

육미지황탕이 흰쥐의 뇌손상 회복에 미치는 영향

김용진, 김방울, 김경선, 전홍열, 강화정, 김정상*, 홍석

동신대학교 한의과대학 심계내과학교실, 동신대학교 한의과대학 해부학교실*

Effects of Yukmijihwang-tang to Recover the Brain Damage of Mice

Yong-Jin Kim, Bang-Oul Kim, Kyung-Sun Kim, Hong-Yeol Jeon, Hwa-Jeong Kang,
Jeong-Sang Kim*, Seok Hong

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine Dongshin University
Dept. of Anatomy, College of Oriental Medicine Dongshin University

Objectives : This study was designed to investigate the effects of Yukmijihwang-tang on contusion of the mice induced with medicine.

Methods : I observed the effects of light and electron microscopes, and examined hematological changes and VEGF-immunohistochemistry.

Results : Hematology: Leukocytes were increased significantly in a control group of mice compared with the experimental group.

Light microscope : A few neurons were condensed in the 7-day experimental group, but condensed remarkably in the 3-day control group. Most glial cells were observed in the 3-day experimental group. Edema and dilatation of vessels occurred significantly in the 3-day control group, and these results occurred weakly in the 7-day experimental group.

VEGF-immunohistochemistry : VEGF-immunohistochemical reactivity for the glial cells was the highest in the 3-day experimental group, and immunoreactivity for the vessels and neurons highly increased in the 7-day experimental group.

Electron microscope : In the 3-day control group, protoplasmic astrocytes concerned with angiogenesis contained weakly developed rough endoplasmic reticulum, and a few of glial filaments were observed. In the 7-day experimental group, the bundles of glial filaments were found in the cytoplasmic process of astrocytes.

Conclusion : medication using Yukmijihwang-tang of mice contused by medical stress is highly effective in inflammatory response, curing cell damage and angiogenesis.

Key Words: Yukmijihwang-tang, VEGF-immunohistochemistry, angiogenesis.

I. 서론

두부손상은 손상부위의 신경세포 기능 및 뇌에너지 대사의 장애와 뇌혈류의 감소로 인하여 자가조절

능을 상실함으로써 뇌부종을 초래하게 되고,¹ 뇌손상도는 손상 후 혈관신생(angiogenesis), 대사장애개선, 뇌세포막 펌프작용의 회복 등에 의해 신경세포의 손상을 가역적으로 소생시켜주는 뇌혈관계 자가조절능(auto-regulation)을 어느 정도 유지하느냐에 달려있다.^{1,3}

· 접수 : 2002년 7월 10일 · 채택 : 2002년 7월 31일
· 교신저자 : 김용진, 광주 남구 월산동 377-12 동신대학교부속
한방병원 동신대학교 한의과대학 심계내과학교실
(Tel. 062-350-7282, FAX : 062-366-1882, E-mail :
riv2000@hanmail.net)

한의학에서 뇌는 腦髓의 총족여부에 따라 정신 및 신체활동의 성쇠와 관계되며, 腦髓의 기능이 실조되거나 감퇴되면 補腎水하는 六味地黃湯을 다용하였다.^{3,5,12}

六味地黃湯은 송대 『小兒藥證直決』⁵에 수록된 이래, 역대의가들이 腎陰虛, 腎精不足한 諸證에 사용해 왔으며,^{5,9} 뇌 흥분성 질환, 내분비기능실조, 자율신경실조, 고혈압, 자가면역질환, 만성염증 등의 질환을 치료한다.^{10,11}

六味地黃湯의 성장 및 노화방지, 뇌기능활성화에 대한 실험적 연구로 성장발육의 촉진, 세포면역기능 증가, 뇌기능의 활성화, 정신사고활동촉진, 뇌·고환에서의 항산화작용 등이 보고되고¹²⁻¹⁶ 있으나 뇌좌상 후 회복기전에 관한 연구는 없었다.

뇌좌상 후 회복기전 중 혈관신생은 새로운 혈관을 만들기 위한 기본적인 과정으로 생식, 발생, 상처회복 등 정상 성장 발육 과정에 있어서나, 창상과 염증 및 허혈 병소 등 병적 신체 상태에서도 필수적으로 동반되는 중요 현상이며,¹⁷⁻²⁴ 혈관신생과 관련된 여러 가지 물질 중 VEGF(vascular endothelial growth factor)는 혈관내피세포에 특이적인 유사분열촉진제로 혈관신생을 촉진하는 작용을 한다.^{25,26}

이에 저자는 六味地黃湯이 물리적 충격을 가하여 뇌좌상을 유발시킨 흰쥐에 미치는 영향을 밝히고자 뇌조직의 광학 및 전자현미경 관찰, 혈액학적인 변화와 VEGF-면역조직화학검색을 하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1) 동물

체중 250g내외의 웅성 흰쥐(Sprague dawley strain)를 다물사이언스(주)로부터 구입한 후 한의과대학 동물사육실에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약물

본 실험에 사용한 약제는 동신대학교 한방병원에서 구입한 六味地黃湯 2첩을 증류수 600ml와 함께 약탕기에 넣고 3시간 동안 전탕한 후 전탕액을 취해

고속원심분리기(Centricon T-42K, Kontron)로 원심분리(5,000rpm)하여 침전물을 제거하고 rotatory evaporator (Buchi, Netheland)를 사용하여 농축 후 동결건조하여 25.1g을 얻었다. 六味地黃湯의 구성약물은 <方藥合編>²⁷에 準하였으며, 그 내용과 분량 및 생약명²⁸은 다음과 같다.

