

# 생산공정 차이에 따른 竹瀝이 apoptosis 및 신경세포 보호 효과에 미치는 영향

최찬헌\*

동신대학교 한의과대학 생리학교실

## Anti-apoptotic and Neuroprotective Effects of *Bambusae Caulis in Liquamen* Manufactured by Different Production Process

Chan Hun Choi\*

Department of Oriental Physiology, College of Oriental Medicine, Dongshin University

*Bambusae Caulis in Liquamen*(BCL) has been commonly prescribed for stroke patients in the traditional Oriental medicine. So this study is aims to investigate the anti-apoptotic and neuroprotective effects of *Bambusae Caulis in Liquamen*(BCL) manufactured by different production process on the focal ischemia induced by intraluminal filament insertion in rats. The focal ischemia was induced by intraluminal filament insertion into middle cerebral artery. The animals were divided into four groups (n=15 in each group). The ischemia induced and not treated group : Control group, the ischemia induced and oral medication of the three kinds of BCL : BCL-A group, BCL-B group, BCL-C group. BCL-A was produced by heating at a low temperature(250°C) in electric kiln and filtering. BCL-B was produced by heating at a high temperature(900°C~1,000°C) in yellow earth kiln and refining and filtering. BCL-C was produced by heating at a low temperature(400°C) yellow earth kiln and no refining and filtering. The anti-apoptotic and neuroprotective effects of the oral medication of BCL were observed by Bax, Bcl-2, cytochrome c, mGluR5, cresyl violet and ChAT-stain. Our study suggests that BCL-A(was produced by heating at a low temperature in electric kiln and filtering) and BCL-C(was produced by heating at a low temperature in yellow earth kiln and no refining and filtering) show anti-apoptotic and neuroprotective effects on the focal ischemia induced by intraluminal filament insertion in rats and BCL-C is more effective than BCL-A.

Key words : *Bambusae Caulis in Liquamen*, Apoptosis, Bax, Bcl-2, cytochrome c

### 서 론

中風은 서양의학의 뇌혈관질환에 해당된다고 볼 수 있는데<sup>1,2)</sup>, 뇌혈관질환은 뇌의 정상적인 혈액공급 장애에 의한 모든 신경질환을 의미하며 통상 뇌혈관사고(cerebrovascular accident, CVA) 또는 뇌졸중이라고 불리며 발생빈도, 유행률, 사망률이 높은 중요한 신경학적 질환이다. 이러한 뇌혈관질환은 크게 저산소증(hypoxia), 허혈증(ischemia)과 경색(infarction)등의 혈관폐쇄나 저혈압에 의한 병변과 두개강내 출혈, 그리고 고혈압에 의한

병변 등 세 종류로 나눌 수 있다<sup>3)</sup>. 허혈이 지속되면 산소와 혈당 공급량이 감소하면서 세포의 ATP 생산이 줄어들고 세포가 사망하게 되는데, 허혈에 의한 뇌신경세포 사망은 주로 괴사(necrosis)의 특성을 보이는 것으로 알려져 왔으나 최근 실험동물을 이용한 뇌허혈 모형에서 세포자멸사(apoptosis)도 관여함이 보고되고 있다<sup>4)</sup>.

대나무를 고온으로 가열하여 얻은 汁液인 竹瀝은 氣味가 甘·寒·無毒하고 淸熱, 瀉火, 潤燥, 化痰, 養血, 補陰의 效能을 지니고 있는 淸熱化痰藥으로<sup>5-7)</sup> 최근 보고에는 竹瀝이 高血壓, 動脈硬化 등에 의한 心臟血管性疾患과 증풍치료에 유용하게 활용되는 약재 가운데 하나로 보고되고 있다<sup>8-11)</sup>.

현재 임상에서는 가열온도 및 추출설비의 차이가 있는 다양한 竹瀝이 시판되고 있는데, 竹瀝은 생산공정에 따라서 동일한

\* 교신저자 : 최찬헌, 전남 나주시 대호동 252 동신대학교 한의과대학

E-mail : mensolog@dsu.ac.kr, Tel : 061-330-3515

접수 : 2007/07/13 · 채택 : 2007/08/20

질환에도 각기 다른 유효성이 나타난다<sup>12-14)</sup>.

중풍에 미치는 竹瀝의 효능을 평가하기 위한 연구로 intraluminal filament 挿入術에 의하여 hippocampus부위 뇌세포조직에 급성 虛血性 局所 腦損傷(focal ischemia)을 유발시킨 뇌허혈 동물모델을 대상으로 竹瀝 藥鍼을 투여하여 유의성 있는 소견을 관찰했다는 보고가 있다<sup>15)</sup>.

