

노령 흰쥐의 뇌허혈 손상시 凉膈散火湯이 뇌해마의 c-Fos 및 c-Jun 발현에 미치는 영향

김성준, 신정원*, 손영주*, 정혁상, 원란*, 손낙원*

경희대학교 한의과대학 해부학교실, 경희대학교 동서의학대학원 신경과학교실*

Effect of *Yanggyuksanhwa-tang* on c-Fos and c-Jun Expression in Ischemic Damaged Hippocampus of Aged BCAO Rats

Seung-Jun Kim, Jung-Won Shin*, Youngjoo Sohn*, Hyuk-Sang Jung, Ran Won*, Nak-Won Sohn*

Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Department of Neuroscience, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University*

This study investigated the effect of *Yanggyuksanhwa-tang* on cerebral ischemia of the rats. Considering age-related impact on cerebral ischemia, aged rats (18 months old) were used for this study. Ischemic damage was induced by the transient occlusion of bilateral common carotid arteries (BCAO) under the hypotension. *Yanggyuksanhwa-tang* was administered twice orally. Then changes of immunohistochemical expression of c-fos and c-jun in ischemic damaged hippocampus were observed.

The BCAO in aged rats led significant increase of c-fos expression in CA1 and DG of hippocampus. While the treatment of *Yanggyuksanhwa-tang* significantly attenuated the increase of c-fos expression in CA1 hippocampus following BCAO ischemia. Depending on changes of the normalized optical density (NOD) of immunohistochemical c-fos expression, the treatment of *Yanggyuksanhwa-tang* significantly attenuated the increase of NOD in CA1 and DG of hippocampus. And there was not changes in CA2 and CA3 hippocampus with respect to the control BCAO group. The BCAO in aged rats led significant increase of c-jun expression in CA1 hippocampus. While the treatment of *Yanggyuksanhwa-tang* significantly attenuated the increase of c-jun expression in CA1 hippocampus following BCAO ischemia. Depending on changes of the NOD of immunohistochemical c-jun expression, the treatment of *Yanggyuksanhwa-tang* significantly attenuated the increase of NOD in CA1 hippocampus. And there was not changes in CA2, CA3 and DG of hippocampus with respect to the control BCAO group.

Key Words: Aging, Ischemia, c-Fos, c-Jun, *Yanggyuksanhwa-tang*, rat

1. 緒 論

신경손상 보호효능의 효과적인 치료약물 개발에 있어서 어려운 점 중 하나가 뇌경색의 임상증상과 유사하고 약물효능을 정확히 예측할 수 있는 신뢰성 있는 실험동물모형이 없다는 것이다^{1,2}. 실제 뇌졸중 환자에 있어서는 뇌혈류 상태와 뇌경색 크기, 뇌의

· 접수 : 2003년 4월 17일 · 채택 : 2003년 6월 16일
· 교신저자 : 손낙원, 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1번지 경희대학교 동서의학대학원 신경과학교실
(Tel: 031-201-2747 Fax: 031-204-8119, E-mail: sohnw@khu.ac.kr)
· 본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(01-PJ9-PG1-01CO03-0003)과 BK 21 사업에 의해 지원되었음.

구조적 상태와 뇌경색 발생의 위치 등에 따라 그 상관관계가 매우 가변적이며 임상증상이 다양하게 나타나는 것에 비하여 뇌허혈의 실험동물 모형에서는 일정한 손상 유발을 나타낼 뿐이다³. 또한 뇌졸중 발생의 중요한 원인요소 중 하나가 노령이다^{4,5}. 뇌허혈에 있어서 노령이 중요한 원인요소이지만 이러한 점을 감안하여 동물실험이 이루어지는 경우가 드물고 거의 대부분 건강하고 젊은 실험동물을 사용하고 있다⁶.

이러한 면에서 본 연구는 실제 중풍의 발병 연령이 노령인 점을 감안하여 실험동물을 출생 후 18개월된 노령 흰쥐를 사용하여 실험적 개선을 시도하였다. 본 실험에 사용한 한약물은 중풍에 대한 임상 통계 연구에서 가장 빈번히 사용되는 처방 중 하나로 보고되어 있으며, 清熱涼血, 瀉火解毒, 除煩解鬱, 祛風解表, 勝濕解痙하는 효능이 있고, 清熱, 解鬱, 祛風하는 작용이 있는 凉膈散火湯을 선정하였다^{7,8}.

전체적 또는 국소적 모든 뇌허혈은 즉시적으로 뇌조직에서 생화학적인 변화를 야기시키며, 뇌허혈이 유발된 후 수분 이내에 gene들의 발현 증가가 나타난다. 이러한 매우 빠른 반응을 나타내는 유전자들을 IEGs의 범주로 구분한다⁹. 뇌허혈에 가장 민감한 것으로 알려진 DG, CA1, CA3의 추체신경세포, neo-cortex, 소뇌의 Purkinje cells 등에서 c-fos와 c-jun 등의 mRNA 발현이 크게 증가하는 것이 보고되어 있다¹⁰. 이에 저자는 노령 흰쥐에 저혈압을 유도한 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법으로 뇌허혈 손상을 유발하고, 凉膈散火湯을 경구투여한 다음 뇌허혈 손상 이전에 관련된 IEGs 중 c-fos 및 c-jun 발현의 변화를 관찰한바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 18개월 (750~900g)의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 (21~23℃), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에

서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물의 조제 및 투여

본 실험에 사용한 凉膈散火湯은 東醫壽世保元⁸에 기재된 것으로 그 처방 내용은 아래와 같다. 일반적인 물추출 엑기스 제조방법에 의하여 1첩 당 17.3g의 엑기스를 얻었다. 약물은 뇌허혈 유발 2시간 및 6시간 후에, 총 2회 경구투여 하였으며, 1회 투여량은 5.8 mg/100g으로 하였다.(Table 1)

3. 실험군의 구분

실험군은 뇌허혈을 유발하기 위하여 시행된 수술과정 중 저혈압 유발과 총경동맥의 폐쇄만을 제외하고 모든 수술과정을 시행한 실험군을 sham군 (Sham)으로 하고, 저혈압 상태에서 뇌허혈을 유발한 실험군을 대조군 (Control), 저혈압 상태에서 뇌허혈을 유발하고 凉膈散火湯을 경구투여한 실험군을 凉膈散火湯군 (Sample)으로 구분하였으며, 각 실험군은 18개월령의 흰쥐 6마리씩으로 구성하였다.

