

원 저

# 竹瀝枳朮丸의 메탄올추출 엑기스가 흰쥐의 전뇌허혈에 미치는 영향

류지철, 김영균, 권정남

동의대학교 부속한방병원 심계내과학교실

## Effects of Methanol Extract of *Jukryukjichul-hwan* on Global Cerebral Ischemia of Rats

Ji-Cheol Ryu, Young-Kyun Kim, Jung-Nam Kwon

Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

**Objectives** : Ischemic brain injury is a worldwide problem that often causes irreversible brain damage. Moreover, prevention of ischemic brain injury is more important than anything else, since after-effects of stroke significantly threaten the quality of life. *Jukryukjichul-hwan* (JRH) is an oriental medicinal formula for stroke patients in Korea. This study evaluated neuroprotective effects of methanol extract of JRH on global cerebral ischemia in rats. Changes of the pyramidal neurons, Bax and TUNEL immuno-positive neurons in CA1 hippocampus were observed using immunohistochemistry.

**Methods** : Sprague-Dawley Rats were induced with temporal global cerebral ischemia (TGI) by occluding the bilateral common carotid artery with hypotension. The rats were divided into 3 groups. We treated one group with methanol extract of JRH after operation, another group before and after the operation. We observed Bax expressions inducing apoptosis of neurons and TUNEL-positive Pyramidal Neurons as an index of survival and apoptosis of pyramidal neurons in CA1 Hippocampus.

**Results** : JRH treatment before and after TGI inhibited Bax expression in CA1 hippocampus. JRH treatment before and after TGI reduced the cell death of pyramidal neurons in CA1 hippocampus. JRH treatment after TGI reduced the cell death of pyramidal neurons in CA1 hippocampus. JRH treatment before and after TGI reduced TUNEL-positive cells in CA1 hippocampus.

**Conclusion** : These results suggest that JRH has a neuroprotective effect (by anti-apoptosis) against cerebral ischemia.

**Key Words**: *Jukryukjichul-hwan*, temporal global ischemia (TGI), neuroprotective effect.

### 緒 論

뇌졸중은 의식장애, 운동장애, 언어장애 등을 동반하는 질환으로서 전 세계적으로 3대 사망 원인 중 하나이다. 복잡한 사회생활, 과도한 업무와 스트레스로 30-40대의 젊은 층에서도 점차 발병률이 증가하는 추세에 있다.<sup>1)</sup> 또한 높은 사망률과 심각한 후유증을 동반하고, 아직은 효과적인 치료 방법이 없어 최근에는 예방의 중요성과 발병 초기의 뇌손상을 최대한 줄이는 방법이 부각되고 있다.

· 접수 : 2005년 12월 2일 · 논문심사 : 2005년 12월 4일  
· 채택 : 2005년 5월 26일  
· 교신저자 : 권정남, 부산광역시 부산진구 양정 2동 산 45-1  
동의대학교 부속한방병원 한방 2내과  
(Tel: 051-850-8622, Fax: 051-867-5162,  
E-mail: jnkwon@demc.or.kr)

뇌졸중은 혈관 파열로 인한 출혈성 뇌졸중과 폐쇄로 인한 허혈성 뇌졸중으로 구분되며 최근에는 허혈성 뇌졸중이 증가하고 있는 추세이다. 뇌경색은 혈관폐쇄로 인하여 산소와 혈당의 공급이 소실되고 세포막 붕괴 및 에너지 생산과정의 와해로 세포대사의 변화를 초래하여 각종 신경학적 증상이 나타나게 된다.<sup>2)</sup>

한의학에서 뇌졸중은 中風의 범주에 속하는데, 中風의 전조증에 관해서 朱 登<sup>3-5)</sup>은 眩暈, 手足麻木, 肌肉蠕動, 神志不寧 등을 언급하며 중풍 예방의 중요성을 강조하였다. 中風 예방을 위한 처방으로 許<sup>6)</sup>는 愈風湯, 天麻丸, 防風通聖散, 竹瀝枳朮丸 등을 제시하였으며, 이러한 처방 중에서 竹瀝枳朮丸에 대해 龔<sup>7)</sup>은 中風의 예방과 발병초기에 化痰清火, 理胃調脾의 작용으로 神妙한 효능을 나타내는 처방이라 하였다. 그러나 竹瀝枳朮丸과 뇌허혈 질환 치료와의 상관관계에 대해 언급한 논문 및 실험은 아직 찾아볼 수 없었다.

이에 저자는 竹瀝枳朮丸의 뇌허혈 질환 치료 효능 관찰을 위해, 竹瀝枳朮丸의 매탄올추출 엑기스를 전뇌허혈 유발 이후 및 유발 이전과 이후에 각각 투여한 다음 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서 신경세포 자연사를 유도하는 Bax 발현량, 추체신경세포의 생존 및 신경세포 자연사의 지표가 되는 TUNEL 양성반응 세포 수를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 材料 및 方法

#### 1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 10주령 (250-260g)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.

Table 1. Prescription of Jukryukjichul-Hwan

韓藥名	生藥名	重量(g)
神曲	<i>Massa Medicata Fermentata</i>	240
白茯苓	<i>Poria</i>	40
白芥子(炒)	<i>Semen Sinapis</i>	40
半夏	<i>Rhizoma Pinelliae</i>	40
蒼朮(米泔浸鹽水炒)	<i>Rhizoma Atractylodis</i>	40
黃芩	<i>Radix Scutellariae</i>	40
枳實	<i>Fructus Aurantii Immaturus</i>	40
陳皮	<i>Pericarpium Citri Nobilis</i>	40
南星(法製*)	<i>Rhizoma Arisaematis</i>	40
山楂	<i>Fructus Crataegi</i>	40
當歸(酒洗)	<i>Radix Angelicae Gigantis</i>	20
黃連(薑汁炒)	<i>Rhizoma Coptidis</i>	20
竹瀝	<i>Bambusae Caulis in Liquamen</i>	200
薑汁	<i>Rhizoma Zingiberis Juice</i>	200
總 量		1040

\* 法製 : 南星을 白礬, 皂角, 生薑과 함께 半日동안 달여서 皂角과 生薑은 버리고 焙乾.

