

원 저

흰쥐의 一過性 前腦 虛血 損傷에 대한 艾葉 藥鍼의 신경보호 작용

김재효, 장진요, 박병림²⁾, 김경식, 손인철,

원광대학교 한의과대학 경혈학교실, 원광대학교 의과대학 생리학교실¹⁾

Protective Effects of *Folium Artemisiae Argyi* Herbal Acupuncture on Transient Forebrain Ischemic Injury in Rats

Jae-Hyo Kim, Jin-Yo Jang, Byung-Rim Park¹⁾, Kyung-Sik Kim, In-Cheul Son

Department of Acupoint, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea,
Department of Physiology, Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Korea¹⁾

Objectives : Recently, the new therapeutic tool, that is herbal acupuncture, has been developed and applied to various diseases including the cerebrovascular accident. The main characteristics of herbal acupuncture are a combination of acupuncture and herbal medicine. It was not well known the therapeutic effect and the mechanism of herbal acupuncture on transient forebrain ischemic injury, although it has been used frequently in clinics. The objective was to determine the effect of *folium artemisiae argyi* (艾葉) herbal acupuncture on the transient forebrain ischemic injured rat.

Methods : In this study, the effects of *folium artemisiae argyi* (艾葉) herbal acupuncture on the LR₃, named Taechung, on neuroprotection after the transient forebrain ischemia were investigated in Sprague-Dawley rats. Expressions of cFos, FosB and BDNF protein in the hippocampus and cortex were observed at 2 hrs and 48 hrs after transient forebrain ischemia by immunohistochemistry and ELISA technique.

Results : Expression of cFos protein was increased slightly in the hippocampus and cortex at 2 hrs after transient forebrain ischemia, but FosB protein was increased highly comparing to cFos protein. However, pretreatment with *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture on LR₃ significantly increased expression of cFos protein and significantly decreased expression of FosB protein compared to control group. These features were observed in the retrosplenial granular cortex as well as the hippocampus. Also, pretreatment with *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture on LR₃ significantly increased the expression of BDNF protein in the hippocampus (263.26±44.56 pg/ml extracted by water, 275.35±51.47 pg/ml extracted by moxa tar) and the cortex (102.33±13.65 pg/ml extracted by water, 109.54±9.37 pg/ml extracted by moxa tar) compared to the hippocampus (134.07±2.96 pg/ml) and the cortex (61.16±4.11 pg/ml) in control group at 48 hrs after transient forebrain ischemia.

Conclusions : These results suggest that pretreatment with *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture on LR₃ has neuroprotective effect on transient forebrain ischemia and the herbal acupuncture on LR₃ may be related to antioxidative function of *folium artemisiae argyi*. (J Korean Oriental Med 2003;24(2):81-93)

Key Words: *folium artemisiae argyi*, herbal acupuncture, transient forebrain ischemia, immediate early gene, BDNF

· 접수 : 2003년 2월 14일 · 논문심사 : 2003년 3월 19일 · 채택 : 2003년 4월 18일
· 교신저자 : 손인철, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 경혈학교실
(Tel. 063-850-6448, Fax. 063-857-6458, E-mail: ichsohn@wonkwang.ac.kr)
· 본 연구비는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2001-000-00452-0)지원으로 수행되었음

서론

中風은 暴仆, 卒暴僵仆, 不知人, 不省人事, 昏倒, 昏不知人, 精神夢寐 등의 갑작스런 의식장애와 偏枯, 四肢不舉, 半身不遂, 口眼喎斜 등의 운동장애 및 舌強不語, 暴瘡, 言語蹇澁 등의 언어장애 증상이 나타나는 病證으로, 臨床上 中經絡과 中臟腑로 나뉘어 지며, 中臟腑는 다시 閉證과 脫證으로 구분되어진다. 中經絡은 口眼喎斜, 半身不遂, 手足麻木 등과 같은 증상이지만, 病의 부위가 비교적 淺하고 病情 역시 비교적 가볍다. 반면 中臟腑는 突然昏仆, 人事不省하여 病의 부위가 깊고, 病情 역시 심하여, 閉證의 경우 神志昏沈, 牙關皮閉, 兩手緊握, 面赤氣粗, 喉中痰鳴 등의 증상이 나타나며, 脫證의 경우 神志昏糊, 目合口張, 手撒, 鼻鼾息微, 呼吸微弱 등의 증상이 출현한다.

太衝(LR)은 足厥陰肝經의 俞土穴이자 原穴로 足拇趾 次趾間의 本節後 2寸에 위치하고 있으며, 合谷과 더불어 四關穴을 구성하여 鍼灸治療에서 가장 많이 활용되는 經穴이다. 太衝은 平肝理氣, 鎮驚安神, 泄熱(下焦濕熱)理血, 清熄肝火肝陽 및 通經活絡하는 效能으로 頭痛, 眩暈, 目赤疼痛, 中風, 驚風, 癲狂, 癇證, 脇痛, 腹脹, 胃痛, 嘔逆, 月經不調, 崩漏, 癰閉, 疝氣, 足跗腫, 下肢痿痺 등 다양한 질환을 치료하는데 적용되고 있으며¹⁾, 이 중에서 中風의 各種 症狀 治療에 활용되고 있으나, 아직 太衝과 相關한 實驗研究는 보고되지 않은 形편이다.

艾葉은 菊花科에 속한 다년생 초목인 황해쑥 (*Artemisia argyi*. Lev et Vant), 약쑥 (*Artemisia asiatica* Nakai.)와 野艾 (*Artemisia vulgaris* L.) 등의 잎을 건조한 것으로, 調理氣血, 逐寒濕, 溫經止血, 安胎하여 心腹冷痛, 泄瀉, 久痢, 下血, 月經不調, 帶下, 胎動不安, 癰瘍, 疥癬 등에 사용되어 왔는데²⁾, 대개의 경우에는 艾灸療法을 통해 營血 및 衛氣의 장애로 기인된 제반 질환 및 疼痛을 艾灸의 生體反應으로 營衛를 소통시키고, 經絡循環의 病變을 조화하는데 사용되었다³⁾. 또한, 최근의 연구 결과에서는 艾葉 추출물에서 혈소판 응집 억제작용⁴⁾ 및 항산화효과^{5,6)} 등이 보고되었다.

藥鍼療法은 經絡學說의 原理에 의거하여 各種 藥

物을 선택해서 相關한 穴位, 壓痛點, 反應點에 주입하여 鍼刺戟과 藥物刺戟을 동시에 가능케 하는 방법으로 1950년대부터 中國에서 개발되기 시작하여 國內에서는 1960년대부터 사용되어져 왔으며, 中國의 경우 虛血性 腦卒中의 急性期, 恢復期에 각각 적용하여 효과를 보고 있다⁷⁾. 다양한 종류의 藥材를 이용한 藥鍼 연구 및 臨床 治療 例가 최근까지 살펴 볼 수 있는 반면, 艾葉의 藥鍼 개발에 관하여 독성실험과 같은 기초적 연구 단계에 머물러 있으며⁸⁾, 아직까지는 艾葉 藥鍼을 통한 동물실험 예나 치료 예는 보고되지 않고 있다.