4. 뇌허혈 손상 유발

뇌허혈은 Chan 등¹¹의 방법에 따라 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 transient global ischemia (TGI) 방법을 적용하였다. TGI 방법을 간단히 설명하면, 마취는 70% N₂O와 30% O₂의 혼합 가스에 5% isoflurane으로 마취를 시작하여 수술 도중에는 1.5~2%의 농도로 마취를 유지하였다. 체온은

Table 1. Prescription of Yanggyuksanhwa-tang

韓藥名	生藥名	重量
生地黃	Rehmanniae Radix Preparat	8.0 g
忍冬藤	Lonicerae Caulis	8.0 g
連翹	Forsythiae Fructus	8.0 g
山梔子	Gardeniae Fructus	4.0 g
薄荷	Menthae Herba	4.0 g
知母	Anemarrhenae Rhizoma	4.0 g
石膏	Gypsum Fibrosum	4.0 g
防風	Ledebouriellae Radix	4.0 g
荊芥	Schizonepetae Herba	4.0 g
總量		48.0 g

feedback-regulated heating pad로 수술 전과정 동안 $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 조절하였다. 양측 서혜부의 대퇴동맥을 노출시킨 후 PE-50 polyethylene catheter를 장착시키고, 한쪽에는 phygiograph를 연결하여 동맥혈압을 수술 전과정 동안 지속적으로 기록하고, 다른 한쪽은 blood gas 측정 및 저혈압 유발을 위한 혈액채취에 사용하였다. 이후 전경부에서 양측 총경동맥을 노출시킨 후 PE-30 polyethylene tube로 만든 폐쇄용 고리를 장착하였다. 총경동맥 폐쇄를 위한 준비수술이 끝난 후 약 5분간의 안정기를 주었다. 저혈압의 유도는 Chan 등¹¹의 방법과 Sugawara 등¹²의 연구결과에 근거하여 평균동맥혈압이 40mmHg가 유지되도록 한쪽 대퇴동맥으로부터 빠르게 혈액을 제거하였다. 저혈압이 유발된 즉시 전경부의 폐쇄고리를 당기고 metal clip으로 양측 총경동맥을 폐쇄하여 뇌허혈을 유발시켰다. 뇌허혈 유발 8분 후에 양측 총경동맥을 폐쇄한 metal clip을 제거하여 혈행을 재개통하고, 대퇴동맥을 통하여 혈액을 재주입하여 혈압을 정상으로 회복시켰다. 이후 상처부위를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다.(Fig. 1)

5. 뇌조직의 처리

TGI 유발 24시간 후 각각의 실험동물을 sodium pentobarbital의 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다.

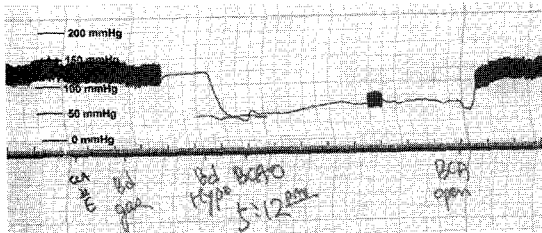


Fig. 1. A physiograph chart recorded the mean arterial blood pressure (MABP) from the femoral artery. The MABP was decreased to ~40 mmHg. Bilateral common carotid artery occlusion was maintained for 8 min. Then the blood flow was reperused, and the MABP was restored.

이후 뇌를 두개골로부터 제거한 다음 24시간 정도 post-fixation 하고, sucrose 용액에 넣어 침전시켰다. 다음 -40°C 의 dry ice-isophentan에서 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80°C 에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50 μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

6. c-fos 및 c-jun 면역조직화학염색

선택한 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10분~15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain)과 bovine serum albumin (Sigma)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어낸 후, primary antibody를 처리하였다. c-fos 및 c-jun antibody (mouse monoclonal IgG, Oncogene Science)는 1:200의 희석배율로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후, 4 $^\circ\text{C}$ 에서 overnight으로 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)으로 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl₂ · H₂O (Sigma)를 섞은 diaminobenzidine-tetrachloride (Sigma)에서 5~10분간 발색 반응 시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2~3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

7. 뇌해마 각 구역의 c-fos 및 c-jun 발현 표준광농도의 측정

뇌해마의 CA1, CA2, CA3 및 DG구역의 c-fos 및 c-jun 발현에 따른 표준광농도 (normalized optical density, NOD)의 측정은 CCD 카메라와 영상분석시스템이 부착된 광학현미경과 NIH Image software를 사용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, c-fos 및 c-jun 발현이 면역조직화학적으로 염색된 뇌해마 조직의 각 부위를 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고, 뇌해마의 기준구역, CA1 하부의 뇌해마 실질조직, 과 측정하고자 하는 구역의 광농도 (optical density)를 256등급의 grey level에 따라 측정하고, 측

정구역의 측정값을 기준구역의 측정값에 대하여 표준화하는 방법으로 NOD를 계산하였다.