## 2. 약물의 조제

본 실험에 사용한 처방은 竹瀝枳朮丸으로 《東醫寶鑑》<sup>6)</sup>에 수록된 것을 기준으로 하였으며, 동의대학교 부속한방병원 약재과에서 구입하여 사용하였다. 처방 내용과 1劑 분량은 다음과 같다(table 1).

약물의 조제는 竹瀝枳朮丸 환약을 粗末한 다음 140g을 70% 메탄올 2,000ml에 섞어 상온에서 5일간 추출하였다. 이후 rotary evaporator로 감압 농축하여 메탄올을 완전히 제거한 다음 동결건조하여 1회 복용량 7.0g의 竹瀝枳朮丸으로부터 2.35g의 메탄올추출 엑기스를 얻었다. 竹瀝枳朮丸 메탄올추출 엑기스의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100g 당 체중비례 계산량의 10배인 39.2mg으로 하였다.

## 3. 실험군의 구분

竹瀝枳朮丸 메탄올추출 엑기스가 전뇌허혈에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 실험군은 정상군(Normal 군)과 일반적인 정상 실험동물에 양측 총경동맥을 폐쇄하여 뇌허혈을 유발한 대조군(Control 군)과 뇌허혈 유발 후 竹瀝枳朮丸 메탄올 엑기스를 1일 1회씩 경구투여한 竹瀝枳朮丸-I군(Sample I 군), 뇌허혈 유발 5일전부터 1일 1회씩 경구투여하고 뇌허혈 유발 후 계속하여 1일 1회 경구투여한 竹瀝枳朮丸-II군(Sample II 군)으로 나누었다. 각 군 당 실험동물은 12마리씩 배정하였으며, 그 중 6마리는 실험 3일째에 Bax 발현을 관찰하기 위해서 희생시켰고, 나머지 6마리는 실험 5일째에 희생하여 뇌해마 신경세포의 변화와 TUNEL 양성반응 신경세포를 관찰하였다.

## 4. 전뇌허혈의 유발

전뇌허혈을 유발하기 위하여, 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 transient global ischemia (TGI) 방법을 사용하였다. 마취는 70% N<sub>2</sub>O와 30% O<sub>2</sub>의 혼합가스에 5% isoflurane으로 마취를 시작하여 수술 도중에는 1.5-2%의 농도로 마취를 유지하였다. 체온은 feedback-regulated

heating pad로 수술 전과정 동안 37.0±0.5°C로 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. 총경동맥 폐쇄를 위한 준비수술이 끝난 후 약 5분간의 안정기를 주었다. 저혈압의 유도는 Chan 등<sup>8)</sup>의 방법과 Sugawara 등<sup>9)</sup>의 연구결과에 근거하여 한쪽 대퇴동맥으로부터 빠르게 혈액을 제거하여 평균동맥혈압이 40mmHg에 이르게 하여 유지시켰다. 저혈압이 유발된 즉시 전경부의 총경동맥 폐쇄용 고리를 당기고 metal clip으로 고정하여 뇌허혈을 유발시켰다. 뇌허혈 유발 10분 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

전뇌허혈 유발과 약물투여 3일째 및 5일째에 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 post-fixation하고, sucrose 용액에 넣어 침전시켰다. 다음 -40°C의 dry ice-isophentan에서 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80°C에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50 $\mu$ m 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

6. Bax의 면역조직화학염색 및 발현량의 관찰  
선택한 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10분-15분 정도 반응시킨 다

음 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 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. Bax antibody (mouse anti-rat Bax, B-9, Santa Cruz, USA)는 1:2000의 희석배율로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후, 4°C에서 overnight로 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase complex의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 이후 diaminobenzidine으로 발색시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다. Bax 발현의 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여, 뇌해마 CA<sub>1</sub> 영역의 영상을 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고 NIH Image software를 사용하여 흡광도 (optical density)를 256등급의 흑백농도 (grey level)에 따라 측정하였다.<sup>10,11)</sup>

7. Cresyl violet 염색 및 신경세포 변화의 관찰

선택한 뇌조직을 poly-L-lysine으로 코팅된 슬라이드에 붙여 건조시키고, 1% cresyl violet solution으로 2분간 염색한 다음 일반적인 조직표본제작법에 따라 탈수, 봉합 하여 전뇌허혈 유발 및 약

물투여에 따른 뇌해마 (hippocampus) CA1영역에서 신경세포의 변화를 관찰하였다. 뇌해마 CA1구역 추체신경세포 수 및 추체신경세포 층의 두께는 CCD 카메라와 영상분석시스템이 부착된 광학현미경으로 cresyl violet으로 염색된 조직에서 CA1의 일정길이 (1,000µm) 내에 존재하는 추체신경세포의 수를 NIH Image software로 측정하였다.<sup>12)</sup>

8. TUNEL 면역조직화학염색 및 양성반응 신경세포 수의 관찰

선택한 뇌조직을 proteinase K (20 µg/ml)에 15분간 반응시킨 다음 탈이온화된 물로 4회 씻어내고, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 5분간 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)를 포함한 digoxigenin-dUTP 용액에서 1시간 반응시켰다. Stop/Wash 완충액으로 TdT반응을 정지시키고, PBS로 15분간 씻어 낸 후, anti-digoxigenin peroxidase에 30분간 반응시킨 다음 diaminobenzidine으로 발색시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다. TUNEL 양성반응 신경세포는 뇌해마 CA<sub>1</sub>영역의 영상을 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고 NIH Image software를 사용하여 그 수를 측정하였다.<sup>13,14)</sup>

