

葛根이 뇌허혈 손상 흰쥐의 뇌해마 c-Fos와 c-Jun 발현에 미치는 영향

조규철 · 김연섭*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Effect of *Puerariae Radix* on c-Fos and c-Jun Expressions in Ischemic Damaged Hippocampus of Rats

Gyu-Chil Jo, Youn Sub Kim*

Department of Anatomy-Meridian, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

Objective : This study investigated a neuroprotective effect of *Puerariae Radix* on cerebral ischemia. Method : The global cerebral ischemia was induced by bilateral common carotid arteries occlusion under hypotension (40mmHg) in Sprague-Dawley rats. After the treatment of *Puerariae Radix* extract, changes of c-Fos and c-Jun expressions, immediate early genes expressed by cerebral ischemia, in the hippocampus were observed immunohistochemically. Result : The results obtained are as follows; The significant increases of c-Fos and c-Jun expressions were observed in the hippocampus of the ischemic damaged rat brains. Then *Puerariae Radix* treatment demonstrated significant decreases of c-Fos and c-Jun expressions in CA1 region and dentate gyrus as compared with control group. On the upregulated c-Fos expression induced by cerebral ischemia, *Puerariae Radix* treatment demonstrated significant decreases of c-Fos expressions in CA1 region (P<0.01) and dentate gyrus (P<0.05) as compared to the control group, but there were not a significant changes in CA2 and CA3 regions of the hippocampus. On the upregulated c-Jun expression induced by cerebral ischemia, *Puerariae Radix* treatment demonstrated significant decrease of c-Jun expression in CA1 region (P<0.05) as compared to the control group, but there were not a significant changes in CA2, CA3, and dentate gyrus of the hippocampus. Conclusion : These results suggested that *Puerariae Radix* reveals the neuroprotective effect through the reduction of immediate early genes, c-Fos and c-Jun, induced by cerebral ischemia.

Key words : *Puerariae Radix*, c-Fos, c-Jun, cerebral ischemia

서 론

葛根은 콩과에 속한 다년생 藤本인 칩의 뿌리를 건조한 것으로 약성이 甘辛, 平하다. 辛味가 發散透表하여 解肌除熱하는 작용이 있으므로 風寒, 風熱에 사용하며, 生津止渴의 효능이 있어 胃熱口渴, 消渴 등에 사용한다 하였다.¹⁻³⁾ 약리작용으로도 해열과 혈압강하 작용이 있으며, 관상동맥 확장과 뇌혈류량 증가 및 기억력 증강 작용이 보고된바 있다.^{4,5)} 또한 葛根이 숙취효과가 있다고 하여 실험연구는 주로 alcohol 대사 및 alcohol 중독에 대한

효능⁶⁻⁹⁾과 간질환에 대한 연구¹⁰⁻¹³⁾가 많다.

최근 연구에 의하면 葛根이 흰쥐의 뇌해마에서 alcohol 손상에 의한 c-Fos 발현을 유의하게 감소시키고,¹⁴⁾ 저하된 신경세포의 분화를 증가시켰다고 하였다.¹⁵⁾ 또한 葛根의 유효성분인 puerarin은 D-galactose로 유발된 기억력감퇴에 대하여 유의한 효능을 나타내어 항산화작용이 있다고 하였으며,¹⁶⁾ 또한 뇌허혈 손상에 대하여도 보호작용이 있다고 하였다.¹⁷⁾

중추신경계에서는 전체적 또는 국소적 뇌허혈 등 다양한 스트레스에 반응하여 즉시적으로 immediate early genes (IEGs) 발현을 유발시킨다.¹⁸⁾ 뇌허혈이 유발된 후 수분내에 gene들의 발현 증가가 나타나며, 특히 뇌허혈에 가장 민감한 것으로 알려진 뇌해마의 DG, CA1, CA3의 추체신경세포에서 IEGs의 일종인