III. 實驗成績

1. 뇌해마 c-fos 발현의 변화

뇌허혈을 유발하지 않은 Sham군에서는 c-fos의 발현이 관찰되지 않거나 일부 실험동물에서 뇌해마 CA1 부위와 DG 부위에서 미약하게 발현된 것이 관찰되었다. 정상상태에서는 발현되지 않는 것이 일반적이나 미약하게 발현된 실험동물은 아마도 수술 등의 스트레스에 의한 것으로 추정된다. 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 뇌해마 전영역에서 c-fos의 발현이 현저히 증가하였으며, 특히 CA1 부위와 DG 부위에서 증가가 확실하게 관찰되었다. 凉膈散火湯을 투여한 군에서는 c-fos의 발현이 대조군에 비하여 감소하였고, CA1 부위에서 가장 확실하게 감소한 것으로 관찰되었다.(Fig. 2)

2. 표준광농도를 이용한 뇌해마 각 구역의 c-fos 발현 정도의 변화

뇌해마 각 구역에서의 표준광농도는 저혈압과 뇌허혈을 유발하지 않은 Sham군은 CA1 구역에서 106 ± 9 , CA2 구역에서 102 ± 9 , CA3 구역에서 96 ± 8 및 DG 구역에서는 112 ± 7 로 나타났다. 이러한 표준광농도의 분포는 CA1, CA2 및 CA3 구역에서는 c-fos가 발현되지 않았고, DG 구역에서는 c-fos가 미약하게 발현되었음을 나타내준다. 저혈압과 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 CA1 구역에서 226 ± 15 , CA2 구역에서 132 ± 7 , CA3 구역에서 128 ± 11 및 DG 구역에서는 213 ± 12 로 측정되었다. 이는 c-fos 발현이 CA1 구역과 DG 구역에서는 약 200%의 강한 증가를 나타내었으며, CA2와 CA3 구역에서는 약 130% 증가한 것을 나타내준다. 凉膈散火湯을 투여한 군은 CA1 구역에서 163 ± 12 , CA2 구역에서 128 ± 6 , CA3 구역에서 118 ± 8 및 DG 구역에서는 168 ± 10 로 측정되었다. 이는 凉膈散火湯의 투여에 의하여 CA1 구역과 DG 구역에서 c-fos의 발현이 약 150%만 증가

함으로서 대조군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 감소를 나타내었으며, CA2와 CA3 구역에서는 약 125% 증가하여 대조군에 비하여 변화가 없었음을 보여준다.(Table 2, Fig. 3)

3. 뇌해마 c-jun 발현의 변화

뇌허혈을 유발하지 않은 Sham군에서는 c-jun의 발현이 관찰되지 않거나 일부 실험동물에서 뇌해마 DG 부위에서 미약하게 발현된 것이 관찰되었다. 정상상태에서는 발현되지 않는 것이 일반적이나 미약하게 발현된 실험동물은 아마도 수술 등의 스트레스에 의한 것으로 추정된다. 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 뇌해마 전영역에서 c-jun의 발현이 현저히 증가하였으며, 특히 CA1 부위에서 증가가 확실하게 관찰

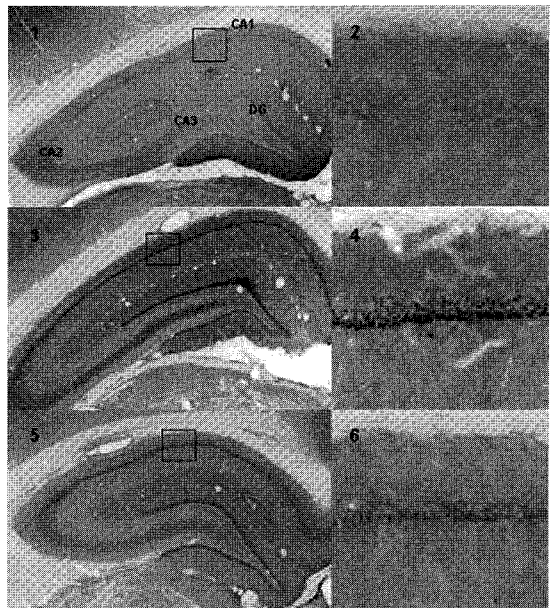


Fig. 2. c-Fos immunohistochemical stained hippocampus and CA1 of aged BCAO rats. Section 1 and 2 are Sham operated group. Section 3 and 4 demonstrate the increase of c-fos expression in CA1 and DG of hippocampus of the BCAO aged rats (Control group). Section 5 and 6 demonstrate the decrease of c-fos expression, compared to the control group, following *Yanggyuksanhwa-tang* treatment to the aged BCAO rats.

Table 2. Changes of Normalized Optical Densities of c-Fos Expression in Hippocampal Sub-regions of Aged BCAO Rats

Groups	Sub-regions of Hippocampus			
	CA1	CA2	CA3	DG
Sham	106±9	102±9	96±8	112±7
Control	226±15 (213.2%)	132±7 (129.4%)	128±11 (133.3%)	213±12 (190.2%)
Sample	163±12** (153.8%)	128±6 (125.5%)	118±8 (122.9%)	168±10* (150.0%)

Data are demonstrated Mean ± Standard Error.

Percentages in parentheses are increase percentage with respect to Sham data.

Sham; Sham operated group without hypotension and bilateral common carotid artery occlusion.

Control; Group operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 8 minutes on aged rats.

Sample; Group operated as same as control group and treated with *Yanggyuksanhwa-tang*.

*, statistical significance, *; P<0.05, **; P<0.01.

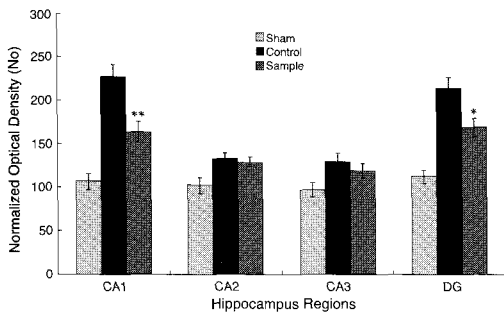


Fig. 3. c-Fos expressions in hippocampus of aged BCAO rats with immunohistochemical staining. Sham shows hippocampus of sham operated animals without hypotension and bilateral common carotid artery occlusion. Control shows hippocampus of aged rats operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 8 minutes. Sample shows hippocampus of aged rats operated as same as control group and treated with *Yanggyuksanhwa-tang*. c-fos protein was expressed strongly in CA1 and DG of hippocampus of BCAO aged rats. Strong expression of c-fos in CA1 and DG was reduced by treatment of *Yanggyuksanhwa-tang* to the aged BCAO rats.

