

六君子湯이 腦虛血에 미치는 억제 효과

김희성 · 이상록 · 정현우*

동신대학교 한의과대학 병리학교실

The Inhibitive Effects of Yukgunja-tang on the Cerebral Ischemia

Hee Seong Kim, Sang Lock Lee, Hyun Woo Jeong*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Dongshin University

This experimental study was designed to investigate the effects of Yukgunja-tang(YGJT) on the inhibition of cerebral ischemia in rats. And We measured regional cerebral blood flow(rCBF) and pial arterial diameter(PAD) in cerebral ischemic rats, and cytokines production in serum of cerebral ischemic rats.

The results were as follows ; Both rCBF and PAD were significantly and stably increased by YGJT(10 mg/kg, i.p.) during the period of cerebral reperfusion, which contrasted with the findings of rapid and marked increase in control group. In cytokine production of serum by drawing from femoral arterial blood after middle cerebral arterial occlusion(MCAO) 1 hr, IL-1 β and TGF- β production of sample group were similar to that of control group, but sample group was decreased TNF- α production compared with control group, and was significantly increased IL-10 production in compared with control group. In cytokine production of serum by drawing from femoral arterial blood after reperfusion 1 hr, sample group was significantly decreased IL-1 β and TNF- α production compared with control group, but TGF- β production of sample group was similar to that of control group, and sample group was significantly increased IL-10 production compared with control group. In cytokine production of serum by drawing from femoral arterial blood after reperfusion 4 hrs, sample group was significantly decreased IL-1 β production compared with control group, and sample group was decreased TNF- α production in compared with control group, but TGF- β production of sample group was similar to that of control group, and sample group was increased IL-10 production compared with control group. This results were suggested that YGJT has inhibitive effect on the brain damage by inhibited IL-1 β production and TNF- α production, but accelerated IL-10 production. We thought that YGJT should have an anti-ischemic effect through the improvement of cerebral hemodynamics and inhibitive effect on the brain damage.

Key words : Yukgunja-tang(六君子湯), cerebral ischemia, regional cerebral blood flow, pial arterial diameter, cytokines production, brain damage

서 론

六君子湯은 虞¹⁾가 “痰挾氣虛發飪”을 치료한다라고 한 이래 許²⁾는 氣虛痰盛에, 張³⁾은 “以肥人多氣虛也 … 然肥人多濕多滯”에 사용된다하였다. 뇌는 심장으로부터 박출되는 혈액의 공급을 받아 산소와 포도당 등의 영양물질을 얻음으로써 제 기능을 수행하지만⁴⁻⁵⁾ 만약 뇌로 공급되는 혈류(50 ml/100 g/min)⁶⁾가 10 ml/100 g/min이하로 감소하게 되면 허혈성 뇌손상이 발생해

glutamate의 과잉분비로 일련의 대사물질이 생성되거나 침착하게 됨으로써 뇌신경세포 사멸 및 운동마비·지각마비 등을 포함한 신경학적 증상들이 출현하게 된다⁷⁻¹¹⁾.

최근, 노년인구의 증가 등으로 뇌에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 趙 등¹²⁾은 牛黃清心元을, 金 등¹³⁾은 星香正氣散을, 任 등¹⁴⁾은 滋陰健脾湯加枳殼·天麻를, 李 등¹⁵⁾은 靑皮 분획물을 이용하여 중대뇌동맥 폐색으로 인한 뇌허혈 병태 모델에 미치는 항허혈 효과 및 작용기전을 보고하였고, 六君子湯에 대한 연구로는 장 등¹⁶⁾이 위액분비 및 적출 위 운동에 대하여, 강 등¹⁷⁾이 손상된 비장조직의 회복효과에 대하여, 정 등¹⁸⁾은 guanylate cyclase와 관련되어 뇌혈류역학의 변화를 개선시키고, 신경세포

* 교신저자 : 정현우, 전남 나주시 대호동 252, 동신대학교 한의과대학
· E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr Tel : 061-330-3524
· 접수 : 2004/01/07 · 수정 : 2004/03/08 · 채택 : 2004/03/22

의 LDH 양을 억제함으로써 허혈로 인한 뇌손상을 억제할 수 있을 것이라 보고하였을 뿐 뇌허혈시 나타나는 뇌혈류역학 변동 개선효과 및 뇌손상시 분비되는 각종의 사이토카인에 대한 억제 효과에 대해서는 아직까지 보고되지 않았다.

이에 저자들은 본방이 뇌허혈로 인한 뇌손상이 발생되었을 때 효과가 있을 것으로 생각되어 뇌허혈시 변동되는 국소 뇌혈류량 및 뇌연막 동맥 직경에 미치는 개선 효과를 관찰하고, 허혈 당시보다는 허혈이 일어난 조직으로 산소가 재공급될 때 염증반응이 더욱 진행되기 때문에¹⁹⁻²¹⁾ 뇌허혈 동물의 혈액내에서 생성되는 염증촉발 사이토카인과 항염증 사이토카인의 생성능을 측정할 결과 유의성을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

동물은 체중 300 g내외의 음성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 (주)다물사이언스 및 화인 실험동물센터로부터 구입하여 항온습습 장치가 부착된 사육장에서 고형사료(삼양주식회사, Korea)와 1차 증류수를 충분히 공급하면서 실험실 환경(실내온도 24±2 °C, 습도 55±5 %, 12 시간 drak/light)에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약재

실험에 사용된 약재는 동신대학교 부속광주한방병원에서 구입한 후 정선해서 사용하였고, 六君子湯의 구성약물은 『方藥合編』에 수록된 처방을 근거로 하였으며, 분량 및 생약명은 다음과 같다(Table 1)^{22,23)}.