* 교신저자 : 김연섭, 성남시 수성구 복정동 산65, 경원대학교 한의과대학

· E-mail : ysk@kyungwon.ac.kr, Tel : 031-750-5420

· 접수 : 2004/02/06 · 수정 : 2004/03/22 · 채택 : 2004/04/02

c-Fos와 c-Jun 발현이 크게 증가되는 것으로 보고되어 있다.^{19,20)}

이에 저자는 기존에 보고된 葛根의 c-Fos 발현 억제 및 puerarin의 뇌허혈손상 보호작용에 착안하여, 葛根의 뇌허혈에 대한 신경세포손상 보호효능을 동물실험에서 관찰하고자 흰쥐에 저혈압을 유도한 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법으로 뇌허혈을 유발하고, 葛根을 경구투여한 다음 뇌세포의 손상억제 및 보호효과를 측정하는 지표로 뇌해마 각 구역에서의 c-Fos와 c-Jun 발현에 대한 영향을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

실험방법

1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 12주령 (280~300g)의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 (21~23℃), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물의 조제 및 투여

본 실험에 사용한 약물은 葛根(Puerariae Radix)으로 약재 200g을 일반적인 물추출 엑기스 제조방법에 의하여 약재 4g 당 1,500mg의 엑기스를 얻었다. 약물은 뇌허혈 후 1일 1회씩 3일간 경구투여 하였으며, 1회 투여량은 체중 100g 당 25.0mg으로 하였다.

3. 실험군의 구분

실험군은 뇌허혈을 유발하기 위한 수술과정 중 저혈압 유발과 총경동맥 폐쇄를 제외하고 모든 수술과정을 시행한 비교군을 sham군 (Sham)으로 하고, 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 8분간 폐쇄하여 뇌허혈을 유발한 군을 대조군 (Control), 저혈압 상태에서 대조군과 동일하게 뇌허혈을 유발하고 葛根엑기스 25.0 mg/100g를 경구투여한 군을 葛根군 (Sample)으로 구분하였으며, 각 실험군은 흰쥐 6마리씩으로 구성하였다.

4. 뇌허혈 손상 유발

뇌허혈은 Chan 등²¹⁾의 방법에 따라 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 transient global ischemia (TGI) 방법을 적용하였다. TGI 방법을 간단히 설명하면, 마취는 70% N₂O와 30% O₂의 혼합가스에 5% isoflurane으로 마취를 시작하여 수술 도중에는 1.5~2.0%의 농도로 마취를 유지하였다. 체온은 feedback-regulated heating pad로 수술 전과정 동안 37.0±0.5℃로 조절하였다. 양측 서혜부의 대퇴동맥을 노출시킨 후 PE-50 polyethylene catheter를 장착시키고, 한쪽에는 physiograph를 연결하여 동맥혈압을 수술 전과정 동안 지속적으로 기록하고, 다른 한쪽은 저혈압 유발을 위한 혈액채취에 사용하였다. 이후 전경부에서 양측 총경동맥을 노출시킨 후 PE-30 polyethylene tube로 만든 폐쇄용 고리를 장착하였다. 총

경동맥 폐쇄를 위한 준비수술이 끝난 후 약 5분간의 안정기를 주었다. 저혈압의 유도는 Chan 등²¹⁾의 방법과 Sugawara 등²²⁾의 연구결과에 근거하여 평균동맥혈압이 40mmHg가 유지되도록 한쪽 대퇴동맥으로부터 빠르게 혈액을 제거하였다. 혈압이 40mmHg에 이르면 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.

5. 뇌조직의 처리

TGI 유발 3일 후 각각의 실험동물을 sodium pentobarbital의 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 두개골로부터 제거한 다음 24시간 정도 재고정하고, sucrose 용액에 넣어 침전시켰다. 다음 -40℃의 dry ice-isophentan으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50µm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

6. c-Fos 및 c-Jun 면역조직화학염색²³⁾

뇌해마 부위가 포함된 선택한 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10분~15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum과 bovine serum albumin을 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 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℃에서 overnight으로 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, avidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)으로 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl₂·H₂O를 섞은 diaminobenzidine-tetrachloride에서 5~10분간 발색 반응 시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2~3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

7. c-Fos 및 c-Jun 발현에 따른 면역염색농도의 측정

뇌해마의 CA1, CA2, CA3 및 DG구역의 c-Fos 및 c-Jun 발현에 따른 면역염색농도 (immuno-reaction density, IRD)의 측정은 CCD 카메라와 영상분석시스템이 부착된 광학현미경과 NIH Image software (Ver. 1.62)를 사용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, c-Fos 및 c-Jun 발현이 면역조직화학적으로 염색된 뇌해마 조직의 각 부위를 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고, 뇌해마의 기준구역과 측정하고자 하는 구역의 면역염색농도를 256등급의 흑백농도 (grey level)에 따라 측정하고, 측정구역의 측정값을 기준구역의 측정값에 대하여 표준화하는 방법으로 면역염색농도를 계산하였다. 기준구역은 CA1 하부의 뇌해마 실질조직 부위로 하였다.