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Rehmanniae glutinosa liboschitz var. purpurea Makino	15.00
山藥	Discoreae japonica Thunberg	7.50
山茱萸	Cornus officinalis Siebold et Zuccarini	7.50
白茯苓	Pachyma hoelen Rumphios	5.625
牡丹皮	Paeonia moutan Sims	5.625
澤瀉	Alisma orientale Juzepczuk	5.625
總計		46.875

3) 뇌좌상 유발

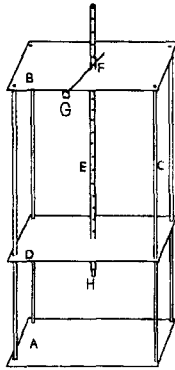
drop device는 Shapira 등²⁹의 방법에 準하여 뇌좌상을 유발하기 위하여 먼저 흰쥐를 ether로 마취시킨 후 충격을 가할 부위인 두정엽 좌측 2~3mm 부분의 두피를 절개하였으며, 스테인레스로 제작한 플랫폼[A], [B], [D]와 이를 지탱하는 bar [C]를 기본 형태로 1.6kg의 무게를 지닌 metal bar[E]에 1cm 간격으로 구멍을 뚫고 [H]부위는 실리콘으로 코팅한다. Metal bar의 실리콘 코팅 부분[H]이 매번 동일한 부위를 가격하게 하기 위해 흰쥐를 고정시킨 입체정위고정기(Narishige, Japan)를 플랫폼[A]에 부착하고 6cm 높이인 [F]부위의 고정장치[G]를 잡아당겨 metal bar[E]의 실리콘으로 코팅된 부위[H]로 동일 부위의 두개골을 가격한 후 즉시 두피 절개 부위를 봉합하고 소독하였다.<Scheme 1>

4) 약물의 투여

뇌좌상을 유발시킨 다음 대조군과 실험군은 모두 통상적인 식이를 하도록 하였고, 실험군은 추출된 약물을 1.6g/kg씩 매일 1회 구강투여하여 3일군과 7일군으로 구분하였다.

5) 체중의 측정

대조군과 실험군의 체중변화를 실험기간 동안 측정하였다.



Scheme 1 Weight-drop device was used in this study to produce closed head trauma in rat.

6) 혈액학적 변화

대조군과 실험군의 혈액학적 변화를 측정하기 위하여 ether 마취하에서 복강을 열고 좌심실의 혈액을 채취하였으며, 채취된 혈액은 EDTA-2K가 처리된 병(CBC bottle)에 옮긴 다음 Sysmax k-800 CBC assay(Sysmax Co.)를 이용하여 WBC, RBC, PLT, HCT를 측정하였다.

7) VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)의 면역조직화학적 검사

흰쥐 뇌조직의 관찰을 위해 ether 마취하에서 PBS(phosphate buffer saline (0.9% NaCl))를 관류시켜 혈액을 제거한 후 4% paraformaldehyde(0.1M PBS, pH 7.4)로 관류고정하고 뇌조직을 적출한 다음 다시 4% paraformaldehyde로 24시간 동안 재고정하였다. paraffin으로 포매한 뇌조직을 microtome을 사용하여 5 μ m 두께로 절편하고, 절편된 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 이를 Xylene에 담구어 탈파라핀하고 농도가 낮아지는 순의 ethanol로 흡수과정을 거친다.

뇌조직을 PBS에 하루 동안 배양시킨 다음 다시 15분간 PBS로 세척하고 10% horse serum을 함유한 blocking solution을 사용하여 20분간 배양시키고 다시 PBS로 15분간 세척하였다.

세척된 뇌조직을 VEGF 항체처리한 후 습도가 높은 상온의 배양접시에서 2시간 동안 배양시키고 15분간 PBS로 세척 후 biotinylated antimouse IgG 처리하여 30분간 배양시킨 후 다시 15분간 PBS로 세척

하였다.

이를 다시 avidin-biotinylated enzyme complex (ABC) reagent (Vector Lab, CA, USA)를 조직에 처리 30분간 반응시키고 다시 PBS로 15분간 세척하였다.

DAB 발색시약을 조직에 떨어뜨려 2분간 발색시킨 후 흐르는 물에 과량의 염색시약을 제거하고, 이를 50, 60, 70, 80%까지의 ethanol에 수초 동안 담구고 90, 95, 100-I, 100-II, Xylene+100% EtOH, Xylene까지는 5분씩 담구어 수분을 완전히 제거하였다.

Xylene이 마르지 않은 상태에서 Canada balsam을 한 방울 떨어뜨려 cover glass로 씌운 다음 hot plate에 고정하고 광학현미경으로 검경 후 사진 촬영하였다.

8) 전자현미경 관찰

광학현미경 관찰부위와 동일부위의 뇌조직 절편을 약 1mm 크기로 細切한 후 Sorensen's phosphate buffer(pH 7.4)로 조정된 2.5% glutaraldehyde에서 3시간 전고정하고 동일한 완충액으로 15분씩 3회 세척한 다음 동일한 완충액 내에 1% osmium tetroxide(OsO₄) 용액으로 2시간 동안 후고정하였다.