Table 2. Changes of Bax Expressions in CA1 Hippocampus of Global Cerebral Ischemia in Rats

Groups	Optical Density (% of Normal)	Decrease (%)
Normal	100.0±0.0	-
Control	928.3±100.4	-
Sample I	726.5±68.3	21.7
Sample II	419.3±74.7**	54.8

Normal: Non operated group  
 Control: Group operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 10 minutes  
 Sample I: Group treated with methanol extract of *Jukryukjichul-hwan* after the same operation as the control group  
 Sample II: Group treated with methanol extract of *Jukryukjichul-hwan* before and after the same operation as the control group  
 Decreases in % are calculated between sample and control.  
 Data are presented as mean±standard error (n=6).  
 \*: Statistical significance with student T-test; \*\*: P<0.01

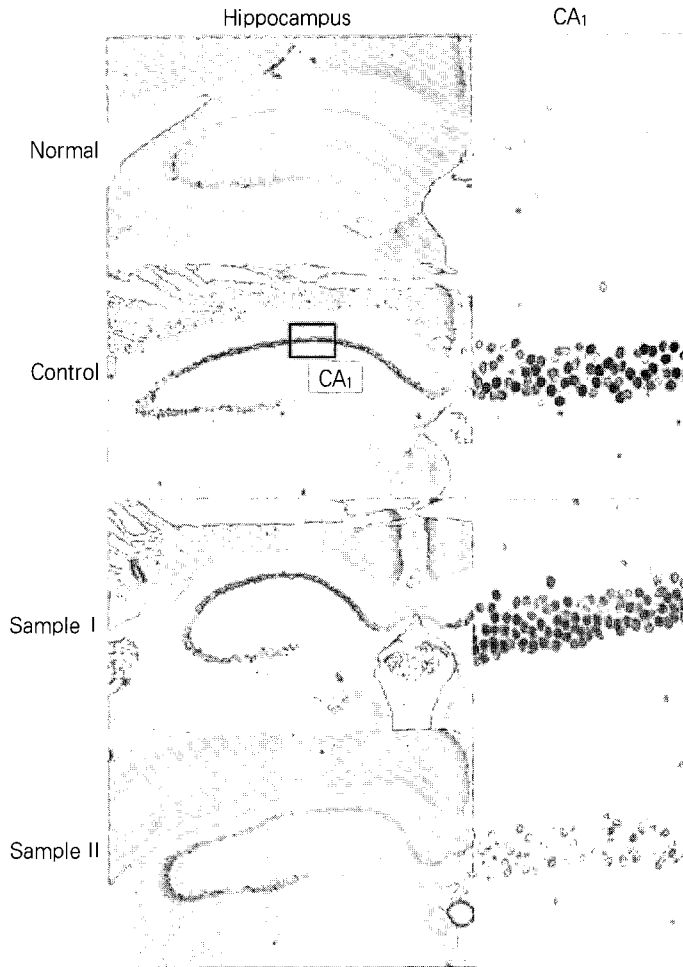


Fig. 1. Brain sections stained with immunohistochemistry of Bax proteins. Bax expression of sample II group suppressed significantly compared to the control group.

### 9. 통계분석 방법

통계분석은 student t-test와 ANOVA를 사용하였고  $P < 0.05$ 이하를 통계적 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

## 結 果

### 1. Bax 발현에 미치는 영향

전뇌허혈 유발 3일 후 신경세포의 자연사를 유발하는 Bax의 발현을 관찰한 바, 정상군의 뇌해마

CA<sub>1</sub> 구역에서 발현된 Bax 발현량을 100%로 하였을 때 전뇌허혈을 유발한 대조군은 Bax 발현량이  $928.3 \pm 100.4\%$  증가하였다. 전뇌허혈 유발 후 竹瀝枳朮丸의 메탄올추출 액기스를 투여한 sample I 군은 Bax 발현량이  $726.5 \pm 68.3\%$ 로 대조군에 비하여 21.7% 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 전뇌허혈 유발 전과 후 모두 竹瀝枳朮丸의 메탄올추출 액기스를 투여한 sample II 군은 Bax 발현량이  $419.3 \pm 74.7\%$ 로 대조군에 비하여 54.8% 유의하게 감소하였다( $P < 0.01$ ).(Table 2, Fig. 1). 이러한