Table 1. Prescription of Yukgunja-tang(YGJT)

Herbs	Quantity(g)
半夏 Pinelliae Rhizoma	6.000
白朮 Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	6.000
人蔘 Ginseng Radix	4.000
白茯苓 Poria	4.000
陳皮 Aurantii nobilis Pericarpium	4.000
炙甘草 Glycyrrhizae Radix	2.000
生薑 Zingibers Rhizoma Recens	11.000
大棗 Jujubae Fructus	8.000
Totally	45.000

2. 방법

1) 검액의 조제

六君子湯(Yukgunja-tang, YGJT) 1첩 분량(45.0 g)을 3,000 ml 환저 플라스크에 증류수 1,500 ml와 함께 120 분간 가열한 다음 전탕액을 여과지로 여과한 뒤 5,000 rpm으로 30 분간 원심분리하였다. 그 후 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)에 넣어 감압농축한 후 Freeze dryer(SFDSM 06, Korea)로 동결건조시켜 9.8 g(수득율 21.78 %)을 얻었다.

2) 뇌허혈 병태모델 유발

뇌허혈의 병태 모델 유발은 널리 사용하는 중대뇌동맥

(middle cerebral artery, MCA) 폐쇄법을 이용하였다. 병태 모델은 Longa 등의 방법²⁴⁾에 따라 흰쥐의 총경동맥과 외경동맥을 결찰하고 내·외경동맥의 분지점으로부터 내경동맥내로 외경동맥을 통하여 3-0 단선조 나일론 봉합사를 삽입함으로써 MCA 기저부를 폐쇄하였다. 2 시간 후 내경동맥내에 삽입되어 있는 단선조 나일론 봉합사를 MCA 기저부로부터 제거해 줌으로써 혈액을 재관류시켰다.

3) 뇌허혈 병태 모델의 국소 뇌혈류량 변동 측정

흰쥐를 stereotactic frame(DKI, U.S.A.)에 고정시키고 정중선을 따라 두피를 절개하여 두정골을 노출시킨 후 bregma의 4~6 mm 측방, -2~1 mm 전방에 직경 5~6 mm의 두개창 수술을 시행하였다. 이때 두개골의 두께를 최대한 얇게 남겨 경막의 출혈을 방지하도록 하였다. Laser doppler flowmeter (Transonic Instrument, U.S.A.)용 needle probe(직경 0.8 mm)를 대뇌(두정엽) 피질 표면에 수직이 되도록 stereotactic micromanipulator를 사용하여 뇌연막 동맥에 조심스럽게 근접시켜 국소 뇌혈류량 (regional cerebral blood flow, rCBF)을 측정하였다. 일정시간 동안 안정시킨 후 2)와 같은 방법으로 뇌허혈 병태 모델을 유발시킨 후 실험 protocol에 따라 YGJT(10 mg/kg, i.p.)을 투여하였다. 병태모델 유발 2 시간 후 혈류를 재관류시킨 다음 4 시간 측정하였다²⁵⁾.

4) 뇌허혈 병태 모델의 뇌연막 동맥 직경 변동 측정

(1) 폐쇄 두개창 설치

흰쥐의 체위를 복외위로 변경시키고 두부를 stereotactic frame에 고정시킨 다음 정중선을 따라 두피를 절개한 후 두개골의 관상 봉합 미측 두정골에 saline-cooled drill(Dremel, USA)을 사용하여 craniotomy(5×5 mm)를 시행하였다. 뇌경막과 지주막을 절개하여 제거함으로써 뇌연막 표면을 노출시키고, craniotomy 주위를 dental acrylic으로 둘러싼 후 dental acrylic mount속에 세 개의 polyethylene tube(두 개는 관류용, 나머지 한 개는 두개내압 측정용)를 삽입 놓았다. 그 후 dental acrylic위에 직경 12 mm의 cover glass를 놓고 cyanoacrylate를 사용하여 즉시 밀봉시킨 후 95 % O₂와 5 % CO₂로 포화시킨 인공 뇌척수액을 관류시켰다. 이때 두개창의 용적은 약 0.8 ml, 그리고 두개내압은 5~8 mmHg로 유지토록 하였다²⁶⁾.

인공 뇌척수액의 조성은 다음과 같다 : Na⁺ 156.5 mEq/ℓ, K⁺ 2.95 mEq/ℓ, Ca²⁺ 2.5 mEq/ℓ, Mg²⁺ 1.33 mEq/ℓ, Cl⁻ 138.7 mEq/ℓ, HCO₃⁻ 24.6 mEq/ℓ, dextrose 66.5 mg/dℓ 및 urea 40.2 mg/dℓ(pH 7.35~7.40).

(2) 뇌연막 동맥 직경 변동 측정

흰쥐의 두정골에 4)-①과 같이 폐쇄 두개창을 설치하고, 2)와 같이 뇌허혈 병태 모델을 유발시킨 후 실험 protocol에 따라 YGJT(10 mg/kg, i.p.)을 투여하였다. 병태모델 유발 2 시간 후 혈류를 재관류시켜 변동되는 뇌연막 동맥 직경(pial arterial diameter, PAD)을 4 시간 측정하였다²⁷⁾. 실험기간 동안 변화되는 PAD는 폐쇄 두개창을 통한 video-microscopy 방법과 width analyzer(Model C3161, Hamamatsu Photonics, Japan)를 사용하여 TV monitor에 나타나는 혈관 영상을 video cassette

recorder(S-VHS, Mitsubishi)에 녹화 보존해 두었다가 필요시마다 재생 확인하였다.

5) 뇌허혈 병태 모델의 혈청내 cytokines 생성능 측정

(1) 채혈 및 혈청분리

2)와 같이 뇌허혈 병태 모델을 유발시킨 다음 폐색 1 시간 후, 재관류 1 시간 후 그리고 재관류 4 시간이 경과한 다음 병태 모델의 대퇴동맥에서 1.0 ml를 채혈하였다. 채혈시에는 반드시 뇌혈류역학 변동이 변화되지 않도록 하기 위하여 조심스럽게 5.0 ml 주사기를 통해 채혈하였고, 만약 채혈시 뇌혈류역학 변동에 이상이 발생되면 cytokine 생성능 측정 혈청으로 사용하지 않았다. 채혈 후 30 분 동안 실온에 방치한 후 3,000 rpm으로 30 분 동안 원심분리시킨 후 혈청만을 취해 냉동 보관하면서 필요시마다 해동시켜 사용하였다.