고정된 조직은 동일한 완충액으로 15분씩 3회 세척한 다음 알콜 농도가 상승하는 순서로 무수 알콜까지 탈수하여 propylene oxide로 치환한 후 Epon 포매제로 포매하였고, 포매된 조직을 35 $^{\circ}$ C에서 12시간, 45 $^{\circ}$ C에서 12시간, 60 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 중합시킨 다음 초박편기(ultramicrotome, Reichert supemova형)를 사용하여 1 μ m 두께로 절편제작 후 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰대상부위를 확인하였다.

확인한 부위를 60nm의 초박절편으로 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 100CX-II 투과형 전자현미경(80KV)으로 관찰하였다.

9) 통계처리

각 군별로 7마리의 측정값을 얻었으며, 각각의 대조군과 실험군의 값을 SAS(Statistical Analysis System) program에 의하여 평균치와 표준오차를 계산하고, t-test와 P-value가 최소한 0.05이하인 경우에 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

Ⅲ. 결 과

1) 체중의 변화

뇌좌상을 유발시킨 흰쥐에 육미지황탕을 투여한 결과 3일군에서는 대조군(17g)의 증가량보다 실험군(22g)이 높았으나, 7일군에서는 실험군(39g)보다 대조군(43g)이 높았다(Table I).

Table 1. The effect of YM on the increase of body weight in rats(unit=gram).

		Before	After	Increase
3day	CON	214	232	17
	YM	209	231	22
7day	CON	214	257	43
	YM	213	252	39

2) 혈액학적 변화

(1) 백혈구 수

육미지황탕을 3일간 투여한 실험군 3일(3.2±0.27)의 백혈구수는 대조군 3일(6.6±0.79)에 비하여 유의성 있게 감소하였고, 대조군 7일도 백혈구의 수(5.0±0.84)가 다소 감소하였지만 실험군 7일(3.6±0.62)에 비해서는 증가하였다(Table II).

Table 2. The effect of YM on the WBC in rats(unit=10³/mm³).

		CON	YM	T-test
3day		6.6±0.79	3.2±0.27	0.002
7day		5.0±0.84	3.6±0.62	0.189

(2) 적혈구 수

적혈구 용적은 모든 군에서 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Table III).

Table 3. The effect of YM on the RBC in rats.(unit=10⁶/mm³).

		CON	YM	T-test
3day		6.9±0.23	6.9±0.18	0.767
7day		6.8±0.09	7.0±0.10	0.145

(3) 적혈구 용적

대조군 3일, 실험군 3일, 대조군 7일 및 실험군 7일

에서 적혈구 수의 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table IV).

Table 4. The effect of YM on the HCT in rats(unit=%)

		CON	YM	T-test
3day		39.9±0.46	39.3±0.93	0.585
7day		39.7±0.27	39.8±0.62	0.938

(4) 혈소판 수

실험군 3일의 혈소판 수(858±80)는 대조군 3일(1,178±38)에 비해 유의하게 감소하였고, 실험군 7일(978±27)은 대조군 7일(1,011±69)에 비하여 다소 감소하였으나 유의성은 없었다(Table V).

Table 5. The effect of YM on the PLT in rats.(unit=10³/mm³).

		CON	YM	T-test
3day		1178±38	858±80	0.004
7day		1011±69	978±27	0.718

3) 뇌조직의 조직학적 및 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)의 면역조직화학적 검사

흰쥐의 좌측 측두골 부위에 물리적 충격을 가하여 뇌좌상을 유발시킨 후 3일이 경과한 대조군 3일의 좌반구 측두엽을 Hematoxylin과 Eosin으로 이중 염색(H-E염색)하여 광학현미경으로 관찰하였다. 대조군 3일의 뇌조직은 모세혈관내피세포들의 파괴와 모세혈관들의 부종현상으로 인한 팽창, 피질 부위 신경핵들의 응축이 관찰되었다(Fig. 1 & 1a). 실험군 3일은 모세혈관내피세포들의 회복, 모세혈관들의 부종현상으로 인한 팽창과 함께 신경핵들의 핵막과 핵소체 발달, 아교세포들(glia cells)의 연결막(pia mater) 부근 피질부에서의 현저한 증가가 관찰되었다. (Fig. 3 & 3a).

대조군 7일은 모세혈관내피세포들의 파괴양상은 존재하나 모세혈관들의 부종현상이 대조군 3일에 비하여 감소되었고, 신경핵들의 등근 핵막과 아교세포들의 증가가 관찰되었다(Fig. 5). 실험군 7일은 정상에 근접한 신경핵들의 발달과 대조군 7일이나 실험

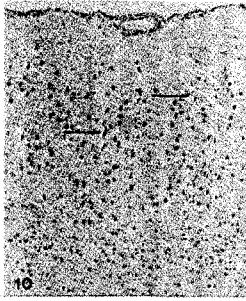


Fig. 1 Light micrograph of 3 days control group. The peripheral region of the blood vessels are dilated and nuclei of neurons are condensed. Arrow indicates dilated blood vessel. H-E stain. Fig. 1, $\times 100$; Fig. 1a, $\times 200$.

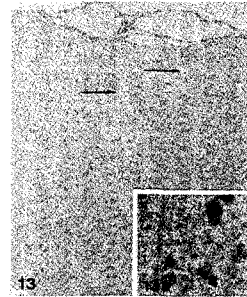


Fig. 4 Light micrograph of 3 days experimental group. A number of VEGF-immunoreactive glial cells are observed in the cortical region (upper two arrows). A arrow of lower portion indicates same blood vessel as fig. 3. VEGF-immunostain. $\times 100$.