腦虛血 損傷 중 一過性 前腦 虛血 損傷 (transient forebrain ischemia)은 실험동물에서 兩側 椎骨動脈과 頸動脈을 일시적으로 폐쇄 (four vessel occlusion, 4-VO)시켜 뇌에 혈액공급을 완전히 차단한 다음 혈액공급을 재개하는 虛血 및 再貫流 損傷 (ischemia-reperfusion)⁹⁾으로 腦虛血에 관한 病態生理를 연구하기 위하여 많이 활용되고 있다. 一過性 前腦 虛血 損傷은 지속적으로 뇌혈류를 차단할 경우 즉부순환이 없으므로 前腦가 급성 뇌경색에 빠지게 되고 높은 치사율을 보이게 되나, 15분 정도의 일시적인 虛血을 가하고 재관류시키면 급성 뇌경색에 빠지는 않지만 3-4일 경과 후 뇌의 新皮質 (neocortex), 線條體 (striatum), 海馬 (hippocampus) CA1 부위 와 小腦 (cerebellum)에 선택적으로 신경세포의 손실이 나타나는 遲延性 神經 細胞死 (delayed neuronal death) 현상이 관찰되는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾.

이에 본 연구에서는 中風 治療에 대한 적용 가능성이 매우 높아 보이는 艾葉을 활용하여 足厥陰肝經의 俞土穴이자 原穴로 알려진 太衝에 艾葉 藥鍼 刺戟을 수행하여 흰쥐에서 一過性 前腦 虛血 (transient forebrain ischemia)에 의하여 유발되는 뇌세포 사멸 과정으로부터 신경방어 효과 여부를 확인하고자, cFos 와 FosB 면역 단백질 및 BDNF 단백질 발현의 변화 관찰을 통해 艾葉 藥鍼 刺戟과 신경보호 및 방어 작용에 대하여 이해하고자 하였다. 더욱이, 艾葉을 水溶性 抽出物과 燃燒時 發生되는 tar性 灸津 抽出物이라는 두가지의 종류의 추출물을 藥鍼 刺戟을 위한 藥

物로 구분하여 各各 前腦 虛血 損傷에 대하여 특이적으로 效果를 발휘하는지를 규명하고자 하였고, 이에 有意한 結果를 얻어 報告하는 바이다.

실험방법

1. 實驗 動物

실험동물은 체중 200~250 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷 (Samtako's Sam : TacN (SD) BR, Korea)을 사용하였으며, 실험 1주일 전부터 실온의 실험실 환경에 적응할 수 있도록 하여 stress 및 환경의 변화에 따른 영향을 최소화하였다. 正常群 (Nor), 一過性 前腦 虛血 損傷만 가한 虛血 損傷群 (Con), 艾葉 藥鍼 시술 후 一過性 虛血 損傷을 유발한 藥鍼群의 3개 실험군으로 분류하였다. 藥鍼 施術群의 경우, 抽出物에 따라 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼群 (Moxa-W)과 灸津 抽出 艾葉 藥鍼群 (Moxa-T)으로 구분하였다.

2. 一過性 前腦 虛血 損傷 (Transient forebrain ischemic injury)

一過性 前腦 虛血은 Pulsinelli 등⁹⁾이 제시한 양측 추골동맥 (vertebral a.)과 경동맥 (common carotid a.)의 4개의 혈관 폐색법에 의하여 유발시켰다. 실험동물은 2% halothane (2-Bromo-2-chloro - 1,1,1 - trifluoroethane, Sigma-Aldrich Inc, U.S.A.)과 100% 산소의 혼합가스를 2 L/min로 마취를 시작하였으며, 마취가 이루어진 뒤 0.5% halothane과 100% 산소의 혼합가스로 마취를 유지하였다. 먼저 추골동맥 폐색은 복와외 위치에서 정중 항배부위의 피부를 절개한 후 제 1경추의 alar foraminae를 노출시켜 제 1경추와 제 2경추 사이로 지나가는 양측 추골동맥 (vertebral artery)을 전기인두를 사용하여 영구적으로 폐색시켰다. 추골동맥 폐색을 유발 한 후 24시간 후, 경동맥 폐색을 위하여 흰쥐를 양와위자세로 위치시킨 후 정중 경부 부위의 피부를 절개하여 양측 경동맥을 분리하였으며, 분리된 경동맥 (common carotid artery)을 micro aneurysm clips (# 160-863, George Tiemann and Co., Plainview, NY)을 이용하여 폐색하고 아울러 봉

합사로 경부 근육내에 존재하는 측지분지의 흐름을 폐쇄하였다. 대뇌로 흐르는 혈류를 15분 동안 차단하는 동안에는 흰쥐의 체온을 heating bed를 이용하여 36-37℃를 유지하였으며, 혈관계쇄 동안 동공산대와 righting reflex 소실을 확인하였다. 虛血 유발 15분 후 결찰을 풀어줌으로써 혈류를 재개시켰으며, 회복시 발작을 보이는 흰쥐는 본 실험에서 제외하였다.

3. 藥鍼液 製造

藥材 : 약재는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입하여 정선한 후에 사용하였다.

水溶性 抽出物 : 艾葉 (*folium artemisiae argyi*) 200 g을 물 2000 ml와 함께 환적플라스크에 넣고 환류장치를 부착하여 1시간동안 전탕한 후 여과포로 여과하였다. 여과액을 3000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 52℃에서 진공농축으로 감압농축시켜 -70℃에서 24시간 동결시킨다. 그 후 동결건조기로 48시간 동결건조하여 15.5 g의 분말시료를 얻었으며, 이를 saline을 용매로 하여 50 mg/ml의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

灸津 (Tar of *folium artemisiae argyi*) 抽出物 : 삼각 플라스크 입구에 깨묵 링을 올려놓고, 1회마다 艾葉 (봉래구관, 서울) 5 g을 뜸 절구를 이용하여 원뿔 모양으로 만든다. 다음 넓은 면을 아래로 깨묵 링위에 올려놓고, 불을 붙여서 삼각 플라스크 바닥으로 흐르는 뜸 tar를 모은다. 뜸썩이 타면서 침강하는 tar 성분이 더 이상 나오지 않으면 버리고, 새로운 뜸으로 대체하기를 반복한다. 플라스크 바닥에 모인 뜸 tar를 methanol 100%로 녹이고 column을 이용하여 재 등의 불순물을 제거하고 40±2℃를 증탕증류기를 이용하여 methanol을 90% 증발시킨다. 남은 tar성분과 methanol 혼합물을 -70℃의 냉동동결건조기를 이용하여 72시간 건조시킨후, ethyl alcohol을 용매로 이용하여 20 mg/ml의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

4. 取穴 및 藥鍼 刺戟

一過性 前腦 虛血 損傷을 유발하기 1 시간 전에 약 침자극을 실시하였다. 실험동물의 藥鍼刺戟은 左右

側下肢에서 足厥陰肝經의 原穴인 太衝 (LR₄)을 인체와 상응하는 흰쥐의 제 1趾와 제 2趾 사이에서 취혈하였으며, 26 gauge의 1 ml 注射器를 사용하여 經穴部位의 皮下에 삽입하여 각각 0.2 ml을 1회 주입하였다.