본 연구에서는 생산공정을 달리한 竹瀝이 각기 다른 효과를 나타내는 것은 유효성분이 달라지기 때문으로 추론되기 때문에 각기 다른 생산공정에 의한 竹瀝이 중풍에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 평가하고자 전기가마의 내통에 대나무를 넣고 전기를 열원으로 250℃ 정도에서 竹瀝을 채취하는 생산공법으로 얻은 저온추출죽력, 황토가마에서 약 1000℃ 이상으로 가열하여 대나무 숯을 만들면서 부산물로 얻어진 竹瀝液(竹醋液)을 정제한 고온추출죽력 그리고 항아리에 대나무를 넣고 왕겨를 열원으로 400℃ 이하에서 竹瀝을 채취하는 생산공법으로 얻은 저온추출죽력 등 3 種의 竹瀝을 추출한 다음 영구적 국소 뇌허혈 유발 백서에 경구투여한 후, hippocampal CA1부위의 Bax, Bcl-2, cytochrome c, mGluR5, cresyl violet 염색과 Choline acetyltransferase (ChAT) 발현을 통해 세포자멸사 억제 효과와 신경보호 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 동물

실험동물은 삼육동물센터로부터 구입한 260~300 g, 8 주령의 수컷 Sprague-Dawley계 白鼠로, 일주일간 실험실 환경(온도 22±3℃, 습도 50±10%)에 적응시킨 후 사용하였다. 각 cage당 3~4 마리씩 넣었으며, 물과 사료(pellet, Samyang, Korea)를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 2. 시료의 조제

#### 1) 저온추출 죽력 A(*Bambusae Caulis in Liquame-A*, BCL-A)

BCL-A는 전기가마를 이용하여 저온에서 짧은 시간 가열하여 추출한 죽력을 활성탄 흡착과 여과과정을 거쳐 최종 생산된 제품으로 생산공정은 아래와 같다.

나주소재 ○○(주)에서 700 L×700 W×800 H의 전기가마 내통에 대나무를 넣어 250℃ 로 22 시간 30 분 가열하여 얻은 죽력 원액을 죽력 중량 대비 10% 활성탄(200~250 mesh, Yakuri pure chemical Inc. Japan)으로 흡착시킨 후 여과과정(pore size, 0.4 μm)을 거친 죽력이다. 물리화학적 성분 조성표는 다음과 같다(Table 1-3).

#### 2) 고온추출 죽력 B(*Bambusae Caulis in Liquame-B*, BCL-B)

BCL-B는 황토가마에서 고온으로 장시간 대나무를 가열하여 숯을 만들면서 얻어진 죽력으로 흡착, 여과 그리고 삼압중류 과정을 거친 제품으로 생산공정은 아래와 같다.

담양소재 ○○상사에서 황토가마에 대나무를 넣어 1000℃ 이상의 온도로 3 일간 고온 가열하여 대나무 숯을 얻으면서 연통

주위에 냉각수를 통과시켜 탄화과정에서 발생하는 연기를 80~150℃ 로 냉각하면서 모아진 竹瀝液(竹醋液)을 3 년간 숙성시킨 죽력원액을 죽력 중량 대비 10% 활성탄(200~250 mesh, Yakuri pure chemical Inc. Japan)으로 흡착시킨 후 여과과정(pore size, 0.4 μm)을 거친 다음 자체 제작한 삼압중류장치를 이용하여 10 8℃ 에서 증류하여 유출되는 액 가운데 초기와 후기 증류액 각각 10%를 제거하고 중간의 80%만을 취한 증류액이다. 물리화학적 성분 조성표는 다음과 같다(Table 1-3).

#### 3) 저온추출 죽력 C(*Bambusae Caulis in Liquame-C*, BCL-C)

BCL-C는 항아리에서 저온으로 장시간 가열하여 얻어진 죽력으로 별도의 흡착, 여과 과정을 거치지 않은 제품으로 생산공정은 아래와 같다.

담양소재 ○○산업에서 항아리에 대나무를 넣은 후 왕겨를 연료로 400℃ 이하로 5 일간 가열하여 얻은 죽력이다. 물리화학적 성분 조성표는 다음과 같다(Table 1-3).

Table 1. pH, transparency and Hunter's color values of filtered *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing by electric furnace

<i>Bambusae Caulis in Liquamen</i>	pH	specific gravity	O · D at 680nm	Hunter's color values		
				L	a	b
BCL-A	2.78	1.016	0.033	83.76	10.51	40.79
BCL-B	3.17	1.014	0.131	56.53	26.48	61.66
BCL-C	2.28	1.006	0.037	85.59	30.19	118.48

BCL-A : Filtered *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing by electric furnace(700L×700W×800H). BCL-B : Filtered & refined *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing at high temperature. BCL-C : *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing at low temperature. L : degree of light and shade, a : degree of red, b : degree of yellow

Table 2. Organic acids, total sugars and tar content of filtered *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing by electric furnace

<i>Bambusae Caulis in Liquamen</i>	organic acids(%)	total sugars(Brix,%)	tar(%)
BCL-A	5.32	2.6	0.143
BCL-B	5.69	5.3	0.430
BCL-C	3.96	2.6	0.091

BCL-A : Filtered *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing by electric furnace(700L×700W×800H). BCL-B : Filtered & refined *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing at high temperature. BCL-C : *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing at low temperature

Table 3. Methanol and phenolic compounds content of filtered *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing by electric furnace

<i>Bambusae Caulis in Liquamen</i>	methanol(mg / ml)	phenolic compounds(ppm)
BCL-A	0.38	73.14
BCL-B	1.14	83.20
BCL-C	1.98	2876.11

BCL-A : Filtered *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing by electric furnace(700L×700W×800H). BCL-B : Filtered & refined *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing at high temperature. BCL-C : *Bambusae Caulis in Liquamen* produced with the process of manufacturing at low temperature

실험기간 동안 시료에 별도의 label을 붙여 각각의 시료를 인지하지 못하게 하였다.

