되기도 하였다.²⁰⁾ Neuronal gene expression은 transmembrane의 signal transduction의 구성요소에 의해 변화되는 것으로 알려져 있으며, 또한 다양한 physiological stimuli에 의해 활성화된다고 알려져 있다.²¹⁾ 이러한 physiological stimuli중에서 c-fos는 자극에 의해 즉시 반응하는 immediate early genes(IEGs)인데 이는 central nervous system(CNS)에서 다양한 자극²²⁾이나 ischemic-hypoxic system²³⁾, epilepsy²⁴⁾, motor

& sensory cortical stimulation에 의해서 반응을 하게 된다.

c-fos는 presynaptic terminal growth를 통해 synaptic plasticity를 일으키며, CNS내의 nerve growth factor의 활성화를 돕는다.²⁵⁾ 이유는 nerve growth factor는 c-fos에 의해 유도발생되어지기 때문이다. c-fos protein은 mouse submandibular gland내에 immunocytochemically하게 위치해 있으며, 이는 β -adrenergic stimulation에 의해 level이 상승하거나 여러 종류의 mouse tissue나 human conceptus의 nuclei에 존재됨이 밝혀졌다.²⁶⁾ Kainate receptor는 neuronal depolarization이나 neuron내로 Ca^{++} 이온의 유입에 의해 활성화가 되며 이러한 결과로 인해 excitotoxic neuronal injury를 입게 된다.²⁷⁾

hippocampal pyramidal neuron들, 특히 CA3는 KA의 독성에 대한 선택적으로 공격을 받게 되는데 아마도 CA3의 형태학적 측면에서 볼 때, dentate gyrus granule cell로부터 직접적으로 glutamatergic 물질들의 유입에 의한 것으로 볼 수 있다.²⁸⁾

앞서 설명한대로 CA3의 조직 손상은 시간이 지남에 따라 점점 심해 KA주입 7일째의 경우는 1일째에 비해 현격한 차이가 있음을 볼 수 있었다. 그러나 熱多寒少湯을 투여한 실험 군에서는 조직손상의 지표인 c-fos의 발현 정도가 현격히 줄어들었으며 현미경하 육안적 소견에서도 조직의 손상억제가 확인되었다. 관찰 결과 7일후 소견에 c-fos 발현이 나타나지 않았다.

Excitotoxic neuronal injury에 의해 chromosomal DNA는 fragment로 된다. single strand DNA²⁹⁾는 nick translation technique에 의해 절편으로 만들어질수가 있는데, 이는 외부

영향을 세포수준에서 보편적으로 해석하는 방법이며 조직손상의 정도를 보다 미세한 수준에서 판단하는 지표가 된다. 특히 Brain ischemia³⁰⁾나 epilepsy³¹⁾와 같은 다양한 neuropathologic 환경에서 neuronal injury를 연구하는 데에 DNA fragmentation은 매우 유용한 방법이라 할 수 있다. 본 실험에서 熱多寒少湯을 투여한 실험군에서는 조직손상의 지표인 DNA는 fragmentation의 발현 정도가 현격히 줄어들었으며 실험 3일 후 관찰 소견에 DNA는 fragmentation이 나타나 있지 않았다.

c-fos와 DNA fragmentation의 발현을 지표로 볼 때 熱多寒少湯은 조직의 손상을 억제하는데 유의성 있는 효과를 보였다. 투약 후 초기 1-2일간은 별다른 효과가 없었으며 일부 동물에서는 오히려 손상 지표가 증가하는 경우도 있었다. 그러나 3일 이후부터 효과를 나타내기 시작하여 3주 경과 후까지 지속적인 유의성을 보였다.

본 연구와 유사한 실험에서 신⁴⁾과 이⁵⁾ R-PIA를, 오⁶⁾는 MK-801을 투약하여 유의한 효과를 얻어 내었는데 이러한 약물들은 투약 첫날부터 현저한 효과를 보여주고 있다는 점이 본 실험과 크게 다른 점이다. 그 이유는 R-PIA는 adenosine A1 수용체 효현제이며 MK-801은 NMDA 수용체 길항제로 작용하여 KA 투여시 발생하는 산소유리기나 흥분성 아미노산이 신경세포내 수용체에 부착되는 것을 직접 막아 세포 파괴를 방지할 수 있기 때문이다. 熱多寒少湯은 투약 즉시 빠른 효과는 보이지 않으므로 이러한 기전을 직접 차단하는 효과는 없는 것 같다. 그러나 며칠 후부터 지속적으로 보여주는 손상억제 효과는 아직 알려지지 않은 어떠한 신경세포의 파괴 기전을 熱多寒少湯이 억제 해주고 있다는 점을 시사하고 있다. 이에 대해서는 앞으로 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이 실험을 통해 KA투여로 인한 변연계 구조물의 기질적 손상, 특히 해마체의 손상이 熱多寒少湯의 투여로 병변의 진행을 억제할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