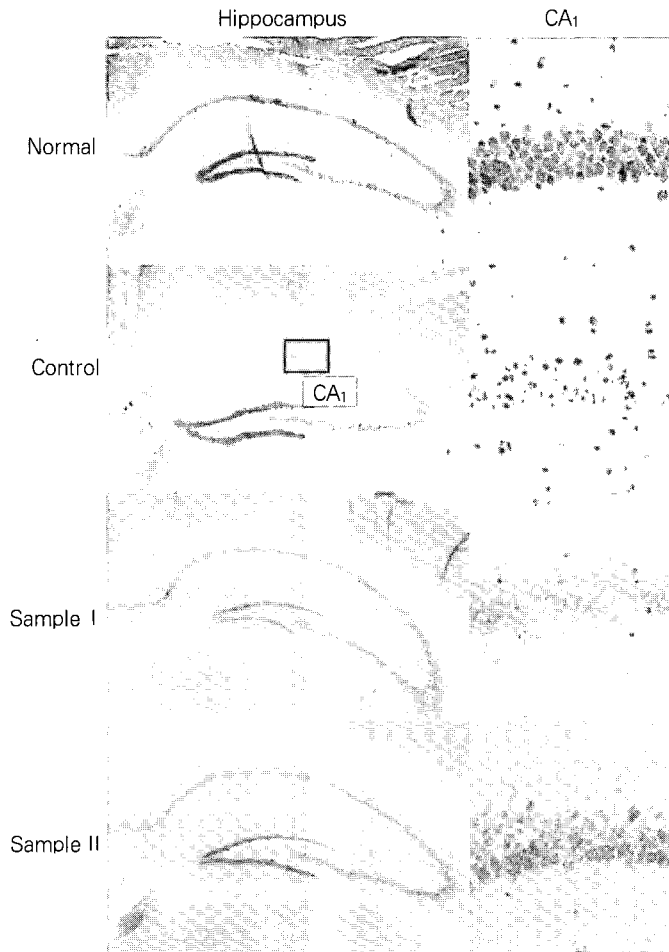


Fig. 2. Brain sections stained with cresyl violet. Survival pyramidal neurons of sample I and sample II groups were increased significantly compared to the control group.

결과는 sample I 군의 경우 투약 3일째에 Bax 발현을 유의하게 억제하지 못하였으므로 이후 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서 신경세포들이 Bax 발현에 의하여 자연사할 것임을 나타내는 반면, sample II 군의 경우는 전뇌허혈에 의한 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서의 신경세포 자연사를 유의하게 억제할 수 있음을 나타낸다.

## 2. 추체신경세포 생존에 미치는 영향

전뇌허혈 유발 5일후에 정상적으로 생존하고

있는 추체신경세포 수를 cresyl violet으로 염색하여 관찰한 바, 정상군의 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서 관찰된 추체신경세포 수는  $211.5 \pm 9.1$  개 이었으며, 전뇌허혈을 유발한 대조군은 생존하는 추체신경세포 수가  $63.5 \pm 11.6$  개로 현저히 감소하였다. 전뇌허혈 유발 후 竹瀝枳朮丸의 메탄올추출 엑기스를 투여한 sample I 군은 생존하는 추체신경세포 수가  $103.8 \pm 12.6$  개로 대조군에 비하여 63.5% 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ). 전뇌허혈 유발 전과 후 모두 竹瀝枳朮丸의 메탄올추출 엑기스를 투여

**Table 3.** Changes of Survival of Pyramidal Neurons in CA<sub>1</sub> Hippocampus of Global Cerebral Ischemia in Rats

Groups	Cell Number	Increase (%)
Normal	211.5±9.1	-
Control	63.5±11.6	-
Sample I	103.8±12.6*	63.5
Sample II	123.7±13.2**	94.8

Normal: Non operated group

Control: Group operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 10 minutes

Sample I: Group treated with methanol extract of *Jukryukjichul-hwan* after the same operation as the control group

Sample II: Group treated with methanol extract of *Jukryukjichul-hwan* before and after the same operation as the control group

Increases in % are calculated between sample and control.

Data are presented as mean±standard error (n=6).

\*: Statistical significance with student T-test

\*: P<0.05; \*\*: P<0.01

한 sample II 군은 생존하는 추체신경세포 수가 123.7±13.2 개로 대조군에 비하여 94.8% 유의하게 증가하였다(P<0.01).(Table 3, Fig. 2). 이러한 결과는 전뇌허혈 유발 이후에 약물을 투여한 sample I 군과 전뇌허혈 유발 이전과 이후 모두 약물을 투여한 sample II 군 모두 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서의 신경세포 생존에 유의한 효능이 있음을 나타낸다.

### 3. TUNEL 양성반응 신경세포에 미치는 영향

전뇌허혈 유발 5일후에 신경세포 자연사의 지표가 되는 TUNEL 염색에 양성반응을 보이는 추체신경세포 수를 관찰한 바, 정상군의 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서 관찰된 TUNEL 양성반응 추체신경세포 수는 9.0±1.7 개 이었으며, 전뇌허혈을 유발한 대조군에서는 TUNEL 염색에 양성반응을 나타낸 추체신경세포 수가 79.2±8.4 개로 현저하게 증가하였다. 전뇌허혈 유발 후 竹瀝枳朮丸의 메탄올추출 엑기스를 투여한 sample I 군은 TUNEL 염색에 양성반응을 나타낸 추체신경세포 수가 70.8±11.8 개로 대조군에 비하여 10.5%만이 감소하여 통계학적 유의성이 없었다. 전뇌허혈 유발 전과 후 모두 竹瀝枳朮丸의 메탄올추출 엑기스를 투여한 sample II 군은 TUNEL 염색에 양성반응을 나타낸 추체신경세포 수가 58.2±7.2 개로

대조군에 비하여 26.5% 유의하게 감소하였다(P<0.05). (table 4, Fig. 3). 이러한 결과는 sample I 군의 경우 뇌허혈에 의한 신경세포의 자연사를 유의하게 억제하지 못하였으나 sample II 군의 경우는 전뇌허혈에 의한 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서의 신경세포 자연사를 유의하게 억제하였음을 나타낸다.

## 考 察

中風은 일단 발병하면 예후가 불량하여 사망률이 높으며, 사망하지 않더라도 半身不遂, 言語不利, 口眼喎斜. 神志不清과 같은 후유증이나 합병증을 남겨 환자 본인은 물론 가정, 사회 경제적으로 큰 손실을 입힌다. 또한 재발율이 높으며 재발하였을 경우 예후가 더욱 좋지 않은 것으로 알려져 예방 및 조기 치료가 매우 중요한 의의를 가진다.<sup>15,16)</sup>

실제로 급성 중풍환자의 18-26%에서 1회 이상의 중풍 과거력을 가지고 있으며, 재발할 경우 더 심각한 장애를 남기는 경우가 많다. 또한 뇌졸중 발병 후 일년 내 재발은 6-14%, 5년 내 재발은 20-37%로 보고 된 바 있다.<sup>17)</sup> 그러므로 중풍의 발병률과 재발율을 높일 수 있는 위험인자들을 조기에 발견하고 치료 예방하는 적극적인 노력이 필요하다.