(2) Interleukin(IL)-1β 생성능 측정

허혈성 병태 모델의 혈청내에서 생성되는 IL-1β 양 측정은 rIL-1β ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 rIL-1β Standard diluent buffer(SDB) 100 μl를 농도별로 넣은 후, 나머지 well에는 혈청 50 μl와 SDB 50 μl를 넣은 다음 실온에서 3 시간 동안 방치한 뒤 washing buffer(WB)로 4 회 세척하였다. 이후 각 well에 Biotin-labeled anti-rIL-1β 100 μl를 넣은 후 실온에서 1 시간 동안 방치한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 각 well에 Streptavidin-Peroxidase(HRP) 100 μl를 넣은 다음 실온에서 30 분 동안 방치한 뒤 WB로 4 회 세척한 후 Stabilized chromogen(SC) 100 μl를 넣은 다음 빛을 차단시킨 실온에서 30 분 동안 방치하였다. 이후 Stop solution(SB) 100 μl를 넣은 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다

(3) Tumor necrosis factor(TNF)-α 생성능 측정

허혈성 병태 모델의 혈청내에서 생성되는 TNF-α 양 측정은 rTNF-α ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 rTNF-α SDB 50 μl를 농도별로 넣은 다음, 나머지 well에 혈청과 control(high, low)를 각각 50 μl씩 분주한 후 SDB 50 μl를 넣었다. 이후 각 well에 Biotin-labeled anti-rTNF-α 50 μl를 넣고 실온에서 90 분 동안 incubation한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해놓은 HRP를 각 well에 100 μl씩 분주한 다음 다시 실온에서 45 분 동안 incubation한 후 WB로 4 회 세척하였다. 그 다음 SC를 각 well에 100 μl씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 SS를 각 well에 100 μl씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다

(4) IL-10 생성능 측정

허혈성 병태 모델의 혈청내에서 생성되는 IL-10 양 측정은 rIL-10 ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 SDB 100 μl씩 분주한 후 나머지 well에 혈청과 control(high, low)를 각각 50 μl씩 분주한 다음 SDB 50 μl를 넣었다. 이후 각 well에 Biotin-labeled anti-rIL-10 50 μl를 넣고 실온에서 2 시간 동안 incubation한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해놓은 HRP를 각 well에 100 μl씩 분주한 다음 다시 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 WB로 4 회 세척하였다. 그 다음 SC를 각 well에 100 μl씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30 분 동

안 incubation한 후 SS를 을 각 well에 100 μl씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다³²⁻³³).

(5) Transforming growth factor(TGF)-β 생성능 측정

허혈성 병태 모델의 혈청내에서 생성되는 TGF-β 양 측정은 TGF-β1 ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 SDB 200 μl씩 분주한 후 나머지 well에 혈청과 control를 각각 200 μl씩 넣은 다음 각 well에 Biotin-labeled anti-TGF-β1 50 μl를 분주한 후 실온에서 3 시간 동안 incubation한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해놓은 HRP를 각 well에 100 μl씩 분주한 다음 다시 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 WB로 4 회 세척하였다. 그 다음 SC를 각 well에 100 μl씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 SS를 각 well에 100 μl씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다³⁴⁻³⁵).

3. 통계처리

YGJT의 효과에 대한 통계처리는 Student's paired and/or unpaired t-test에 의하였고, p-value는 0.05 이하인 경우에만 유의성을 인정하였다³⁶).

실험성적

1. YGJT가 뇌허혈 병태모델의 생리학적 변수에 미치는 영향

YGJT(10 mg/kg, i.p.)가 뇌허혈-재관류 동안에 뇌허혈 병태 모델의 생리학적 변수(MABP, HR, pH, 동맥혈의 산소 분압, 동맥혈의 이산화탄소 분압 및 직장내 온도 등)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 뇌허혈 전과 뇌허혈 1 시간 후 그리고 혈액 재관류 6 시간 후의 생리학적 변수를 측정하였다(Table 2). YGJT를 투여하지 않은 상태에서 각각의 시간대별로 측정된 결과를 대조군으로 하였을 때, YGJT를 투여하였을 때의 병태 모델 생리학적 변수는 대조군과 유사한 상태를 유지하였다.

Table 2. Changes of YGJT on the physiological parameters in cerebral ischemic rats

Groups	MABP (mmHg)	HR (bpm)	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	Rectal temperature (°C)
Control						
Before ischemia	109±2	411±14	7.43±0.02	82±2	44±1	37.0±0.2
1 hr after ischemia	108±3	422±15	7.44±0.02	82±3	44±2	37.3±0.2
6 hr after reperfusion	107±5	411±12	7.43±0.02	83±3	43±2	37.2±0.1
YGJT						
Before ischemia	110±4	415±13	7.42±0.02	81±3	42±2	37.1±0.2
1 hr after ischemia	107±5	420±12	7.43±0.03	82±2	44±1	37.0±0.2
6 hr after reperfusion	107±4	414±14	7.41±0.03	82±2	43±1	37.1±0.1

YGJT : Yukgunja-tang extract Data are expressed as mean±SE., PaO₂ : partial pressure of oxygen in arterial blood, PaCO₂ : partial pressure of carbon dioxide in arterial blood, MABP : mean arterial blood pressure., HR : heart rate.

2. YGJT가 뇌허혈 병태 모델의 뇌혈류역학 변동에 미치는 개선 효과

1) YGJT가 국소 뇌혈류량 변동에 미치는 개선 효과

뇌허혈 병태 모델의 rCBF 변동에 미치는 YGJT의 개선효과를 관찰하기 위하여 MCA폐쇄법으로 뇌허혈 병태 모델을 유발

시킨 다음 YGJT(10 mg/kg, i.p.)를 투여하여 뇌허혈-재관류 후에 변동되는 rCBF를 관찰하였다(Fig. 1).

정상 흰쥐의 rCBF를 100.00±0.07 %라 하였을 때, 뇌허혈 상태 대조군의 rCBF 변동은 뇌허혈 2 시간 동안 각각 27.97±0.11 %, 30.35±0.15 %, 30.67±0.15 %, 32.57±0.16 %로 차단되었다. 그러나 대조군의 rCBF 변동은 재관류 후 1 시간 30 분동안 기저치보다 각각 158.10±0.08 %, 161.13±0.08 %, 169.45±0.08 %로 불안정한 증가상태를 나타내었고, 이후 재관류 시간이 경과될수록 각각 168.45±0.07 %, 139.66±0.07 %, 122.53±0.08 %, 121.19±0.12 %, 114.55±0.15 %로 감소되는 경향을 보였다. 그러나 기저치보다는 증가되었다.