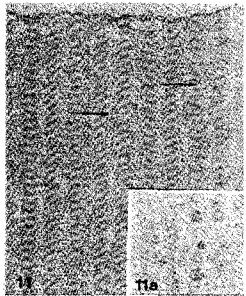


Fig. 2 Light micrograph of 3 days control group. Arrow indicates same blood vessel as fig. 1. VEGF-immunostain. $\times 100$.

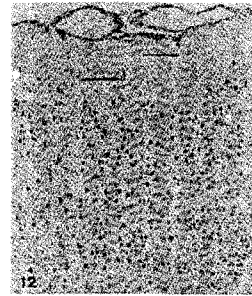


Fig. 3 Light micrograph of 3 days experimental group. The peripheral region of the blood vessels are dilated. Arrow indicates dilated blood vessel. H-E stain. Fig. 3, $\times 100$; Fig. 3a, $\times 200$.

군 3일에 비하여 경미한 모세혈관들의 부종현상이 관찰되었으며, 특히 연질막에서부터 성장해 나온 모세혈관들을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

VEGF-면역조직화학염색을 한 대조군 3일의 VEGF-면역반응성은 연질막에서는 높게 관찰되었으나 모세혈관, 아교세포 및 신경세포에서는 아주 미약하였다(Fig. 2). 실험군 3일은 연질막, 연질막내의 혈관 및 혈관내피세포에서 대조군 3일에 비하여 높게 관찰되었으며, 특히 연질막 부근 피질부의 아교세포에서는 현저했지만 연질막 안쪽의 피질 부위에서는 대조군 3일과 유사하였다(Fig. 4).

대조군 7일의 VEGF-면역반응성도 연질막, 연질막내의 혈관 및 혈관내피세포에서 높게 관찰되었으나, 뇌실질 조직내의 모세혈관, 아교세포 및 신경세포에

서는 아주 미약하여 실험군 3일과 유사하였다(Fig. 6 & 6a). 실험군 7일도 또한 연질막, 연질막내의 혈관 및 혈관내피세포들에서 비교적 높게 관찰되었으나, 다른점은 연질막내의 혈관에서 뿜어 나온 것으로 보이는 모세혈관과 다수의 모세혈관들의 열기에서 대조군과 실험군 3일에 비하여 높은 VEGF-면역반응성을 보여주었다(Fig. 8, Fig. 8a).

4) 전자현미경 관찰

대조군 3일의 혈관내피세포는 일부가 손상된 원형질별아교세포(protooplasmic astrocytes)의 세포질돌기, 손상된 부위의 유수신경다발과 소포 형태의 물질 및 혈관의 바닥막(basal lamina)안의 과립형백혈구와 인접한 곳에 존재하는 전자밀도가 높은 물질들이 관찰되었으며, 세포질소기관인 과립세포질세망(rough

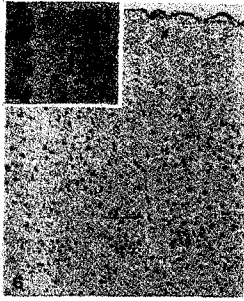


Fig. 5 Light micrograph of 7 days control group. The peripheral region of the blood vessels are dilated(two arrows) and a number of nuclei of neurons are condensed. H-E stain. ×100

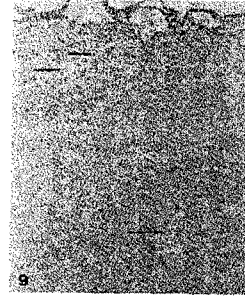


Fig. 8 Light micrograph of 7 days experimental group. A number of VEGF-immunoreactive glial cells and neurons(8a) are observed. Regenerating blood vessel show immunoreaction for VEGF(upper arrow). Fig. 8, ×100; Fig. 8a, ×400.

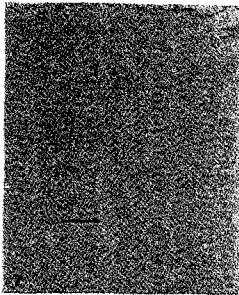


Fig. 6 Light micrograph of 7 days control group. Arrow indicates same blood vessel as fig. 5. VEGF-immunostain. The VEGF-immunoreactive nuclei of neurons and blood vessels are faintly observed. ×100. 6a, ×400.



Fig. 9 Electron micrograph of 3 days control group. A granulocyte is observed in the peripheral region of blood vessel. Destructed astrocyte is observed in the lower portion. G, granule; N, nucleus. ×20,000.

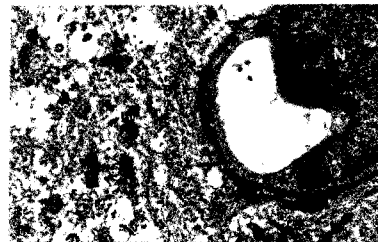


Fig. 10 Electron micrograph of 3 days experimental group. The capillary enveloped by astrocytic processes which more or less destructed is observed. BL, basal lamina; M, mitochondria; N, nucleus of endothelial cell. ×20,000.

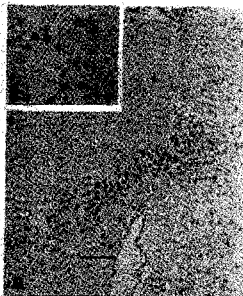


Fig. 7 Light micrograph of 7 days experimental group. The peripheral region of the blood vessels are dilated(lower arrow). Regenerating blood vessel from pia mater vessel is observed(upper arrow). H-E stain. ×100

endoplasmic reticulum)과 신경아교세포섬유(glial filament)의 발달은 미약하였다(Fig. 9).

