

淸肺瀉肝湯이 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 미치는 영향

오연환, 정승현, 박인식*, 신길조, 이원철
동국대학교 한의과대학 내과학교실, 해부학교실*

The Effects of *Chungpesagan-Tang* Extracts on Reversible Forebrain Ischemia in Sprague-Dawley Rats

Yean-Hwan Oh, Sung-Hyun Jeong, In-Sick Park*, Gil-Cho Shin, Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, Dept. of Anatomy*, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : The purpose of this investigation is to evaluate the effect of *Chungpesagan-Tang* Extracts on reversible forebrain ischemia in Sprague-Dawley rats.

Methods : the volume of cerebral infarction and edema, the pathohistological change of neurons, the number of survived neurons, neurotransmitters through immunohistochemical methods, proteins connected with neurotransmitters through immunohistochemical methods and the pathohistological change of neurons through electro-microscopy were investigated. From these reseach data, the protection of neurons and the activity of brain cells were examined.

Results :

1. The infaction volume of the control group was 23.9%, and that of the sample group was 16%.
2. The brain edema volume of the control group increased by 17% compared to the normal group and that of the sample group increased by 10%.
3. The light microscopy revealed that the neurons in the ischemia-induced area and CA1 area of hippocampus were most heavily damaged and that the sample group was less damaged compared with the control group. Most pyramidal neurons died in 7 days when brain ischemia was induced.
4. The number of survived pyramidal neurons in the CA1 area of the hippocampus were studied. The normal group had 93 neurons/mm, survived the control group(after 3 days) had 21/mm, the control group(after 7 days) had 3/mm and the sample group 33/mm.
5. The immunohistochemical methods revealed that:
 - (1) In the control group, the sensitivity of GABA, NOS, DBH were increased, and those of Synapsin, eEF-1 α decreased. NOS and DBH had positive reactions in the control group, but negative in the normal group.
 - (2) In thd sample group, the sensitivity of GABA, NOS, DBH were attenuated, and those of NPY, Synapsin, CaMKII, eEF-1 α increased when compared to the control group.
6. The electro-microscopy revealed that most neurons died by necrosis and some neurons died by apoptosis. Several imflammation cells appeared in the injured area of neurons. The number of neurons in the sample group that died by ischemia decreased. But, the number that died by apoptosis did not significantly change.

Conclusions : The data shows that the effect of *Chungpesagan-Tang* Extracts on reversible forebrain ischemia in Sprague-Dawley rats is significant.

Key Word : *Chungpesagan-Tang* extracts, Reversible forebrain ischemia, Sprague-Dawley rats

I. 緒 論

腦卒中은 우리나라 성인 3대 사망원 인중의 하나로, 1980년대 이후 뇌출혈

보다는 뇌경색의 비율이 점차 증가하는 경향을 보이고 있다.

지금까지 뇌허혈연구는 주로 혈액순 환과 에너지 공급이 차단된 후에 신경세

포를 죽음으로 이끄는 병태 생리학적 기 전을 설명하는 것이었는데, 최근 연구 결과에 의하면 신경세포의 사망에 괴사 과정(necrotic process) 외에 apoptosis 가 또 하나의 원인이 된다고 한다. 현재 뇌허혈과 관련하여 가장 활발히 연구되고 있는 부분은, necrosis와 apoptosis

접수 : 2001년 6월 30일 채택 : 2001년 7월 21일

교신저자 : 정승현 (경북 경주시 용강동 357 동국대학교 경주한방병원 3내과, 전화 : 054-770-1577, H·P: 011-505-2382, E-mail: omdjeong@hanmail.net)

Table 1. The Amount and Composition of Chungpesagan-Tang Extracts.

Species	Part used	Latin name	Weight(g)
<i>Puerariae Radix</i>	Root	<i>Pueraria thunbergiana Benth</i>	16.0
<i>Scutellariae Radix</i>	Root	<i>Scutellaria baikalensis</i>	8.0
<i>Angelicae tenuissimae Radix</i>	Root	<i>Ligusticum tenuissimum Kitag</i>	8.0
<i>Raphami Semen</i>	Semen	<i>Raphanus sativus</i>	4.0
<i>Platycodi Radix</i>	Root	<i>Platycodon grandiflorum</i>	4.0
<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	Rhizoma	<i>Cimicifuga heracleifolia KOM.</i>	4.0
<i>Angelicae Radix</i>	Root	<i>Angelica dahurica</i>	4.0
<i>Rhei Rhizom</i>	Rhizoma	<i>Rheum coreanum</i>	4.0
Total Amount			52.0

를 구별하는 문제와 신경전달물질에 대한 것으로 뇌허혈과정을 이해하고 뇌경색으로 인한 세포괴사를 최소화하기 위하여 반드시 규명해야할 부분이다.² 뇌허혈에 대한 한의학적 연구로는 단일 혹은 복합 한약처방이 뇌혈류대사 개선제 또는 뇌허혈로 인한 괴사 및 손상에 유효한 작용이 있는지에 대한 검색이 주를 이루고 있는데, 현재까지 蘇合香元³·六一順氣湯⁴·補陽還五湯⁵·大造丸⁶·黃連解毒湯⁷·高麗紅蔘 複合方⁸·防風當歸飲⁹·祛風至寶丹¹⁰등이 뇌허혈로 인한 괴사 및 손상의 치료에 유효하다고 보고된 바 있다.

초기 腦卒中 환자의 치료에 많이 사용되는¹¹ 淸肺瀉肝湯은 熱多寒少湯에 大黃을 加味한 처방으로 燥澀便閉症, 滿渴狂症, 消渴, 虛勞夢泄病^{12,13}의 적응증외에 중풍치료에서 가장 높은 빈도를 가진 처방으로 알려져있다.

淸肺瀉肝湯에 대한 지금까지의 연구로는 윤¹³의 太陰人 淸肺瀉肝湯의 效能에 對한 實驗的 研究, 김 등¹⁴의 肝疾患에 對한 淸肺瀉肝湯의 治療效果에 關한 實驗的 研究, 김 등¹⁵의 淸肺瀉肝湯과 大黃의 瀉下效果에 關한 實驗的 研究 등이 보고된 바 있으나, 淸肺瀉肝湯이 뇌허혈에 미치는 영향에 대한 병태조직학적 연구는 아직까지 없었다.

이에 저자는 淸肺瀉肝湯의 신경세포

보호작용과 뇌세포활성화 정도를 규명하기 위하여 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류 모델에 미치는 뇌경색의 부피 변화, 뇌부종의 증감, 광학현미경에 의한 신경세포의 변화 및 생존세포수 측정, 면역조직화학법에 의한 신경전달물질 및 관련 단백질의 변화, 전자현미경에 의한 신경세포의 변화 등을 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 動物

수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐(250~350g, 대한동물실험센터)를 대상으로 실험을 실시하였다. 실험동물은 정상군(Normal group) 1마리, 중간대뇌동맥(middle cerebral artery:MCA) 폐쇄 후 재관류 모델 유발군인 대조군(Control group) 10마리, 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류 모델 유발 후 淸肺瀉肝湯을 경구투여한 실험군(Sample group) 10마리로 각각 분류하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용된 淸肺瀉肝湯은 『東醫四象新編』¹²에 의거하였으며, 동국대학교 한방병원에서 조제된 것으로, 1첩당 약물의 분량은 다음과 같다(Table

1). 淸肺瀉肝湯의 제조는 2첩을 증류수 1,000ml에 넣어 2시간동안 전탕한 다음 원심분리 후 여과하고, 그 여액을 rotary evaporator에서 100ml로 농축하여 동결건조한 후 청폐사간탕 추출물 28.95g을 얻었다.

2. 方法

1) 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류 모델의 유발

국소적 뇌허혈을 유발하기 위해서 Longa 등¹⁶이 언급한 방법을 변형하여 오른쪽 중대뇌동맥을 결찰하였다.

목의 정중선을 절개하여 오른쪽의 바깥목동맥(external carotid artery : ECA)을 분리시키고 두개강 바깥에 위치한 속목동맥(internal carotid artery : ICA)의 유일한 분지인 날개구개동맥(ptyergoid artery : PPA)을 분리시켰다. PPA의 시작부위를 미세혈관클립을 이용하여 결찰시켜 혈관속의 실이 PPA속으로 들어가지 않게 하였다. ECA의 가지들을 전기인두를 이용하여 소작시키고, 온목동맥(common carotid artery : CCA)의 기시부위에서 1cm 정도 원위부위를 6-0 silk 봉합사로 묶고 절단하였다. 6-0 silk 봉합사로 ECA의 근위부위를 느슨하게 묶고, 일시적으로 ECA 기시부위에 미세혈관클립으로 결찰하였다. ECA의 기시부위를 미세가위를 이

용하여 구멍을 내고 3-0 나이론 실 한가닥을 절개부위를 통하여 ECA에서 ICA쪽으로 밀어넣었다. 혈관속으로 들어가는 실의 끝부분은 미세한 sandpaper로 갈아 끝부분을 둥글게 하였다. ECA의 기시부위와 실사이에는 출혈을 방지하기 위하여 6-0 silk 봉합사를 이용하여 3-0 나이론 실과 ECA를 가볍게 묶고, 미세혈관클립을 제거한 후 나일론 실을 부드럽게 ICA속으로 밀어넣었다. 나일론 실이 약 17.5mm정도 들어가면 실의 끝부분이 두개강내의 ICA 분지부와 MCA의 시작부위에 도달되어, ICA로부터 분지되는 앞대뇌동맥(anterior carotid artery : ACA)과 MCA로 가는 뒤대뇌동맥(posterior carotid artery : PCA)의 혈액공급이 차단된다. 중간대뇌동맥의 혈관폐쇄를 통한 혈액공급의 중단을 1시간동안 유지한 후 재관류시키고, ECA의 기시부를 6-0 봉합사로 묶고 절개된 피부를 봉합하였다(Fig. 1).