### 3. 실험군의 구성 및 절차

실험군들은 ischemia 유발 후 saline을 구강투여한 대조군(control, n=15), ischemia 유발 후 BCL-A를 구강투여한 군(n=15), ischemia 유발 후 BCL-B를 구강투여한 군(n=15), ischemia 유발 후 BCL-C를 구강투여한 군(n=15) 등 4개 군으로 구성하였다.

Ischemia 유발 3일 후부터 각 군들은 1회/2일(오전 10시)의 빈도로 14일간 총 7회, 0.01 ml/kg 농도로 0.5 ml/kg 씩 zonde(Natsune, Japan)를 이용하여 구강투여를 시행한 다음 15일째에 白鼠를 희생시켜 뇌를 신속히 적출하거나 관류 고정하였다.

### 4. Occlusion에 의한 허혈성 국소 뇌손상 유발

국소 뇌허혈은 Longa 등<sup>16)</sup>의 방법을 변형하여 좌측 중대뇌동맥을 폐색시켜 만들었다. 상세한 실험 방법은 다음과 같다.

白鼠를 80% O<sub>2</sub>와 20% CO<sub>2</sub>가 혼합된 가스에 5% isoflurane(Choongwae, Korea)을 이용하여 흡입마취 유도를 한 후 2% isoflurane으로 계속 유지시켰다. 白鼠의 직장에 체온측정 probe를 삽입하고 가온 등과 가온 매트리스를 이용하여 마취유지 기간 동안 체온을 38°C로 유지하였다. 좌측 중대뇌동맥을 폐색하기 위하여 경부 정중선을 따라 피부를 절개하고 흉골허근과 흉골저작근 사이에 좌측 총경동맥을 노출한 후 좌측 내경동맥의 원위부를 최대한 확보한 후 미세혈관 클립(W.P.I., U.S.A.)을 이용하여 결찰하였고, 좌측 내경동맥과 intraluminal filament 사이의 출혈을 방지하기 위하여 6-0 silk suture실을 이용하여 좌측 총경동맥 근위부 및 좌측 외경동맥 분지부를 결찰하였다. 좌측 총경동맥의 좌측 외경동맥과 좌측내경동맥 분지부에서 1cm 정도 되는 좌측 내경동맥의 원위부에 미세혈관 가위(W.P.I., U.S.A.)를 사용하여 구멍을 내었다. 미세혈관 클립을 제거한 후 좌측 내경동맥내로 20 mm의 치과 인상제(Durelon, Germany)가 발라진 intraluminal filament(직경 0.28 mm rounded tip)를 좌측 내경동맥상의 구멍에 intraluminal filament가 faint resistance의 느낌이 느껴질 때 까지(약 17 mm) 부드럽게 삽입하여 그 끝이 좌측 중대뇌동맥까지 도달하도록 하여 좌측 중대뇌동맥부위에 국소 허혈을 유발하였다. 출혈을 방지하기 위하여 좌측 내경동맥상의 intraluminal filament 삽입부위를 가볍게 묶은 후 절개된 피부를 봉합하였다. 그 후 백서를 희생시킨 후 삽입된 intraluminal filament가 중대뇌동맥과 전대뇌동맥의 기시부 사이에 위치함을 확인한 후 분자생물학 및 조직학적 관찰을 하였다.

### 5. Western blotting

#### 1) Protein preparation

白鼠를 단두한 후 뇌의 좌우를 분리하고 hippocampus를 적출하여 신속히 액체 질소에 급속 냉동시키고 분석할 때까지 -70°C에서 보관하여, Bax, Bcl-2, cytochrome c 단백질발현을 Western blot방식을 이용하여 관찰하였다. 白鼠의 hippocampus에 NP40 lysis buffer(pH 8.0 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF(Phenylmethyl-sulfonyl fluoride), 1% NP-40, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Trypsin inhibitor)와 1x Protease Cocktail inhibitor(BD, U.S.A.) 혼합액 500 µl를 넣어

homogenization하였다. 이 sample을 20 분간 ice상태에 놓아둔 후 12,000 rpm에서 4°C 상태로 20 분간 원심분리한 후 상층액을 분리하였다. 이 sample은 bicinchonic acid(BCA) assay kit(Pierce, U.S.A.)를 사용해 정량하였다.

#### 2) Electrophoresis

12% polyacrylamide resolving gel은 30 분간 굳히고, 4% polyacrylamide stacking gel은 resolving gel 위에 붓고 comb을 꽂아 30 분간 굳혔다. Gel running tank에 장착하고 pH 8.3의 running buffer(0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 10% SDS)를 부었다. 5x SDS sample buffer(pH 6.8 100 mM Tris, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 200 mM DTT, 10% 2-mercaptoethanol) 5 µl에 정량된 단백질 sample을 넣어 100°C에서 5 분간 끓인 후, 80 V(200 mA)로 전기영동하였다.