정상 흰쥐의 rCBF를 100.00±4.26 %라 하였을 때, YGJT를 투여한 뇌허혈 상태 실험군의 rCBF 변동은 뇌허혈 2 시간 동안 각각 32.80±7.15 %, 37.17±6.66 %, 36.97±7.18 %, 36.22±5.38 %로 차단되었고, 재관류 후에는 기저치보다 2 시간 동안 각각 105.00±5.00 %, 108.80±5.61 %, 106.10±10.53 %, 101.00±6.68 %로 증가되었지만 이후 재관류 시간이 경과될수록 실험군의 rCBF 변동은 각각 99.40±5.61 %, 96.90±5.27 %, 95.40±4.18 %, 94.00±3.27 %로 기저치보다 감소되었다. 실험군의 rCBF 변동은 대조군의 불안정한 rCBF 변동에 비해서 유의성(P<0.01)있고 안정적으로 개선되었다.

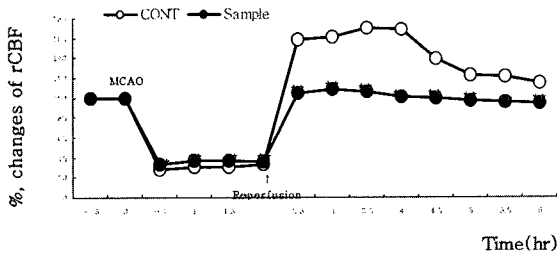


Fig. 1. Effects of YGJT on the rCBF response in cerebral ischemic rats. YGJT : Cheonmabanhwa-tang extract, MCAO : middle cerebral artery occlusion, Control : After caused MCAO(5 min), YGJT non-treated group. Sample : After caused MCAO, YGJT(10 mg/kg, i.p.) treated group. rCBF : regional cerebral blood flow. * : Statistically significance compared with Control group(* : P<0.05).

2) YGJT가 뇌연막 동맥 직경 변동에 미치는 개선 효과

뇌허혈 병태 모델의 PAD 변동에 미치는 YGJT의 개선효과를 관찰하기 위하여 MCA폐쇄법으로 뇌허혈 병태 모델을 유발시킨 다음 YGJT(10 mg/kg, i.p.)를 투여하여 뇌허혈-재관류 후에 변동되는 PAD를 관찰하였다(Fig. 2).

정상 흰쥐의 PAD를 100.00±0.11 %라 하였을 때, 뇌허혈 상태 대조군의 PAD 변동은 뇌허혈 2 시간 동안 각각 55.17±0.12 %, 52.03±0.13 %, 51.07±0.09 %, 50.31±0.07 %로 차단되었고, 재관류 후에는 기저치보다 각각 180.07±0.15 %과 166.54±0.22 %로 불안정한 확장상태를 나타내었다. 이후 재관류 시간이 경과될수록 각각 142.04±0.25 %, 138.08±0.23 %, 133.41±0.21 %, 118.65±0.16 %, 117.08±0.10 %, 112.42±0.11 %로 감소되었지만 기저치보다는 확장된 PAD 변동을 나타내었다.

정상 흰쥐의 PAD를 100.00±0.14 %라 하였을 때, YGJT를 투

여한 뇌허혈 상태 실험군의 PAD 변동은 뇌허혈 2 시간 동안 각각 56.81±0.07 %, 60.84±0.08 %, 57.35±0.08 %, 58.73±0.09 %로 차단되었고, 재관류 후에는 2 시간 동안 기저치보다 각각 102.72±0.12 %, 115.82±0.13 %, 116.23±0.13 %, 121.54±0.15 %로 확장되었으나 이후 재관류 시간이 경과될수록 실험군의 PAD 변동은 각각 116.23±0.14 %, 104.40±0.10 %, 104.59±0.11 %, 96.18±0.09 %로 수축되었다. 실험군의 PAD 변동은 대조군의 불안정한 PAD 변동에 비해서 유의성(P<0.05)있게 안정적으로 개선되었다.

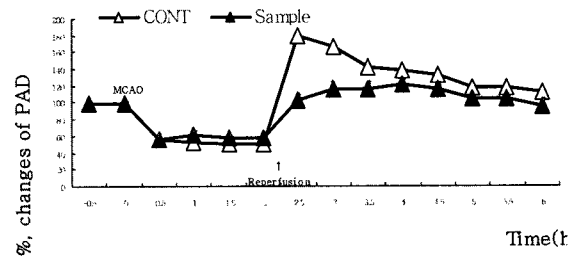


Fig. 2. Effects of YGJT on the PAD response in cerebral ischemic rats. PAD : pial arterial diameter. Other legends are the same as Fig. 1. * : Statistically significance compared with Control group(* : P<0.05).

3. YGJT가 뇌허혈 병태 모델의 혈청에서 생산되는 사이토카인 양에 미치는 효과

1) MCA 폐쇄 1 시간 후 생산되는 사이토카인 양에 미치는 효과
 뇌허혈 병태 모델의 혈청에서 생산되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 MCA 폐쇄법으로 뇌허혈을 유발시킨 후 YGJT를 투여하고, 유발 1 시간이 경과된 다음 뇌허혈 병태 모델의 혈액을 취하여 사이토카인 생성능을 측정하였다(Fig. 3).

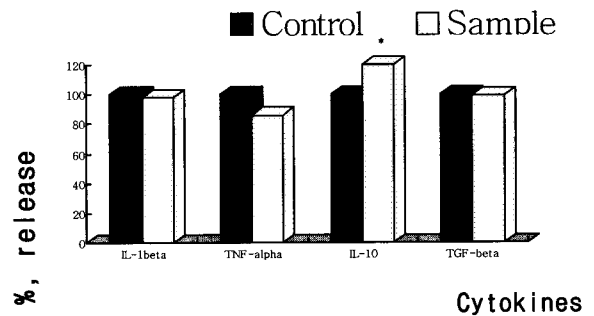


Fig. 3. Effects of YGJT on the cytokines production in serum of cerebral ischemic rats after MCAO 1 hr. This figure is cytokines production of serum by drawing from femoral arterial blood after MCAO 1 hr. Other legends are the same as Fig. 1. * : Statistically significance compared with Control group(* : P<0.05).