**Table 4.** Changes of TUNEL-Positive Pyramidal Neurons in CA<sub>1</sub> Hippocampus of Global Cerebral Ischemia in Rats

Groups	Number of Positive Cells	Decrease (%)
Normal	9.0±1.7	-
Control	79.2±8.4	-
Sample I	70.8±11.8	10.5
Sample II	58.2±7.2*	26.5

Normal: Non operated group

Control: Group operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 10 minutes

Sample I: Group treated with methanol extract of *Jukryukjichul-hwan* after the same operation as the control group

Sample II: Group treated with methanol extract of *Jukryukjichul-hwan* before and after the same operation as the control group

Decreases in % are calculated between sample and control.

Data are presented as mean±standard error (n=6).

\*: Statistical significance with student T-test; \*: P<0.05

뇌졸중을 일으키기 쉬운 여러 위험 인자로는 고혈압, 심장질환, 심방세동, 당뇨, 오랜 기간의 흡연, 고지혈증, 뇌졸중의 과거력, 일과성 뇌허혈 발작, 무증상성 경동맥 협착증 등이고, 콜레스테롤, 지질, 비만, 음주, 경구피임약 등도 가능성 있는 요소들이다.<sup>1,18)</sup> 뇌졸중과 위험 인자와의 관계<sup>19,20)</sup>, 초발군과 재발군에 대한 임상적 고찰<sup>16,21)</sup> 등은 여러 차례 보고 된 바 있다.

한의학에선 이미 다양한 中風 전조증을 여러 문헌에서 언급하면서 예방과 조기 치료의 중요성을 강조해 왔다. 李<sup>22)</sup>는 手足麻木, 肌肉蠕動, 心神憤亂, 眉稜骨痛의 증상들을 전조증으로 인식하였고, 王<sup>23)</sup>은 34種의 전조증을 詳述하여 歷代 醫家中 가장 풍부한 견해를 보인 바 있다.

《東醫寶鑑》<sup>6)</sup>에서도 전조증으로 大拇指와 次指의 麻木不仁, 혹은 手足이 少力하거나 혹은 肌肉이 약간 당기는 것 등을 언급하면서 이러한 증상이 있으면 3년 내에 반드시 중풍이 오게 되니, 榮衛를 고르게 하기 위해 愈風湯, 天麻丸, 加減防風通聖散, 竹瀝枳朮丸, 搜風順氣丸 등을 복용하여 예방할 것을 제시하였다.

竹瀝枳朮丸은 化痰清火, 理胃調脾<sup>7)</sup>의 효능으로 肥白氣虛한 사람에게 복용케 하면 中風예방에 지극히 효과적이라 하였다. 竹瀝枳朮丸의 처방에서는, 半夏·南星을 白礬·皂角·生薑과 함께 半日

동안 달여서 皂角과 生薑을 버리고 焙乾하며, 枳實·黃芩·陳皮·蒼朮을 米泔浸鹽水炒, 山查·白芥子炒·白茯苓 各 1兩, 黃連薑汁炒, 當歸酒洗 各 5錢을 作末하고 神曲 6兩에 薑汁·竹瀝 各 1盞으로 煮糊 和丸梧子大하여 淡薑湯 혹은 白湯에 100丸을 吞下한다. 또한 竹瀝枳朮丸의 君藥인 竹瀝의 뇌허혈 질환 치료 효과<sup>24,25)</sup>와 약리 작용<sup>26)</sup>에 대한 것은 이미 보고 된 바 있다.

허혈성 뇌경색은 두 가지 병리생태학적 과정으로 발생하는데 하나는 혈관폐쇄로 인하여 산소와 혈당 공급이 소실되는 것이고, 둘째는 세포막 붕괴와 에너지 생산과정의 와해로 세포대사의 변화를 초래한다는 것이다. 뇌허혈은 국소허혈과 전뇌허혈로 나눌 수 있고, 전뇌허혈의 경우 절대적이고 측부순환이 없으며, 정상체온에서 4-8분 내에 비가역적인 신경세포 파괴가 발생한다. 국소허혈의 경우는 거의 항상 측부순환을 통해 어느 정도의 혈액순환이 일어나고 다양한 정도의 산소와 당이 공급된다.<sup>18)</sup>

뇌허혈 손상에 대한 연구에는 많은 종류의 실험동물모형이 사용되며, 크게 국소뇌허혈 (focal ischemia)과 전뇌허혈 (global ischemia)의 두 가지 모형으로 구분할 수 있다. 국소뇌허혈 모형은 한쪽의 중대뇌동맥을 폐쇄하여 대뇌피질에 국소적인 뇌허혈 손상을 유발하는 방법으로 전뇌허혈 모