#### 3) Electrotransfer

전기영동이 끝난 gel은 transfer buffer(25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol)에 filter paper, nitrocellulose membrane을 얹고 20 mA에서 24시간 transfer하였다. Membrane은 5% nonfat milk와 TBST(0.1% Tween20 in pH 7.4 Tris-based saline buffer)에 1 시간 동안 blocking하고 TBST로 2회 washing하였다. Bax antibody(1:1500, Cell signalling, U.S.A.), Bcl-2 antibody(1:1500, santacruz, U.S.A.)와 cytochrome c antibody(1:2000, BD, U.S.A.)를 2% nonfat milk/TBST(1:2000 dilution)에서 4°C에서 overnight하였다. TBST로 4회 washing 후 2차 항체로 Bax와 Bcl-2는 horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG(1:1500, Cell signalling, USA), cytochrome c는 horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG(1:2000, jackson immunoresearch, U.S.A.)를 2% nonfat milk/TBST에서 1 시간 배양하였고 TBST로 4회 washing하였다. Membrane은 TBST를 제거한 후 enhanced chemiluminescence plus western blotting detection reagents(Amersham, U.K.)를 넣고 3분 동안 반응시켰다. 발현된 Bax, Bcl-2, cytochrome c의 band들은 ECL film(Amersham, U.K.)을 developer(1:5, Dongjin, Korea)와 Fixer(1:5, Dongjin, Korea)에서 현상하였다. 발현된 Bax, Bcl-2, cytochrome c의 intensity는 Kodak MI Software(Kodak, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

### 6. Total RNA 분리 및 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

#### 1) Total RNA 분리

Total RNA의 분리는 좌측 hippocampus 부위의 조직(3 g)을 500 µl TRIZOL reagent(Gibco-BRL, U.S.A.)로 균질화하고 균질액에 대해 1 ml의 chloroform(Sigma, U.S.A.)을 가하여 15 초 동안 흔들어 잘 혼합한 후, 실온상태에서 15 분 방치하고 난 다음 세포 유전물을 제거하기 위하여 4°C, 14,000 rpm에서 15 분 동안 원심분리하였다. 원심분리로 얻어진 상층액과 1 ml의 isopropanol(sigma, USA)을 첨가하여 실온상태에서 5 분 동안 방치한 후 RNA pellet을 얻기 위하여 4°C, 14,000 rpm에서 8 분간 원심분리하고, 원심분리로 생긴 pellet에 냉장 보관된 70%

ethanol과 함께 DEPC (diethylpyrocarbonate)를 넣고 4°C, 7,500 rpm에서 5 분간 원심분리 후 pellet만 남기고 모두 제거하고, 남은 ethanol은 실온에서 5 분간 방치시켜 건조시킨 다음 DEPC-treated water에 녹여 spectrophotometer(Eppendorf, Germany)에서 OD260 값을 읽어 RNA의 순도 및 농도를 정량하였다. 이들 뇌조직의 total RNA는 사용 시까지 -70°C 에서 보관하였다.

## 2) RT-PCR

분리된 total RNA 2 µg과 2.5 µl Oligo (dT), DEPC-treated water를 RT premix(Bioneer, Korea)에 넣어 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)를 이용하여 50 µl cDNA를 합성하여 PCR 증폭을 위한 template로 사용하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (sense primer: 5'-TGCATCCTGCACCACCAACT-3', antisense primer: 5'-CGCCTGCTTACCACCTTC-3')를 internal control로 사용하였다. Reverse transcription temperature cycle은 42°C에서 1 시간 동안 cDNA synthesis, 94°C 에서 5 분 동안 denature 그리고 4°C에서 5 분 동안 cooling시키는 단계를 거쳤다. mGluR5 유전자에 대한 白鼠의 특이 primer는 PCR-premix kit(Bioneer, Korea)를 사용하였다. Polymerase chain reaction은 cDNA 2 µl, mGluR5 sense primer 1 µl, mGluR5 antisense primer 1 µl, DEPC-treated water를 PCR premix(Bioneer, Korea)에 넣었다. PCR temperature cycle은 cDNA의 증폭을 위하여 95°C 에서 30 초 동안 pre-denaturation, 94°C 에서 40 초 동안 melting, 55°C 에서 40 초 동안 annealing, 72°C 에서 90 초 동안 extension하는 과정을 30 회 반복 수행하고 마지막 cycle에서 72°C 에서 600 초 동안 extension 단계를 거쳐 mGluR5 유전자증폭을 primer(senseprimer: 5'-TCCAATC TGCTCCTCTACC-3', antisense primer: 5'-CAACGATGAA GAACTCTGCG-3')를 이용하여 Mastercycler gradient(Eppendorf, Germany)에서 시행하였다. 이렇게 증폭된 mGluR5의 DNA를 ethidium bromide(EtBr, 10 mg/ml)를 포함한 1.5% agarose gel상에서 0.5x TBE buffer (80 mM Tris-HCL, 80 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3)로 50 V에서 전기 영동시켜 관찰한 후 Image Station(Kodak, U.S.A.)을 이용하여 촬영하였으며, Kodak MI Software(Kodak, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