8. 통계처리

성적은 Graphpad Prism(USA)으로 Student's t-test를 이용해 검정한 P값이 0.05미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

실험성적

1. 뇌해마 각 구역에서 c-Fos와 c-Jun 발현의 변화

c-Fos와 c-Jun은 정상상태에서는 발현되지 않는 것이 일반적이나 뇌허혈은 유발하지 않고 수술만을 시행한 sham군에서는 뇌해마 전 부위에서 미약한 발현이 관찰되었다. 이는 뇌허혈은 유발시키지 않았으나 뇌허혈 유발을 위한 수술의 전과정은 동일하게 시행하였으므로 전경부의 절개 등 수술에 따른 스트레스에 의한 것으로 추정된다. 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 뇌해마 전 영역에서 c-Fos와 c-Jun 모두의 발현이 현저히 증가하였으며, 특히 CA1과 DG구역에서 증가가 확실하게 관찰되었다. 이는 뇌허혈 손상에 대하여 CA1과 DG구역이 민감하다는 기존의 연구보고와 일치하는 결과이다. 葛根엑기스를 투여한 갈근군은 전반적으로 c-Fos와 c-Jun 발현이 모두 감소된 것으로 관찰되었다. 이러한 발현의 감소는 CA1과 DG 부위에서 특히 현저하였으며, c-Jun 보다는 c-Fos가 보다 더 현저하였다. 이는 葛根이 뇌허혈 손상에 대하여 보호효능이 있다는 것을 나타낸다. (Fig. 2, 4)

2. 뇌해마 각 구역에서 c-Fos 발현에 따른 면역염색농도의 변화

뇌해마 각 구역에서의 c-Fos 면역염색농도는 뇌허혈을 유발하지 않은 sham군은 CA1구역에서 19.2±5.6, CA2구역에서 17.9±6.0, CA3구역에서 14.3±7.4 및 DG구역에서는 19.7±7.0로 나타났다. 이러한 면역염색농도는 CA1, CA2, CA3 및 DG 전 구역에서는 c-Fos가 미약하게 발현되었음을 나타낸다. 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 CA1구역에서 109.4±10.9, CA2구역에서 98.7±15.4, CA3구역에서 58.2±8.3 및 DG구역에서는 115.9±11.2로 측정되었다. 이는 뇌허혈 유발에 의하여 뇌해마 전 구역에서 c-Fos 발현이 증가되었으며, 특히 CA1과 DG구역에서는 sham군에 비하여 500% 이상 현저하게 증가하였음을 나타낸다. 뇌허혈이 유발된 후 葛根은 투여한 갈근군은 CA1구역에서는 70.5±7.8로 대조군에 비하여 P<0.01의 유의한 감소를 나타내었다. CA2구역에서는 75.4±14.6로 감소하였으나 유의성은 없었으며, CA3구역에서도 49.4±9.9로 감소는 하였으나 유의성은 없었다. DG구역에서는 74.3±11.7로 대조군에 비하여 P<0.05의 유의한 감소를 나타내었다. 뇌허혈 유발에 의하여 증가된 c-Fos 발현이 葛根의 투여에 의하여 뇌허혈 손상에 민감한 CA1과 DG 구역에서 유의하게 감소된 이러한 결과는 葛根이 일정한 신경세포손상 보호효능을 가지고 있음을 나타내준다. (Fig. 1, 2)

3. 뇌해마 각 구역에서 c-Jun 발현에 따른 면역염색농도의 변화

뇌해마 각 구역에서의 c-Jun 면역염색농도는 뇌허혈을 유발하지 않은 sham군은 CA1구역에서 22.5±4.6, CA2구역에서 21.0±3.7, CA3구역에서 14.9±3.0 및 DG구역에서는 20.1±4.8로 나