2) 藥材投與

대조군은 보통의 조건하에서 72시간 동안 생존시켰다가 희생시켜 실험에 사용하였고, 실험군은 淸肺瀉肝湯 추출액을 1.65ml/kg씩 1일 2회 경구투여하였으며, 72시간 후 희생시켜 실험에 사용하였다.

3) TTC 염색

먼저 실험동물을 단두하여 희생시키고 뇌를 적출한 후, 두께 2mm의 뇌절편을 제작하였다. 뇌절편들은 1% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (Tetrazolium Red:TTC)용액에 넣어 보관한 후 사진을 찍었다.

4) 뇌경색의 부피 및 뇌부종 측정

뇌경색의 부피(cerebral infarction volume)는 TTC로 염색 처리한 각 절편 절단면에 뇌경색의 부위를 표시한 후, 이 표시된 부위를 따라서 image analyser(Optimas 5.0, USA)를 이용하여 경색부위의 면적을 구하고, 절편의 두께(2mm)를 곱하여 각 절편의 뇌경색의 부피를 얻고, 이들 절편의 값을 합하여 전체 뇌경색의 부피를 구하였다. 전체 뇌의 부피는 각 절편 절단면의 면적에 각 절편의 두께를 곱한 후, 각 절편의 값을 합하여 구하였다. 전체 뇌부피에 대한 전체 뇌경색 부피의 비율은 전체 뇌경색의 부피를 전체 뇌부피로 나누고 100을 곱하여 백분율로 표시하였다. 뇌부종(brain edema)의 측정은 정상측과 뇌경색측 대뇌반구의 부피를 위와같은 방법으로 측정하여 정상측에 대한 뇌경색 부피의 비율을 구하였고, 그 비율을 뇌부종의 지표로 하였다.

5) 광학현미경용 표본제작

신선한 뇌조직 표본을 얻기 위해서 심장용 관류고정(cardiac perfusion fixation)을 실시하였다. 즉 외과적 수술 72시간 후 생존한 실험 동물의 복강에 sodium pentobarbital(40mg/kg)을 주사하여 마취시킨 후 전흉벽을 열어 좌심실에서 대동맥쪽으로 카테타를 삽입하고 30ml의 생리식염수를 주입하면서 우심방의 심방귀부분을 열어 혈관내의 혈액을 제거하였다. Paraffin 포매용으로는 500ml 10% neutral buffered formalin (pH 7.4, 4℃)으로 관류고정을 시켰으며, 뇌는 적출하여 다시 동일고정액으로 24시간 동안 후고정을 실시하였다. 후고정 후에 tap water에서 충분히 세척하고, 통상적인 방법으로 탈수과정을 거친 후 paraffin에 포매하고 조직절편기

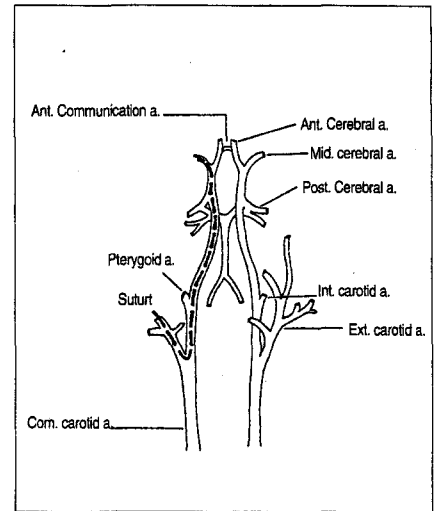


Fig. 1. Diagram of cerebrovascular anatomy in rats illustrates extracranial and intracranial vascular relations exploited in our method of reversible occlusion of middle cerebral artery.

(Microtome, American optical Co.)를 이용하여 제작된 연속 조직절편에서 30μm마다 한 장씩 5μm두께의 조직을 취하여 gelatin을 입힌 slide glass에 얹어 신전기(slide warmer)에서 2~4시간 동안 건조시킨 후 염색에 이용하였다.

6) 전자현미경용 표본제작

실험동물을 sodium pentobarbital 용액으로 마취시킨 후 37℃의 생리식염수 20ml를 심장에 관류시켜 혈관속의 혈액을 제거하고, 150ml의 half karnovsky 용액(0.5% paraformaldehyde와 2% glutaraldehyde)으로 심장관류고정을 시행하였다. 그 후 뇌를 적출하고 hippocampus 부위를 trimming한 다음, 1×1×3mm의 크기로 세절하고 동일 고정액에 2시간 고정하였다. 그 후 osmium tetroxide에 2시간동안 후고정을 시행하였다. 후고정된 조직은 2% uranyl acetate 용액에서 90분동안 block 염색을 시행한 후, 알코올의 농도 상승순으로 50%, 60%, 70%, 80%,

Table 2. Details of the Antisera

	Host	Dilution	Sources
GABA	Rabbit	1 : 10,000	DiaSorin
NPY	Rabbit	1 : 1,000	Incstar
DBH	Rabbit	1 : 500	Eugen Tech
NOS	Rabbit	1 : 8,000	DiaSorin
α -Synapsin	Rabbit	1 : 5,000	자체제작
α -CaMKII	Rabbit	1 : 5,000	자체제작
c-fos	Rabbit	1 : 4,000	DiaSorin
α -NR2A	Rabbit	1 : 5,000	자체제작
α -NR2B	Rabbit	1 : 5,000	자체제작
α -PSD95	Rabbit	1 : 5,000	자체제작
eEF-1 α	Rabbit	1 : 5,000	자체제작
PDE2	Rabbit	1 : 5,000	DiaSorin

GABA : gamma amino butyric acid

NPY : neuropeptide Y

DBH : dopamine beta hydroxylase

NOS : Neuronal nitric oxide synthase C-terminal

 α -CaMKII : α -isoform of type II Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase

NR2A : N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2A

NR2B : N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B

eEF-1 α : eukaryotic elongation factor-1 α

PDE2 : type 2 phosphodiesterase

항체는 동국대학교 의과대학 해부학교실 문일수 교수로부터 받았음.

95% 및 100%에 두어 탈수시킨 후 propylene oxide에서 1시간, propylene oxide와 epon 수지혼합액(1:1의 비율)에서 1시간, epon 수지에서 일속한 뒤 epon 수지(EMbed 812, EMS, USA)로 포매하여 60°C 배양기에서 중합시켰다. 그 후 중합된 epon block은 ultramicrotome(Sorval, Germany)을 이용하여 1 μ m 두께로 박절편(semithin section)을 만들어 1% toluidin blue 액으로 염색하고, 염색표본을 광학현미경(Axioskope, zeiss Germany)으로 관찰하여 목적부위를 선택하였다. 목적부위는 남기고 나머지 부위는 모두 잘라낸 뒤 ultramicrotome(Nova, Germany)을 이용하여 60-90nm 두께의 초박절편을 만들고 nickel grid 위에 올려 건조시킨 후 전자염색을 시행하였다. 전자염색은 2% uranyl acetate 용액에 15분간 둔 뒤 증류수로 잘 세척하고 lead citrate 용액에 8분간 둔 뒤 다시 증류수로 잘 세척하여 시행하였다. 그 후 전자현

미경(H-7500, Hitachi, Japan)으로 80KV에서 관찰하였다.

7) 면역조직화학 염색

실험동물을 4% paraformaldehyde in PBS로 심장관류고정을 시행한 후, 두개골에서 뇌를 적출하고 다시 동일고정액에 12시간 동안 후고정을 실시하였다. 동결로 인한 조직파괴를 방지(cryoprotection)하기 위하여 이 조직을 다시 20% sucrose를 포함하는 0.1M PB 용액에 24시간 동안 넣어 조직을 가라앉힌 뒤, Tissue-Tek O.C.T. compound로 포매하고 CO₂ gas 로 급속냉동시킨 후, 동결절편기(cryostat)로 두께 30 μ m의 절편을 만든 다음 0.02M PBS 용액에 모았다.

면역조직화학법은 부유법(floating method)으로 실시하였다. 즉 동결절편 조직을 0.1M PB 용액으로 세척하고, 다시 0.02 M PBS 용액으로 15분간씩 3번 세척하여 동결조직 내에 함유된

O.C.T. compound 성분을 제거하였다. 단백질에 의한 비 특이적 면역반응을 막기 위하여 10% normal goat serum (NGS)으로 1시간동안(4°C) 전처리하고, 1차 항체(Table 2)를 1% NGS 와 1% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 PBS용액에 적당한 배율로 희석하여 4°C에서 48시간 반응시킨 후, PBS로 15분간씩 3번 세척하였다. 이어서 2차항체로서 biotinylated goat-anti rabbit immunoglobulin G 를 PBS 용액에 1 : 500으로 희석하여 4°C에서 24시간 반응시킨 후 PBS 로 15분간씩 3번 세척하였다. 그 후 조직표본을 사용 30분전에 만들어 놓은 ABC(avidin-biotin peroxidase complex, A : 10 μ l, B : 10 μ l in 1ml PBS) 용액에 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS와 Tris-HCl buffer(TB, 0.05 M, pH 7.4) 용액으로 15분간씩 각각 3번 세척하였다. 이어서 TB에 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)가 혼합된 기질용액에 조직표본을 실온에서 30분간 둔 뒤, 다시 TB에 DAB와 0.03% hydrogen peroxide가 혼합된 기질용액에 5~10분간 두어 발색반응시킨 후 TB, PBS로 각각 세척하고 봉입하여 검경하였다.