## 7. Immunohistochemistry

### 1) Cresyl violet 염색

白鼠를 pentobarbital sodium(100 mg/kg, i.p. Hanlim, Korea)으로 마취시킨 후, 0.9% saline 200 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액(fixative) 800 ml를 심장을 통해 관류시켰다. 처음 고정액 200 ml는 2 분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 800 ml는 25 분간에 걸쳐 천천히 관류시켰다. 고정이 끝난 白鼠의 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2 시간 경과 후 고정시키고, 20% sucrose가 함유된 PBS(phosphate buffered saline)에 넣어 4°C 에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 hippocampus를 30 µm의 두께로 잘랐다. PBS로 조직을 몇 차례 씻고 xylene(5 min), 100% alcohol(2 min), 95% alcohol(1

min), 70% alcohol(1 min), D.W.(2 min)순으로 옮겨 담아 탈지, 탈수를 시킨 다음 cresyl violet buffer(5 min)로 염색을 하였다. 염색이 끝난 조직은 광학현미경(Olympus, Japan)을 사용하여 40 배로 확대하여 관찰하였고, 신경세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다.

### 2) Choline acetyltransferase(ChAT)

뇌 조직을 PBS에 3 회 정도 세척한 후 primary sheep ChAT anti-body (1:1,500, polyclonal, Cambridge Research Bio chemicals, U.S.A.)를 사용하였다. 1차 항체는 PBS에 0.3% Triton X-100을 첨가한 PBST에서 2% 토끼 혈청과 0.1% sodium acid(Sigma, U.S.A.)로 2000 배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4°C 에서 72 시간 동안 지속적으로 흔들어 주면서 배양하였다. 그 후 3 번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음 2 시간 동안 실온에서 2% 토끼 혈청을 함유하는 PBST에서 200 배 희석한 biotinylated anti-sheep serum (Vector Laboratories, U.S.A.)에 반응시켰다. PBST로 3 번 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 2 시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent(Vector Laboratories, U.S.A.)에 위치시켰다. PBS로 몇 번 헹군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 DAB(diaminobenzidine)을 사용하여 발현시켰다. 모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 광학현미경으로 40 배로 확대하여 hippocampus에서 ChAT-immunoreactive 신경 세포의 밀도를 Scion image program(Scion, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다.

## 8. 통계처리

모든 측정값은 Excel statistic program(Microsoft, U.S.A.)을 이용하여 평균치와 표준오차(mean±standard error)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Window용 SPSS(SPSS, U.S.A.)를 사용하여 비모수적 방법으로 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 각 실험군은 대조군에 비하여 α=0.05 수준(P<0.05)과 α=0.01 수준(P<0.01)에서 유의성을 검정하였다.

## 실험성적

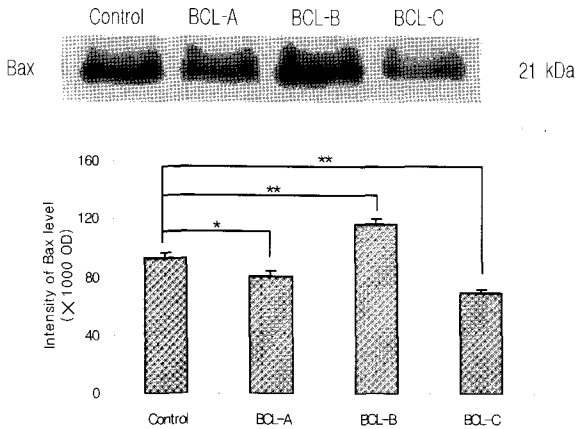
### 1. Bax 발현 변화

각 군에서 hippocampal CA1 부위의 Bax 발현정도를 관찰한 결과, control군은 93.6±3.50(×1000 OD), BCL-A군은 80.9±3.88(×1000 OD), BCL-B군은 116.5±2.83(×1000 OD), BCL-C군은 69.4±4.04(×1000 OD)로, control군에 비해 BCL-A군(P<0.05)과 BCL-C군(P<0.01)은 유의하게 감소되었으나, BCL-B군(P<0.01)은 유의하게 증가되었다(Fig. 1).

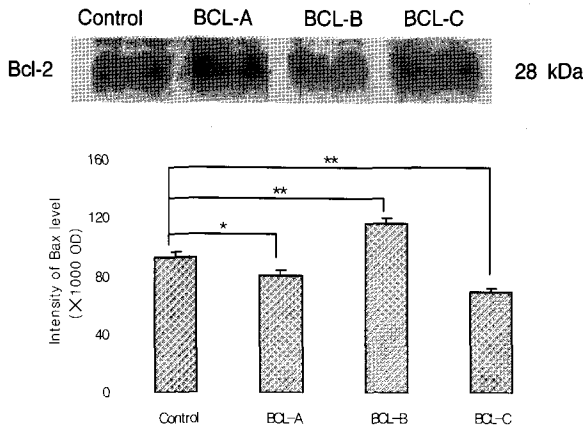
### 2. Bcl-2 발현 변화

각 군에서 hippocampal CA1 부위의 Bcl-2 발현정도를 관찰한 결과, control군은 61.3±3.05(×1000 OD), BCL-A군은 63.8±4.19(×1000 OD), BCL-B군은 53.4±3.93(×1000 OD), BCL-C군은 55.9±4.56(×1000 OD)으로, control군에 비해 모든 군들에서는 유

의한 변화를 나타내지 못하였다(Fig. 2).