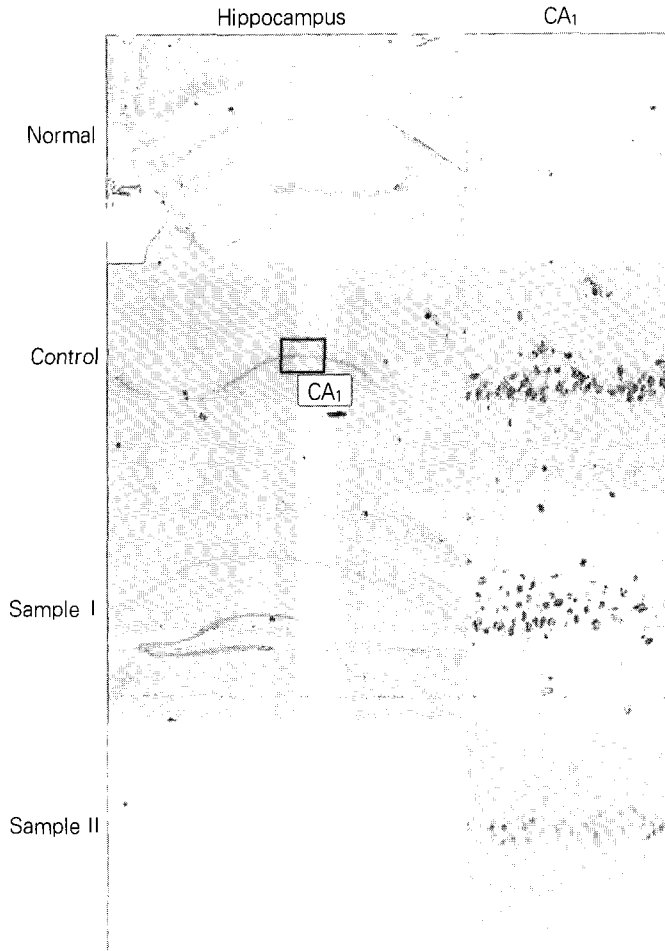


Fig. 3. Brain sections stained with TUNEL immunoreaction. TUNEL-positive pyramidal neurons of sample II group was decreased significantly compared to the control group.

형에 비하여 뇌혈류가 높게 유지되므로 손상을 명확히 하기 위해서는 혈관 폐쇄를 오래 유지해야 하고, 뇌허혈 손상의 중심부에는 손상이 심하고 주변부에는 손상의 정도가 미약한 차이가 있으며 대사 상태 또한 상이한 단점이 있다.<sup>27,28)</sup> 전뇌허혈 모형 중 혈압을 50 mmHg 이하로 낮춘 상태에서 양측의 총경동맥을 폐쇄하는 방법은 뇌혈류를 약 15% 정도 감소시켜 뇌해마 (hippocampus), 대뇌피질 (cerebral cortex) 및 선조체 (striatum) 모두에 허혈손상을 유발한다. 이러한 정도의 허혈

손상은 비교적 심하지 않은 손상을 유발하므로 약물의 효능을 검증하는데 유의하게 사용된다.<sup>29,30)</sup>

중추신경계의 대표적인 질환인 뇌경색과 각종 신경퇴행성 질환들에서 신경세포는 괴사 (necrosis) 와 자연사 (apoptosis)라는 두 가지의 특징적인 과정을 거쳐 사멸한다. 괴사는 급성적이고 강력한 조직손상에 관련된 병리적이고 염증성인 세포사멸로 급격한 생에너지의 악화와 세포막과 미토콘드리아막의 투과성 장애로 부종에 이어 세포의 분해과정을 거치는 조절되지 않은 과정이다.<sup>31)</sup> 이에

비하여 자연사는 비교적 덜 강력하고 만성적인 조직손상에 관련된 비염증성의 ATP 소모가 요구되는 조절된 과정으로, 세포막의 특성이 유지되는 상태에서 세포핵의 절단과 염색질의 응축에 이어 세포 응축이 나타나고 세포소기관들과 염색질이 자연사체 (apoptotic body)를 형성한 다음 주변 세포들의 식작용에 의하여 사멸하는 과정을 거친다.<sup>32)</sup> 그러므로 이러한 신경세포 자연사의 대사적, 생리적 과정을 관찰하는 것은 중추신경계 질환을 조절할 수 있는 실마리를 제공한다.

Bax (Bcl-associated protein X)와 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)는 세포자연사를 조절하는 인자이다. Bax는 Bcl-2와 거의 유사한 아미노산 서열을 가지고 있으며, 과도하게 발현될 경우 세포가 자연사 과정을 일으키게 되는데 중추신경계의 신경세포에서 발현되며 노화와 함께 증가하는 경향을 나타낸다. 이에 비하여 Bcl-2는 세포자연사를 억제하여 세포의 생존을 촉진하며, 성장기의 신경세포에 다량으로 존재하나 노화와 함께 급격히 감소한다.<sup>33)</sup> Bcl-2의 세포자연사 억제효능은 Bax와 결합하여 Bax가 세포자연사를 일으키는 기능을 저해하여 나타난다. 그러므로 Bax와 Bcl-2는 세포의 생존과 사망에 상반된 역할을 수행하고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>34)</sup> 또한 Bax는 뇌허혈과 같은 다양한 세포 외부로부터의 유해 자극에 대하여 신경세포의 손상 가능성 여부를 결정하는 것으로 보고되어 있다. 그러므로 뇌허혈에 의하여 가장 민감하게 신경세포의 자연사가 일어나는 뇌해마 추체신경세포에서 Bax의 발현은 장차 신경세포가 사망할 것이라는 것을 판별할 수 있는 중요한 지표로 사용되고 있다.<sup>35)</sup> Sample I 군은 Bax 발현량이  $726.5 \pm 68.3\%$ 로 대조군에 비하여 21.7% 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었고, sample II 군은 Bax 발현량이  $419.3 \pm 74.7\%$ 로 대조군에 비하여 54.8% 유의하게 감소하였다( $P < 0.01$ ). Sample II 군의 경우는 전뇌허혈에 의한 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서의 신경세포 자연사를 유의하게 억제할 수 있음

을 나타내었다.