대조군의 IL-1β 생성능을 100.00±0.03 %라 하였을 때 실험군의 IL-1β 생성능은 98.18±0.03 %로 대조군과 유사하게 나타났고, 대조군의 TNF-α 생성능을 100.00±0.04 %라 하였을 때 실험군의 TNF-α 생성능은 85.96±0.07 %로 대조군에 비해 감소되었다. 대조군의 IL-10 생성능을 100.00±0.11 %라 하였을 때 실험군의

IL-10 생성능은 137.08 ± 0.08 %로 대조군보다 유의성($P < 0.05$)있게 증가되었고, 대조군의 TGF- β 생성능을 100.00 ± 0.05 %라 하였을 때 실험군의 TGF- β 생성능은 98.57 ± 0.04 %로 대조군과 유사하게 나타났다.

2) 재관류 1 시간 후 생산되는 사이토카인 양에 미치는 효과
뇌허혈 병태 모델의 혈청에서 생산되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 MCA 폐색법으로 유발된 뇌허혈 병태 모델에게 재관류시킨 다음 1 시간이 경과된 후 뇌허혈 병태 모델의 혈액을 취하여 사이토카인 생성능을 측정하였다(Fig. 4).

대조군의 IL-1 β 생성능을 100.00 ± 0.02 %라 하였을 때 실험군의 IL-1 β 생성능은 94.25 ± 0.01 %로 대조군보다 유의성($P < 0.05$)있게 감소되었고, 대조군의 TNF- α 생성능을 100.00 ± 0.02 %라 하였을 때 실험군의 TNF- α 생성능도 67.97 ± 0.07 %로 대조군에 비해 유의성($P < 0.001$)있게 감소되었다. 대조군의 IL-10 생성능을 100.00 ± 0.06 %라 하였을 때 실험군의 IL-10 생성능은 178.34 ± 0.14 %로 대조군보다 유의성($P < 0.05$)있게 증가되었고, 대조군의 TGF- β 생성능을 100.00 ± 0.06 %라 하였을 때 실험군의 TGF- β 생성능은 98.46 ± 0.01 %로 대조군과 유사하게 나타났다.

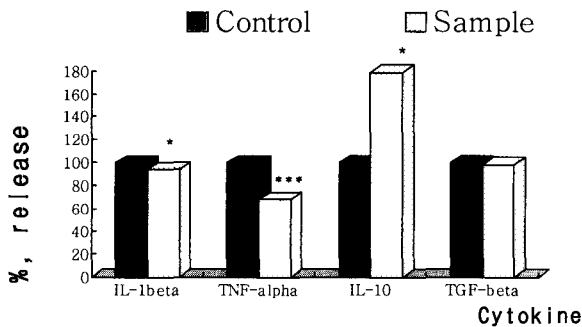


Fig. 4. Effects of YGJT on the cytokines production in serum of cerebral ischemic rats after reperfusion 1 hr. This figure is cytokines production of serum by drawing from femoral arterial blood after reperfusion 1 hr. Other legends are the same as Fig. 1. * : Statistically significance compared with Control group(* : $P < 0.05$, *** : $P < 0.001$)

3) 재관류 4 시간 후 생산되는 사이토카인 양에 미치는 효과
뇌허혈 병태 모델의 혈청에서 생산되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 MCA 폐색법으로 유발된 뇌허혈 병태 모델에게 재관류시킨 다음 4 시간이 경과된 후 뇌허혈 병태 모델의 혈액을 취하여 사이토카인 생성능을 측정하였다(Fig. 5).

대조군의 IL-1 β 생성능을 100.00 ± 0.01 %라 하였을 때 실험군의 IL-1 β 생성능은 91.91 ± 0.01 %로 대조군보다 유의성($P < 0.01$)있게 감소되었고, 대조군의 TNF- α 생성능을 100.00 ± 0.05 %라 하였을 때 실험군의 TNF- α 생성능도 93.95 ± 0.05 %로 대조군에 비해 감소되었다. 대조군의 IL-10 생성능을 100.00 ± 0.12 %라 하였을 때 실험군의 IL-10 생성능은 108.50 ± 0.07 %로 증가되었고, 대조군의 TGF- β 생성능을 100.00 ± 0.06 %라 하였을 때 실험군의 TGF- β 생성능은 98.62 ± 0.04 %로 대조군과 유사하게 나타났다.

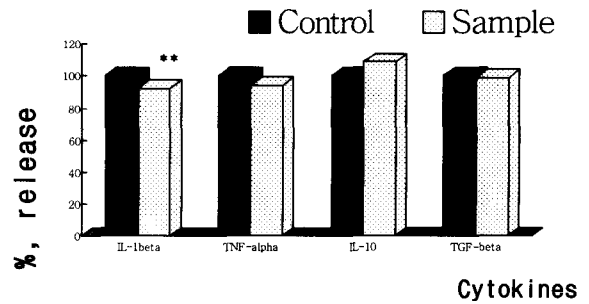


Fig. 5. Effects of YGJT on the cytokines production in serum of cerebral ischemic rats after reperfusion 4 hrs. This figure is cytokines production of serum by drawing from femoral arterial blood after reperfusion 4 hrs. Other legends are the same as Fig. 1. * : Statistically significance compared with Control group(** : $P < 0.01$).

고찰

六君子湯은 健脾養胃하는 四君子湯에 祛濕痰하는 二陳湯을 合方한 方劑로 虞가 “痰挾氣虛發飪”¹⁾을 치료한다 수록한 이후 許²⁾는 氣虛痰盛에, 李³⁷⁾·朱³⁸⁾는 脾胃不和에, 汪³⁹⁾은 氣虛有痰 및 脾虛肺損에 사용할 수 있다하였고, 張³⁾은 “以肥人多氣虛也 … 肥人多氣虛之證 然肥人多濕多滯 故氣道多有不利 若果痰氣壅滯 … 治痰之法 … 宜四君六君”이라하여 肥人中風에 補氣·燥濕·化痰를 목적으로 활용할 수 있음을 설명하였다.