5. cFos & FosB 면역 조직 화학 검사

실험동물을 chloral hydrate (400 mg/kg)로 마취 후 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 심장을 관류하여 혈액을 제거하였으며, 다시 4% paraformaldehyde로 관류시킨 후 뇌를 분리하였다. 분리된 뇌는 4% paraformaldehyde에서 3시간 동안 실온에서 고정 한 후 30% sucrose에서 2일 이상 방치하였다. 냉동절편기 (Leica, Germany)를 이용하여 35 μ m의 두께로 조직절편을 만들어서 slide glass에 부착 후, 세포내 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 10% H₂O₂용액에서 20분 동안 진탕하고, 그 후 pH 7.4의 PBS 용액으로 3회 이상 세척 하고 0.5% Triton-X 100으로 20분간 진탕한 후 PBS로 2회 이상 세척하였다. 그후 blocking agent (normal goat serum)를 실온에서 60분간 처리한 다원일차항체 (cFos, Oncogene Sci, USA, 1:1000; FosB, SC-7203, Santa Cruz)를 4℃에서 8시간 반응시킨 후 2시간 동안 실온에서 진탕시키고 PBS로 세척하였다. 그 후 2차항체인 biotinylated anti-rabbit & anti-mouse immunoglobulin (Dako, Denmark)을 실온에서 40분간 처리하여 PBS로 세척하고, streptavidin peroxidase (Vector ABC kit)를 90분간 처리하여 PB로 세척한 뒤 chromogen인 0.05% diaminobenzidine으로 발색하였다. 증류수로 1시간 동안 세척 후 광학 현미경으로 진갈색의 cFos 또는 FosB 양성 세포를 관찰하였고 화상 자동분석 시스템 (Image-Pro Plus, U.S.A.)을 이용하여 海馬 (hippocampus) 및 대뇌피질 (cortex)에서 cFos 또는 FosB 양성 세포의 수를 측정하였다.

6. Brain derived neurotropic factor (BDNF) 단백질 측정 및 정량

ELISA (Enzyme-linked immunoassay; promega,

U.S.A.) 방법을 이용하여 신경친화성 물질의 하나인 BDNF 단백질을 측정하였다. 질소 탱크에 침수시킨 조직에서 단백질을 추출하기 위해 teflon grass homogenizer를 이용하여 분쇄하였으며 이때 lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 % NP40, 10 % glycerol, 1mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 0.5 mM sodium vanadate)는 100 mg 조직의 10 volume으로 사용하였다. 이어 13,000 g, 4℃에서 30분간 원심분리를 하여 상등액을 취한 후 DPBS buffer (per liter; 0.2 g KCl, 8.0 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 1.15 g Na₂HPO₄ pH 7.35, 133 mg CaCl₂ · 2H₂O, 100 mg MgCl₂ · 6H₂O)를 이용하여 1/3로 희석하고, 희석액 100 μ l를 ELISA에 사용하였다. 항 BDNF 단일항체로 ELISA plate well을 coating한 후 overnight 동안 배양시킨 후 1번 세척하고 Block & Sample 1×Buffer를 이용하여 비특이적인 단백 결합부를 제거하고 1번 세척하였다. 그 다음 BDNF 표준시약과 실험 조직을 plate well에 가한 후 2시간 ~ overnight 으로 배양한 후 5번 세척하고, 1/500으로 희석한 항체인 BDNF (anti-Humam BDNF) 복합항체를 가하고 2시간 동안 배양하였다. 배양된 표준시약 및 조직이 담겨진 plate well을 5번 세척 후 항 IgY HRP (Horse-Radish Peroxidase)를 가하고 1시간 가량 상온에서 배양하고 다시 plate well을 5번 세척 후 발색반응을 위해 TMB One solution (Promega, U.S.A.)을 가하여 상온에서 10분간 배양 후 발색반응을 관찰하였다. 적정한 발색반응이 나타나면 1N hydrochloric acid를 가하여 반응을 멈추고 ELISA Reader (Molecular Devices, THERMO max, U.S.A.)로 자외선 450 nm에서 흡광도를 측정한 다음 시약의 표준값을 정하기 위하여 각 농도별로 광학밀도 (OD; optical density) 값을 측정하여 표준곡선을 구하였고 실험시약의 광학밀도를 측정하였다. 이후 실험시약의 농도를 정량화하기 위하여 표준곡선을 이용하여 실험조직의 BDNF 농도를 구하였다.

7. 統計 (Statistics)

컴퓨터 통계프로그램인 SigmaStat 2.0 (SPSS Inc.,

U.S.A.)을 이용하였으며, 실험결과는 Mean±S.E.M.로 표현하였으며, 통계검정은 unpaired student t-test와 일원분산분석법으로 실시하였다. P 값이 0.05 미만인 경우에만 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

실험결과

1. 一過性 前腦 虛血 損傷 후 흰쥐의 海馬에서 cFos 및 Fos B 蛋白 發顯과 艾葉 藥鍼의 效果

一過性 前腦 虛血 損傷 誘發 후, 2 시간이 경과된 대조군에서는 CA1 영역에서 11.33±2.6 개의 cFos 단백질의 발현이 관찰되었다. 반면, 太衝 藥鍼 前處治 실험군에서 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼群에서는 51.4±8.55 개로 cFos 단백질의 발현이 유의하게 증가하였으며, 灸津 抽出 藥鍼群에서도 30.43±3.11 개로 cFos

단백이 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다. 특히, 水溶性 抽出物과 灸津 抽出物 間의 발현량 비교에서도 水溶性 抽出物이 뚜렷한 증가를 보여주고 있다 (Fig. 1).

해마부위의 CA1에서의 FosB 단백질 발현을 관찰한 결과에서는 cFos 단백질 발현 양상과 정반대로 대조군에서는 84.86±7.22 개의 FosB 단백질 발현이 관찰되어 一過性 前腦 虛血 損傷으로 매우 크게 증가하는 양상을 보여주었다. 太衝에 대한 藥鍼 前處治 실험군에서는 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼에서는 23.29±3.18 개로 매우 유의하게 FosB 단백질 발현이 抑制됨을 관찰하였으며, 역시 灸津 藥鍼에서도 11.67±4.41 개로 FosB 단백질 발현이 水溶性 抽出群에 비하여 크게 억제됨이 관찰되었다 (Fig. 2).

齒狀回 (dentate gyrus, DG)에서 一過性 前腦 虛血 損傷과 太衝에 대한 艾葉 藥鍼의 효과를 관찰하였다.

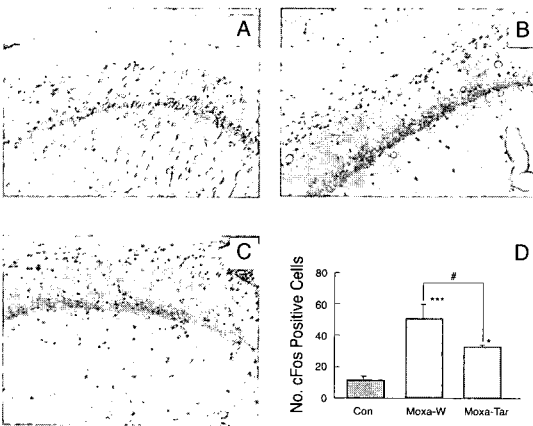


Fig. 1. Effects of *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture of LR3 on cFos positive protein expression in the CA1 at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from the tar of *folium artemisiae argyi* in Moxa-T group. Values are Mean±SE. Number of each group is 10. * significant difference from control group (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$); # significant difference between two acupuncture group (# $p < 0.05$).

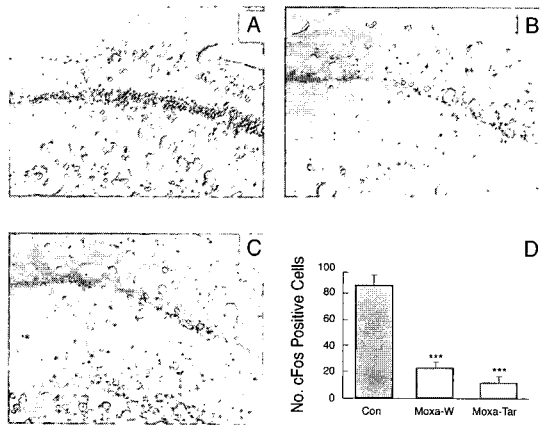


Fig. 2. Effects of *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture of LR3 on FosB positive protein expression in the CA1 at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from the tar of *folium artemisiae argyi* in Moxa-T group. Notations are the same as the previous figures. * significant difference from control group (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

一過性 前腦 虛血 損傷 후 2 시간제에 cFos 단백 발 현을 관찰한 결과, 대조군은 40.83±5.44 개의 단백질 발현이 관찰되었다. 반면, 太衝에 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼을 前處治한 실험군에서는 94.56±8.35 개가 관찰되어 대조군에서 비하여 유의하게 증가된 cFos 단백질 발현이 관찰되었는데, 灸津 藥鍼群에서는 52.43±5.53 개가 관찰되어 대조군에 비하여 증가된 경향을 가지었으나, 오히려 水溶性 抽出 艾葉에 비하여 큰 영향을 받지 않는 것으로 관찰되었다. 이러한 억제된 발현은 해마부위의 CA1에서 관찰된 것보다도 비슷한 양상을 나타내고 있었다 (Fig. 3).