실험에 사용한 항체의 희석 비율과 Sources는 다음과 같다(Table 2).

8) 결과분석

본 실험에서 얻어진 결과의 통계처리와 유의성 검정은 Sigma Plot program 4.0(Sigma, USA)에 의하여 처리하였다.

III. 結 果

1. TTC 염색 소견

허혈에 의한 상해 정도를 확인하기 위

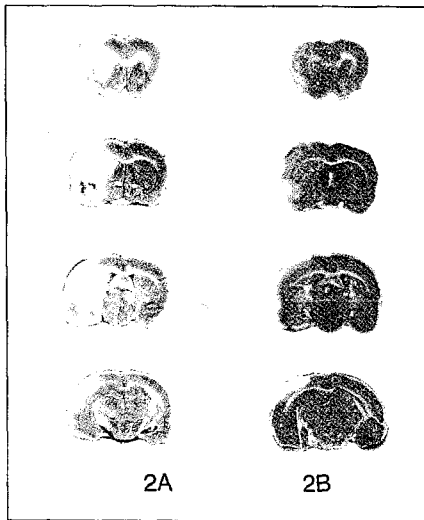


Fig. 2. Coronal section of brain slice from occlusion of the right middle cerebral artery rats.
 2A: control group
 2B: sample group, TTC stain.

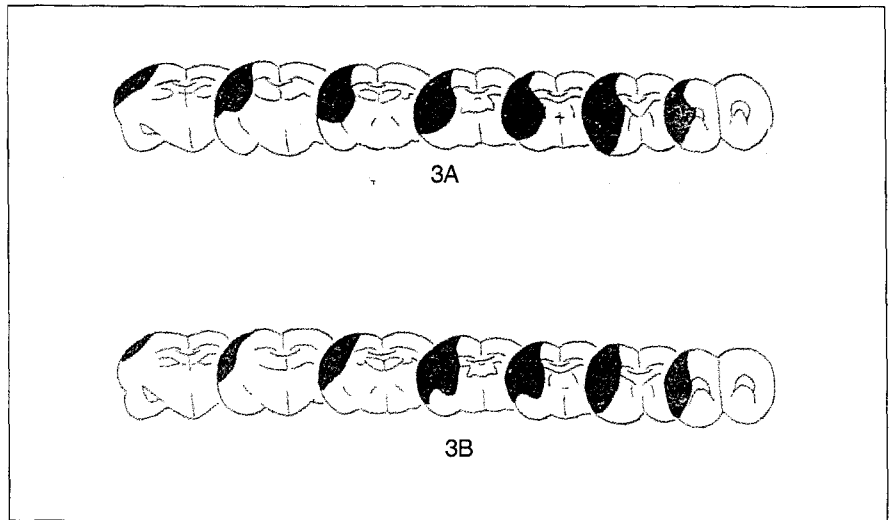


Fig. 3. Schematic diagram of infarct area in the stroked rat brain.
 3A: 72 hrs reperfusion following 1hr MCAO
 3B: 72 hrs reperfusion following 1hr MCAO with *Chungpesagan-Tang* treatment..

Table 3. Cerebral Infarction/Total Volumes(mm^3) of Rats Following the MCA Occlusion

	Infarct volume	Total volume	Infarct percentage(%)
Normal	0	821	0
Control	203 ± 19^a	848 ± 12	23.9

Figure 2

Table 4. Cerebral Edema of Rats Following the MCA Occlusion

Treatment	n	right hemisphere volume	left hemisphere volume	Rt/Lt ratio(%)
Normal	1	411	411	100
Control	3	458 ± 14 ^{a)}	390 ± 4	117
Sample	3	437 ± 6	397 ± 6	110*

a) Mean ± S.D
 Normal : normal Rat
 Control : 3 days after middle cerebral artery occlusion of rats
 Sample : 3 days after middle cerebral artery occlusion of rats with *Chungpesagan-Tang* treatment
 * P < 0.05 compared with control group

3. 뇌부종의 변화

대조군에서는 허혈 유발 동측의 대뇌반구가 반대쪽 대뇌반구에 비하여 약 17% 정도 부피가 커져 오른쪽 대뇌반구가 왼쪽 대뇌반구 쪽으로 치우쳐져 있었다. 실험군에서는 허혈 유발 동측의 대뇌반구가 반대쪽 대뇌반구에 비하여 약 10% 정도로 증가하여 유의성있는 감소효과를 나타내었다(P<0.05)(Table 4, Fig. 5).

4. 광학현미경 소견

정상군에서 흰쥐의 해마형성체(hippocampal formation) 부위 중 고유 해마부위의 피라미드 세포층은 주로 많은 가지돌기를 가진 다극성 신경세포층으로, 약 3~5층은 피라미드세포가 규칙적, 연속적으로 배열되어 있었다. 피라미드 세포층은 CA1에서 CA3지역으로 나눌 수 있었는데, CA1지역을 1mm 두께로 semithin section하여 toluidine blue로 염색한 결과, 이들 세포들은 크고 둥글며 밝게 염색이 되는 핵과 진하고 분명하게 염색이 되는 핵인을 가지고 있었다. 또한 핵과 상대적으로 짙게 염색되는 세포질과 많은 돌기를 가지고 있었는데, 돌기들은 주로 치아이랑 부위로 가지를 뻗고 있었다(Fig. 7A).

허혈유발 3일군에서는 허혈을 유발시킨 부위 및 동측 해마형성체의 CA1 지

역에서 피라미드형 신경세포수가 많이 줄어 있었으며, 세포층도 줄고 그 배열도 불규칙적, 불연속적으로 나타났다. 이들 세포들의 일부는 전체적으로 어둡게 염색되고 핵과 세포질이 위축되어 있었으며, 다른 일부 세포들에서는 핵과 세포질이 정상군에 비하여 부풀어있고 여러가지 크고 작은 vacuole이 형성되는 등 선택적 괴사 형태를 나타내었다. 그리고 일부 표본에서는 상해를 입은 피라미드 세포층에 염증세포들이 출현하는 것을 관찰할 수 있었다. 이들 염증세포의 대다수는 짙게 염색되는 핵이 세포질의 대부분을 차지하는 특징을 가진 임파구들(lymphocyte)이었으며, 핵이 3개 정도로 나누어진 중성호성백혈구(neutrophil leukocyte)도 약간 관찰되었다. 상해로 인하여 없어진 세포의 자리에는 여러 결합조직성분과 염증세포들이 차지하고 있었다(Fig. 7B). 허혈유발 7일군에서는 거의 모든 세포가 괴사되어 정상적인 피라미드세포는 거의 찾아볼 수 없었으며, 일부 조직표본에서는 많은 수의 염증세포가 나타났다(Fig. 7C).

실험군에서는 허혈을 유발시킨 동측의 해마형성체 CA1 지역에서 정상군에는 미치지 못하지만 대조군에 비하여 세포층의 수도 늘고 더 규칙적인 배열을 나타내었다. 남아있는 피라미드 세포들

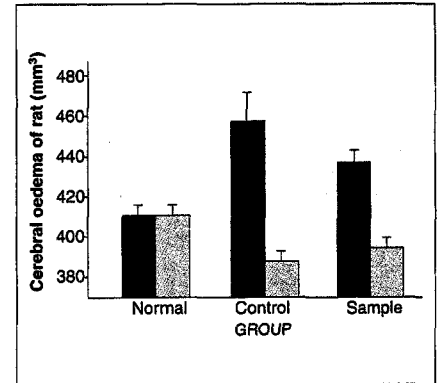


Fig. 5. Cerebral edema of rats following the MCA occlusion
 Normal : normal Rat
 Control : 3 days after middle cerebral artery occlusion of rats
 Sample : 3 days after middle cerebral artery occlusion of rats with *Chungpesagan-Tang* treatment
 * P < 0.05 compared with control group

은 정상군에 비하여 핵과 세포질이 커져 있거나, 핵이 응축되는 등 상해소견을 나타내었으며, 일부 표본에서는 대조군과 마찬가지로 피라미드층에 많은 수의 염증세포들이 관찰되었다(Fig. 7D).

대뇌피질 부위는 뇌연질막에 싸인 대뇌피질의 회색질이 외측으로 위치하고 그 속으로 백색질이 존재하였다. 허혈유발 7일군에서는 중대뇌동맥이 지배하는 회색질내 대부분의 신경세포가 사멸되었으며, 그 부위에 염증세포들이 나타났다. 실험군에서는 상해부위가 많이 줄었지만, 대조군과 유사한 신경세포의 사멸과 림프구, 중성호성백혈구 및 macrophage 등 염증세포들을 관찰할 수 있었다(Fig. 12).