뇌는 심장으로부터 박출되는 혈액의 공급($50 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$)을 받아 산소와 포도당 등의 영양물질을 얻음으로써 제 기능을 수행한다^{4,5)}. 그러나 뇌혈류량이 $15 \sim 18 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$ 으로 감소되면 세포자체의 기능은 어느 정도 유지될 수 있으나⁴⁰⁻⁴¹⁾ $10 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$ 이하로 감소하게 되면 세포내 산증과 같은 에너지 대사 장애가 초래되어 치명적인 뇌신경 조직의 손상이 나타나게 된다^{9,11)}. 특히 뇌혈류 감소로 인한 허혈성 뇌질환이 나타나게 되면 일련의 대사물질(산소자유기 혹은 글루탐산 등)이 생성되거나 침착하게 되어 뇌신경세포를 포함한 뇌조직이 손상됨으로써 운동마비·지각마비 등의 신경학적 증상들이 출현하게 된다¹⁰⁻¹¹⁾. 이에 저자들은 본방이 허혈로 인한 뇌손상을 억제할 수 있을 것이라 보고¹⁸⁾되었고, 뇌혈류가 감소하게 되면 허혈성 뇌손상이 나타나기 때문에 본방(YGJT)이 뇌허혈시 변동되는 rCBF 및 PAD의 개선 효과를 살펴보는 동시에 항허혈 기전을 밝히고자 뇌허혈 동물의 혈액내에서 항염증 사이토카인의 생성능과 염증촉발 사이토카인의 생성능을 살펴보았다.

최근 보고에 의하면 허혈성 뇌손상은 허혈 당시보다는 허혈이 일어난 조직으로 산소가 재공급될 때 주로 일어난다¹⁹⁾하여 일과정 뇌허혈을 유발시킨 후 YGJT을 투여한 결과 재관류 후 불안정한 rCBF 증가상태를 보였던 대조군보다 유의성있게 안정적으로 증가시켰고, 재관류 시간이 경과될수록 YGJT을 투여한 뇌허혈 동물의 rCBF는 기저치보다도 안정적으로 감소되었다. 또한 뇌허혈 동물의 PAD 변동도 재관류 후 불안정한 PAD 확장상태를 보였던 대조군보다 유의성있게 안정적인 확장상태를 나타내어 YGJT는 뇌허혈시에도 유의한 뇌혈류역학 변동을 개선시킴

로써 허혈로 인한 뇌손상을 억제할 수 있을 것으로 생각된다. 뇌허혈이 일어나면 혈액중의 다형 백혈구가 혈관 내벽에 부착하여 뇌조직내로 침윤을 하게되고, 조직내에 축적된 호중구로부터 여러 물질들이 유리되면서 염증반응에 의한 허혈성 뇌조직 손상은 더욱 진행하게 된다^{20,21)}. 허혈성 뇌손상시에는 세포성장, 세포활성, 염증 등과 같은 중요한 생물학적 작용을 조절하는 각종의 사이토카인과 밀접하게 관계된다^{42,43)}. 염증에 관여하는 2가지의 중요한 사이토카인에는 IL-1 β 와 TNF- α 가 있는데, 이 중 IL-1 β 는 대식세포, 림프구 및 내피세포 등의 세포에서 유리되는 것으로 내독소, 물리적 손상이나 염증반응에 의해 유발되고, 뇌로 이동될 경우 열을 유발시키며, 코르티코 스테로이드의 분비를 증가시키고, TNF- α 는 종양의 출혈성 괴사 및 염증반응에 관여하며, IL-1 β 와 TNF- α 는 염증의 급성기에 서로 작용하여 상승작용을 나타낸다⁵⁴⁾.

뇌허혈시 염증반응이 나타나고, 염증반응으로 인해 더욱 더 심한 뇌손상이 나타난다하여 허혈로 인해 야기되는 뇌손상 억제 효과를 나타낸 YGJT가 염증촉발 사이토카인 생성능에 미치는 효과를 관찰하였다.

MCA 폐색 1 시간 후 IL-1 β 의 생성능은 대조군과 실험군에서 뚜렷한 변화를 나타내지 않았으나 재관류 1 시간 후와 4 시간 후에는 실험군의 IL-1 β 생성능이 대조군에 비해서 유의성있게 감소되어 YGJT는 염증촉발 사이토카인인 IL-1 β 의 생성능을 억제하여 뇌혈류 변동을 개선시키고, 뇌손상을 억제하는 것으로 생각된다.

MCA 폐색 1 시간 후 TNF- α 의 생성능은 대조군에 비해 실험군에서 뚜렷한 감소를 나타내었고, 특히 재관류 1 시간 후에는 실험군의 TNF- α 생성능이 대조군에 비해서 유의성있게 감소되었다. 이와 같은 결과들은 허혈시 IL-1 β 와 TNF- α 가 상승된다는 보고^{44,45)}에서 볼 수 있듯이 YGJT가 염증촉발 사이토카인의 생성을 억제함으로써 허혈시 나타나는 염증반응을 억제하고, 허혈성 뇌손상을 억제하는 것으로 생각된다.

염증촉발 사이토카인을 억제하는 기전으로 항염증 사이토카인인 IL-10과 TGF- β 가 있는데, IL-10은 IL-1 β 와 TNF- α 를 생성하는 대식세포의 생성을 억제하고, TGF- β 는 혈소판 및 내피세포 등에서 생산되는 것으로 대식세포에서 생성되는 NO의 양 등을 불활성화시킨다⁵⁴⁾. 또한 Daddi 등은 IL-10과 TGF- β 가 뇌허혈시 재관류로 인해 나타나는 뇌손상을 감소시킨다는 보고⁴⁶⁾를 하였기에 염증촉발 사이토카인의 생성능 억제에 영향을 미친 YGJT가 항염증 사이토카인 생성능에도 영향을 미칠 것으로 생각되었다.