**Fig. 1.** Effect of oral medication of *Bambusae Caulis in Liquamen* (BCL) on the intensity of Bax in the hippocampal CA1. Results are shown as mean±S.E. Control group, oral medication of saline group after being ischemia induced; BCL-A, oral medication of BCL-A group after being ischemia induced; BCL-B, oral medication of BCL-B group after being ischemia induced; BCL-C, oral medication of BCL-C group after being ischemia induced; \*, P<0.05, \*\*, P<0.01 as compared with the control group.



**Fig. 2.** Effect of oral medication of *Bambusae Caulis in Liquamen* (BCL) on the intensity of Bcl-2 in the hippocampal CA1. Results are shown as mean±S.E. Control group, oral medication of saline group after being ischemia induced; BCL-A, oral medication of BCL-A group after being ischemia induced; BCL-B, oral medication of BCL-B group after being ischemia induced; BCL-C, oral medication of BCL-C group after being ischemia induced.

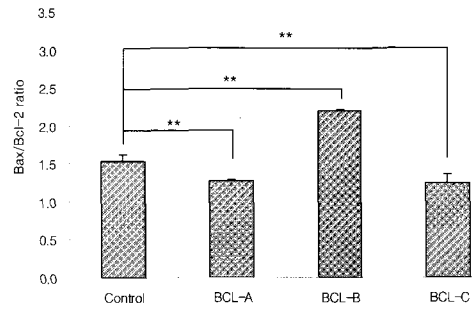
**3. Bax/Bcl-2 ratio 변화**

각 군에서 hippocampal CA1 부위의 Bax/Bcl-2 ratio를 관찰한 결과, control군은 1.5±0.02, BCL-A군은 1.3±0.02, BCL-B군은 2.2±0.11, BCL-C군은 1.2±0.03으로, control군에 비해 BCL-A군 (P<0.01)과 BCL-C군(P<0.01)은 유의하게 감소되었으나, BCL-B군 (P<0.01)은 유의하게 증가되었다(Fig. 3).

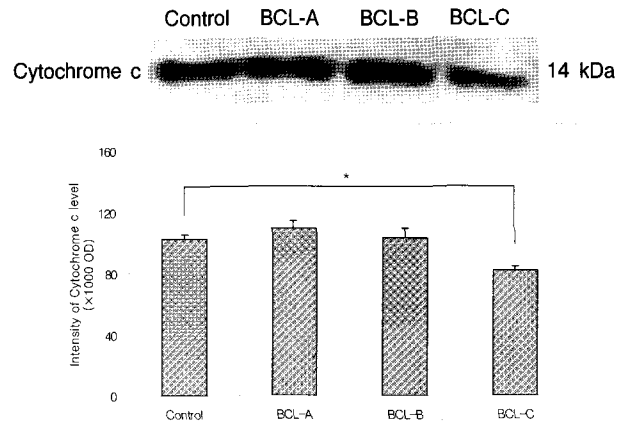
**4. Cytochrome c 발현 변화**

각 군에서 hippocampal CA1 부위의 cytochrome c 발현 정도를 관찰한 결과, control군은 102.6±4.92(×1000 OD), BCL-A군은 109.4±6.29 (×1000 OD), BCL-B군은 103.4±2.72(×1000 OD),

BCL-C군은 81.8±3.22(×1000 OD)로, control군에 비해 BCL-C군 (P<0.05)이 유의하게 감소되었다(Fig. 4).



**Fig. 3.** Effect of oral medication of *Bambusae Caulis in Liquamen* (BCL) on the intensity of Bax/Bcl-2 ratio in the hippocampal CA1. Results are shown as mean±S.E. Control group, oral medication of saline group after being ischemia induced; BCL-A, oral medication of BCL-A group after being ischemia induced; BCL-B, oral medication of BCL-B group after being ischemia induced; BCL-C, oral medication of BCL-C group after being ischemia induced; \*\*, P<0.01 as compared with the control group.



**Fig. 4.** Effect of oral medication of *Bambusae Caulis in Liquamen* (BCL) on the intensity of cytochrome c in the hippocampal CA1. Results are shown as mean±S.E. Control group, oral medication of saline group after being ischemia induced; BCL-A, oral medication of BCL-A group after being ischemia induced; BCL-B, oral medication of BCL-B group after being ischemia induced; BCL-C, oral medication of BCL-C group after being ischemia induced; \*, P<0.05 as compared with the control group.

**5. mGluR5 발현 변화**

각 군에서 hippocampal CA1 부위의 mGluR5 발현 정도를 관찰한 결과, control군은 468.0±13.66(×1000 OD), BCL-A군은 458.2±12.32(×1000 OD), BCL-B군은 437.5±10.65(×1000 OD), BCL-C군은 513.1±8.32(×1000 OD)로, control군에 비해 BCL-C군 (P<0.05)이 유의하게 증가되었다(Fig. 5).

**6. Cresyl violet을 이용한 신경세포 손상 방어효과**

각 군에서 hippocampal CA1 부위를 cresyl violet에 염색하여 신경세포 밀도로서 손상방어 효과를 살펴본 결과, control군은 14.0±1.78 (Density), BCL-A군은 29.3±2.51(Density), BCL-B군은 25.5±1.73 (Density), BCL-C군은 25.6±1.89(Density)로, control군에 비해 모든 실험군들 (P<0.01)이 유의하게 증가되었다(Fig. 6, 7).