5. 생존세포수의 변화

중대뇌동맥을 1시간동안 결찰시킨 다음 재관류시킨 흰쥐의 해마형성체내 pyramidal neuron의 생존여부를 조사하기 위하여 정상군, 대조군(3일째 7일째) 및 실험군의 생존세포수를 헤아려서

Table 5. Effect of *Chungpesagan-Tang* on Number Change of Pyramidal neuron in CA1 area of Hippocampus in the Middle Cerebral Artery Occlusion of Rats

	Normal	Control(3days)	Control(7days)	Sample
Cell Count	93	21 ± 4.0 ^{a)}	3 ± 2.0	33 ± 4.1*

a) Mean ± S.D

Normal : normal rat

Control(3days) : 3 days after middle cerebral artery occlusion of rats

Control(7days) : 7 days after middle cerebral artery occlusion of rats

Sample : 3 days after middle cerebral artery occlusion of rats

with *Chungpesagan-Tang* treatment

* P < 0.05 compared with control group

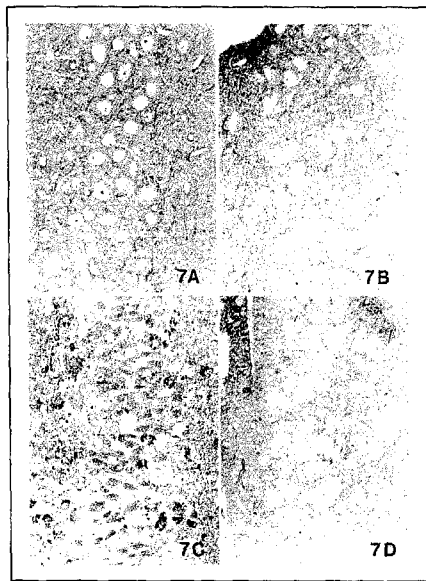


Fig. 7. Semithin stain of hippocampal CA1 area. A: normal group, B: control group(3days after MCAO), C: control group (7days after MCAO), D: test(*Chungpesagan-Tang* treatment) group. toluidine blue stain, × 200

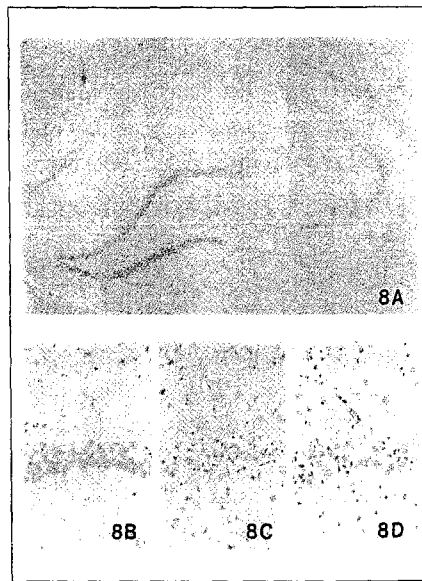


Fig. 8. Immunocytochemical staining for NR2A in hippocampus. A: control 7 days group × 40, B: normal group. × 200, C: 72 hours after MCAO D: 72 hours after MCAO with *Chungpesagan-Tang* treatment. × 200.

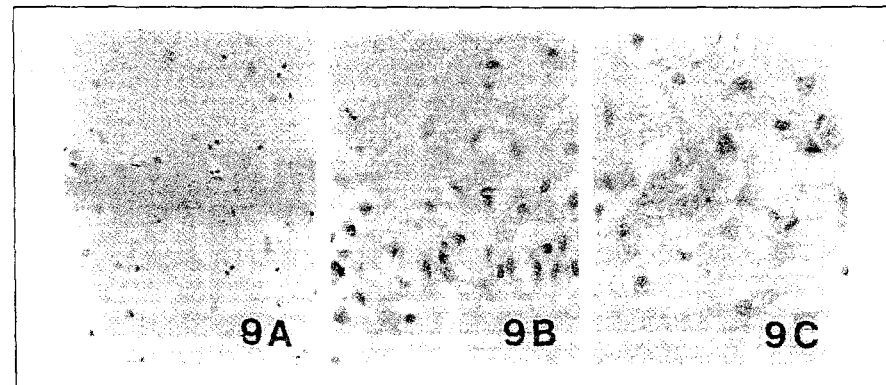


Fig. 9. Immunocytochemical staining for GABA in hippocampus. A: normal group × 200, B: 7 days after MC AO × 400, C: 7 days after MC AO with *Chungpesagan-Tang* treatment × 400

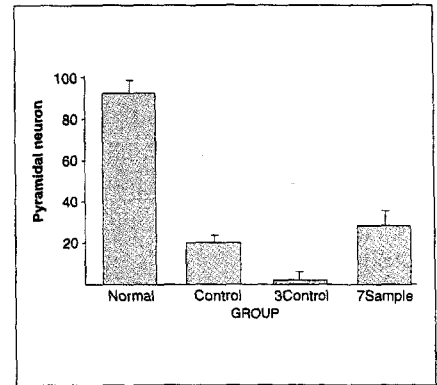


Fig. 6. Effect of *Chungpesagan-Tang* on number change of pyramidal neuron in CA1 area of hippocampus in the middle cerebral artery occlusion of rats

Normal : normal rat

Control(3days) : 3 days after middle cerebral artery occlusion of rats

Control(7days) : 7 days after middle cerebral artery occlusion of rats

Sample : 3 days after middle cerebral artery occlusion of rats

with *Chungpesagan-Tang* treatment

* P < 0.05 compared with control group

개체수의 변화를 조사하였다. 해마형성체 CA1지역내의 pyramidal neuron의 수는 CA1지역의 중간부위를 임의적으로 선택하여 측정하였다. 세포수 측정은 1mm의 두께로 절단한 semithin 표본에서 시행하였으며, 가로길이 1mm내에서 살아 있다고 추정되는 pyramidal neuron을 직접 헤아려서 나타내었다.

정상군에서 해마형성체 CA1지역에 존재하는 pyramidal neuron의 수는 가로길이 1mm내에 평균 93개가 존재하고 있었다. 대조군(3일째)에서는 평균 21개가 생존하고 있었으며, 대조군(7일째)에서는 단지 평균 3개만 남아 있었다. 그러나 실험군에서는 뇌허혈 유발 후 3일째 평균 33개의 pyramidal neuron이 생존하여 대조군에 비하여 유의성있는 결과를 나타내었다(P<0.05) (Table 5, Fig. 6).

6. 면역조직화학 소견

뇌조직에 존재하는 여러 신경전달물질이나 그 과정에 관여하는 단백질에 대한 항체를 이용하여 허혈자극에 의한 그 분포변화를 조사하였다(Table 6).

정상군에서는 해마형성체 CA1 지역에서 GABA(Fig. 9A), NPY 및 CaMKII가 양성반응을 나타내었으며, Synapsin 및 eEF-1 α (Fig. 10A)는 강한 양성반응을 나타내었다. 이들의 반응양상은 주로 피라미드 신경세포의 세포체에서 양성반응이 관찰되었으며, 일부는 세포막을 중심으로 세포주변부위에서 양성반응을 나타내었다. PDE2의 경우 해마형성체내에서는 아주 약하게 염색이 되었으나, 대뇌피질부위에서는 전반적으로 강한 양성반응을 나타내었다. 그러나 NOS, DBH, PSD (Fig. 11A), c-fos, NR2A(Fig. 8) 및 NR2B는 전혀 반응이 나타나지 않았다.

대조군에서는 GABA(Fig. 9B)의 양성반응이 증가되었고, Synapsin, eEF-1 α (Fig. 10B)의 양성반응이 감소되었으며, 정상군에서 음성반응을 나타내었던 NOS와 DBH에서 양성반응이 나타났다. 이들의 반응양상은 정상군과 거의 같았으나, 그 반응성은 항체에 따라 여러가지로 변화되어 많은 피라미드 세포가 상해조건을 보이면서 없어지는 상태에서 약한 반응들을 관찰할 수 있었다.