MCA 폐색 1 시간 후와 재관류 1 시간 후 실험군의 IL-10의 생성능은 대조군보다 유의성있는 증가현상을 나타내었고, 재관류 4 시간 후에도 실험군이 대조군보다 약간 증가되는 현상을 나타내었으나 실험군의 TGF- β 의 생성능은 모든 시간대에서 대조군의 생성능과 유사하게 나타났다. 이는 IL-10이 급성 뇌허혈시 조기치료의 기전으로 작용한다는 Vila 등의 보고⁴²⁾, cGMP가 IL-10과 관련된다는 Lei 등의 보고⁴⁷⁾ 그리고 cGMP가 IL-1 β , TNF- α 및 산소자유기를 억제한다는 Schubert 등의 보고⁴⁸⁾에서 알 수 있듯이 YGJT가 항염증 사이토카인인 IL-10의 생성능을 촉진시켜 염증촉발 사이토카인의 생성을 억제함으로써 뇌혈류 변

동을 개선시키고, 뇌손상을 억제하는 것으로 생각된다.

이상의 결과, YGJT는 cGMP를 활성화시켜 IL-10의 생성능을 촉진시키고, 염증촉발 사이토카인의 생성능을 억제하여 뇌혈류 변동을 개선시켜 뇌허혈로 인해 초기 뇌손상에 유의하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

허혈성 뇌손상에 대한 六君子湯의 억제효과를 알아보기 위하여 뇌허혈 병태 모델의 rCBF 및 PAD 변동에 미치는 개선 효과 및 혈액내 사이토카인 생성능을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 뇌허혈 병태 모델에 있어 실험군의 rCBF 및 PAD 변동은 재관류시 대조군의 변동보다 유의성있게 개선되었다. 뇌허혈 병태 모델 유발 1 시간 후, 실험군의 IL-1 β 및 TGF- β 생성능은 대조군과 유사하였으나 실험군의 TNF- α 생성능은 대조군에 비해 감소되었고, 실험군의 IL-10 생성능은 대조군에 비해 유의성있게 증가되었다. 뇌허혈 병태 모델에 있어 재관류 1 시간 후, 실험군의 IL-1 β 및 TNF- α 생성능은 대조군에 비해 유의성있게 감소되었으나 실험군의 IL-10 생성능은 대조군에 비해 유의성있게 증가되었고, 실험군의 TGF- β 생성능은 대조군과 유사하였다.

뇌허혈 병태 모델에 있어 재관류 4 시간 후, 실험군의 IL-1 β 생성능은 대조군에 비해 유의성있게 감소되었고, TNF- α 생성능은 대조군에 비해 감소되었으며, 실험군의 IL-10 생성능은 대조군에 비해 증가되었고, 실험군의 TGF- β 생성능은 대조군과 유사하였다.

참고문헌

1. 虞 搏 : 醫學正傳, p. 133, 人民衛生出版社, 北京, 1981.
2. 許 浚 : 東醫寶鑑, p. 134, 359, 南山堂, 서울, 1983.
3. 張介賓 : 景岳全書(上), pp. 211~212, 大星文化社, 서울, 1992.
4. 김기석 : 뇌, pp. 49~50, 성원사, 서울, 1989.
5. 대한병리학회 : 병리학, pp. 87~99, 1263~1264, 고문사, 서울, 1994.
6. Kety, S.S., Schmidt, C.F. : The nitrous oxide method for the man ; theory, procedure and normal values, J. Clin Invest 27 : 476~483, 1948.
7. Harris, R.J., Symon, L., Branston, N.M., Bayhan, M. : Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia, J. Cereb Blood Flow Metab. 1 : 203~209, 1981.
8. Wieloch, T., Siesjo, B.K. : Ischemic brain injury ; the importance of calcium, lipolytic activities and free fatty acids, Pathol Biol(Paris). 30 : 269~277, 1982.
9. 이경은, 김경환 : 허혈, 재관류 손상에서 뇌조직 아민 변동과 Free Radical과의 관련성, 大韓神經科學會誌 8(1):2~8, 1990.
10. 의학교육연구원 : 물리요법, pp. 399~403, 서울대학교 출판부, 서울, 1996.
11. 대한신경외과학회 : 신경외과학, pp. 150~156, 275~279, 284~285, p. 299, 중앙문화사, 서울, 1997.