타났다. 이러한 면역염색농도는 CA1, CA2, CA3 및 DG 전 구역에서는 c-Jun이 미약하게 발현되었음을 나타낸다. 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 CA1구역에서 48.7±7.6, CA2구역에서 43.1±8.1, CA3구역에서 33.8±9.4 및 DG구역에서는 37.0±5.3으로 측정되었다. 이는 뇌허혈 유발에 의하여 뇌해마 전 구역에서 c-Jun 발현이 증가하였으며, c-Fos 발현에 비하여는 현저하지 않음을 나타낸다. 뇌허혈이 유발된 후 葛根을 투여한 갈근군은 CA1구역에서는 32.0±4.9로 대조군에 비하여 P<0.05의 유의한 감소를 나타내었다. CA2구역에서는 31.7±5.5로, CA3구역에서는 27.6±5.0으로, DG구역에서는 30.3±4.2로 모두 대조군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 뇌허혈 유발에 의하여 증가된 c-Jun 발현이 葛根의 투여에 의하여 CA1구역에서 현저히 감소된 이러한 결과 역시 葛根이 일정한 신경세포손상 보호효능을 가지고 있음을 나타내준다. (Fig. 3, 4)

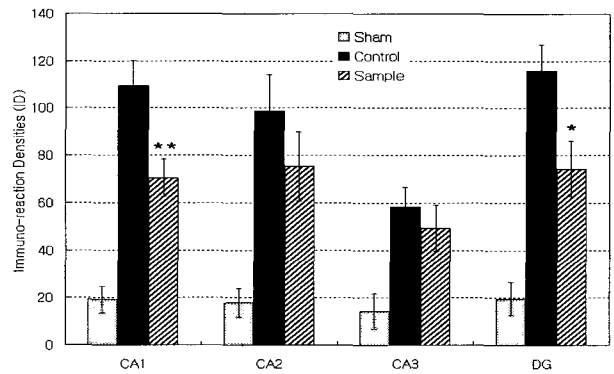


Fig. 1. Effect of *Puerariae Radix* on immuno-reaction densities depending on c-Fos expression in hippocampus of ischemic damaged rats induced by bilateral common carotid artery occlusion.

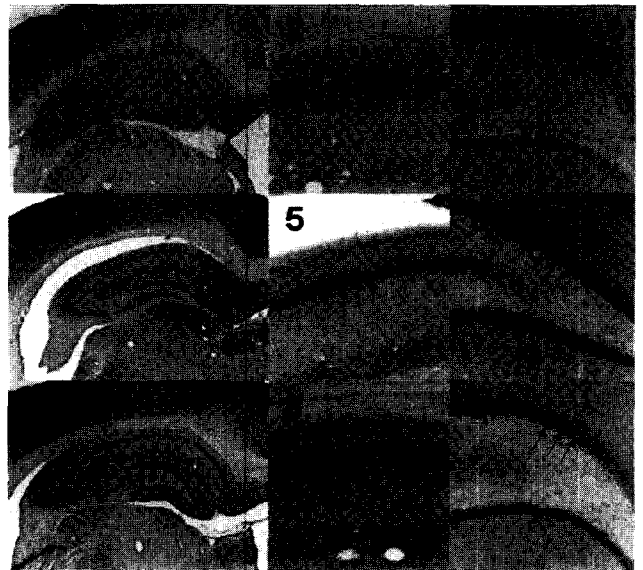


Fig. 2. Immunohistochemical expressions of c-Fos in hippocampal sub-regions of ischemic damaged rats induced by bilateral common carotid artery occlusion (section 1, 2 and 3, Sham; section 4, 5 and 6, Control; section 7, 8 and 9, Sample). The sample group (*Puerariae Radix* treatment group) shows significant decrease of immuno-reaction of c-Fos in CA1 and DG of hippocampus as compared to the control group.