실험군에서는 GABA(Fig. 9C), NPY 및 DBH 등에서 양성반응이 나타났고, Synapsin 및 eEF-1 α (Fig. 10C)에서 강한 양성반응이 나타났다. 이들 중 GABA 및 DBH는 대조군에 비하여 그 반응성이 약해졌으며, NOS의 양성반응도 대조군에 비하여 많이 약해졌다. NPY, Synapsin CaMKII 및 eEF-1 α 등은 대조군에 비하여 그 반응성이 증가

Table 6. Antibody Binding Patterns in CA1 Area of Hippocampus

	Normal	Control	Test
GABA	+	++	+
NPY	+	+/-	+
NOS	-	+	+/-
DBH	-	++	+
Synapsin	++	+	++
CaMKII	+	-	+/-
eEF-1 α	+++	+	+++
PDE2	+/-	+/-	+/-
PSD	-	-	-s
c-fos	-	-	-
NR2A	-	-	-
NR2B	-	-	-

- : negative
 +/- : very weak positive
 + : weak positive
 ++ : moderate positive
 +++ : strong positive

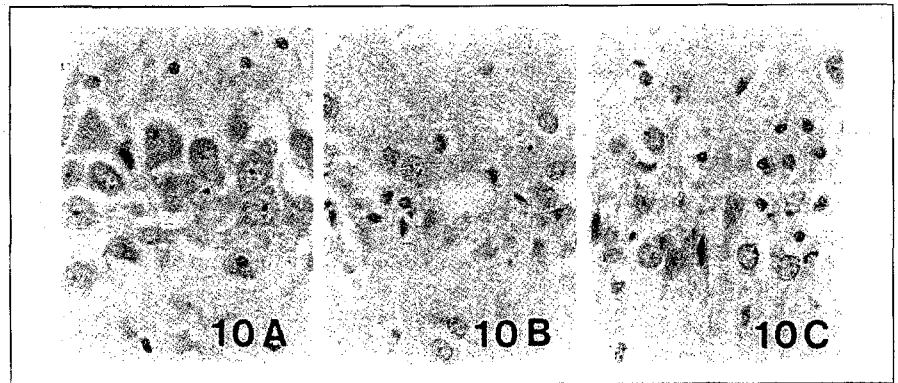


Fig. 10. Immunocytochemical staining for eEF-1 α in hippocampus. A : normal group \times 400, B : 72 hours after MCAO \times 400, C : 72 hours after MCAO with Chung pesagan-Tang treatment \times 400

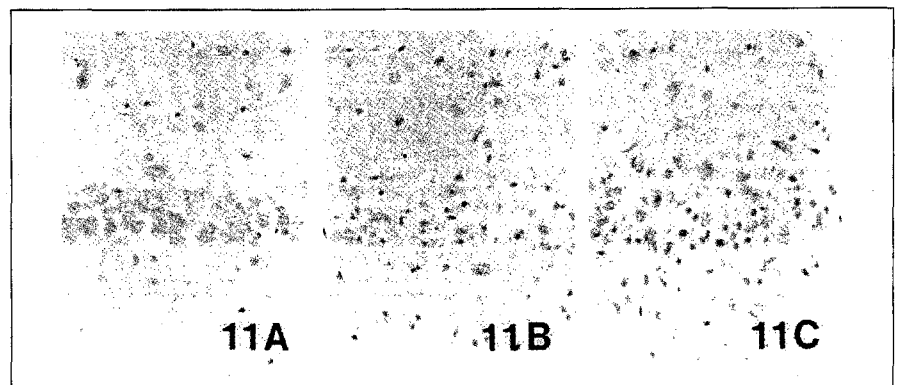


Fig. 11. Immunocytochemical staining for PSD in hippocampus. A : normal group \times 200, B : 72 hours after MCAO \times 200, C : 72 hours after MCAO with Chung pesagan-Tang treatment \times 200

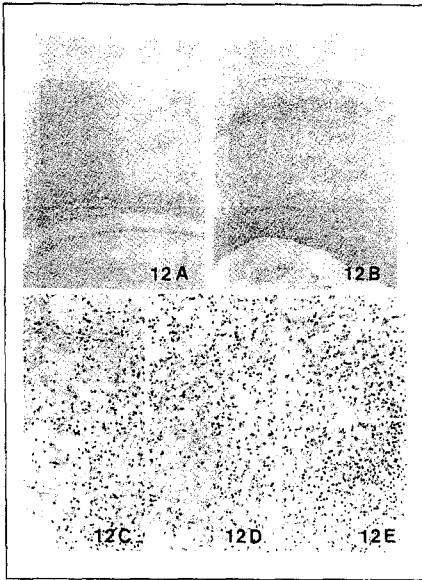


Fig. 12. Immunocytochemical staining for PDE2 in cerebral cortex. A : normal group $\times 40$, B : 7 days after MCAO $\times 40$, C : deep layer of cerebral cortex, D : middle layer of cerebral cortex, E : superficial layer of cerebral cortex

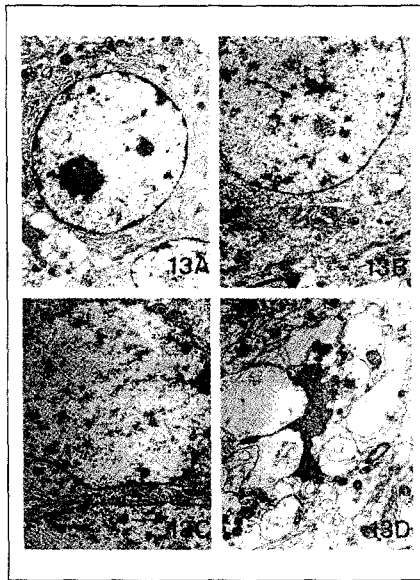


Fig. 13. The fine structure of pyramidal neuron in hippocampal CA1 area. A : normal pyramidal neuron, B : necrosis of early stage(1 days after MCAO) C : necrosis of middle stage(3 days after MCAO), D : necrosis of late stage (7 days after MCAO)

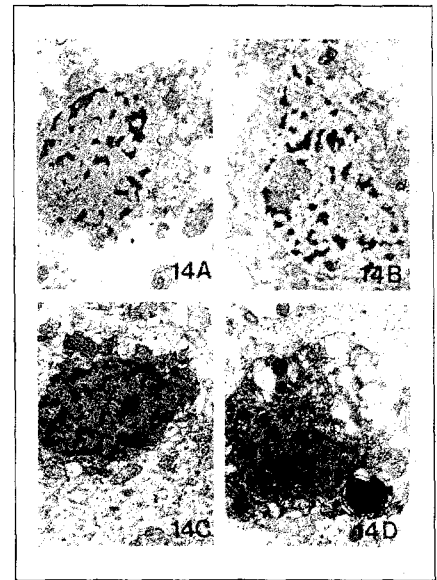


Fig. 14. The fine structure of apoptosis in hippocampal CA1 area.

하였는데, 세포질을 중심으로 하여 주로 양성반응이 나타났으며 세포막주변부위 까지 양성반응이 퍼져 나타나는 경우도 있었다. NPY 등 일부항체는 해마형성체내의 사이신경세포(interneuron)에서 면역양성반응을 내기도 하였다.

7. 전자현미경 소견

정상군에서 pyramidal neuron의 세포체(Fig. 13A)는 타원형 또는 난원형이었으며, 핵의 모양은 난원형으로 세포의 절반 이상을 차지할 정도로 크고 세포체의 중앙에 위치하고 있었으며 세포질이 핵의 주변부위를 둘러싸고 있었다. 핵질은 주로 퍼진 염색질(euchromatin)로 구성되어 있었으며 높은 전자밀도를 보이는 구형의 핵소체가 핵의 한쪽에 편재되어 나타났다. 한편 pyramidal neuron의 세포질내에는 과립세포질세망(rough endo-plasmic reticulum), 골

지복합체(Golgi complex), 사립체(mitochondria) 및 자유리보솜체(free ribosome) 등의 세포소기관이 발달되어 있었고, 용해소체(lysosome) 및 리포푸신과립(lipofuscin granule)도 소수 관찰되었다(Fig. 13B). 해마형성체에서 발견되는 신경섬유는 pyramidal neuron에서 바깥쪽으로 뻗은 축삭(axon)과 안쪽으로 뻗은 가지돌기(dendrite)들로 구성되어 있었는데, 축삭의 시작부위는 과립세포질세망이 발달되어 있었으며, 축삭의 내부에는 많은 신경세사(neurofilament)와 막이 잘 발달된 사립체를 관찰할 수 있었다. 가지돌기는 수초신경섬유(myelinated nerve fiber)와 무수초신경섬유(unmyelinated nerve fiber)가 나타났는데, 수초는 전자밀도가 매우 높게 나타났으며 가지돌기들에서는 내부에 많은 신경세사와 막이 잘 발달된 사립체를 관찰할

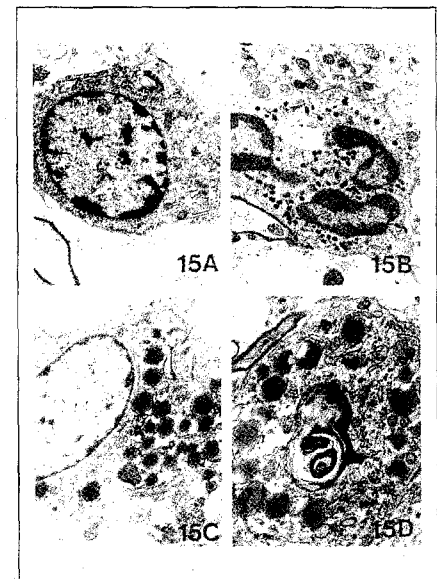


Fig. 15. The ultrastructural structure of inflammatory cells in hippocampal CA1 area and cerebral cortex. A : typical lymphocyte, B : neutrophil leucocyte, C : macrophage in hippocampal CA1 area, D : cell debris in macrophage.

수 있었다.

대조군의 pyramidal neuron의 세포체에서는 전형적인 세포 피사와 같은 현상이 곳곳에서 관찰되었다. 일부 상해세

포에서는 핵막이 부풀어 오르고 핵질이 수축되었으며 공포 형성으로 인한 부종성 변화를 볼 수 있었다(Fig. 13C). 그리고 핵질내에서는 전자밀도가 높아져 뭉친 염색질 형태를 보였다. 또 다른 상해세포는 핵과 세포질의 수축으로 핵질과 세포질이 작아지면서 세포자체의 전자밀도가 증가하기도 하였다(Fig. 13D). 그리고 사립체나 과립세포질세망의 파괴가 일어나고 미세소관이 거의 나타나지 않았다. 그리고 광학현미경에서 괴사 소견을 보이지 않던 많은 신경세포들에서도 세포내 부종의 현상 등 상해소견을 나타내었다. 일부 가지돌기에서는 세포막 주변부위에서 미세공포(microvacuole)들이 많이 생성되고, 많은 가지돌기들이 수축되었으며 전자밀도가 높아졌고 일부에서는 공포에 의한 확장 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 관찰되는 많은 신경종말(nerve terminal)은 부종 소견을 보이고 있었으며, 연접소포(synaptic vesicles)의 탈락을 관찰할 수 있었다.