되었다. 凉膈散火湯을 투여한 군에서는 c-jun의 발현이 대조군에 비하여 감소하였고, 그 감소는 CA1 부위에서 가장 확실하게 관찰되었다.(Fig. 4)

4. 표준광농도를 이용한 뇌해마 각 구역의 c-jun 발현 정도의 변화

뇌해마 각 구역에서의 표준광농도는 저혈압과 뇌허혈을 유발하지 않은 Sham군은 CA1 구역에서 103

±4, CA2 구역에서 98±5, CA3 구역에서 101±4 및 DG 구역에서는 108±8로 나타났다. 이러한 표준광농도의 분포는 CA1, CA2 및 CA3 구역에서는 c-jun이 발현되지 않았고, DG 구역에서는 c-jun이 미약하게 발현되었음을 나타내준다. 저혈압과 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 CA1 구역에서 175±11, CA2 구역에서 111±7, CA3 구역에서 110±9 및 DG 구역에서는 135±8로 측정되었다. 이는 c-jun 발현이 CA1 구역에서는 약 170%의 강한 증가를 나타내었으며, DG 구역에서는 약 125% 증가하였고, CA2와 CA3 구역에서는 약 110% 증가한 것을 나타내준다. 凉膈散火湯을 투여한 군은 CA1 구역에서 133±10, CA2 구역에서 100±8, CA3 구역에서 103±8 및 DG 구역에서는 128±11로 측정되었다. 이는 凉膈散火湯의 투여에 의하여 CA1 구역에서 c-jun의 발현이 약 130%만 증가함으로써 대조군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 감소를 나타내었으며, CA2와 CA3 및 DG 구역에서는 약 100~120% 증가하여 대조군에 비하여 유의성 있는 변화가 없었음을 보여준다.(Table 3, Fig. 5)

IV. 考 察

뇌졸중은 45세 이후에서부터 약 80세 사이에서 인구 10만명당 250~400명의 발병빈도로 영구적인 불구를 유발시키는, 질환사망률이 약 30%에 이르는 질

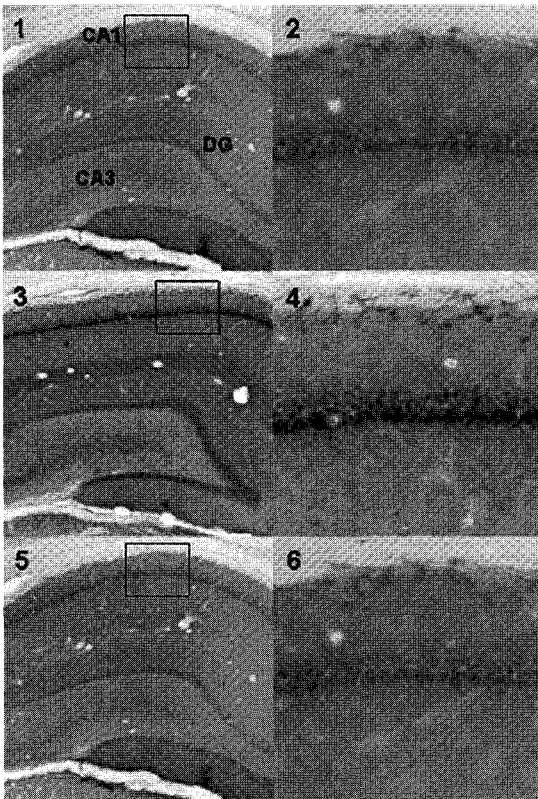


Fig. 4. c-Jun immunohistochemical stained hippocampus and CA1 of aged BCAA rats. Section 1 and 2 are Sham operated group. Section 3 and 4 demonstrate the increase of c-jun expression in CA1 hippocampus of the BCAA aged rats (Control group). Section 5 and 6 demonstrate the decrease of c-jun expression, compared to the control group, following *Yanggyuksanhwa-tang* treatment to the aged BCAA rats.

병으로 전체 질병 사망원인의 세 번째로 대두되고 있다^{13,14}. 허혈성 뇌경색에 대하여는 glutamate antagonist 또는 NMDA receptor antagonist 등의 약물들이 연구 개발되고 있으나 아직까지 적절한 신경손상 보호효능의 치료약물은 없는 실정이다. 현재는 유일하게 섬유소용해 (fibrinolysis)에 유효한 약물이 사용되고 있을 뿐이다. 그러나 이러한 섬유소 및 혈전용해제 사용에 의한 유효한 치료효능 역시 발병 이후 약 3시간이내에 처치하여야 한다는 현실적으로 어려운

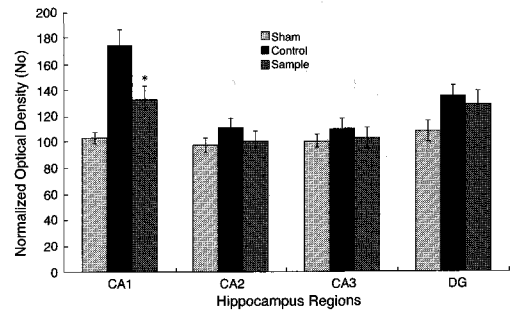


Fig. 5. c-Jun expressions in hippocampus of aged BCAA rats with immunohistochemical staining. Sham shows hippocampus of sham operated animals without hypotension and bilateral common carotid artery occlusion. Control shows hippocampus of aged rats operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 8 minutes. Sample shows hippocampus of aged rats operated as same as control group and treated with *Yanggyuksanhwa-tang*. c-Jun protein was expressed strongly in CA1 of hippocampus of BCAA aged rats. Strong expression of c-Jun in CA1 was reduced by treatment of *Yanggyuksanhwa-tang* to the aged BCAA rats.

유효치료시기의 제한을 받게 된다¹⁵.