一過性 前腦 虛血 損傷 후 齒狀回에서의 FosB 단백질 발현을 관찰하여 보면, 146.44±11.36 개로 cFos 발현에 비하여 매우 증가된 양상을 볼 수 있다. 그러나, 이러한 발현 양상은 太衝에 대한 艾葉 藥鍼 前處治에 의하여 유의하게 감소되는 것을 관찰할 수 있

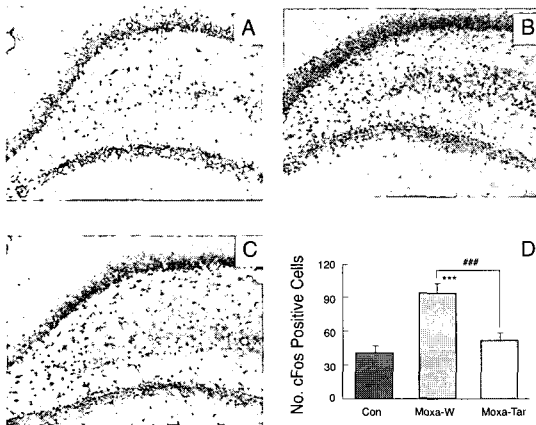


Fig. 3. Effects of *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture of LR3 on cFos positive protein expression in the dentate gyrus at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from the tar of *folium artemisiae argyi* in Moxa-T group. Notations are the same as the previous figures. * significant difference from control group (** $p < 0.001$); # significant difference between two acupuncture group (### $p < 0.001$).

는데, 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼群에서는 125±4.04 개로 대조군에 비하여 감소된 경향을 나타내었고, 灸津 藥鍼群에서는 89±2.83 개로 대조군과 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼群에 비하여 유의하게 감소된 발현 양상을 나타내었다. 이는 CA1 영역에서 FosB 단백질 발현 양상과 비교하여 볼 때, CA1 영역의 FosB 단백질 발현 억제효과보다는 약하였지만, 艾葉 藥鍼이 발현을 억제하는 것은 같은 양상을 보였으며, 아울러 灸津 抽出物이 더욱 효과가 크다는 것을 보여주었다 (Fig. 4).

2. 一過性 前腦 虛血 損傷 후 흰쥐의 retrosplenial granular b cortex 영역에서 cFos 및 Fos B 단백질 발현과 艾葉 藥鍼의 효과

Retrosplenial granular b cortex에서의 cFos 단백질 및 FosB 단백질 발현을 관찰한 결과, 一過性 前腦 虛血 損傷을 유발한 대조군에서 10±2.89 개와 139.29±

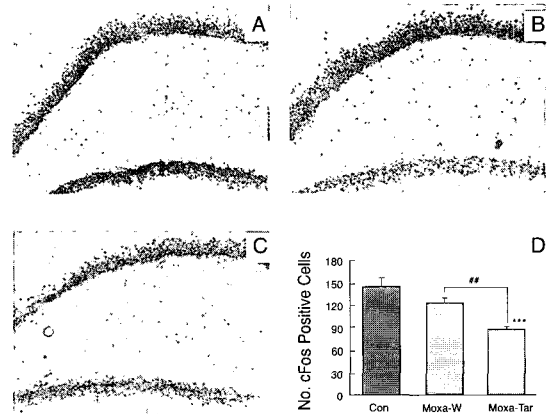


Fig. 4. Effects of *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture of LR3 on FosB positive protein expression in the dentate gyrus at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from the tar of *folium artemisiae argyi* in Moxa-T group. Notations are the same as the previous figures. * significant difference from control group (** $p < 0.001$); # significant difference between two acupuncture group (## $p < 0.01$).

12.16 개의 발현이 관찰되었다. 太衝에 대한 艾葉 藥鍼 施術群에서는, 水溶性 抽出物 藥鍼群에서 cFos 단백질 발현이 14.25 ± 2.32 개, 灸津 艾葉 藥鍼群은 17.75 ± 4.27 개로 대조군과 비교하여 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 반면, FosB의 발현은 水溶性 抽出物 藥鍼群에서는 41.33 ± 13.42 개, 灸津 艾葉 藥鍼群에서는 57 ± 11.27 개로 대조군에 비하여 FosB 발현이 유의하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 억제 효과는 해마부위에서 관찰된 경향과 유사하였다 (Fig. 5 & 6).

3. 一過性 前腦 虛血 損傷 후 BDNF 단백질 발현에 대한 艾葉 藥鍼의 효과

以上에서는 초기발현 유전 단백질 cFos와 FosB 단백질 발현을 통해 艾葉 藥鍼의 효과를 관찰할 수 있었다. 이를 이해하기 위하여 艾葉 藥鍼 前處治 후 유발된 一過性 前腦 虛血 損傷 흰쥐에서 48시간째

BDNF (brain derived neurotrophic factor) 단백질의 발현을 관찰하고 정량화 하였다. 그 결과, 대뇌피질에서는 정상군 (64.3 ± 1.32 pg/ml)에 비하여 一過性 前腦 虛血 損傷을 유발한 대조군 (61.16 ± 4.11 pg/ml)에서 약한 BDNF 단백질 발현의 감소가 관찰되었으나, 유의한 편은 아니었다. 그러나, 艾葉 藥鍼 前處治 실험군에서는 水溶性 抽出物을 통한 艾葉 藥鍼群에서 102.33 ± 13.65 pg/ml로 BDNF 단백질의 유의한 증가를 나타내었으며, 灸津 艾葉 藥鍼群에서도 109.54 ± 9.37 pg/ml로 역시 유의한 증가를 나타내었다 (Fig. 7).

해마에서는 정상군에서는 94.65 ± 0.82 pg/ml의 BDNF가 정량화되었으며, 대조군에서는 134.07 ± 2.96 pg/ml로 정상군에 비하여 유의하게 증가된 BDNF 단백질을 관찰할 수 있었다. 艾葉 藥鍼 前處治 실험군에서도 유의한 증가를 관찰하였는데, 水溶性 抽出物 艾葉 藥鍼群에서는 263.26 ± 44.56 pg/ml을 나타내었으며, 灸津 抽出物 艾葉 藥鍼群에서는 $275.35 \pm$

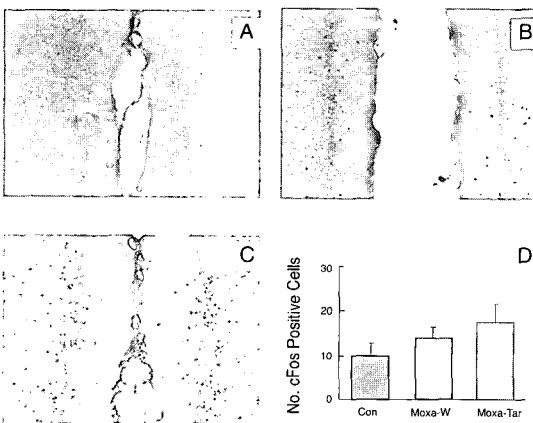


Fig. 5. Effects of *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture of LR3 on cFos positive protein expression in the retrosplenial granular b cortex (RSGb) at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from the tar of *folium artemisiae argyi* in Moxa-T group. Notations are the same as the previous figures.