V. 結 論

본 연구에서는 熱多寒少湯이 뇌의 해마체와 기타 변연계 구조물의 손상을 억제하고 회복시키는 효과를 실험하기 위하여 mouse에 kainic acid를 복강 투여 하고 熱多寒少湯을 복용시킨 후 손상의 지표인 DNA fragmentation과 c-fos의 발현정도를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. kainic acid 투여후 hippocampus(CA1, CA³), dentate gyrus, amygdala, cortex layer 등에서 신경세포의 손상이 유발되었다.
2. kainic acid 투여후 대조군은 CA3 영역에서 DNA fragmentation이 3주 째에도 지속적으로 발현되었으나 熱多寒少湯 투여군은 3일 이후부터 DNA fragmentation이 발현되지 않았다.
3. kainic acid 투여후 대조군은 hippocampus(CA1, CA3), dentate gyrus, amygdala, cortex layer 등에서 c-fos가 3주 째에도 지속적으로 발현되었으나 熱多寒少湯 투여군은 7일 이후부터 c-fos가 발현되지 않았다.
4. 熱多寒少湯은 병변 초기에는 변화를 보이지 않았으나 투약 3일 이후부터 신경세포 손상억제 효과가 나타남을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합할 때 太陰人의 襄熱證에 응용하는 熱多寒少湯은 mouse의 해마체 및 변연계 구조물에서 kainic acid 에 의한 신경세포 손상의 억제 효과가 있다고 사료된다.

參 考 文 獻

1. 송일병: 사상의학적 증풍관리의 임상적 연구, 四象醫學會誌, 8(2) : 117-130, 1996.
2. 노민희외: 인체해부학, 서울, 정담, p.244, 1993.
3. Nadler JV, Perry BW, Cotman CW, Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. Nature, 271 : 676-677, 1978.
4. 신동진: RPIA가 kainic acid 유발 경련 흰쥐의 해마에 미치는 영향에 관한 형태학적 및면역조직학적연구, 한양대학교 대학원, 1997.
5. 이계훈: 편도핵내로 투여한 kainic acid에 의한 해마의 손상에서 R-PIA의 전 처치가 vimentin 및 GFAP의 면역조직반응변화에 미치는 영향에 관한 연구, 한양대학교 대학원, 1998
6. 오영철: kainic acid로 유발된 흰쥐의 경련발작에 미치는 MK-801의 영향, 경북대학교 대학원, 1993.
7. 이제마: 동의수세보원, 서울, 여강출판사, p.272, 1992.
8. Tamura S, Pharmacological studies on the principles of Diginea simplex Ag. J. Pharmacol. Soc. Jpn., 74 : 1290-1293, 1954
9. Nadler JV, Perry BW and Cotman CW, Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. Nature, 271 676-677, 1978
10. Margerison JH, Corsellis J, Epilepsy and the temporal lobes. Brain, 89 : 499-529, 1966
11. 황의완: 치매치료에 대한 한의학적 접근방법, 경희의학, pp.105-130, 1997.
12. 량병무, 차광석: 國譯 韓醫學大系, 15: 東武遺稿, 서울, 海東醫學社, pp158-168, 211, 1999.
13. 신민교: 臨床本草學, 서울, 남산당, pp.308-309, 393-393, 506-508, 513-514, 537-538, 540-541, 1986.
14. 최용준·김경요: 熱多寒少湯이 혈압, 국소뇌혈류량 및 腦軟膜動脈에 미치는 영향, 四象醫學會誌, 10(1):285-293, 1998.
15. Monaghan D.T., Bridges R.J. and Cotman C.W., The excitatory amino acid and receptors : their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 29 : 365-402, 1989.
16. Dragunow M, Robertson HA. Localization and induction of c-fos protein-like immunoreactive material in the nuclei of adult mammalian neurons. Brain Res. 440 : 252-2600, 1988.
17. Sperk G, Lassman H, Baran H, Kish SJ, Seitelberger F, Hornykiewicz O kainic acid induced seizures : neurochemical

- and histopathological changes. *Neurosciences*, 10:1301-1315, 1983.
18. Parent A. *Carpenter's Human Neuroanatomy* 9th ed., Williams & Willkins. 1996.
 19. Iqbal Z. Excitatory amino acid receptor-mediated neuronal signal transduction : Modulation by pyramines and calcium. *Molecular & Cellular Biochemistry*. 149-150 : 233-240, 1995.
 20. Meng SZ, Obona T, Isumi H, Takshima S. A developmental expression of AMPA-selective glutamate receptor subunits in Human basal ganglia. *Brain & Development*. 19(6) : 388-392, 1997.
 21. Schonthal A. Nuclear proto-oncogene products : Fine-tuned components of signal transduction pathways. *Cell Signal*. 2 : 215-225, 1990.
 22. Sheng M, Greenberg M. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. 4 : 477-48, 1990.
 23. Gass P, Spranger M, Herdegen T, Bravo R, Kock P, Hacke W, Kiessling M. Induction of FOS and JUN protein after focal ischemia in the rat : differential effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Acta Neuropathol*. 84 : 545-553, 1992.