신경손상 보호효능을 갖는 효과적인 치료약물의 개발에 어려운 점 중 하나가 뇌경색의 임상증상과 유사하고 약물효능을 정확히 예측할 수 있는 신뢰성 있는 실험동물모형이 없다는 것이다¹². 실제 뇌졸중 환자에 있어서는 뇌혈류 상태와 뇌경색 크기, 뇌의 구조적 상태와 뇌경색 발생의 위치 등에 따라 그 상관관계가 매우 가변적이며 임상증상이 다양하게 나타나는 것에 비하여 뇌허혈의 실험동물 모형에서는 일정한 손상 유발을 나타낼 뿐이다³. 또한 뇌졸중 발생의 중요한 원인요소 중 하나가 노령이다. 뇌졸중 환자 216명에 대하여 CT scan으로 임상연구를 한 결과, 연령이 가장 영향이 큰 예후판정 지표라고 보고되었다^{4,5}. 그러나 실험모형에서는 거의 대부분 건강하고 젊은 실험동물을 사용하고 있다⁶. 젊은 흰쥐와 노령 흰쥐의 국소 뇌허혈에 대한 연구에 의하면, 국소 뇌허혈 모형에서 뇌경색의 크기가 연령 의존적으로 증가한다고 보고되어 있다¹⁶. 또한 젊은 흰쥐에서

Table 3. Changes of Normalized Optical Densities of c-Jun Expression in Hippocampal Sub-regions of Aged B CAO Rats

Groups	Sub-regions of Hippocampus			
	CA1	CA2	CA3	DG
Sham	103 ± 4	98 ± 5	101 ± 4	108 ± 8
Control	175 ± 11 (169.9%)	111 ± 7 (113.3%)	110 ± 9 (108.9%)	135 ± 8 (125.0%)
Sample	133 ± 10* (129.1%)	100 ± 8 (102.0%)	103 ± 8 (102.0%)	128 ± 11 (118.5%)

Data are demonstrated Mean ± Standard Error.

Percentages in parentheses are increase percentage with respect to Sham data.

Sham; Sham operated group without hypotension and bilateral common carotid artery occlusion.

Control; Group operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 8 minutes on aged rats.

Sample; Group operated as same as control group and treated with *Yanggyuksanhwa-tang*.

*, statistical significance, *, P<0.05.

는 즉시적이고 심한 손상 후에 회복기전이 진행되는 것에 비하여 노령 흰쥐에서는 손상이 지속적이고 회복기전이 제대로 진행되지 못하는 특징이 있다고 하였다⁷. 그러나 뇌허혈에 있어서 노령이 중요한 원인 요소이지만 이러한 점을 감안하여 동물실험을 한 연구는 많지 않다. 그러므로 본 연구는 18개월된 노령 흰쥐를 사용하여 한약물의 효능을 관찰하므로써 실험적 개선을 시도하였다.

본 연구에 사용된 한약물인 涼膈散火湯은 東醫壽世保元⁸에서 少陽人 胸膈熱症을 치료하는 처방으로 구성되었으며¹⁸, 임상 통계 연구에 의하면 涼膈散火湯이 뇌졸중의 임상에서 가장 빈번히 사용되는 처방 중 하나라고 하였다⁷. 涼膈散火湯 중 生地黃은 瀉心火, 淸肺熱하고, 忍冬藤과 連翹 역시 心肺二經의 熱을 내리고 解毒하며, 梔子和 薄荷는 宣滯解鬱하고, 石膏는 肺와 胃 및 三焦의 熱을 제거하고, 知母와 함께 除渴止煩한다. 防風과 荊芥는 散風濕하며, 頭目滯氣한 것과 四肢攣急한 症을 치료하고, 生地黃과 知母는 補腎水 및 滋陰하는 효능이 있다. 그러므로 본 처방은 淸熱涼血, 瀉火解毒, 除煩解鬱, 祛風解表, 勝濕解痲하는 효능으로 淸熱, 解鬱, 祛風하는 中風의 치료 처방이다¹⁸⁻²⁰.

涼膈散火湯에 대한 실험적 연구로는 뇌혈관질환과 관련하여 혈압 상승 및 국소뇌혈류 증가 효능이 있으므로 뇌허혈에 대한 유의한 효능이 있을 것으로 보고하였고¹⁹, 또한 지주막하 출혈 이후의 혈관경련에

대하여 혈관내피세포의 손상과 혈관내막의 비후를 회복시키고, 평활근의 수축을 감소시키는 동시에 괴사를 호전시키는 등 체반 병리적 변화를 회복시켜 연속을 감소시키는 효과가 있다고 보고하였다²⁰. 또한 그 기전과 관련하여 혈관확장에 관여하는 신경전달물질과 신경 peptide의 활성화에 기여하고, 특히 혈관확장에 관여하는 CGRP와 VIP 면역양성반응 신경섬유에 현저한 변화를 유발하는 것으로 보고하였다²⁰. 이외에도 간뇌성 경련에 대하여 유의한 효능이 있으며, 진통, 해열 및 수면시간 연장효능이 있는 것으로 보고하였고¹⁸, 비만증과 당뇨병에 대하여도 유의한 효능이 있다고 보고된 바 있다^{21,22}.

이러한 효능의 涼膈散火湯을 뇌허혈이 유발된 노령의 흰쥐에게 경구투여한 다음 그 효능의 판정 지표로 뇌해마 부위에서 c-fos와 c-jun 단백질이 발현되는 정도를 면역조직화학적으로 염색하여 관찰하였다. c-fos와 c-jun은 immediate early genes (IEGs)에 의하여 발현되는 단백질로, 이들에 대하여 설명하면 다음과 같다.

전체적 또는 국소적 모든 뇌허혈은 즉시적으로 뇌조직에서 생화학적인 변화를 야기시키며, 뇌허혈이 유발된 후 수분 이내에 gene들의 발현 증가가 나타난다. 이러한 매우 빠른 반응을 나타내는 gene들을 IEGs의 범주로 구분한다. 또한 중추신경계에서는 다양한 자극이 IEGs 발현을 유발시킨다. 정상적인 상태에서는 IEGs 발현이 일반적으로 아주 낮은 상태이다.