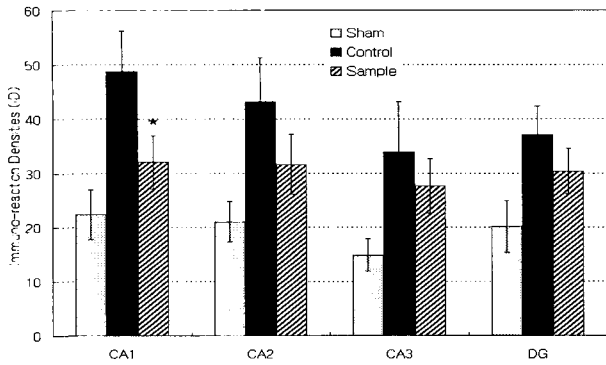


Fig. 3. Effect of Puerariae Radix on immuno-reaction densities depending on c-Jun expression in hippocampus of ischemic damaged rats induced by bilateral common carotid artery occlusion.

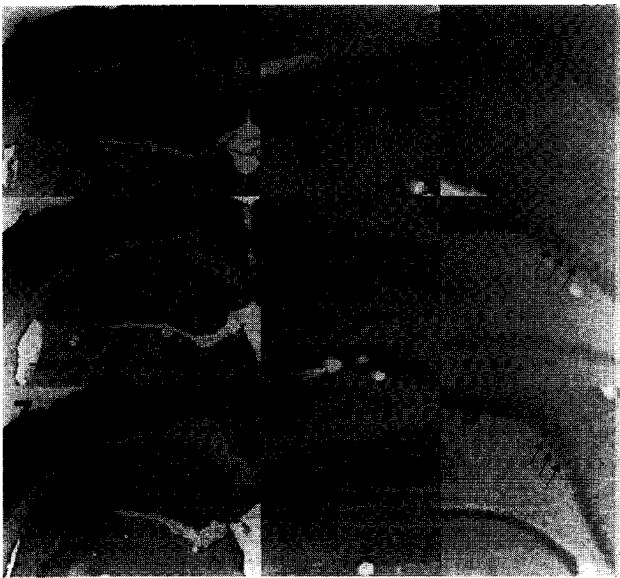


Fig. 4. Immunohistochemical expressions of c-Jun in hippocampal sub-regions of ischemic damaged rats induced by bilateral common carotid artery occlusion (section 1, 2 and 3, Sham; section 4, 5 and 6, Control; section 7, 8 and 9, Sample). The sample group (Puerariae Radix treatment group) shows significant decrease of immuno-reaction of c-Jun in CA1 of hippocampus as compared to the control group.

고찰

葛根에 대한 연구보고들을 살펴보면, alcohol을 투여한 실험 동물의 뇌해마에서 증가된 c-Fos 발현을 葛根이 유의하게 감소시켰다고 하였으며,¹⁴⁾ 뇌해마에서의 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 양성반응 신경세포와 nitric oxide synthase (NOS) 발현을 통하여 alcohol 손상에 대한 葛根의 효능을 관찰한 바 葛根투여에 의하여 저하된 BrdU 양성반응 신경세포와 NOS 발현을 유의하게 증가시켰다고 하였다.¹⁵⁾ 이는 다양한 뇌해마의 손상에 대하여 葛根이 유의한 효능을 나타낼 수 있음을 보여주는 보고이다.

葛根의 유효성분인 puerarin은 D-galactose에 의하여 노령의 생쥐에게 유발된 기억력의 감퇴를 유의하게 개선하며, 뇌조직의 superoxide dismutase (SOD) 활성을 유의하게 증가시키고 lipofuscin 함량을 유의하게 감소시키므로 노령에 따른 뇌조직의 산화적 손상 (oxidative damage)을 개선하는 효능이 있다고 하였

다.¹⁶⁾ 또한 puerarin은 patch clamp를 이용한 연구에서 뇌해마 신경세포의 outward potassium current와 delayed rectifier potassium current를 억제하는 효능이 있으며,²⁴⁾ 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 뇌부종을 유의하게 억제하였다고 하였다.¹⁷⁾ 이러한 보고들 역시 葛根이 뇌허혈 손상에 대하여 유의한 보호효능을 나타낼 수 있음을 추측하게 한다.