실험군 3일은 초승달 모양의 혈관내피세포핵, 혈관

내피를 구성하는 얇은 상피세포층, 바깥쪽의 전자밀도가 높은 바닥막 및 전자밀도가 낮은 세포질들이 관찰되었으며, 대조군 3일에 비하여 발달한 사립체와 신경아교미세섬유 및 혈관과 인접한 신경다발막(perineurium)의 일부분이 손상되어 팽창된 양상이 관찰되었다(Fig. 10).

대조군 7일은 발달된 혈관내피세포의 핵질, 바닥막과 인접한 과립세포질세망 및 드물게 나타나는 신경아교미세섬유가 관찰되었고(Fig. 11), 원형질별아교세포의 둥근 핵막, 전자밀도가 낮은 핵질과 세포질, 및 전자밀도가 높은 일부의 세포질이 관찰되었다(Fig. 13).

실험군 7일은 콩팥 모양의 혈관내피세포핵, 전자밀도가 대조군 7일에 비하여 높은 핵질과 세포질 및 혈관주위의 원형질별아교세포와 혈관의 내막과 인접한 신경아교미세섬유 다발, 세포질 전반의 용해소체가



Fig. 11 Electron micrograph of 7 days control group. A capillary is enveloped by astrocytic processes. N, nucleus of endothelial cell; rER, rough endoplasmic reticulum. × 20,000.

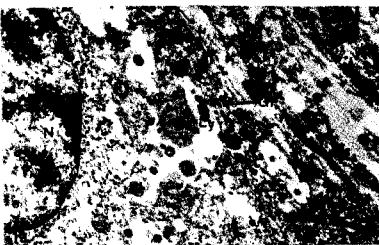


Fig. 12 Electron micrograph of 7 days experimental group. A bundle of glial filaments(GF) are observed perivascular cytoplasm of astrocyte. BL, basal lamina; Ly, lysosome; N, nucleus of endothelial cell. × 20,000.

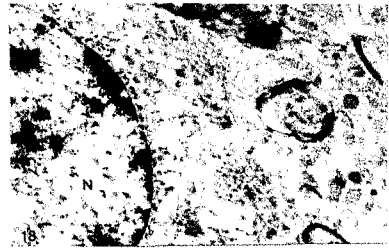


Fig. 13 Electron micrograph of astrocyte from 7 days control group. A lot of electron-dense material are observed(asterisk). N, nucleus. × 20,000.



Fig. 14 Electron micrograph of astrocyte from 7 days experimental group. A number of lysosomes(Ly) and glial filaments(GF) are observed. × 20,000.

관찰되었고(Fig. 12), 대조군 7일에 비하여 등글고 전자밀도가 높은 원형질별아교세포의 핵과 핵질 및 다수의 용해소체와 신경아교미세섬유 다발이 관찰되었다(Fig. 14).

Ⅳ. 고 찰

한의학에서 뇌의 병리는 《靈樞·海論篇》³⁰에서 “髓海有餘 輕徑多力……髓海不足 腦轉耳鳴 脛痠眩冒……”라고 하여 腦髓의 충족여부에 따라 정신 및 신체활동의 성쇠가 관계된다고 하였으며, 腦髓의 기능이 실조되거나 감퇴되면 두통, 현훈, 이명, 실명, 건망, 지능저하, 치매 등의 임상증상이 나타나고 六味地黃湯을 대표적으로 사용한다.³⁸⁻⁴¹

六味地黃湯^{5,9}은 肝腎不足, 眞陰虧損, 精血枯涸, 憔悴羸弱, 腰痛足痠, 發熱作渴, 小便淋閉, 氣壅痰嗽, 頭目眩暈, 健忘, 失眠, 記憶力減退, 不眠, 眼花耳聾, 咽燥舌痛, 齒牙不固 등 선천 원기부족 또는 腎氣虛乏, 陰

虛陽旺으로 발생하는 諸證을 치료하기 위하여 사용 되는 처방으로 張³¹은 『金匱要略』³¹에서 “虛勞腰痛, 少腹拘急, 小便不利者, 八味地黃丸主之”라 하였으나 錢⁵이 『小兒藥證直訣』⁵에서 桂枝와 附子를 除하고 湯으로 명칭을 바꿔 “治肝腎陰虛, 腰膝痠軟, 頭暈眼花, 耳鳴耳聾, 盜汗遺精, 或骨蒸潮熱, 或足心熱, 或消渴, 或虛火牙痛, 舌燥咽痛, 舌紅少苔, 脈細數”이라고 최초로 수록하였고, 그 이후에 六味地黃丸,^{6,23,32} 六味地黃元,^{8,32} 六味丸⁵ 등으로 불리어졌으나 현재는 六味地黃湯으로 주로 사용되고 있다.