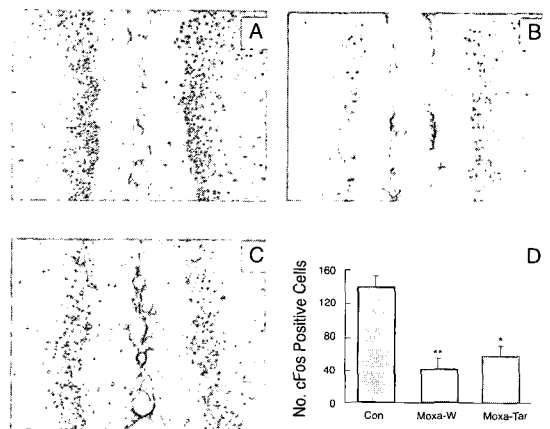


Fig. 6. Effects of *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture of LR3 on FosB positive protein expression in the retrosplenial granular b cortex (RSGb) at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture extracted from the tar of *folium artemisiae argyi* in Moxa-T group. Notations are the same as the previous figures.* significant difference from control group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

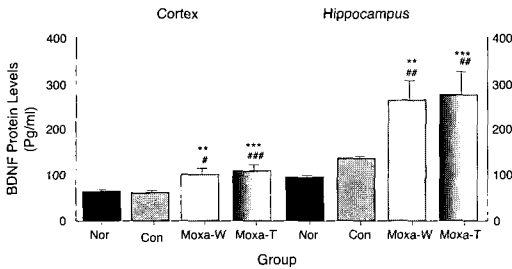


Fig. 7. Effects of *folium artemisiae argyi* herbal acupuncture of LR3 on expression of BDNF protein following transient forebrain ischemia. Levels of BDNF are measured in the cortex and the hippocampus at 48 hrs after ischemia. Values are means±SD. Number of group is 3. *significant difference from normal group (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), #significant difference from control group (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

51.47 pg/ml을 나타내어 정상군과 대조군에 비하여 모두 유의한 증가를 나타내었다 (Fig. 7).

고찰

腦卒中 (stroke)은 韓醫學의 名稱으로 中風으로 불리우며, 뇌혈관 질환으로 뇌혈관의 경색 또는 파열에 의해서 발생되며, 암, 심혈관질환 등과 함께 현대인에게 중요한 사망원인 중의 하나로 국제보건기구 (WHO)에서는 腦卒中을 “血管異常 外에는 뚜렷한 원인이 없이 24시간이상 지속하거나 사망으로 급속히 진행되는 국소적인 뇌기능 장애로 인한 임상증상으로 정의하고 있다¹¹⁾. 뇌혈관 질환은 뇌의 급격한 순환장애로 인하여 발생하는데, 대개 虛血性 뇌혈관 질환과 充血性 뇌혈관 질환으로 양분하며, 그 중 대부분은 虛血性 뇌혈관 질환이다¹²⁾. <<黃帝內經>>에서 “風者 百病之始也”라고 하여, 단순히 風이 질병의 원인이 되어 발생하는 다양한 증상을 언급하고 있었지만, 中風이라는 명칭이 뇌혈관질환과 연관지을 수 있었던 시기는 中國 宋代以後이다. 宋代以前에는 口眼喎斜, 皮膚病, 癩癧風, 精神疾患 등이 다수 風의 증상에 포함되어, 中風에 대한 인식이 腦血管疾患과 직접적인 연관을 맺지 못하였다. 宋代以後에 들어서면

서, 中風은 腦血管疾患의 범주로 축소되기 시작하였다. 中風의 四大症狀으로 偏枯, 風痺, 風謔, 風痲 등과 그 주요증상으로 卒中暴仆, 暴瘡, 口眼喎斜, 手足癱瘓, 人事不省, 言語蹇澁, 痰涎壅盛 등을 언급하며, 이에 관련한 病因病機, 藥物治療 및 鍼灸治療 연구들이 체계화되고 있으며, 아울러 실험적으로 검증되고 있다¹³⁾.

大腦의 虛血 및 酸化의 損傷에 대한 한의학적 치료법에 대한 연구들은 대부분 補陽還五湯이나 星香正氣散 등과 같은 韓藥處方이나 黃芩, 綠茶, 鈞鈎藤 및 天麻 등과 같은 韓藥材에 의한 예방 및 치료에 주로 집중되고 있다. 그러나, 최근 電鍼刺戟 및 電鍼刺戟이 虛血 損傷으로부터 신경손상을 보호할 수 있다는 연구들이 제시되고 있는데, Ou 등¹⁴⁾은 百會와 人中 사이에 가한 電鍼刺戟이 대뇌의 국소적 虛血 損傷 동물에서 basic fibroblast growth factor (bFGF)의 발현을 증가시킨다고 보고하였고, 金 등¹⁵⁾은 足三里에 가한 電鍼刺戟이 들쥐에서의 前腦 虛血 誘發로 나타난 齒狀回 (dentate gyrus)의 세포재생을 증가시킨다고 보고하였고, 金 등¹⁶⁾ 또한 環跳 電鍼刺戟에 의한 뇌세포사의 억제를 관찰하였다. 이에 반하여 艾葉을 통한 腦 虛血性 질환에 대한 효과나 中風과 관련한 동물 실험이나 임상실험은 아직까지 보고되지 않고 있으며, 더욱이 藥鍼療法과 관련하여, 대뇌허혈 손상에 대한 치료효과가 보고되지 않고 있다.

艾葉을 燃燒시킴으로써 生成되는 二次物質, 즉 燃燒生成物에 대한 研究는 加熱에 따른 艾葉의 成分 및 活性變化, 燃燒生成物에 대한 臨床의 效能 糾明을 가능케 하였다. 다만 최근 艾葉에서 다양한 성분과 효능에 대하여 연구되어지고 있는데, phellandrene, couprol, cadinene, cineol, repinen-4-ol, β -caryophyllene, linalool, artemisia acohol, camphor, bornol 등과 艾葉의 燃燒成分物에는 tricosanol, hentriacontane, arachinalkol, thujone, n-nonacosanne, n-hentriacontane, C37H76, tanine 및 그 이성체, catechol, 포화지방족탄화수소 등이 확인되었다¹⁷⁾. 아울러 최근 관심을 끄는 효능으로 돌연변이 억제현상, 혈소판 응집 억제작용¹⁸⁾ 및 항산화효과¹⁹⁾ 등이 보고되었다.