일부 상해 신경세포에서는 apoptosis 소견(Fig. 14)을 관찰할 수 있었다. 이들은 형태학적으로 세포의 부피가 감소하고 핵질 및 세포질이 축합되어 전자밀도가 치밀한 핵분절(nuclear fragmentation)과 세포분절(cellular fragmentation)이 일어나 apoptotic body가 형성되고 있었으며, 일부 apoptotic body들은 주변의 세포들이나 포식세포들에 의해 포식(phagocytosis)되는 것이 관찰되었다.

신경세포의 상해지역으로 염증세포들이 이동해 오는 것을 관찰할 수 있었다. 가장 많은 수를 차지하는 세포로는 핵이 세포질의 대부분을 차지하는 림프구(lymphocyte, Fig. 15A), 핵이 분절되고 작은 분비과립을 가지는 중성호성백

혈구(neutrophil leukocyte, Fig. 15B), 여러 가지 세포 조각들을 포식작용하는 macrophage(Fig. 15C,D) 등을 관찰할 수 있었다.

실험군에서는 전반적으로 대조군과 비슷하게 해마형성체 CA1지역의 pyramidal neuron들에서 많은 신경세포의 상해현상(Fig. 13)을 관찰할 수 있었는데, 상대적으로 대조군보다는 그 수가 적었으나, 대조군과 마찬가지로 핵과 세포질에 부종현상을 동반하는 일반적인 세포죽음의 형태인 괴사소견 및 apoptosis(Fig. 14) 소견이 많이 나타났다. 특히 전형적인 apoptosis의 소견으로 핵질내의 특정부위부터 전자밀도가 증가하기 시작하여 그 부위가 점점 커지는 경향이 나타났다. 그리고 역시 대조군과 마찬가지로 많은 염증세포(Fig. 15)도 관찰할 수 있었다. 그리고 많은 신경세포들이 상해로 인해 사멸하지만 생존해 있는 세포들은 대조군의 신경세포에 비해 비교적 정상적인 상태를 유지하는 경향이 있었다. 핵과 세포질의 부종소견도 대조군에 비하여 훨씬 줄어들었으며 거의 정상적인 가지돌기들이 많이 나타나며 대조군의 세포사이 공간에서 흔히 발견되는 공포화현상도 많이 감소되었다.

IV. 考 察

腦卒中은 감각·운동·인식의 장애를 주증상으로 매우 높은 발병율과 사망율을 보이는 질환이다. 그 중 뇌경색은 뇌동맥의 급격한 폐쇄로 인한 허혈성 괴사로 조직의 파괴가 발생하는 질환이다.¹⁷ 뇌조직의 허혈성 병변은 sodium-potassium pump에 장애를 초래하는데, 이온성 glutamate 수용체를 통하여 Ca²⁺과 Na⁺이 세포안으로 들어가며, 이어서 Cl-

와 H₂O가 따라 들어가 신경세포들이 수분 후에 팽창되는 세포내 부종이 유발되고, lactate의 증가 및 glucose의 소멸이 나타난다. 이때까지는 가역성 병변이나, 이후 허혈이 계속되면 mitochondria의 손상이 오고 세포막이 유리되어 비가역성 병변으로 진행된다.¹⁸

기능 회복과 관련하여 여러 가지 임상적 연구 결과, 대부분의 뇌경색 환자들은 뇌허혈 후 3개월 안에 감각 및 운동기능의 회복을 나타내는 것으로 보고¹⁹되고 있다.

韓醫學에서 중풍치료는 病因·病態에 따른 辨證治療와 체질적 특성에 따른 體質治療로 구분할 수 있으며, 急性期는 응급치료, 恢復期는 기능회복치료를 주안점을 둔다.²⁰ 일반적으로 중풍치료는 淸火熱, 通利大小便, 祛風疎風, 祛瘀, 順氣理氣, 補虛治療 등이 있는데,²⁰ 急性期 중풍치료에는 淸火熱法과 通利大小便法이 주로 응용되며,²¹ 임상에서 응용되는 처방으로는 淸肺瀉肝湯, 涼膈散火湯, 六一順氣湯, 大·小承氣湯, 大柴胡湯 등이 있다. 이 중 淸肺瀉肝湯은 葛根, 黃芩, 蘆本, 蘿菘子, 桔梗, 升麻, 白芷, 大黃의 8가지 약물로 구성된 처방으로¹¹ 뇌졸중 초기 燥澀便閉證, 滿渴狂譫證 등의 燥熱證, 熱實證에 응용될 수 있다.¹²

저자는 임상에서 뇌졸중 급성기에 많이 응용되는 淸肺瀉肝湯이 뇌허혈후 재관류에 유효함을 입증하고 그 기전을 알아보고자, 흰쥐를 대상으로 실험적 뇌허혈후 재관류를 유발시켜 뇌경색의 부피 변화, 뇌부종의 증감, 생존세포수 측정, 면역조직화학법에 의한 신경전달물질과 관련 단백질의 변화 등을 관찰하였다.

본 연구에서는 1시간동안 오른쪽 중대뇌동맥을 결찰시켜 뇌허혈을 유발시킨 후, 재관류시킨 흰쥐를 72시간 후에 희생시켜 뇌조직에서의 뇌경색 정도를

TTC 염색을 이용하여 측정하였다. TTC는 정상세포에서는 미토콘드리아 내의 dehydrogenase와 반응하여 붉게 보이지만, 뇌경색의 경우에는 dehydrogenase가 소실되어 염색이 되지 않아 백색으로 보인다. TTC 용액에 염색이 전혀 안되는 뇌경색 중심 부위는 신경세포가 완전히 죽어서 전혀 재생이 안되는 부위이고, TTC 용액에 약하게 염색이 되는 뇌경색 주변 부위는 신경세포가 상해를 입었지만 완전히 죽지는 않아서 재생의 가능성이 있는 부위로 구분할 수 있다. 이러한 TTC 염색결과, 대조군은 TTC에 의해 염색이 되지 않아 신경세포가 사망한 것으로 추정되는 부위가 중간대뇌동맥이 직접적으로 혈액을 공급하는 곳으로 알려진 꼬리피각의 전체나 대부분에서 나타났으며, 이곳을 중심으로 대뇌 신피질의 많은 부분과 편도체(amygdala)에서도 염색이 되지 않은 부위가 나타났다. 실험군은 대뇌의 신피질 일부에서 희게 나타나 대뇌피질의 일부영역에서 신경세포가 상해를 입었으나, 대조군에 비하여 꼬리피각의 상해소견이 훨씬 줄고, 그 염색된 정도도 더 붉게 나타났다.

뇌경색의 부피는 대조군에서는 대뇌 전체부피의 평균 23.9%를 점유하였고, 실험군에서는 대뇌 전체부피의 16%로 대조군에 비하여 감소하였다. 뇌경색시 뇌조직의 상해에 심각한 영향을 미치는 요인중의 하나는 뇌부종으로 인한 뇌조직의 상해인데, 뇌허혈에 의한 뇌부종의 정도를 알아보기 위하여 양쪽 대뇌반구를 비교 관찰한 결과, 대조군에서는 정상군보다 약 17% 정도 부피가 커졌으며, 실험군에서는 정상군보다 약 10% 정도 커져 본 연구에 사용한 약제가 뇌허혈에 의한 뇌부종의 부피를 유의성 있게 감소시킴을 알 수 있었다.

또한, 해마형성체의 CA1지역 가로 길이 1mm내에 생존하는 피라미드 신경세포의 수는 정상군에서 평균 93개, 대조군(3일째)에서 평균 21개, 대조군(7일째)에서 평균 3개, 실험군에서 평균 33개가 생존하여 실험군에서 대조군에 비하여 유의한 피라미드 신경세포 생존 효과가 있었다.