구성 약물중 熟地黃은 味甘, 性微溫으로 滋陰·補腎·生精, 益髓鎮精하고, 山藥은 味甘, 性平으로 補脾固腎·長肌肉하고, 山茱萸는 味甘酸, 性溫으로 補肝腎之精 滋精秘氣하며, 牡丹皮는 味辛苦, 性微寒으로 活血行瘀·消炎清熱하고, 白茯苓은 味甘淡, 性平으로 利水滲濕하며, 澤瀉는 味甘性寒으로 利水滲濕 泄腎經之火한다.^{9,28,33}

방제학적 측면에서는 熟地黃, 山茱萸, 山藥이 補腎陰, 補肝腎, 補脾胃하고, 澤瀉, 牡丹皮, 茯苓은 滲腎濕, 瀉肝火, 滲脾濕하여 補와 瀉를 겸하는 작용을 한다.³³

六味地黃湯의 성장 및 노화방지, 기능활성화에 대한 실험적 연구로 鄭¹⁴은 혈장 Renin 활성도 및 혈장 Aldosterone 농도에 미치는 영향을, 金³⁴은 혈압에 대한 효과를, 金³⁵은 혈당에 대한 효과를, 金³⁶은 성장 및 혈청 총 cholesterol 함량에 미치는 영향을, 李³⁵는 성장발육의 촉진, 뇌기능의 활성화, 세포면역기능증가를, 姜¹⁶은 六味地黃湯이 뇌, 간장, 신장 및 고환에서, 특히 뇌와 고환에서 유의성있는 항산화효과를 나타내어 뇌와 신의 기능을 강화한다고 보고하였으나 뇌좌상 후 회복기전에 관한 연구는 없었다.

두부손상 즉 뇌실질 및 혈관의 손상으로 인하여 자가조절능이 파괴되면 모세혈관의 투과율이 증가되고 내피세포 접합부(tight junction)가 손상되어 수분과 교질이 세포의 공간으로 들어가서 뇌부종을 일으키고 결과적으로 혈장교질삼투압이 감소하게 되며, 뇌조직으로부터 acetylcholine이나 monoamine 등이 유리되므로서 혈관운동신경기능에 영향을 주거나 혈관내압상승으로 혈관내막을 손상시켜 뇌부종을 더욱

조장한다. 다른 한편으로는 뇌좌상시 심폐중추의 장애로 저산소성 뇌좌상을 초래하여 뇌부종을 일으킬 수도 있다.¹⁴ 따라서 뇌좌상 후 혈관신생, 대사장애 개선, 뇌세포막 펌프작용의 회복 등으로 뇌혈관계 자가조절능을 회복시켜 뇌부종을 치료할 수 있다.^{1,3}

혈관형성은 식물의 성장 과정과 유사한 형태를 보이고 있으며, 인체의 성장과 분화에는 반드시 혈관을 필요로 하는데, 이러한 혈관형성은 태아의 발생과정에서 기초적으로 생성되는 혈관생성과 병리생리학적인 상태에서 혈관이 새롭게 생성되는 혈관신생으로 크게 구분한다.^{17,18}

즉 혈관신생은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 것을 의미하는데 정상적인 성장과정 뿐만 아니라 병리학적인 상태에서도 발생된다. 胚 발생, 자궁내막 재생 및 상처 치유 등과 같은 생리적 조건하에서 혈관신생은 일시적인 현상으로 발생되지만 각종 질병과 연관된 혈관신생은 빠른 속도로 진행될 뿐만 아니라 지속적으로 야기된다. 성인에 있어서 류마티스성 관절염, 당뇨병성망막증, 동맥경화증, 건선, 및 암 등과 같은 질병의 악화에 혈관신생은 매우 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다.^{17,32}

혈관신생과 관련된 인자로 VEGF(vascular endothelial growth factor), acidic and basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor 등의 혈관신생과 관련된 신호체계를 가지고 있는 혈관신생유발인자와 interferon- α , angiostatin, endostatin 등의 주로 내피세포의 이동과 증식을 차단하고 혈관내피의 증식을 억제하여 혈관생성을 차단하는 혈관억제인자가 보고되고 있는데,^{36,37} 이중 대표적인 혈관신생인자로 알려진 VEGF는 정상세포와 형질전환된 세포에서 합성되는, 내피세포에 특이적인 유사분열촉진제로서 내피세포의 증식과 이동, 세포 외 기질의 재형성, 모세혈관의 형성과 같은 혈관신생을 일으키는데 관여함으로써 심혈관계의 발생, 정상혈관계의 생리적 현상^{17,22} 및 뇌좌상부위의 혈관신생에 관여하여 자가조절능과 뇌신경세포를 유지 보호한다.^{1,3,25,38}

이에 본 실험에서는 뇌부종 치료에 있어 六味地黃湯이 뇌혈관신생을 통하여 자가조절능 회복에 미치

는 영향을 관찰하기 위해 뇌좌상이 유발된 흰쥐에게 六味地黃湯을 매일 1회 구강투여한 실험군 3일, 실험군 7일과 투여하지 않은 대조군 3일, 7일로 구분하여 흰쥐의 혈액학적 변화, H-E 염색, VEGF의 면역조직화학적 염색, 전자현미경관찰을 비교하였으며, 특히 뇌혈관신생인자인 VEGF의 양을 실험적으로 검증하기 위한 VEGF-면역조직화학적 염색에 중점을 두어 실험을 실시하였다.

육미지황탕을 3일간 투여한 실험군 3일(3.2 ± 0.27)과 실험군 7일(3.6 ± 0.62)의 백혈구 수는 대조군 3일(6.6 ± 0.79)과 대조군 7일(5.0 ± 0.84)에 비하여 유의성 있는 감소를 보이는 것은 六味地黃湯이 뇌좌상 후 발생한 염증회복에 효과가 있음을 간접적으로 시사하는 것으로 판단된다.