太衝 (LR)은 足厥陰肝經의 兪土穴이자 原穴로 足趾 本節後 2寸에 위치하고 있으며, 치료상 “治臟者, 治其兪”와 “五臟有疾也, 當取十二原”이라는 점에 근거하여 질병치료에 응용하게 된다. 특히, 原穴에 대한 刺戟은 原氣를 通達시키고, 正氣를 維持시킴으로서 病邪를 억제할 수 있게 하며, 또한 臟腑經絡의 虛實을 조절할 수 있게 한다는 특징이 있다. 이러한 점에서 太衝은 肝臟과 肝經의 虛實을 조절할 수 있다. 아울러 足厥陰肝經의 流注는 頭頂部까지 도달하고 있음을 알 수 있으며, 또한 이러한 流注의 특징과 肝藏血이라는 臟象學的 특징을 통해 中風治療에 활용되고 있다.

cFos 단백질은 일정한 자극에 의해 신경세포에서 발현되며, cJun, FosB, Fra-1, Fra-2 등^{18,19)}과 같은 Fos 계열의 단백질인 immediate early gene (IEG) 이다. cfos proto-oncogene은 다양한 자극에 반응하여 흥분되는 세포들과 그들의 경로를 확인하기 위한 기능적 또는 해부학적 표식자로 널리 사용되어져 왔다. 더욱이 cFos 단백질은 cJun 단백질과 결합으로 이량체 (dimer)를 형성하여, activator protein-1 (AP-1)로써 알려진 전사인자를 형성하여, 세포형질에 장기적인 영향을 주는 다른 종류의 이차적인 유전인자를 조절하게 된다²⁰⁾. cfos mRNA와 단백질은 정상조건에서는 거의 발현되지 않으나, 외부의 자극이 주어지면 몇분 내에 cfos mRNA가 유도되어 30-60분내에 가장 크게 증가되며, 이어서 cFos 단백질의 최고수준이 1~3시간 사이에 나타나게 되어 4~6시간까지 신경세포에서 점차 사라지는 과정을 보인다²¹⁾.

fosB 유전자와 단백질은 1989년에 설치류의 3T3 cDNA library로부터 Fos 계열의 3번째로 분리되었다. 설치류의 FosB 단백질은 334개의 아미노산으로 구성되어 있으며, Fra-1과 일정부분이 일치하지만, 72% 수준에서 c-Fos의 DNA-binding domain에서 동일한 부분이 있다²²⁾. FosB와 c-Fos는 그들의 promoter내에 유사한 조절 부위가 존재하는 것으로 추정되며, 이로 인하여 서로의 발현을 억제할 수 있다. 또한, FosB의 SRE는 cFos의 SRE에 비하여 자극에 대한 반응이 약하여, 비교적 신경계에서 cFos의 발현이 더 많은 것

으로 알려져 있다. 정상 상태에서 FosB는 주로 cortex의 layer II, IV, V 와 VI에 산재되어 있으며, 아울러 치상회의 背側에도 존재하는 것으로 보고되고 있으며, 유해성 자극을 가할 경우, 자극 후 2시간부터 발현되어 4~8시간까지 지속되는 것으로 보고되고 있다²³⁾. 또한 허혈성 손상에 노출될 경우에도 FosB의 발현이 증가되며²⁴⁾, 이러한 발현은 주로 해마의 CA1과 치상회에 제한되어 발현된다고 보고하였다²⁴⁾. 이는 FosB의 발현이 허혈성 손상으로 유발되는 신경세포 사멸과정의 정도를 이해하는 지표가 될 수 있음을 보여주는 것으로, 같은 Fos 계열인 cFos 역시 FosB와 마찬가지로 세포사멸의 정도를 측정하는 관찰대상이기도 하나 최근의 연구 경향을 볼 때 cFos의 발현이 신경세포 생존과정과 관련이 있음이 보고되고 있어, FosB와는 다른 각도에서 접근하여야 할 것으로 사료된다.

大腦虛血에 대한 반응으로 중추신경계내 신경세포는 immediate early gene의 일종인 cFos의 발현이 관련연구에서 제시되면서²⁴⁾, 虛血 損傷 後 cFos 발현의 기능적 의의에 대하여 많은 논란이 지속되었고, 대개의 경우 cFos와 그에 관련된 유전물질들이 신경손상에 관련하거나 신경세포의 죽음의 과정에서 유도된다고 주장하였다^{25,26)}. 그러나 최근 들어 cFos와 그와 관련된 gene들이 세포사에 관련되어 있다고 하더라도, 그 발현이 虛血 損傷으로부터 회복하는 필수적인 것이라는 연구가 제시되었다^{26,27)}. 아울러, 虛血 損傷 후 cfos antisense oligonucleotide를 사용하여 cFos의 발현을 억제한 실험에서 오히려 세포손상이 증가하고²⁹⁾, 損傷을 억제시키는 인자로 알려진 nerve growth factor (NGF)의 발현이 억제되는 것으로 밝혀졌다³⁰⁾. 또한, 15분 동안의 虛血과 재관류 후에 cFos는 CA3-4 영역의 방추형 신경세포에서 1-6시간동안 발현되었고, CA1에서는 거의 발현되지 않았으며, cJun은 4-48시간에 발현되었는데, 이러한 결과를 통하여 cFos와 cJun의 초기 발현되는 시공간적 특성을 고려할 때, 一過性 虛血에 의한 신경세포손상으로부터 방어하고 있는 상태를 보여주는 것이라 추정할 수 있다. 또한 cfos null mutant mice에서 신경독소가 더욱 악

화된다고 하며, Cho 등²⁷⁾은 신경손상 방어제제로 알려진 NAMDA (N-acetyl-O-methyl-dopamine)을 전처치하고 虛血 損傷을 유발하였을 때, cFos 단백질의 발현이 상향조정되는 것을 관찰함으로써 cFos의 신경세포방어작용에 대한 가능성을 넓히고 있다. 이와 관련하여, 해마부위에서 cFos 발현이 매우 크게 나타나는 변형 생쥐를 개발한 실험은 cFos가 BDNF의 발현을 조절한다는 것을 확인하였으며, 또한 세포흥분성과 생존을 증계하는 세포기전에 중요한 유전 조절인자라는 사실을 주장하였다²⁸⁾. 그리하여, cFos와 cJun의 결합에 의하여 형성된 AP-1 복합체가 NGF나 glial fibrillary associated protein (GFAP)을 조절할 수 있어, cFos의 발현이 다양한 손상으로부터 신경세포를 보호할 수 있다는 추정을 할 수 있도록 한다. 一過性 前腦 虛血 損傷은 해마의 CA1 방추형 신경세포들이 선택적으로 죽어가는 반면, CA2-3와 DG 신경세포는 부분적 損傷에 머무르며, 이 손상에서 cFos 발현은 초기에는 損傷에 대하여 저항적인 영역에서 전반적으로 확인되다가, 지연성 이차 발현에서는 오히려 손상이 심한 부위에서 발현되는 양상을 나타낸다. 이러한 점을 고려할 때 cFos 단백질의 발현은 虛血 損傷후 초기의 경우에서는 세포 생존을 위한 요소가 될 수 있다고 추정할 수 있다.

본 연구에서는 이러한 cFos 및 FosB 단백질 발현의 특징을 바탕으로, 一過性 前腦 虛血 損傷 후 흰쥐의 해마 및 대뇌피질 영역에서 cFos 및 Fos B 단백질 발현과 艾葉 藥鍼의 효과를 규명하고자 하였다. 그 결과, 一過性 前腦 虛血 損傷을 유발한 후 太衝 藥鍼 前處治 實驗群에서 水溶性 抽出物을 이용한 藥鍼群과 灸津 抽出物을 이용한 약침군에서 cFos 단백질이 대조군에 비하여 각각 유의하게 증가되었고, 水溶性 추출물과 灸津간의 발현량 비교에서도 水溶性 추출물이 뚜렷한 증가를 보여 주었다. 이와는 반대로, FosB 단백질 발현을 관찰한 결과에서는 太衝에 대한 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼과 灸津 抽出 艾葉 藥鍼에서 FosB 단백질 발현이 크게 억제되었는데, 이는 기존의 연구결과에서 설명하는 cFos 단백질과 FosB 단백질의 발현 양상의 차이를 고려할 때, 艾葉을 통한 太衝의 藥鍼 자극