최근 다양한 연구에 의하면, 뇌졸중에 의한 신경세포 사망의 주원인은 excitotoxicity라는 설이 일반적이다. 대개 세포는 세포괴사(necrosis)와 apoptosis라는 두가지 경로를 통하여 죽음에 이르는 것으로 알려져 있는데, 지금까지 excitotoxicity에 의해 사망하는 신경세포들은 세포괴사에 의한 것이라는 보고들이 많았다.²² 이러한 excitotoxicity에 의한 신경세포의 사멸이 형태학적으로 세포괴사의 양상을 보이지만, 최근 일부에서는 internucleosomal DNA fragmentation (DNA ladders) 및 핵염색질의 응축 등을 apoptosis의 증거로 보고²³하고 있어 혼란이 가중되고 있다. 따라서 DNA ladder, TUNEL 염색법, DNA dyes(propidium iodide, Hoechst) 등을 이용하여 세포의 사멸을 apoptosis로 규정한 보고²⁴들은 세포괴사에서도 나타나므로 재검토되어야 할 것이다. 한편 허혈성 세포괴사는 일반적으로 glutamate 수용체(receptor)의 과활동(overactivation)과 세포내 Ca²⁺의 증가,²⁵ 자유기(free radical)의 과생산²⁶ 및 catabolic enzyme의 활성을 포함한 여러 유해한 자극에 의한 세포 내 흥분독성에 의해 유발된다. 그런데 세포 배양 실험에서는 glutamate 수용체의 과활동은 선택적으로 신경세포의 괴사²⁷를 일으키지만, 신경세포의 apoptosis도 일으킬 수도 있다고 보고되고 있다.²⁸

세포괴사(necrosis)의 특징적 형태는

세포질의 팽창, 핵막에 앞선 세포막의 파괴, 핵 염색질의 분산 응축 및 세포 붕괴가 함께 일어나는 것으로 이는 경색초기의 세포와 조직의 부종에서 기인된다. 세포괴사(necrosis)에서는 세포막의 손상으로 인하여 핵을 포함한 세포내용물이 세포 외 공간으로 빠져나가기 때문에 핵과 세포질이 사라질 수 있으며, 이 때문에 감염에 의한 상해가 종종 이러한 괴사소견과 동반하여 나타난다.²⁹ 이와 대조적으로 apoptosis는 세포질의 수축, 세포질의 밀도증가, 세포막에 앞서 핵막의 파괴, 핵염색질의 응고 및 응축 등으로 특징 지워진다.²⁹

일반적으로 apoptosis와 세포괴사(necrosis)를 구별하는 일은 이들 세포의 죽음이 각각 독립적으로 일어나는 것만은 아니므로 매우 어렵다.

전자현미경을 이용하여 세포사망정도를 관찰한 결과 허혈로 인한 세포사망에 세포괴사와 apoptosis가 함께 관련이 있음을 알 수 있었다. 정 등¹⁰은 apoptosis에 선택적인 반응을 하는 TUNEL method를 이용한 실험에서 해마형성체의 CA1 지역에서만 특이적으로 양성반응이 나타났다고 하였는데, 이러한 양성반응을 나타내는 세포 전체가 apoptosis 과정을 겪는 것은 아니고 일부 소수의 경우에서만 형태적으로 apoptosis를 확인할 수 있었다. apoptosis의 최종 확인은 전자현미경을 이용하였는데 핵질과 세포질의 응축현상을 나타내는 apoptosis의 형태가 TUNEL 반응에서의 결과와 같이 수적으로 많이 나타나지는 않았다. 따라서 apoptosis와 세포사망은 많은 상해세포에서 동시에 일어나는 현상으로 추정할 수 있었다.

일반적으로 국소적 대뇌허혈의 초기 과정에는 뇌경색이 유발된 부위에 중성호성백혈구(neutrophil)나 염기호성백

혈구(eosinophil)와 같은 혈액에서 유래된 과립성백혈구(granulocyte)가 기용(recruitment)되고, 후기에는 허혈부위와 주변부위(boundary zone)에 T 림프구(T cell)들과 포식세포(macrophage)들이 침윤(infiltration)된다. 염증반응에서 뇌경색 유발부위로 염증세포의 이주 과정을 보면 그 첫단계로 중성호성백혈구(neutrophil)의 기용현상이 일어나고 있는데, 이 현상에는 뇌조직내의 여러 단백질들 즉, intercellular adhesion molecule 1(ICAM 1), integrin, tumor necrosis factor- α (TNF), interleukin-1, platelet-activating factor 등이 작용하는데, 이들은 백혈구(leukocyte)를 혈관내에서 경색부위로 불러모으는 작용을 한다.³⁰ 그 다음 단계로는 림프구(lymphocyte)가 경색부위로 이주하고 다음으로 포식세포(macrophage)가 경색부위로 이주한다.

뇌경색 유발 후 대뇌 피질부위(cerebral neocortex)나 꼬리피각 부위 등 직접적인 뇌경색유발 부위에서, 핵이 세포질의 대부분을 차지하는 림프구를 비롯한 많은 염증세포의 기용이 관찰되었는데, 특히 뇌경색 유발 초기에는 핵의 모양이 다양한 중성호성백혈구(polymorphonuclear neutrophil)들이 상대적으로 많이 관찰되었으며, 후기에는 림프구가 상대적으로 많이 관찰되었다. 그리고 대조군과 실험군 전체에서 포식세포의 모습도 많이 관찰되었다.

한편 TTC 결과 사진에서 뇌경색이 유발된 부위와 동측의 꼬리피각(caudoputamen) 아래쪽 부위에 작은 혈흔들을 관찰할 수 있었다. 이는 인위적인 뇌경색유발 실험에서 중간대뇌동맥이 부분적으로 파괴된 것으로, 뇌혈관장벽이 손상되어 혈관에서 염증세포들이 상해부위로 기용되는 것이라고 추정할 수

있다.

최근 뇌신경세포의 손상을 감소시키기 위한 방법으로 신경전달물질에 많은 관심이 집중되고 있는데,³¹ 분자생물학의 발전으로 세포막의 수용체나 이온통로 등의 분자적 구조가 밝혀져 신경전달물질에 의한 신호전달 및 세포간 또는 세포 내 통신 기전에 대한 이해가 가능하게 되었다. 이에 저자는 면역조직화학법을 사용하여 신경전달물질인 GABA, NPY와 노르아드레날린의 생성에 관여하는 DBH 및 연접활성의 조절에 관여하는 여러 가지 단백질 및 효소 즉, NOS, Synapsin, CaMKII, c-fos, NR2A, NR2B, PSD95, eEF-1 α , PDE2의 분포변화를 조사하였다.

GABA는 자연단백질 성분인 L-glutamic acid가 GAD(glutamate 탈탄산효소)의 작용을 받아 생성되며, Cl⁻의 투과성 증가, K⁺의 전도 증가 및 Ca²⁺ 전도를 감소시켜 뇌허혈로 인한 세포손상을 억제하는 것으로 알려져 있다.³² NPY는 중추신경계통에서 여러 가지 기능을 수행하고 있는데, NPY가 시상하부의 정중용기에 고농도로 존재하는 점은 어떠한 신경내분비학적 기능을 갖고 있음을 시사하는 것으로 LH, ACTH, vasopressin 등의 혈중량을 조절하고, 그 외에 일간리듬, 음식섭취 행위 및 중추성 자율신경기능 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있다.³³ DBH는 dopamin을 가수분해시켜 noradrenalin으로 전환시키는 효소로 noradrenalin 저장소포와 같이 발견되며,³⁴ DBH의 활성 감소가 norepinephrine, epinephrine의 합성을 감소시키므로 가족성 자율신경실조증의 원인으로 생각되는데, 자율신경실조를 동반한 Parkinson 병에서도 DBH의 활성은 감소된다.³⁵ NOS는 신경 NOS, 상피 NOS, 대식세

포 NOS 등 세가지 isoform이 있는데, 이들 중 신경 NOS는 각 세포에 원래부터 존재하고, 흥분성인 glutamate 수용체가 자극을 받을 경우 칼슘이 세포내로 들어가 calmodulin과 결합하게 되면 활성화되어 NO가 합성된다. 신경계통에서 NO는 신호전달, 신경조절물질로서의 작용이 있으며, 허혈 후 산소 재공급 과정에서 NO가 과다 생성될 때는 과산화물이 공동으로 협력하여 신경독성을 유발한다고 알려져 있다.³⁶ Synapsin은 synaptic vesicle을 actin의 골격에 고정하는 phosphoprotein으로서,³⁷ Moretto 등³⁸은 in vitro 실험에서 저산소 유발 21시간 후 synapsin의 인산화를 관찰하였으며, 이 기전이 저산소에 의해 유발된 세포 사멸에 관계된 것으로 추정하였다. α -CaMKII는 Ca²⁺에 의하여 활성화되는 효소로서 대뇌의 경우 alpha isoform이 전체 PSD 단백질의 20-30%를 차지한다.³⁹ 이 효소는 NM DA 수용체를 통하여 유입된 Ca²⁺에 의하여 활성화되며 연접후 신호전달 단백질 가운데 Ca²⁺에 의하여 조절되는 가장 중요한 단백질로 알려져 있다.⁴⁰

본 연구에서 대조군은 GABA의 양성반응이 증가되었고, Synapsin, eEF-1 α 의 양성반응이 감소되었으며, 정상군에서 음성반응을 나타내던 NOS와 DBH에서 양성반응이 나타났다. 실험군은 GABA, NPY, DBH 등에서 양성반응이 나타났고 Synapsin, eEF-1 α 에서 강한 양성반응이 나타났다. 이들 중 중추신경계에서 자율신경의 기능조절에 관여하는 NPY, 뇌허혈로 인한 세포손상을 방지하는 것으로 알려진 Synapsin, CaMKII, 및 세포의 증식에 관여하는 eEF-1 α 등은 대조군에 비하여 그 면역반응성이 증가하였다.