뇌해마 중 CA<sub>1</sub> 구역의 추체신경세포들은 뇌허혈 손상에 가장 민감하게 반응하는 신경세포이다. 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역의 모든 신경세포들은 약 5분 정도의 전뇌허혈 유발상태에서 손상을 받기 시작하는데 비하여 CA<sub>3</sub> 구역은 약 20분 정도의 허혈유발이 요구된다고 하였다.<sup>36)</sup> 또한 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역의 추체신경세포들은 허혈손상이 가해진 후 약 12시간부터 사망하기 시작하여 수일간에 걸쳐 점차적으로 사망하는 세포지연사 (delayed cell death)의 경향을 나타내며,<sup>37)</sup> 약 10분 이상의 전뇌허혈 유발상태에서는 약 7일후 거의 모든 신경세포가 사망한다고 보고 되어 있다.<sup>38)</sup> 그러므로 5-10분간의 전뇌허혈 유발상태에서 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역의 추체신경세포가 나타내는 세포수의 변화, 각종 유전자 및 단백질 발현의 변화 등은 뇌허혈에 대한 신경세포 손상 기전에 대한 연구와 약물의 신경손상에 대한 보호효능을 연구하는데 가장 흔히 사용되는 지표가 된다.

본 실험에서 Sample I 군은 생존하는 추체신경세포 수가 대조군에 비하여 63.5% 유의하게 증가하였고( $P < 0.05$ ), sample II 군은 생존하는 추체신경세포 수가 대조군에 비하여 94.8% 유의하게 증가하였다( $P < 0.01$ ). 즉 Sample I, sample II 군 모두 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서의 신경세포 생존에 유의한 효능이 있음을 나타내었다.

세포의 자연사는 세포핵의 절단과 염색질의 응축에 이어 세포 응축이 나타나는 특징적인 형태학적 변화와 함께 세포자연사 과정 중에 DNA가 180-200 base의 조각으로 갈라지는 현상인 DNA laddering을 나타낸다.<sup>39)</sup> 이러한 DNA fragmentation을 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)이라는 조직화학적 방법을 사용하여 가시화함으로써 자연사한 세포를 선택적으로 염색하는 방법이 널리 사용되고 있다.<sup>40)</sup> Sample I 군은 TUNEL 염색에 양성반응을 나타낸 추체신경세포 수가 대조군에 비하여

10.5%만이 감소하여 통계학적 유의성이 없었고, sample II 군은 TUNEL 염색에 양성반응을 나타낸 추체신경세포 수가 대조군에 비하여 26.5% 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ ). Sample II 군의 경우는 전뇌허혈에 의한 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서의 신경세포 자연사를 유의하게 억제하였음을 나타내었다.

이상의 Bax 발현 · 추체신경세포 생존 · TUNEL 양성반응 신경세포에 미치는 영향 등을 관찰한 결과, 흰쥐의 총경동맥 폐쇄에 의한 전뇌허혈 유발에서 竹瀝枳朮丸의 투여가 신경세포 자연사를 억제하고, 전뇌허혈에 의한 신경세포손상에 보호효능을 나타내는 것으로 생각된다. 따라서 竹瀝枳朮丸의 中風 예방 효과를 기대할 수 있으며 향후 보다 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

## 結 論

竹瀝枳朮丸이 전뇌허혈에 의한 신경세포손상에 미치는 보호효능을 관찰하기 위해서 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 폐쇄하는 방법으로 흰쥐에 전뇌허혈을 유발하고, 竹瀝枳朮丸의 메탄올추출 엑기스를 전뇌허혈 유발 이후 및 유발 이전과 이후에 각각 투여한 다음 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서 신경세포 자연사를 유도하는 Bax 발현량, 추체신경세포의 생존 및 신경세포 자연사의 지표가 되는 TUNEL 양성반응 세포 수를 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1) 전뇌허혈 유발 후 竹瀝枳朮丸 메탄올추출 엑기스를 투여한 군은 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역의 Bax 발현량이 대조군에 비하여 유의성 있는 변화를 나타내지 못하였다.

2) 전뇌허혈 유발 전과 후 모두 竹瀝枳朮丸 메탄올추출 엑기스를 투여한 군은 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역의 Bax 발현량이 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.

3) 전뇌허혈 유발 후 竹瀝枳朮丸 메탄올추출 엑

기스를 투여한 군은 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역의 생존 추체신경세포 수를 대조군에 비하여 유의성 있게 증가시켰다.

4) 전뇌허혈 유발 전과 후 모두 竹瀝枳朮丸 메탄올추출 엑기스를 투여한 군은 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역의 생존 추체신경세포 수를 대조군에 비하여 매우 유의성 있게 증가시켰다.

5) 전뇌허혈 유발 후 竹瀝枳朮丸 메탄올추출 엑기스를 투여한 군은 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서 TUNEL 양성반응 추체신경세포 수가 대조군에 비하여 유의성 있는 변화를 나타내지 못하였다.

6) 전뇌허혈 유발 전과 후 모두 竹瀝枳朮丸 메탄올추출 엑기스를 투여한 군은 뇌해마 CA<sub>1</sub> 구역에서 TUNEL 양성반응 추체신경세포 수가 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 竹瀝枳朮丸은 신경세포 자연사를 억제함으로써 전뇌허혈에 의한 신경세포손상에 보호효능을 나타내는 것으로 생각된다.