이 효과적으로 작용됨을 보여준 것이라 추측할 수 있다. 이러한 결과는 해마부위 중 치상회 (DG)에서 一過性 前腦 虛血 損傷과 太衝에 대한 艾葉 藥鍼의 효과에서도 비슷한 양상을 나타내어 cFos 단백질 발현이 대조군에 비하여 증가된 경향을 가지었으나, 오히려 水溶性 추출 艾葉에 비하여 큰 영향을 받지 않는 것으로 관찰되었다. 반대로 齒狀回에서의 FosB 단백질 발현은 대조군에 비하여 유의하게 감소된 발현 양상을 나타내었다. 또한, 대뇌피질에서 대조군에 비하여 각각 증가하는 경향과 감소하는 경향을 나타내고 있었으나 이러한 경향성은 해마부위에 비하여 유의하게 관찰되지는 않았다. Retrosplenial cortex 과립층에서의 cFos 단백질 및 FosB 단백질의 발현을 관찰한 결과는 cFos 단백질의 발현이 대조군과 비교하여 뚜렷한 차이를 보이지 않은 반면, FosB의 발현은 灸津 艾葉 藥鍼群에서 대조군에 비하여 FosB 발현이 유의하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 cFos 단백질의 손상 초기 발현이 신경세포의 생존률을 높이는 데 영향을 미치며, 반대로 FosB 단백질의 발현은 신경세포의 사멸과정을 나타내는 것이라는 점을 근거로 할 때, 太衝에 주입한 艾葉 藥鍼 자극은 一過性 前腦 虛血 損傷을 예방하고, 치료하는 데 유익한 역할을 할 수 있음을 가정할 수 있다. 이러한 점을 보다 확신있게 증명하기 위하여, 본 연구에서는 다음에서 언급하는 BDNF 단백질 발현을 관찰하고자 하였다.

BDNF는 많은 종류의 neurotrophin들 중의 하나이며, 신경계의 발달과정에서 강력한 생존 및 분화작용을 수행하는 것으로 알려져 있다. BDNF를 포함한 많은 종류의 neurotrophin들은 성인들의 신경계에 매우 풍부하게 존재하지만, 역시 아직까지도 그 정확한 작용에 대하여서는 완전히 이해되지 않고 있다. 그러나, 간질성 발작, 외상성 손상, 저혈당성 혼수와 대뇌 허혈 손상과 같은 다양한 대뇌 손상은 다양한 前腦부위에서 BDNF의 합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 이러한 BDNF의 증가에 대한 기능이나 작용에 대하여서는 아직 명확한 단계는 아니지만, 기존의 많은 논문에 의하면 손상후 BDNF의 증가는 내재되어 있는 신경보호작용을 나타내는 것이며³⁰⁾, 또한

시냅스간 전달을 조절한다는 것을 보여주고 있다³⁴⁾.

본 연구에서는 초기발현 유전 단백질 cFos와 FosB 단백질의 발현을 통해 艾葉 藥鍼의 효과를 이해하기 위하여, 艾葉 藥鍼 前處治 後 유발된 一過性 前腦 虛血 損傷 흰쥐에서 48시간째 BDNF 단백질의 발현을 관찰하고 정량화 하였다. 그 결과, 대뇌피질에서는 정상군 (64.3 ± 1.32 pg/ml)에 비하여 虛血 損傷을 유발한 대조군 (61.16 ± 4.11 pg/ml)에서 약한 BDNF 단백질 발현의 감소가 관찰되었으나, 유의한 편은 아니었다. 그러나, 艾葉 藥鍼 前處治 실험군에서는 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼群에서 102.33 ± 13.65 pg/ml로 BDNF 단백질의 유의한 증가를 나타내었으며, 灸津 艾葉 藥鍼群에서도 109.54 ± 9.37 pg/ml로 역시 유의한 증가를 나타내었다. 해마부위에서는 정상군에서는 94.65 ± 0.82 pg/ml의 BDNF가 정량화되었으며, 대조군에서는 134.07 ± 2.96 pg/ml로 정상군에 비하여 유의하게 증가된 BDNF 단백질을 관찰할 수 있었다. 艾葉 藥鍼에서도 유의한 증가를 관찰하였는데, 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼群에서는 263.26 ± 44.56 pg/ml을 나타내었으며, 灸津 艾葉 藥鍼群에서는 275.35 ± 51.47 pg/ml을 나타내어 정상군과 대조군에 비하여 모두 유의한 증가를 나타내었다.

이상의 결과를 토대로 BDNF 단백질과 관련된 기존의 연구 결과를 살펴보면, 대뇌의 허혈성 손상이후 손상에 대하여 저항성을 지닌 신경세포 영역에서 BDNF, phosphorylated cyclic AMP-response element-binding protein (pCREB)과 PGHS-2의 수치가 크게 증가한다는 사실을 보고하면서, 이들이 신경보호작용을 하는데 중요한 역할을 함을 주장하였다³⁵⁾. 이러한 BDNF의 증가는 pCREB와 더불어 허혈성 손상 후 48-72 시간에서 가장 크게 증가하며, 특히 해마 부위중 허혈 손상에 대하여 저항성이 높은 신경세포로 구성되어진 치상회에서 증가하는 반면, 허혈 손상에 취약한 CA1 영역에서는 BDNF나 pCREB이 감소하는 것을 보였고, 아울러 48 시간이후에서 cFos 발현이 증가된다고 보고하였다³⁶⁾. 최근의 한 연구에서는 calcineurin의 길항제인 cyclosporin의 투여가 전뇌허혈 손상 후 해마의 CA1 영역에서 나타나는 신경세포

사를 개선시킨다는 사실을 BDNF의 발현량을 토대로 관찰하기도 하였는데³⁷⁾, 이는 BDNF가 CREB에 의하여 조절되어 생존이나 발생단계에 강력한 역할을 한다는 사실에 기인하는 것이다. 이를 바탕으로 cyclosporin A가 calcineurin을 억제하여 pCREB을 유도하고, 결국은 BDNF의 유도를 초래한다는 가설을 세우게 된다. 그리하여, 우리는 다음과 같은 몇가지 사실을 이해할 수 있는데, 즉 대뇌의 일과성 허혈손상은 해마부위에서 특히 취약성을 지닌 CA1 영역에서 세포사가 쉽게 발생되어지며, 이러한 세포사 억제에 관하여 내재적으로 존재하는 BDNF의 활성이 중요하다라는 것을 확인할 수 있다. 그럴 경우, 본 연구 결과에서처럼 太衝에 적용한 艾葉 藥鍼 자극이 단순히 虛血 損傷을 유발한 대조군에 비하여 유의하게 증가된 BDNF의 생성을 촉발한다는 것은 허혈 손상으로 부터 신경세포를 보호하고 신경세포의 사멸과정을 억제한다는 것을 의미하는 것이라 추정할 수 있다.

이상의 연구 결과를 종합하여 볼 때, 흰쥐에서 유발된 一過性 前腦 虛血 損傷이 艾葉 抽出物을 이용한 太衝 부위 藥鍼 刺戟에 의하여 손상 정도가 완화되었다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 효과에 대하여, 보다 다양한 접근방법을 통한 규명이 필요하며, 현재로서는 艾葉 抽出物이 가지는 抗酸化 效果가 가장 큰 영향을 미쳤을 것이라는 추측을 하게 된다. 그러한 이유로는 본 연구와는 별도로 진행된 예비연구 결과에서 항산화 효과 테스트에서 水溶性 抽出物과 灸津 抽出物에서 매우 강한 항산화 작용이 나타났기 때문이다. 그러나, 일회성 약침자극에 의한 허혈 손상 예방 및 치료가 단순히 항산화 효과로만 설명되기에는 신경세포 사멸과정 및 차단의 복잡성을 고려할 때 여러 측면의 연구가 필요하리라 사료된다.