이에 실험적으로 뇌조직 회복과정에서 분비되는 VEGF의 양을 검증하기 위해 동일한 부위를 H-E 염색 및 VEGF-면역조직화학적 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

H-E 염색을 한 결과 대조군에 비해 실험군에서 모세혈관내피세포의 파괴와 모세혈관의 부종이 회복되고, 신경핵과 아교세포가 정상에 근접하는 양상을 보이는 것으로 보아 六味地黃湯이 뇌좌상 후 회복에 관여하는 것으로 판단되며 신경아교세포의 하나인 원형질별아교세포는 세포돌기들이 많은 가지를 내면서 끝부분으로 혈관돌기를 만들어 혈관과 뇌를 덮고 있는 연질막에 부착하기 때문에³⁹ 신경아교세포들의 연질막 부근에서의 현저한 증가가 관찰되는 것으로 생각되며 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되기 때문에^{17,25} 연질막의 혈관에서 성장해온 모세혈관들을 관찰할 수 있었던 것으로 생각된다.

VEGF-면역조직화학적 염색을 한 결과 대조군에 비해 실험군에서 연질막, 연질막내의 혈관 및 혈관내피세포의 VEGF-면역반응성이 높게 관찰된 것은 六味地黃湯이 내피세포의 이동을 용이하게 하기 위한 모혈관의 기저막단백 분해와 모세혈관의 발아, 혈관신생 자극원을 향한 내피세포의 이동, 이동세포 바로 다음 부위의 내피세포의 증식, 내피세포의 성숙과 모세혈관으로 분화라는 연속된 4단계의 혈관신생을 유

발하는 것^{17,18,25}을 보여주는 것으로 사료되며, 연질막내의 혈관에서 뻗어 나온 것으로 보이는 모세혈관과 다수의 모세혈관들의 열기에서 높은 VEGF-면역반응성을 보여주는 것 또한 六味地黃湯이 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 것을 유도하기 때문에^{17,25} 연질막의 혈관에서 성장해온 모세혈관들을 관찰할 수 있었던 것으로 사료된다.

세포는 세포질에 따라 구조가 유지되며, 기능을 나타내게 되는데, 세포질소기관으로는 에너지를 공급하는 화학반응이 일어나는 미토콘드리아, 단백질의 합성, 변형, 수송 등의 역할을 하는 과립세포질세망, 세포내의 물질 운반을 담당하는 사립체, 필요 없어진 단백질이나 유해한 단백질 등을 분해 처리하는 용해소체(lysosome) 등이 있다.⁴⁰ 미소부위의 관찰을 위하여 광학현미경과 동일한 부위를 전자현미경으로 관찰한 결과 세포질소기관들이 대조군에 비하여 실험군에서 잘 관찰된다는 것은 六味地黃湯이 세포의 구조와 기능을 회복시키는 효과가 있다고 생각되며, 중추신경계의 신경세포는 현재 재생가능성에 대한 연구가 진행되고 있지만 일반적으로 일단 손상을 받으면 분열하지 않으므로 재생되지 않는 것으로 알려져 있으나 신경아교세포 중 하나인 원형질별아교세포와 신경아교미세섬유는 분열하여 증식할 수 있고 신경세포의 지지구조를 이루며 수초 형성과 탐식 작용을 하고 주위환경과 활발한 물질대사의 수단을 제공하므로³⁹ 대조군보다 실험군에서 원형질별아교세포가 발달하고 신경아교미세섬유가 증가하는 것은 六味地黃湯이 신경세포를 보호 유지할 수 있다는 것을 보여주는 것으로 思料된다.

이상의 결과로 보아 六味地黃湯은 뇌좌상이 유발된 흰쥐의 뇌내 염증 감퇴, 혈관신생, 세포의 구조와 기능 회복 및 신경세포의 보호에 유효한 것으로 사료되나 六味地黃湯이 혈관신생에 관여하는 VEGF에 어떻게 영향을 미치는지에 관해서는 분자생물학 및 생화학적인 연구가 지속되어야 한다고 본다.

V. 결 론

六味地黃湯이 물리적 충격을 가하여 뇌좌상을 유발시킨 흰쥐에 미치는 영향을 밝히고자 뇌조직의 광학 및 전자현미경 관찰, 혈액학적인 변화와 VEGF-면역조직화학검색을 하였다.

혈액학적인 변화 : 백혈구의 수는 대조군이 실험군에 비하여 유의성있게 증가하였으나, 적혈구, 적혈구 용적과 혈소판의 수는 모든 대조군과 실험군 사이에 유의성 있는 변화가 없었다.

광학현미경적 관찰 : 신경세포는 대조군 3일에서 핵의 응축이 현저하였으나 실험군 7일에서는 응축된 핵이 소수 관찰되었다. 아교세포는 실험군 3일에서 실험군 7일이나 대조군에 비하여 가장 많이 나타났다. 부종과 혈관의 팽창은 대조군 3일에서 가장 현저하였으며, 실험군 7일에서 가장 미약하였다.

VEGF-면역조직화학적 검색 : 아교세포의 VEGF-면역반응성은 실험군 3일에서 가장 높았으며, 혈관과 신경세포의 VEGF-면역반응성은 실험군 7일에서 가장 높게 나타났다.

전자현미경 관찰 : 대조군 3일에서 혈관형성에 관여하는 원형질별아교세포는 과립세포질세망(rough endoplasmic reticulum)의 발달이 미약하고 신경아교미세섬유(glial filament)가 소수 관찰되었으나, 실험군 7일에서는 신경아교미세섬유의 다발이 혈관주변에 발달해 있었다.