본 실험에서는 뇌허혈이 유발된 흰쥐에 葛根을 경구투여한 다음 그 효능의 판정 지표로 뇌해마 부위에서 c-fos와 c-jun 단백질이 발현되는 정도를 면역조직화학적으로 염색하여 관찰하였다. 전체적 또는 국소적 모든 뇌허혈은 유발된 후 수분 이내에 gene들의 발현 증가를 나타낸다. 이러한 매우 빠른 반응을 나타내는 gene들을 immediate early genes (IEGs)라고 하며, 뇌의 병리생리적 조건 즉, 경련이나 허혈과 같은 상태는 중추신경계의 광범위한 부위에서 IEGs 발현의 증가를 나타낸다고 하였다. 직접적으로 손상받은 부위에서 발현된 것은 물론 손상부위 바깥영역에서도 역시 발현되며, 뇌허혈 후 수시간 또는 수일간 생존하는 뇌조직에서는 보다 많은 gene들이 발현된다고 하였다.²⁵⁾

뇌허혈은 강력한 IEGs stimulator이다. 전뇌허혈 동물모형에서 여러 뇌부위에서 IEGs의 발현이 보고 되어있다. 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.²⁶⁻²⁸⁾ 흰쥐의 4-VO에 의하여 뇌해마의 DG, CA1, CA3의 추체신경세포, neocortex, 소뇌의 Purkinje cells 등에서 c-fos mRNA 발현이 크게 증가한다고 하였으며, c-jun, jun-B, jun-D 등 다른 IEGs 역시 전뇌허혈에서 발현이 증가되었다고 하였다.^{20,29)} 국소 뇌허혈 역시 IEGs 발현에 변화를 야기한다. 미약한 국소 뇌허혈에서는 IEGs 발현이 허혈영역에 제한되어 있으나, 심한 국소 뇌허혈에서는 IEGs 발현이 허혈영역 밖에서도 관찰되므로 흰쥐의 뇌경색 모형에서는 c-jun, jun-B, jun-D, zif/268, c-fos, nur/77 및 Krox20 등의 증가가 재관류 1시간 이내에 관찰되었다고 하였다.³⁰⁻³²⁾ 뇌허혈 시간이 30분에서 90분으로 증가되면 IEGs의 발현이 허혈영역의 외부에서는 물론 반대측 뇌해마에서도 관찰되며, 흰쥐에서 영구적으로 중대뇌동맥을 폐쇄한 경우에는 중대뇌동맥이 혈액공급을 하는 부위는 물론 반대측의 대뇌피질 구조물에서도 c-fos와 c-jun 및 zif/268의 발현이 관찰되고,³³⁾ 또다른 국소 뇌경색 모형에서는 시상이나, 내측과 외측 슬상핵 및 흑질과 같은 뇌의 심부 구조에서도 c-fos와 jun-B의 발현이 관찰된다고 하였다.^{34,35)}

본 실험의 결과 뇌허혈 손상에 대하여 葛根엑기스를 투여한 갈근군에서는 전반적으로 c-Fos와 c-Jun 발현이 모두 감소된 것으로 관찰되었으며, 이러한 발현의 감소는 CA1과 DG 부위에서 특히 현저하였고, c-Jun 보다는 c-Fos가 보다 더 현저하였다. 컴퓨터영상분석기를 사용하여 뇌해마의 각 구역에서 c-Fos와 c-Jun의 발현에 따른 면역염색농도를 측정하여 비교한 결과 c-Fos 발현의 변화는 葛根을 투여한 갈근군은 CA1구역에서 대조군에 비하여 P<0.01의 유의한 감소를 나타내었다. CA2와 CA3구역에서는 감소는 하였으나 유의성은 없었으며, DG구역에서는 대조군에 비하여 P<0.05의 유의한 감소를 나타내었다. 또한 c-Jun 발현