결 과

艾葉 藥鍼의 신경보호 및 방어작용 기전을 규명하기 위하여 一過性 前腦 虛血 損傷 후 太衝에 藥鍼하여 해마 및 대뇌피질영역에서 cFos, Fos B 및 BDNF 단백질 발현 양상을 관찰하여 다음과 같은 結論을

얻었다.

1. 一過性 前腦 虛血 損傷 유발 2시간 후, 해마부위 중 CA1 영역과 齒狀回的 cFos 단백질발현은 실험군(Moxa-W, Moxa-T)이 대조군에 비하여 각각 유의하게 증가되었고, Moxa-W 군이 Moxa-T군에 비하여 뚜렷한 증가를 보였다.
2. 一過性 前腦 虛血 損傷으로 해마부위 중 CA1 영역과 齒狀回的 FosB 단백질 발현이 크게 증가하였으나 실험군에서는 유의하게 억제되었다.
3. 실험군의 대뇌 피질의 cFos 단백질발현은 대조군에 비하여 증가하였으며, FosB 단백질발현은 대조군에 비하여 감소의 경향을 보였다.
4. 一過性 前腦 虛血 損傷 유발 48시간에 정상군과 대조군의 대뇌피질 BDNF 단백질발현은 감소하였으나 실험군에서는 유의한 증가를 보였다.
5. 一過性 前腦 虛血 損傷 유발 48시간에 대조군의 해마 부위 BDNF 단백질발현은 정상군에 비하여 유의하게 증가를 보였다. 실험군의 해마 부위 BDNF 단백질발현이 정상군과 대조군에 비하여 모두 유의한 증가를 보였다.

以上の結果를 종합하면, 太衝 艾葉 藥鍼이 一過性 前腦 虛血 損傷을 예방하고 치료하는데 效果의이였으며, 艾葉의 抽出 方式에 따라 대뇌 부위별 cFos, FosB 및 BDNF 단백질발현에 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 全國韓醫科大學 鍼灸,經穴學教室 編著. 鍼灸學. 서울: 集文堂. 1994:667-668.
2. 全國韓醫科大學本草學教授共編著. 本草學. 서울: 永林社. 1995:405-406.
3. 林鍾國. 鍼灸治療學. 서울: 集文堂. 2001:233-235.
4. Tsutomu U, Hiroshi K, Zenichi O. Antiinflammatory effect of extract from Phellodendri cortex. J. Med. Pharma. Society for WAKAN-YAKU. 1989;6:158-164.
5. 大西基代, 戶田靜男, 菅田良仁, 東家一雄, 黑巖共一, 木村通郎. 艾葉의 燃燒 生成物이 過酸化脂質에 미치는 작용. 全日本鍼灸學會誌. 1990;40(2):228-231.

6. Chiba A, Nakanishi H, Chichibu S. Thermal and antiradical properties of indirect moxibustion. Am J Chin Med. 1997;25(3-4):281-287.
7. 김수범. 中風의 藥鍼療法. 藥鍼學會誌. 1997;1(1):126-137.
8. 윤성목, 임종국. 에엽 약침액의 급성, 아급성 독성에 관한 연구. 大韓鍼灸學會誌. 2000;17(1):143-151.
9. Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. Stroke. 1988;19(7):913-914.
10. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. J Neurol Sci. 2000;179(1-2):1-33.
11. Waltimo O, Kaste M, Aho K, Kotila M. Outcome of stroke in the Espoo-Kauniainen area, Finland. Ann Clin Res. 1980;12(6):326-330.
12. 김영석. 임상중풍학. 서울:서원당. 1997:303-8, 317-329.
13. 常青. 實用中風防治手冊. 北京:中國中醫藥出版社. 1993:24-25, 46.
14. Ou YW, Han L, Da CD, Huang YL, Cheng JS. Influence of acupuncture upon expressing levels of basic fibroblast growth factor in rat brain following focal cerebral ischemia-evaluated by time-resolved fluorescence immunoassay. Neurol Res. 2001;23(1):47-50.
15. Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, Huh Y, Chung JH, Seo JC, Kang JE, Lee HJ, Yim SV, Kim CJ. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. Neurosci Lett. 2001;297(1):21-24.
16. 김풍식, 김재효, 최동욱, 김경식, 손인철. 一過性 前腦 虛血 損傷에 대한 環跳(GB30) 電鍼刺戟의 效果. 大韓 經絡經穴學會誌. 2002;19(1):35-46.
17. 지형준, 이상인. 대한약전의 한약(생약)규격집 주해서. 서울:한국메디칼인텍스사. 1989:242-243.
18. Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature. 1984;311(5985):433-438.
19. Kovacs KJ. c-Fos as a transcription factor : a stressful (re)view from a functional map. Neurochem. Int.

- 1998;33(4):287-297.
20. Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. 1990;4(4):477-485.
 21. Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*. 1995;64(2):477-505.
 22. Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB / ATF proteins. *Brain Res Rev*. 1998;28(3):370-490.
 23. Herdegen T, Tolle T, Bravo R, Zieglgansberger W, Zimmermann M. Sequential expression of JUN B, JUN D and FOS B proteins in rat spinal neurons: cascade of transcriptional operations during nociception. *Neurosci. Lett*. 1991;129(2):221-224.
 24. 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(6):914-924.
 25. Preston GA, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, Srinivasan DG, Alcorta DA, Barrett JC. Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Mol Cell Biol*. 1996;16(1):211-218.
 26. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe? *Stroke*. 1996;27(9):1682-1687.
 27. Cho S, Park EM, Kim Y, Liu N, Gal J, Volpe BT, Joh TH. Early c-Fos induction after cerebral ischemia: a possible neuroprotective role. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(5):550-556.
 28. Hafezi F, Steinbach JP, Marti A, Munz K, Wang ZQ, Wagner EF, Aguzzi A, Reme CE. The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat Med*. 1997;3(3):346-349.
 29. Zhang Y, Widmayer MA, Zhang B, Cui JK, Baskin DS. Suppression of post-ischemic-induced fos protein expression by an antisense oligonucleotide to c-fos mRNA leads to increased tissue damage. *Brain Res*. 1999;832(1-2):112-117.
 30. Cui JK, Hsu CY, Liu PK. Suppression of postischemic hippocampal nerve growth factor expression by a c-fos antisense oligodeoxynucleotide. *J Neurosci*. 1999; 19(4):1335-1344.
 31. Zhang JH, Zhang DS, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M. c-fos regulates neuronal excitability and survival. *nature genetics*, 2002;30:416-420.
 32. Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci*. 1994;17(11):490-496.
 33. Schabitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2000;31(9):2212-2217.
 34. Tanaka T, Saito H, Matsuki N. Inhibition of GABAA synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J. Neurosci*. 1997;17(9):2959-2966.
 35. Walton M, Connor B, Lawlor P, Young D, Sirimanne E, Gluckman P, Cole G, Dragunow M. Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res Brain Res Rev*. 1999;29(2-3):137-168
 36. Marshall R. Walton and Mike Dragunow. Is CREB a key to neuronal survival? *Trend in Neuroscience*. 2000;23-2:48-53.
 37. Miyata K, Omori N, Uchino H, Yamaguchi T, Isshiki A, Shibasaki F. Involvement of the brain-derived neurotrophic factor/TrkB pathway in neuroprotective effect of cyclosporin A in forebrain ischemia. *Neuroscience*. 2001;105(3):571-578.