이상의 결과로 보아 육미지황탕은 뇌좌상이 유발된 흰쥐의 염증반응과 혈관신생에 유효한 결과를 보여준 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 홍상수 등. 경도 두부외상 환자에서 뇌좌상주위 부종영역에서의 자기공명분광법을 이용한 대사변화. 대한신경외과학회지 2000;29(9):1233-1237.
2. 박종태. 두부손상에 따른 뇌의 이차적 변화. 中央醫學 1997;437:655-660.

3. 成疆慶. 腦의 機能에 對한 臟象論的 考察. 大韓韓醫學會誌 1995;16(1):468-474.
4. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울:중앙문화사;1989,157-158.
5. 錢乙. 小兒藥證直決. 江蘇:江蘇科學技術出版社;1983,47-48.
6. 汪訥庵. 醫方集解. 서울:綜合醫苑社;1976,1-2,4.
7. 武之望. 濟陰綱目. 서울:柳林社;1975,133.
8. 許俊. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社;1981,364-369.
9. 申佶求. 申氏本草學(各論). 서울:壽文社;1973,16-29,77-9,92-5,101-6,110-2,357,367,694.
10. 董黎明. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社;1986,463.
11. 王宇, 矢禾. 中醫腎臟病學. 河南:河南科學技術出版社;1990,60.
12. 李英九 등. 六味地黃湯이 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響. 大韓韓方內科學會誌 1997;18(2):94-110.
13. 金宇炫, 申政圭, 金完熙. 六味地黃湯投與가 rat의 成長 및 血清總 cholesterol 含量에 미치는 影響. 慶熙大學校 韓醫科大學 論文集 1978:111-115.
14. 鄭銀鄉, 柳道坤, 李昊燮. 六味地黃湯 煎湯液 投與가 白鼠의 血漿 Renin 活性度, 血漿 Aldosterone 및 Atrial Natriuretic Peptide 濃度에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌 1997;10:267-272.
15. 李進容. 六味地黃丸의 小兒疾患治療에 對한 文獻的 考察. 大韓韓方小兒科學會誌 1990;4(1):51-64.
16. 姜政秀. 六味地黃湯의 抗酸化作用에 關한 研究. 大田大學校大學院. 2000.
17. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem 1992;267:10931-10934.
18. Risau W, Flamme I. Mechanism of angiogenesis. Nature 1997;386:671-674.
19. Hu DE, Fan TD. Suppression of VEGF-induced angiogenesis by the protein tyrosine kinase inhibitor lavendustin A. Br J Pharmacol 1995(a);114:262-268.
20. Kimura M, Kobayashi S, Luo B, Kimura I. Selective inhibition by magneshinin, compounds from "shin-i"

- (*Flos magnoliae*), of adjuvant-induced angiogenesis and granuloma formation in the mouse pouch. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;93:365-370.
21. Yukiko M, Yutaka N. Angiotensin II blocks ATP-sensitive K⁺ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1991;181:700-706.
 22. Paul RC, Chandan AA, Ian Appleton, Joanne RB, Michael PS, Derek AW. The Pharmacological Modulation of Angiogenesis in Chronic Granulomatous Inflammation. *J Pharmacol Exp Thera* 1995;274:1463-1472.
 23. 전원경 등. 한약제의 신생혈관생성 억제 활성화에 관한 연구. *한국한의학회지* 1998;4(1):129-138.
 24. 정연웅 등. 혈관신생에 영향을 미치는 약제에 관한 연구. *대한암학회지* 1990;22(2):267-273.
 25. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사; 1998, 89-90,222.
 26. 임병국 등. 폐암 및 결핵성 흉막염에서 VEGF의 임상적 의의. *결핵 및 호흡기질환* 2001;50(2):171-181.
 27. 黃度淵. 證脈方藥合編. 서울:南山堂;1977,166.
 28. 辛民教. 臨床本草學. 서울:永林社;1986,185, 248,274,385,649,657.
 29. Sukriti Nag, Jennifer L. Takahashi, Daniel WK. Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Blood Brain Barrier Breakdown and Angiogenesis in Brain Trauma. *Journal of Neurophatology and Experimental Neurology* 1997;56(8):912-921.
 30. 楊維傑 編. 黃帝內經譯解(靈樞). 서울:成輔社;1980,84-89.
 31. 張仲景. 金匱要略方論. 台北:台聯國風出版社;1973,34-35.
 32. 陳士澤. 石室秘錄. 서울:大星文化社;1993,148-149.
 33. 游士勳. 實用中醫方劑學. 臺北:樂群出版社;1983,112-114,397-400.
 34. 金雨植, 李東熙. 六味地黃湯 煎湯液이 家兔血壓 및 白鼠肝 TBA식에 미치는 影響에 關한 研究. 慶熙大學校 論文集 1979;2:145-152.
 35. 金聖泰, 曹東鉉, 杜鎬京. 加味地黃湯이 Streptozotocin 投與 白鼠 血糖量에 미치는 影響. 慶熙大學校論文集 1992;15:397.
 36. Weidong-Richard JI. et al. Charactererization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *FASEB* 1998;1731-1738.
 37. Lynn AC. et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin : Effects on neovascularization. *J Immunol* 1998;6845-6852.
 38. Kun LJ, Xiao OM, David AG. Vascular endothelial growth factor: Direct neuroprotective effect in vitro ischemia. *PNAS* 2000;97:102427.
 39. 김종만. 신경해부생리학. 서울: 도서출판 정담;2000,16-24.
 40. 김상호 등. 일반병리학. 서울:고문사;1995,5-7.