이상의 결과로 볼 때 淸肺瀉肝湯이 뇌

허혈로 인한 신경세포의 손상을 감소시키는 데 도움이 되는 것으로 생각되며, 향후 뇌조직 허혈자극에 대한 보다 구체적인 신경세포손상의 기전에 대한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

V. 結 論

淸肺瀉肝湯이 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류 모델에 미치는 효능을 실험적으로 규명하기 위하여, 뇌경색의 부피 변화 · 뇌부종의 증감 · 광학현미경에 의한 신경세포의 변화 및 생존세포수 측정 · 면역조직화학법에 의한 신경전달물질과 관련 단백질의 변화 · 전자현미경에 의한 신경세포의 변화 등을 살펴본다. 신경세포 보호작용과 뇌세포활성화 정도를 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 뇌경색의 부피는 대조군에서 약 23.9%를 차지하였고, 허혈유발 후 淸肺瀉肝湯을 투여한 실험군에서 약 16%를 차지하여 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 보였다.
2. 뇌부종은 대조군이 정상군보다 약 17%, 실험군이 정상군보다 약 10% 정도 부피가 커져, 실험군에서 대조군에 비하여 유의성있는 감소를 보였다.
3. 광학현미경 소견으로 대조군에서는 허혈을 유발시킨 부위와 동측의 해마형성체의 CA1 지역에 위치하는 신경세포가 가장 많은 상해를 입었으며, 실험군은 대조군보다 그 상해 정도가 감소하였다.
4. 생존세포수의 변화에 있어서는, 해마형성체의 CA1지역 가로길이 1mm내에 생존하는 pyramidal neuron의 수가 정상군에서 평균 93개, 대조군(3일째)에서 평균 21개, 대조군(7일째)에서 평

군 3개, 실험군에서 평균 33개이었다.

5. 면역조직화학 소견으로 대조군에서는 GABA의 양성반응이 증가되었고, Synapsin, eEF-1 α 의 양성반응이 감소되었으며, 정상군에서 음성반응을 나타내던 NOS와 DBH는 양성반응을 나타내었다. 반면 실험군에서는 GABA, NOS, DBH는 대조군에 비하여 반응성이 약해졌으며, NPY, Synapsin, CaMKII, eEF-1 α 등은 대조군에 비하여 그 반응성이 증가하였다.

6. 전자현미경 소견으로 대조군에서는 허혈에 의한 많은 신경세포의 괴사가 나타났으며, 일부 apoptosis 소견 및 신경세포의 상해부위로 여러 가지 염증세포들이 관찰되었다. 허혈유발 후 淸肺瀉肝湯을 투여한 실험군은 대조군에 비하여 신경세포의 괴사소견이 감소되었으나, apoptosis 소견은 큰 변화가 없었다.

VI. 參 考 文 獻

1. 통계청. 사망원인통계연보. 서울:통계청;1999;21,22.
2. Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isia T, Hyman BT, Moskowitz MA. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:238-247.
3. 최은정, 신길조, 이원철. 蘇合香元이 實驗的 腦梗塞 흰쥐의 局所腦血流量 및 梗塞 면적에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 1997;18(1):462-465.
4. 정승현, 신길조, 이원철. 六一順氣湯 抽出物이 생쥐의 全腦虛血에 미치는 영향. *동국한의학회연구소논문집.* 1999;7(2):149-154.
5. 설인찬, 김병탁. 加味補陽還五湯이 高脂血症, 血栓, 高粘度血症, 高血壓 및 腦損傷에 미치는 영향. *한방성인병학회지.* 1998;4(1):133-162.
6. 조규선, 이원철, 윤상협. 흰쥐의 中大腦動脈 閉鎖後 大造丸 투여가 大腦半球 및 視

床萎縮에 미치는 영향. *한방성인병학회지.* 1998;4(1):163-175.

7. 김선영, 윤상협, 이원철. 흰쥐의 中大腦動脈 閉鎖後 黃連解毒湯 投與가 大腦半球 및 視床萎縮에 미치는 영향. *동국논총.* 1998;37:229-246.
8. 오상진, 박일현, 김성훈. 高麗紅蔘 複合方이 實驗的 腦梗塞에 미치는 영향. *한의학학회지.* 1999;20(1):161-171.
9. 홍천표, 정승현, 박인식, 신길조, 이원철. 防風當歸飲이 중대뇌동맥 폐쇄후 재관류 모델에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2000;21(2):319-327.
10. 鄭完祐. 祛風至寶丹이 Mongolian Gerbil의 가역성 전뇌허혈 모델에 미치는 영향. *동국대학교 대학원.* 1999:39-41.
11. 宋一炳. 四象醫學의 中風管理의 臨床的 研究. *四象醫學會誌.* 1996;8(2):117-130.
12. 元持常. 東醫四象新編. 서울:종합의원사;1974:66-67.
13. 尹炳洙. 太陰人 淸肺瀉肝湯의 效能에 對한 實驗的 研究. *四象醫學會誌.* 1990;2(1):135-146.
14. 金定濟, 金賢濟, 安秉國, 洪元植, 金完熙, 李尙仁, 李學仁, 安德均, 申珉圭, 文濬典, 金光湖. 肝疾患에 對한 淸肺瀉肝湯의 治療效果에 關한 實驗的 研究. *慶熙韓醫大 論文集.* 1978;1:9-13.
15. 김정진, 박은경, 배형섭, 문상관, 김영석, 이경섭, 김동현, 조기호. 淸肺瀉肝湯과 大黃의 瀉下效果에 關한 實驗的 研究. *大韓韓醫學會誌.* 1999;20(3):87-93.
16. Longa EZ, Weinstein PR, Calson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rat. *Stroke.* 1987;20:84-91.
17. 이병인. 급성 허혈성 뇌졸중 환자에 있어서 응급 관동맥내 혈전용 해제 주입요법에 관한 예비연구. *대한신경외과학회지.* 1990;8(1):2,8.
18. Toole JF, Burrow DD. Pathophysiology and clinical evaluation of ischemic vascular disease. *Neurological surgery.* Vol. 3. Edited by youmans JR. Philadelphia, W. B. Saunders. 1990:1463-1515.
19. Nakayama H, Jorgensen H, Raaschou H, Olsen T. Recovery of upper extremity function in stroke patients: the Copenhagen Stroke Study. *Arch Phys Med Rehabil.* 1994;75:394-398.
20. 김영석. 중풍(뇌졸중). *중풍학술대회논문*

- 집. 1995:1-56.
21. 강화정, 문병순. 中風의 治療에 있어 清熱法에 대한 文獻的 考察. 한의학연구소논문집. 1996;2(1):26-39.
 22. Gwag BJ, Koh JY, Demaro J, Ying HS, Jacquin MF and Chio DW Slowly-triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. *Neurosci.* 1997;77:393-401.
 23. Du C, Hu R, Csernansky CA, Liu XZ, Hsu CY and Choi DW Additive neuroprotective effects of dextrophan and cycloheximide in rats subjected to transient focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1996;718:233-236.
 24. Goldberg MP, Weiss JH, Pham PC and Chio DW Caspase inhibition selectively reduces the apoptotic component of oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal cell death. *Mol Cell Neurosci.* 1997;9(3):159-169.
 25. Siejeo B, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989;9:127-140.
 26. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in modes of focal ischemia. *Stroke.* 1997;28:1283-1288.
 27. MacManus JP, Rasquinha I, Black MA. Glutamate-treated rat cortical neuronal cultures die in a way different from the classical apoptosis induced by staurosporine. *Exp Cell Res.* 1997;233:310-320.
 28. Bonfoco ED, Krainc M, Ankarcrona M. Apoptosis and necrosis - two distinct events induced, respectively by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 1995;92:7162-7166.
 29. Keer JFR, Harmon BV. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In *apoptosis: the Molecular Basis Of Cell Death.* L.D. Tomei & F.O. Cope. Eds.:5-29. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, NY. 1991.
 30. Vila N, Filella X, Deulofeu R, Ascaso C, Abellana R, Chamorro A. Cytokine-induced inflammation and long-term stroke functional outcome. *J Neurol Sci.* 1999;162(2):185-188.
 31. 醫學教育硏修院. 藥物療法. 서울:서울대학교출판부;1989,399-403.
 32. 서유현. 신경전달물질. 서울:민음사;1996,22-3,272,302,314.
 33. Parker SL, Carroll BL, Kalra SP, Stpierre S, Fournier A, Crowley WR. Neuropeptide Y Y-2 receptors hypothalamic in neuroendocrine areas are up-regulated by estradiol and decreased by progesterone cotreatment in the ovariectomized rat. *Endocrinology.* 1996;137(7):2896-2900.
 34. Iijima K, Kogure K. Prevention of delayed neural death in gerbil hippocampus by iron channel blockers. *Stroke.* 1988;19:1003-1007.
 35. 이귀녕, 이종순. 임상병리과일. 서울:의학문화사;1996,428.
 36. Yamamoto S, Golanov EV, Berger SB, Reis DJ. Inhibition of nitric oxide synthesis increases focal ischemic infarction in rat. *J Cereb Blood Flow and Metab.* 1992;12:712-726.
 37. Huttner WB, Schiebler W, Greengard P, De Camilli P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol.* 1983;96(5):1374-1388.
 38. Moretto MB, de Mattos-Dutra A, Arteni N, Meirelles R, de Freitas MS, Netto CA, Pessoa-Pureur R. Effects of neonatal hypoxia on the in vitro phosphorylation of synapsin I in rat synaptosomes. *Neurochem Res.* 1999;24(10):1269.
 39. Miller SG, Kennedy MB. Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. *J Biol Chem.* 1985;260:9039-9046.
 40. Lisman J. The CaMKII hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci.* 1994;17(10):406-412.