생리적인 자극일 경우에는 그 자극과 기능적으로 관련된 뇌부위에서만 IEGs 발현의 증가가 나타난다⁹. 예를 들어서, 음수박탈(water deprivation)은 선택적으로 항이노호르몬(ADH) 생산과 관련된 paraventricular nucleus에서의 c-fos 발현 증가를 나타낸다²³. 이에 비하여 병리생리적 조건 즉, 경련이나 허혈과 같은 상태는 중추신경계의 광범위한 부위에서 IEGs 발현의 증가를 나타낸다²⁴. 또한 직접적으로 손상받은 부위에서 발현됨은 물론 손상부위 바깥영역에서도 역시 발현되게 된다. 뇌허혈 후 수시간 또는 수일간 생존하는 뇌조직에서는 보다 많은 gene들이 발현 된다. 뇌허혈의 반응으로 나타나는 gene 발현에 대한 기능적 연구에 의하면, 이러한 변화가 유익하기도 하고 유해하기도 하다고 하였다. 즉, gene 발현의 변화가 뇌허혈 후 회복기전에서 중요한 역할을 하는 것 같기도 하고, 반대로 뇌허혈에 따른 apoptotic cell death에 관여하는 gene의 발현이 나아가 뇌조직 손상을 유발하는 것으로도 보인다고 보고되고 있다⁹.

IEGs 발현은 몇 단계의 과정을 거친다. Glutamate를 분비하게 하는 어떠한 자극이 first messenger가 된다. 다음으로, 세포내 calcium 농도가 높아지는 것과 같은 세포질내의 생화학적 변화나 second messenger들이 PKA (cAMP-dependent)나 PKC (calcium-dependent)를 활성화시킨다. 다음으로, 이러한 kinase들이 serum response element (SRE)나 calcium/cAMP response element (Ca/CRE) 같은 DNA binding protein들을 phosphorylate 시킨다. DNA binding protein들은 response element라고 불리는 genomic DNA의 특수한 binding site들을 인식하게 된다. 이러한 response element들은 gene의 promotor 부위에 존재하며, 각각 gene의 transcription을 조절한다. IEGs의 signal transduction pathway에는, SRE나 Ca/CRE와 같은 response element들을 통하여 IEG 발현을 조절하는 DNA binding protein들에 집중되는 다양한 signal들이 관여하고 있다^{25,26}.

뇌허혈은 강력한 IEGs stimulator이다. 전뇌허혈 동물모형에서 여러 뇌부위에서 IEGs의 발현이 보고되어 있다. mRNA 발현의 해부학적 위치를 알 수 있는

in situ hybridization 방법을 사용한 실험연구에 의하면 IEGs 발현 증가가 뇌허혈에 가장 민감한 것으로 알려진 뇌부위에서 가장 심한 것으로 보고 되었다^{27,10}. 예를 들어서, 흰쥐의 4-VO에 의하여 DG, CA1, CA3의 추체신경세포, neocortex, 소뇌의 Purkinje cells 등에서 c-fos mRNA 발현이 크게 증가하였다. zif/268, c-jun, jun-B, jun-D 등 다른 IEGs 역시 전뇌허혈에서 발현이 증가되었고 하였다¹⁰.

앞에 언급한 IEG 발현을 유발하는 분자생물학적 기전은 아직 완전하지 않다. 전뇌허혈은 IEGs를 유발하는데 관여하는 다양한 second messenger system들을 유도하게 된다. 뇌허혈에 의한 IEGs의 발현은 아마도 대사적 스트레스에 의한 것일 수가 있다²⁸. 또한 NMDA receptor 길항제들이 IEGs 발현을 감소시키는 것에 의하면 초기의 신호전달과정에 glutamate가 관여하는 것으로도 추정할 수 있다²⁹.

국소 뇌허혈 역시 IEGs 발현에 변화를 야기한다. 미약한 국소 뇌허혈에서는 IEGs 발현이 허혈영역에 제한되어 있으나, 심한 국소 뇌허혈에서는 IEGs 발현이 허혈영역 밖에서도 관찰되었다³⁰⁻³³. 예를 들어서, 흰쥐의 뇌경색 모형에서는 c-jun, jun-B, jun-D, zif/268, c-fos, nur/77 및 Krox20 등의 증가가 재관류 1시간 이내에 관찰되었다^{30,34}. 뇌허혈 시간이 30분에서 90분으로 증가되면 IEGs의 발현이 허혈영역의 외부에서는 물론 반대측 뇌해마에서도 관찰되었다. 흰쥐에서 영구적으로 중대뇌동맥을 폐쇄한 경우에는 중대뇌동맥이 혈액공급을 하는 부위는 물론 반대측의 대뇌피질 구조들에서도 c-fos와 c-jun 및 zif/268의 발현이 관찰되었다³¹. 또다른 국소 뇌경색 모형에서는 thalamus나, lateral and medial geniculate nuclei 및 substantia nigra 등 심부구조에서도 c-fos와 jun-B의 발현이 관찰되었다^{32,33}.

국소 뇌허혈 후에는 IEGs 발현으로 c-fos, fos-B, c-jun, jun-B 및 jun-D의 면역화학적 반응이 나타난다^{35,36}. fos와 jun 종류들 생성에 따른 이중합체형성(dimerization)은 AP-1 binding activity와 homodimer나 heterodimer 생성을 유도하므로 국소뇌허혈 후에는 AP-1 binding activity의 증가가 나타난다^{34,37}. IEGs

의 mRNA 발현은 국소뇌허혈의 중심부 (core region)와 주변부 (penumbral region) 모두에서 관찰되지만 AP-1 binding은 주변부에서만 관찰되었다. 이러한 결과는 심한 허혈 손상은 단백질합성을 억제한다는 것을 나타내준다³⁷.

뇌허혈 후 유전자발현 증가에 관련된 first and second messenger들에 대해서는 아직 완전히 알지 못하고 있다. 중대뇌동맥폐쇄 후 glutamate 길항제인 MK-801을 투여한 경우 뇌허혈 부위에서 c-fos와 jun-B의 발현이 감소하였다^{31,33}. 동일한 조건에서 substantia nigra에서는 여전히 IEGs 발현이 나타났다. 이러한 결과는 뇌허혈 부위로부터 밀리 떨어진 부위에서는 또 다른 신호에 의하여 IEGs 발현이 조절되는 것을 추측하게 한다³⁵.