12. 조규선, 정승현, 신길조, 이원철 : 牛黃清心元이 중대뇌동맥 결찰로 유발된 뇌허혈에 미치는 영향, 대한한의학회지 22(1) : 78~89, 2001.
13. 김선영, 이원철 : 흰쥐의 중대뇌동맥 결찰로 유발된 腦虛血에서 星香正氣散과 藿香正氣散이 神經細胞에 미치는 효과, 大韓韓醫學會誌 22(4) : 142~150, 2001.
14. 임광모, 정현우 : 滋陰健脾湯加枳殼·天麻가 腦細胞 및 腦血流力學 變動에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 17(1) : 64~70, 2003.
15. 이원석, 정현우 : 청피활성분획이 일과성 뇌허혈 병태모델의 뇌혈류역학에 미치는 실험적 효과, 동의생리병리학회지 15(6) : 899~904, 2001.
16. 장인규, 박성일 : 육군자탕이 위액분비 및 적출 위운동에 미치는 영향에 관한 연구, 생약학회지 12(3) : 128~133, 1984.
17. 강윤호, 권오성 : 육군자탕이 Cyclophosphamide로 손상된 비장조직의 회복에 미치는 영향, 동국한의학회연구소 논문집 2(1) : 167~176, 1993.
18. 鄭鉉雨, 金義成 : 四君子湯, 二陳湯, 六君子湯이 腦血流力學 變動에 미치는 實驗的 研究, 東醫病理學會誌 18(1):75~83, 2004.
19. McCord, J.M. : Mechanisms of disease : oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury, New Eng J. Med. 312 : 159~163, 1985.
20. Hallenbeck, J.M., Dutka, A.J., Tanishima, T., Kochanek, P.M., Kumaroo, K.K., Thompson, C.B., Obrenovich, T.P., Contreras, T.J. : Polymorphonuclear leukocyteaccumulation in brain region with low blood flow during the early postischemic period, Stroke 17 : 246~253, 1986.
21. Garcia, J.H., Liu, K.F., Yoshida, Y., Lian, J., Chen, S., del Zoppo, G.J. : Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct(Wistar rat), Am J. Pathol. 144 : 188~199, 1994.
22. 黃度淵 : 證脈·方藥合編, p. 201, 南山堂, 서울, 1985.
23. 全國韓醫學科大學 本草學教授 共編 : 本草學, pp. 136~137, 302~304, 347~349, 448~449, 531~533, 536~537, 540~543, 永林社, 서울, 1999.
24. Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R. : Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, Stroke 20(1) : 84~91, 1989.
25. Chen, S.T., Hsu, C.Y., Hogan, E.L., Maricque, H., Balentine, J.D. : A model of focal ischemic stroke in the rat ; reproducible extension cortical infarction, Stroke 17 : 738~743, 1986.
26. Morii, S., Ngai, A.C., Winn, H.R. : Reactivity of rat pial arterioles and venules to adenosine and carbon dioxide ; with detailed description of the closed cranial window technique in rats, J. Cereb Blood Flow Metab. 6(1):34~41, 1986.
27. Joseph, E., Lebasseeur, M.S., Wei, E.P., Raper, A.J., Kontos, H.A. and Patterson, J.L. : Detailed description of a cranial window technique for acute and chronic experimentals, Stroke 6 : 308~317, 1975.
28. Trembaly, L.F., Valenza, S.P. and Ribelro, J.Li. : Injurious ventilatory strategias increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model, J. Clin. Invest 99(5) : 944~952, 1999.
29. Wang, C.X., Olschowka, J.A. and Wrathall, J.R. : Increase of interleukin-1beta mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat, Brain Res. 759(2) : 190~196, 1997.
30. Stepaniak, J.A., Gould, K.E, Sun, D., Swanborg, R.H. : A comparative study of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis and DA rats, J. Immunol. 155 : 2762~2769, 1995.
31. Rivera, D.L., Ollister, S.M., Liu, X., Thompson, J.H., Zhang, X.J., Pennline, K., Azuero, R., Clark, D.A., Miller, M.J. : Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise, FASEB J. 12(2) : 189~197, 1998.
32. Okura, Y., Takeda, K., Honda, S., Hanawa, H., Watanabe, H., Kodama, M., Izumi, T., Aizawa, Y., Seki, S., Abo, T. : Recombinant murine interleukin-12 facilitates induction of cardiac myosin-specific type 1 helper T cells in rats, Circ Res. 82(10) : 1035~1042, 1998.
33. Lobell, A., Weissert, R., Storch, M.K., Svanholm, C., de Graaf, K.L., Lassmann, H., Andersson, R., Olsson, T., Wigzell, H. : Vaccination with DNA encoding an immunodominant myelin basic protein peptide targeted to Fc of immunoglobulin G suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis, J. Exp. Med. 187(9) : 1543~1548, 1998.
34. Kim, S.J., Romeo, D., Yoo, Y.D., Park, K. : Transforming growth factor-beta ; expression in normal and pathological conditions, Horm. Res. 42(1-2) : 5~8, 1994.
35. Kloen, P., Gebhardt, M.C., Perez-Atayde, A., Rosenberg, A.E., Springfield, D.S., Gold, L.I., Mankin, H.J. : Expression of transforming growth factor-beta(TGF-beta) isoforms in osteosarcomas ; TGF-beta3 is related to disease progression, Cancer, 80(12) : 2230~2239, 1997.
36. Snedecor, G.H. and Cochran, W.G. : Statistical Methods, 6th ed. Amos, Iowastate Univ., 1967.
37. 李 梴 : 醫學入門, pp. 562~563, 大星文化社, 서울, 1989.
38. 朱丹溪 : 丹溪心法, p. 336, 北京市中國書店, 北京, 1986.
39. 汪 昂 : 醫方集解, pp. 28~30, 杏林出版社, 서울, 1977.
40. Sharbrough, F.W., Messick, M.K. Jr., Sundt, T.M. Jr. : Correlation of continuous electroencephalograms with cerebral blood flow measurements during carotid endarterectomy, Stroke 4 : 672~683, 1973.
41. Trojaborg, W., Boysen, G. : Relation between EEG, regional

- cerebral blood flow and internal carotid artery pressure during carotid endarterectomy, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 34 : 61~69, 1973.
42. Vila, N., Castillo, J., Davalos, A., Esteve, A., Planas, A.M., Chamorro, A. : Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke, *Stroke* 34(3) : 671~675, 2003.
43. 하대유 외 25인 : *면역학*, pp. 100~105, 고문사, 서울, 1994.
44. Hayashi, Y., Jikihara, I., Yagi, T., Fukumura, M., Ohashi, Y., Ohta, Y., Takagi, H., Maeda, M. : Immunohistochemical investigation of caspase-1 and effect of caspase-1 inhibitor in delayed neuronal death after transient cerebral ischemia, *Brain Res.* 893(1-2) : 113~120, 2001.
45. Cain, B.S., Meldrum, D.R., Dinarello, C.A., Meng, X., Joo, K.S., Banerjee, A., Harken, A.H. : Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function, *Crit Care Med.* 27(7) : 1309~1318, 1999.
46. Daddi, N., Suda, T., D'Ovidio, F., Kanaan, S.A., Tagawa, T., Grapperhaus, K., Kozower, B.D., Ritter, J.H., Yew, N.S., Mohanakumar, T., Patterson, G.A. : Recipient intramuscular cotransfection of naked plasmid transforming growth factor beta1 and interleukin 10 ameliorates lung graft ischemia-reperfusion injury, *J. Thorac Cardiovasc Surg.* 124(2) : 259~269, 2002.
47. Lei, Y., Zhen, J., Ming, X.L., Jian, H.K. : Induction of higher expression of IL-beta and TNF-alpha, lower expression of IL-10 and cyclic guanosine monophosphate by pulmonary arterial hypertension following cardiopulmonary bypass, *Asian J. Surg.* 25(3) : 203~208, 2002.
48. Schubert, P., Morino, T., Miyazaki, H., Ogata, T., Nakamura, Y., Marchini, C., Ferroni, S. : Cascading glia reactions ; a common pathomechanism and its differentiated control by cyclic nucleotide signaling, *Ann. N. Y. Acad Sci.* 903 : 24~33, 2000.