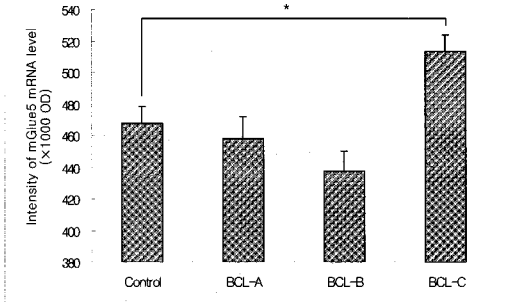
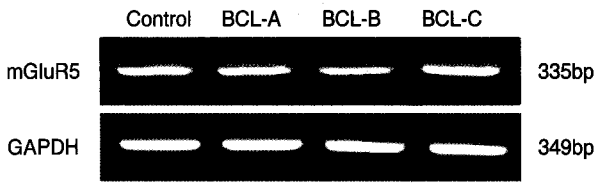


Fig. 5. Effect of oral medication of *Bambusae Caulis in Liquamen* (BCL) on the intensity of mGluR5 in the hippocampal CA1. Results are shown as mean±S.E. Control group, oral medication of saline group after being ischemia induced; BCL-A, oral medication of BCL-A group after being ischemia induced; BCL-B, oral medication of BCL-B group after being ischemia induced; BCL-C, oral medication of BCL-C group after being ischemia induced; \*, P<0.05 as compared with the control group.

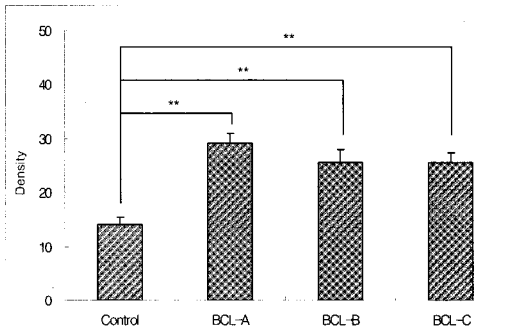


Fig. 6. Effect of oral medication of *Bambusae Caulis in Liquamen* (BCL) on the density of cresyl violet-stained neural cell sections in the hippocampal CA1. Results are shown as mean±S.E. Control group, oral medication of saline group after being ischemia induced; BCL-A, oral medication of BCL-A group after being ischemia induced; BCL-B, oral medication of BCL-B group after being ischemia induced; BCL-C, oral medication of BCL-C group after being ischemia induced; \*\*, P<0.01 as compared with the control group.

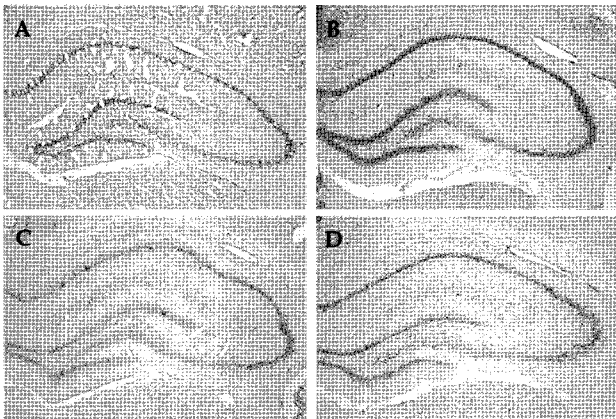


Fig. 7. Representative photomicrographs of coronal sections in the hippocampal CA1. A, Control group; B, BCL-A; C, BCL-B; D, BCL-C. Cresyl violet-stain, ×40.

### 7. ChAT 발현

각 군에서 hippocampal CA1 부위의 ChAT 발현정도를 관찰한 결과, control군은 16.5±2.22(Density), BCL-A군은 28.5±3.28(Density), BCL-B군은 24.8±2.97(Density), BCL-C군은 29.6±4.88(Density)으로, control군에 비해 BCL-A군(P<0.05)과 BCL-C군(P<0.05)이 유의하게 증가되었다(Fig. 8, 9).

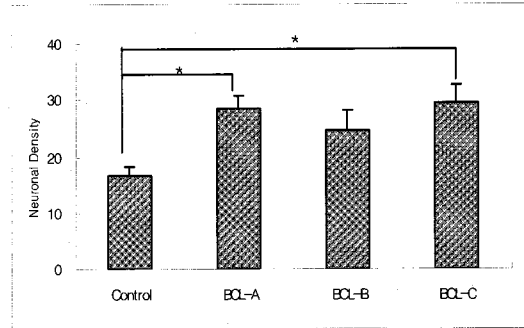


Fig. 8. Effect of oral medication of *Bambusae Caulis in Liquamen* (BCL) on the density of Choline acetyltransferase(ChAT)-stained sections in the hippocampal CA1. Results are shown as mean±S.E. Control group, oral medication of saline group after being ischemia induced; BCL-A, oral medication of BCL-A group after being ischemia induced; BCL-B, oral medication of BCL-B group after being ischemia induced; BCL-C, oral medication of BCL-C group after being ischemia induced; \*, P<0.05 as compared with the control group.