IEGs를 유발하는 분자생물학적 기전을 연구하는 일환으로 뇌허혈 조직을 nuclear run-on assay 방법으로 연구한 결과 c-jun, jun-B, c-fos 및 Krox²⁰의 전사 정도 (transcription level)가 증가됨이 보고되었다^{30,34}. 이는 유전자 전사 정도 (level of gene transcription)의 변화가 관여되는 것을 나타내준다. 이러한 결과는 gene의 promotor region에서의 DNA binding protein의 활성화에 의한 것으로 추측된다. 실제로 c-fos의 promotor region에 response element로 존재하는 cAMP response element (CRE)에 대한 binding activity가 증가되어 있음이 뇌허혈 조직의 nuclear extract에서 관찰되었다. 나아가 posttranscription level에서도 어떠한 조절이 있는가에 대하여는 아직 알지 못하고 있다³⁷.

본실험의 결과, 뇌허혈을 유발하지 않은 Sham군에서는 c-fos의 발현이 관찰되지 않거나 일부 실험동물에서 뇌해마 CA1 부위와 DG 부위에서 미약하게 발현된 것이 관찰되었다. 정상상태에서는 발현되지 않는 것이 일반적이나 미약하게 발현된 실험동물은 아마도 수술 등의 스트레스에 의한 것으로 추정된다. 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 뇌해마 전영역에서 c-fos의 발현이 현저히 증가하였으며, 특히 CA1 부위와 DG 부위에서 증가가 확실하게 관찰되었다. 涼膈散火湯을 투여한 군에서는 c-fos의 발현이 대조군에 비하여 감소하였고, 그 감소는 CA1 부위에서 가장

확실하게 관찰되었다. 뇌해마 각 구역에서의 표준광농도의 측정을 통하여 관찰한 결과 또한 면역조직학적 관찰 결과와 일치하는 경향을 나타내어, 涼膈散火湯의 투여에 의하여 CA1 구역과 DG 구역에서 c-fos의 발현이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다.

뇌해마 c-jun 발현의 변화는 뇌허혈을 유발하지 않은 Sham군에서는 c-jun의 발현이 관찰되지 않거나 일부 실험동물에서 뇌해마 DG 부위에서 미약하게 발현된 것이 관찰되었다. 정상상태에서는 발현되지 않는 것이 일반적이나 미약하게 발현된 실험동물은 아마도 수술 등의 스트레스에 의한 것으로 추정된다. 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 뇌해마 전영역에서 c-jun의 발현이 현저히 증가하였으며, 특히 CA1 부위에서 증가가 확실하게 관찰되었다. 涼膈散火湯을 투여한 군에서는 c-jun의 발현이 대조군에 비하여 감소하였고, 그 감소는 CA1 부위에서 가장 확실하게 관찰되었다. c-jun 역시 표준광농도의 측정을 통하여 관찰한 결과 또한 면역조직학적 관찰 결과와 일치하는 경향을 나타내어, 涼膈散火湯의 투여에 의하여 CA1 구역에서만 c-jun의 발현이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다.

위와 같은 결과에 의하여 涼膈散火湯은 노령 흰쥐의 뇌허혈 손상에 대하여도 유의한 효능이 있음을 알 수 있었으며, 그 기전에 IEGs 즉, c-fos와 c-jun이 관여하는 것으로 추정된다. 그러나 젊은 흰쥐에서의 효능과 노령 흰쥐에서의 효능 등 비교연구 및 기전 연구에 대하여는 지속적인 많은 연구가 진행되어야 할 것이다. 본 연구에서는 최소한 한방 처방의 효능 연구에 있어서 보다 임상 실제에 가까운 실험모형을 도입한 것과 IEGs의 변화를 통하여 뇌허혈에 대한 한약물의 작용기전을 연구한 것은 의미가 있다고 생각한다.

V. 結 論

18개월된 노령 흰쥐에게 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법을 사용하여 뇌

허혈을 유발한 다음 凉膈散火湯을 투여하고 뇌해마 각 부위에서 c-fos와 c-jun 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

뇌허혈이 유발된 대조군에서는 뇌해마 전영역에서 c-fos의 발현이 현저히 증가하였으며, 특히 CA1 부위와 DG 부위에서 증가가 확실하게 관찰되었다. 凉膈散火湯을 투여한 군에서는 c-fos의 발현이 대조군에 비하여 감소하였고, 그 감소는 CA1 부위에서 가장 확실하게 관찰되었다. 뇌해마 각 구역에서 c-fos 발현에 따른 표준광농도는 凉膈散火湯의 투여에 의하여 CA1 구역과 DG 구역에서 대조군에 비하여 유의성 ($P<0.05$) 있는 감소를 나타내었으며, CA2와 CA3 구역에서는 대조군에 비하여 변화가 없었다. 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 뇌해마 전영역에서 c-jun의 발현이 현저히 증가하였으며, 특히 CA1 부위에서 증가가 확실하게 관찰되었다. 凉膈散火湯을 투여한 군에서는 c-jun의 발현이 대조군에 비하여 감소하였고, 그 감소는 CA1 부위에서 가장 확실하게 관찰되었다. 뇌해마 각 구역에서 c-jun 발현에 따른 표준광농도는 凉膈散火湯의 투여에 의하여 CA1 구역에서 대조군에 비하여 유의성 ($P<0.05$) 있는 감소를 나타내었으며, CA2와 CA3 및 DG 구역에서는 대조군에 비하여 유의성 있는 변화가 없었다.