의 변화는 CA1구역에서는 葛根을 투여한 갈근군이 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의한 감소를 나타내었으나 CA2, CA3 및 DG구역에서는 대조군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 뇌허혈 손상에 민감한 CA1과 DG 구역에서 c-Fos와 c-Jun의 발현을 유의하게 감소된 이러한 결과는 葛根이 일정한 신경세포손상 보호효능을 가지고 있음을 나타내준다. IEG 발현을 유발하는 분자생물학적 기전은 아직 완전하지 않으나 전뇌허혈은 IEGs를 유발하는데 관여하는 다양한 second messenger system들을 유도하게 된다고 하였으며, 뇌허혈에 의한 IEGs의 발현은 아마도 대사적 스트레스에 의한 것일 수가 있다고 하였다.^{36,37} NMDA receptor 길항제들이 IEGs 발현을 감소시키는 것에 의하면 초기의 신호전달과정에 glutamate가 관여하는 것으로도 추정할 수 있다.³⁸ 또한 이러한 과정은 뇌허혈에 따른 apoptotic cell death에 관여하는 gene의 발현으로 이행되어 뇌조직 손상을 유발하는 것으로 보고되고 있다.¹⁸ 이러한 보고들을 살펴볼 때 葛根이 뇌허혈에 의한 IEGs 발현을 억제하거나, glutamate에 의한 손상 억제 또는 apoptotic cell death의 억제 작용에 의하여 신경세포손상 보호효능을 나타낼 것으로 추측할 수 있으나 이에 대하여는 보다 더 진전된 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

葛根의 뇌허혈에 대한 신경세포손상 보호효능을 동물실험에서 관찰하고자 흰쥐에 저혈압 상태에서 뇌허혈을 유발하고, 葛根을 투여한 다음 뇌세포의 손상억제 및 보호효과를 측정하는 지표로 뇌해마 각 구역에서 c-Fos와 c-Jun 발현에 대한 영향을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

뇌허혈이 유발된 대조군에서는 뇌해마 전영역에서 c-Fos와 c-Jun의 발현이 현저히 증가하였으며, 葛根을 투여한 군에서는 c-Fos와 c-Jun의 발현이 대조군에 비하여 감소하였고, 그 감소는 CA1구역과 DG구역에서 가장 확실하게 관찰되었다. 뇌허혈 손상에 의하여 뇌해마 각 구역에서 증가된 c-Fos 발현에 대하여 葛根을 투여한 군은 CA1구역에서는 대조군에 비하여 $P < 0.01$ 의 유의성 있는 감소를, DG구역에서 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 감소를 나타내었으며, CA2와 CA3구역에서는 대조군에 비하여 감소는 하였으나 유의성은 없었다. 뇌허혈 손상에 의하여 뇌해마 각 구역에서 증가된 c-Jun 발현에 대하여 葛根을 투여한 군은 CA1구역에서는 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 감소를 나타내었으나 CA2, CA3 및 DG구역에서는 대조군에 비하여 감소는 하였으나 유의성은 없었다.

이상의 결과, 葛根은 뇌허혈 손상 초기에 발현되는 c-Fos와 c-Jun 등 IEGs의 발현을 억제하므로 뇌허혈에 의한 신경세포손상에 대하여 보호효과를 나타내는 것으로 생각된다.