## 參考文獻

1. 김영석. 임상중풍학. 서울: 서원당. 1997: 303-325
2. Kurt J. Isselbacher 외. Harrison's 내과학. 서울 : 정담출판사. 1998: 2409-2415
3. 朱丹溪. 丹溪心法附餘. 山東: 山東科學技術出版社. 1985: 2,3
4. 李 梴. 醫學入門(雜病提綱). 서울: 대성문화사. 1990: 309
5. 張山雷. 中風論詮. 서울: 대성문화사. 1994: 246
6. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사. 1999: 293,294,945
7. 龔信. 古今醫鑑. 北京: 中國中醫藥出版社. 1997 : 54,55
8. 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): 8292-8299.
9. Sugawara T, Kawase M, Lewen A, Noshita N, Gasche Y, Fujimura M, Chan PH. Effect of hypotension severity on hippocampal CA<sub>1</sub> neurons in a rat global ischemia model. *Brain Res.* 2000; 877: 281-287.
  10. Prakasa Babu P, Yoshida Y, Su M, Segura M, Kawamura S, Yasui N. Immunohistochemical expression of Bcl-2, Bax and cytochrome c following focal cerebral ischemia and effect of hypothermia in rat. *Neurosci Lett.* 2000 ; 291(3): 196-200.
  11. Hara A, Iwai T, Niwa M. Immunohistochemical detection of BAX and BCL-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1996; 711: 249-253.
  12. Derugin N, Wendland M, Muramatsu K, Roberts TP, Gregory G, Ferriero DM, Vexler ZS. Evolution of brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in neonatal rats. *Stroke.* 2000; 31(7): 1752-1761.
  13. Whiteside G, Cougnon N, Hunt SP, Munglani R. An improved method for detection of apoptosis in tissue sections and cell culture, using the TUNEL technique combined with Hoechst stain. *Brain Res. Protoc.* 1998; 2(2) : 160-164.
  14. Hara A, Niwa M, Iwai T, Nakashima M, Bunai Y, Uematsu T, Yoshimi N, Mori H. Neuronal apoptosis studied by a sequential TUNEL technique: a method for tract-tracing. *Brain Res Protoc.* 1999; 4(2): 140-146.
  15. 정한영. 뇌졸중 환자의 재활치료 시점에서의 평가와 기능적 회복에 관한 연구. *대한재활의학회지.* 1991; 15: 398-404.
  16. 박숙자, 권정남, 김영균. 중풍환자의 초발군과 재발군에 관한 임상적 고찰. *대한한의학회지.* 2002; 23(3): 119-133
  17. Jorgensen HS, Nakayama H, Reith J, Raaschou HO. Stroke recurrence, predictors, severity, and prognosis. The Copenhagen Stroke Study. *Neurology.* 1997; 48: 891-895
  18. Raymond D. Adams 외. 아담스 신경과학. 서울: 정담출판사. 1998: 715-721
  19. 김무겸, 강민정, 이환녕, 이경민. 중풍 재발과 관련된 위험인자. *대한재활의학회지.* 2000; 24(5): 857-863
  20. 정정수. 뇌졸중 위험인자에 따른 중풍 전조증의 양상에 대한 임상적 고찰. 동의대 대학원 석사학위 논문. 2003.
  21. 강관호, 정인용, 박종영. 뇌졸중환자 290례에 대한 임상적 고찰. *대한한의학회지.* 1997; 18(2) : 223-244
  22. 李 旻. 醫學入門(雜病提綱). 서울: 대성문화사. 1990: 309
  23. 王淸任. 醫林改錯. 서울: 의성당. 1994: 82,83
  24. 류주열, 김영균, 권정남. 죽력과 생강즙이 중대뇌동맥폐쇄에 의한 뇌허혈 손상에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 2002; 23(3): 134-144
  25. 김재홍. 죽력이 흰쥐의 중대뇌동맥 및 전뇌허혈손상에 미치는 영향. *경희대 대학원 석사학위논문.* 2003.
  26. 洪南斗, 金鐘禹, 崔乘基, 金南宰, 孫楨坤. 죽력의 약리작용에 관한 연구(제1보). *경희약대논문집.* 1982; 10: 69-75
  27. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke.* 1989; 20: 1627-1642.
  28. Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia JH. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci.* 1994; 125: 3-10.

29. Smith ML, Auer RN, Siesjo BK. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 1984; 64: 319-332.
30. Swan JH, Meldrum BS. Long term development of selective neuronal loss and the mechanism of protection by 2-amino-7-phosphonohepatnoate in a rat model of incomplete forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1998; 8: 64-78.
31. Kroemer G, Reed J. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 2000; 6: 513-519.
32. Hengartner M. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407: 770-777.
33. Li Y, Chopp M, Powers C, Jiang N. Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res.* 1997; 765(2): 301-312.
34. Gillardon F, Wickert H, Zimmermann M. Up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 is associated with kainate-induced apoptosis in mouse brain. *Neurosci. Lett.* 1995; 192: 85-88.
35. Chen J, Zhu RL, Nakayama M. Expression of the apoptosis-effector gene, BAX, is upregulated in vulnerable hippocampal CA<sub>1</sub> neurons following global ischemia. *J. Neurochem.* 1996; 67: 64-71.
36. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Prog. Brain Res.* 1985; 63: 39-58.
37. Pulsinelli WA, Brierly JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanaesthetized rat. *Stroke.* 1979; 10: 267-272.
38. Coimbra C, Wieloch T. Moderate hypothermia mitigates neuronal damage in the rat brain when initiated several hours following transient cerebral ischemia. *Acta. Neuropathol.* 1994; 87 : 325-331.
39. Love S, Hilton DA. Comparison of methods for the detection of cells in different stages of apoptosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1996; 22: 161-162.
40. Phanithi PB, Yoshida Y, Santana A, Su M, Kawamura S, Yasui N. Mild hypothermia mitigates post-ischemic neuronal death following focal cerebral ischemia in rat brain: immunohistochemical study of Fas, caspase-3 and TUNEL. *Neuropathology.* 2000; 20(4): 273-282.