參考文獻

- DeGraba TJ, Pettigrew LC. Why do neuroprotective drugs work in animals but not in humans?. *Neurol Clin* 2000;18:475-93.
- Wiebers DO, Adams Jr. HP, Whisnant JP. Animal models of stroke: are they relevant to human disease?. *Stroke* 1990;21:1-3.
- Liu Y, Karonen JO, Vanninen RL, Otergaard L, Roivainen R, Nuutinen J, Perkio J, Kronon M, Hamalainen A, Vanninen EJ, Soimakallio S, Kuikka JT, Aronen HJ. Cerebral hemodynamics in human acute ischemic stroke: a study with diffusion- and perfusion-weighted magnetic resonance imaging and SPECT, *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:910-20.
- Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, O' Fallon WM, Wiebers DO. Stroke incidence, prevalence, and survival: secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989. *Stroke* 1996;27:373-80.
- Rasmussen D, Kohler O, Worm-Petersen S, Blegvad N, Jacobsen HL, Bergmann I, Egelblad M, Friis M, Nielsen NT. Computed tomography in prognostic stroke evaluation. *Stroke* 1992;23:506-10.
- Millikan C. Animal stroke model. *Stroke* 1992;23:795-7.
- 권도익, 고창남, 조기호, 기영석, 배형섭, 이경섭. 한방 병원 심계내과 입원 환자에 대한 임상연구, *경희의학* 1996;12(2):200-13.
- 이제마. 東醫壽世保元. 서울:신일문화사;1964,p.70.
- Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate Early Gene Expression in Response to Cerebral Ischemia; Friend or Foe?. *Stroke* 1996;27:1682-7.
- Kiessling M, Stumm G, Xie Y, Herdegen T, Aguzzi A, Bravo R, Gass P. Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13:914-24.
- Chan PH, Kawase M, Murakami K, Chen SF, Li Y, Calagui B, Reola L, Carlson E, Epstein CJ. Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci* 1998;18(20):8292-9.
- Sugawara T, Kawase M, Lewen A, Noshita N, Gasche Y, Fujimura M, Chan PH. Effect of hypotension severity on hippocampal CA1 neurons in a rat global ischemia model. *Brain Res* 2000;877:281-7.
- 박재인, 윤태영, 최중명, 박순영, 유동순. 최근 우리나라 뇌졸중의 역학적 양상에 관한 연구, *경희의대논문집* 1993;18:157:168.
- Dimagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathophysiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22:391-7.
- Adams RJ, Fisher M, Furlan AJ, del Zoppo G. Acute Stroke Treatment Trials in the United States : Rethinking Strategies for Success. *Stroke* 1995;26:2216-8.
- Kharlamov A, Kharlamov E, Armstrong DM. Age-dependent increase in infarct volume following photochemically induced cerebral infarction: putative role of astroglia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000;

- 55(3):B135-41.
17. Shapira S, Spir M, Wengier A, Grauer E, Kadar T. Aging has a complex effect of a rat model of ischemic stroke. *Brain Res* 2002;925:148-58.
 18. 김진성, 송일병. 양격산화당의 효능에 관한 실험적 연구. *경희한의대는문집* 1984;7:273-85.
 19. 이기주, 김경요. 십이미관중탕, 양격산화탕, 형방사백산이 백서의 혈압 및 국소 뇌혈류량에 미치는 영향. *한국전통의학지* 1999;9(2):259-68.
 20. 이동원, 이원철. 지주막하출혈 후 뇌기저동맥벽에 존재하는 면역양성 신경섬유의 변화에 미치는 양격산화탕의 효과. *한의학연구소논문집* 1999;8(1):117-31.
 21. 박재형, 김경요, 전병훈. 양격산화탕이 gold thioglucose로 유발된 백서의 비만증에 미치는 효과. *대한한의학회지* 1996;17(2):145-60.
 22. 홍성범, 홍순용. 소양인에 응용되는 양격산화탕이 백서의 당뇨병에 미치는 영향. *사상의학회지* 1991;3(1):201-17.
 23. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 1988;240:1328-31.
 24. Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T, Morgan JI. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron* 1989;3:359-65.
 25. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:421-51.
 26. Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 1990;4:477-85.
 27. Jorgensen MB, Deckert J, Wright DC, Gehlert DR. Delayed c-fos proto-oncogene expression in the rat hippocampus induced by transient global cerebral ischemia: an in situ hybridization study. *Brain Res* 1989;484:393-8.
 28. Sharp FR, Sagar SM. Alterations in gene expression as an index of neuronal injury: heat shock and the immediate early gene response. *Neurotoxicology* 1994;15:51-9.
 29. Hisanaga K, Sagar SM, Sharp FR. N-Methyl-D-aspartate antagonists block fos-like protein expression induced via multiple signaling pathways in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 1992;58:1836-44.
 30. An G, Lin T-N, Liu J-S, Hsu CY. Induction of Krox-20 expression after focal cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188:1104-10.
 31. Collaco-Moraes Y, Aspey BS, de Bellerocche JS, Harrison MJ. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to MK-801. *Stroke* 1994;25:1855-60.
 32. Kinouchi H, Sharp FR, Chan PH, Koistinaho J, Sagar SM, Yoshimoto T. Induction of c-fos, junB, c-jun, and hsp70 mRNA in cortex, thalamus, basal ganglia, and hippocampus following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:808-17.
 33. Kinouchi H, Sharp FR, Chan PH, Mikawa S, Kamii H, Arai S, Yoshimoto T. MK-801 inhibits the induction of immediate early genes in cerebral cortex, thalamus, and hippocampus, but not in substantia nigra following middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett* 1994;179:111-4.
 34. An G, Lin T-N, Liu J-S, Xue J-J, He Y-Y, Hsu CY. Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. *Ann Neurol* 1993;33:457-64.
 35. Dragunow M, Geilharz E, Sirimanne E, Lawlor P, Williams C, Bravo R, Gluckman P. Immediate-early gene protein expression in neurons undergoing delayed death, but not necrosis, following hypoxic-ischaemic injury to the young rat brain. *Mol Brain Res* 1994;25:19-33.
 36. Uemura Y, Kowall NW, Moskowitz MA. Focal ischemia in rats causes time-dependent expression of c-fos protein immunoreactivity in widespread regions of ipsilateral cortex. *Brain Res* 1991;552:99-105.
 37. Salminen A, Liu PK, Hsu CY. Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;212:939-44.