참고문헌

- 이상인. 본초학. 서울:의학사. p.65-66, 1975.
- 오의락. 본초종신. 서울:행림출판사. p.256, 1972.
- 상해중의학원. 중초약학. 香港:상무인서관. p.532-534, 1977.
- 이상인, 안덕균, 신민규. 한약임상응용. 서울, 성보사. p.370-372, 1982.
- 김호철. 한약약리학. 서울:집문당. p.92-94, 2001.
- 김지훈, 김명정, 김성곤, 박제민, 정영인. 정상 성인에서 갈근(Radix puerariae)의 장기투여가 혈중알칼농도에 미치는 영향. 신경정신의학. 35(6):1230-1235, 1996.
- 강철중, 김명정, 김성곤, 김인주. 알코올 의존환자에서 갈근이 알코올 갈망과 대뇌 국소 혈류량의 변화에 미치는 영향. 신경정신의학. 36(5):861-869, 1997.
- Lee MK, Cho SY, Jang JY, Cho MS, Jeon SM, Jang MK, Kim MJ, Park YB. Effects of Puerariae Flos and Puerariae Radix extracts on antioxidant enzymes in ethanol-treated rats. Am J Chin Med. 29(2):343-354, 2001.
- Keung WM. Anti-dipsotropic isoflavones, The potential therapeutic agents for alcohol dependence. Med Res Rev. 23(6):669-696, 2003.
- 우홍정, 이장훈, 김영철. 인진과 갈근이 d-galactosamine, 급성 alcohol중독 및 CCL₄중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 18:411-429, 1997.
- 송우섭, 장준혁, 김경호, 윤종화, 김갑성. 갈근수침이 Ethanol 투여로 유발된 흰쥐의 간손상에 미치는 영향. 대한침구학회지. 15:279-288, 1998.
- Guerra MC, Speroni E, Broccoli M, Cangini M, Pasini P, Minghetti A, Crespi-Perellino N, Mirasoli M, Cantelli-Forti G, Paolini M. Comparison between chinese medical herb Pueraria lobata crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. Life Sci. 67(24):2997-3006, 2000.
- Arao T, Udayama M, Kinjo J, Nohara T. Preventive effects of saponins from the Pueraria lobata root on in vitro immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures. Planta Med. 64(5):413-6, 1998.
- Jang MH, Shin MC, Lee TH, Bahn GH, Shin HS, Lim S, Kim EH, Kim CJ. Effect of Puerariae radix on c-Fos expression in hippocampus of alcohol-intoxicated juvenile rats. Biol Pharm Bull. 26(1):37-40, 2003.
- Jang MH, Shin MC, Chung JH, Shin HD, Kim Y, Kim EH, Kim CJ. Effects of Puerariae radix on cell proliferation and nitric oxide synthase expression in dentate gyrus of alcohol-intoxicated Sprague-Dawley rats. Jpn J Pharmacol. 88(3): 355-358, 2002.
- Xu XH, Zhao TQ. Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice. Acta Pharmacol Sin. 23(7):587-590, 2002.
- Wang L, Zhao A, Wang F, Chai Q, Chai X. Protective effect of puerarin on acute cerebral ischemia in rats. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 22(12):752-754, 1997.

18. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate Early Gene Expression in Response to Cerebral Ischemia; Friend or Foe?. *Stroke*. 27:1682-1687, 1996.
19. 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*. 13:914-924, 1993.
20. Wessel TC, Joh TH, Volpe BT : In situ hybridization analysis of c-fos and c-jun expression in the rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 567:231-240, 1991.
21. 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*. 18(20):8292-8299, 1998.
22. 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*. 877:281-287, 2000.
23. Neumann-Haefelin T, Wiessner C, Vogel P, Back T, Hossmann KA. Differential expression of the immediate early genes c-fos, c-jun, junB, and NGFI-B in the rat brain following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 14:206-216, 1994.
24. Zhang GQ, Hao XM, Zhou PA, Wu CH, Dai DZ. Puerarin blocks transient outward K⁺ current and delayed rectifier K⁺ current in mice hippocampal CA1 neurons. *Acta Pharmacol Sin*. 22(3):253-256, 2001.
25. Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T, Morgan JJ. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron*. 3:359-365, 1989.
26. Kindy MS, Carney JP, Dempsey RJ, Carney JM. Ischaemic induction of proto-oncogene expression in gerbil brain. *J Mol Neurosci*. 2:217-228, 1991.
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*. 484:393-398, 1989.
28. Onodera H, Kogure K, Ono Y, Igarashi K, Kiyota Y, Nagaoka A. Proto-oncogene c-fos is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. *Neurosci Lett*. 98:101-104, 1989.
29. 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*. 13:914-924, 1993.
30. An G, Lin T-N, Liu J-S, Hsu CY. Induction of Krox-20 expression after focal cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 188:1104-1110, 1992.
31. 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*. 33:457-464, 1993.
32. 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*. 25:19-33, 1994.
33. 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*. 25:1855-1860, 1994.
34. Kinouchi H, Sharp FR, Chan PH, Koistinaho J, Sagar SM, Yoshimoto T. Induction of c-fos, jun B, c-jun, and hsp70 mRNA in cortex, thalamus, basal ganglia, and hippocampus following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 14:808-817, 1994.
35. 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*. 179:111-114, 1994.
36. Sagar SM. The molecular biology of brain ischemia; trendy genes in sick neurons. *Ann Neurol*. 33:437-438, 1993.
37. Sharp FR, Sagar SM. Alterations in gene expression as an index of neuronal injury; heat shock and the immediate early gene response. *Neurotoxicology*. 15:51-59, 1994.
38. 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*. 58:1836-1844, 1992.