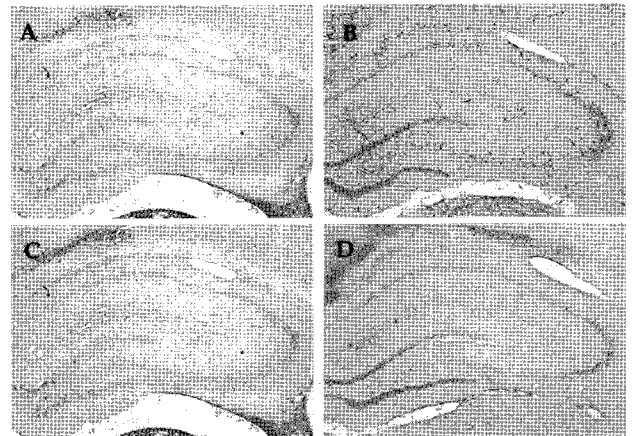


Fig. 9. Representative photomicrographs of coronal sections in the hippocampal CA1. A, Control group; B, BCL-A; C, BCL-B; D, BCL-C. ChAT-stain, ×40.

## 고찰

중풍은 뇌의 혈액공급이 장애를 받아 나타나는 신경성 질환으로써 서양의학에서는 저산소증(hypoxia), 허혈증(ischemia)과 경색(infarction)등의 혈관폐쇄나 저혈압에 의한 병변과 두개강내 출혈, 그리고 고혈압에 의한 병변 등 세 종류로 나누고 있는데 신경조직이 재생되지 않는다는 점에서 비가역적인 변화로 인해 많은 후유증을 남긴다<sup>3)</sup>.

한의학에 있어서 중풍이란 卒然昏仆, 人事不省, 口眼喎斜, 半身不遂, 言語不利 등을 主症狀으로 하는 질병으로 內經시대부터 偏古, 偏風, 身偏不用 등으로 표현되어 왔으나 병인병리의 개념이 시대에 따라 변화하였다. 內經시대에서는 虛邪賊風의 外因

의 개념이었다가 金元시대에 이르러 主火, 主氣, 主濕 등을 病因으로 하는 內傷因論으로 전환되었고 治法으로는 清熱化痰, 滋陰熄風, 活血化痰, 平肝瀉陽 등이 적용되어 왔다<sup>17,18)</sup>.

竹瀝은 清熱化痰하고 鎮痙利竅시키는 효능이 있어 中風昏迷나 痰涎壅塞한 증상에 응용되고 있다<sup>19)</sup>. 竹瀝에는 대나무 탄화 과정에서 생긴 약 300 종 이상의 여러 가지 물질이 혼입되어 있는 것으로 보고되어 있는데<sup>20)</sup> 그 가운데는 tar, aldehydes, methanol, carbonyl compounds, phenolic compounds 등 유해 성분과 활성물질들이 함유되어 있으며 이들 성분들은 생산공정에 있어 가열온도, 추출설비 및 여과, 정제과정에 따라 차이가 있을 뿐만 아니라 같은 질량에도 각기 다른 유효성이 나타날 수 있음이 보고되었다<sup>12,14)</sup>.

국내에서 사용되는 죽력은 채취하는 제조공정에 따라 크게 저온추출 죽력과 고온추출 죽력의 두 종류가 있다. 저온추출 방식은 전통적인 제조공정으로 대나무를 항아리에 넣어 땅속에 묻어둔 후 썰겨를 연료로 사용하여 400℃ 정도로 5 일간 가열하여 竹瀝을 채취하는 방법과 같은 저온추출 방식이지만 생산성을 높이기 위하여 대나무를 전기가마의 내통에 넣은 후 전기를 열원으로 사용하여 250℃ 정도로 11 시간 가열하여 죽력을 채취하는 방법이 있다. 고온추출 방식은 대나무 숯을 제조하는 과정에서 부산물로 竹瀝을 채취하는 공법으로 가마에서 1000℃ 이상으로 3 일간 가열하면서 연통 주위에 냉각수를 통과시켜서 탄화과정에서 발생하는 연기를 80~150℃로 냉각시켜서 연기 중에 포함된 竹瀝液(竹醋液)을 회수한 후 도가니에 담아 3 년간 숙성시키는 방법이다. 이러한 과정을 거친 제품들은 다시 흡착, 여과 혹은 종류의 과정을 거치기도 하는데 장<sup>12,14)</sup> 등은 전기가마에서 저온추출된 죽력을 활성탄 흡착과 여과과정을 거친 후 사용했고, 황도가마에서 고온추출된 죽력은 활성탄 흡착, 여과 그리고 상압증류 과정을 거친 후 사용했다.

본 연구에서는 전기가마에서 저온추출하여 활성탄 흡착과 여과과정을 거친 죽력을 BCL-A, 황도가마에서 저온추출하여 후 활성탄 흡착과 여과 그리고 상압증류 과정을 거친 죽력을 BCL-B, 황도가마에서 전통방식으로 저온추출된 죽력을 BCL-C로 설정하고, 물리화학적 특성이 다른 이들 3 종의 죽력을 국소 뇌허혈로 인해 뇌손상이 유발된 白鼠에 구강투여한 후 hippocampal CA1부위의 Bax, Bcl-2, cytochrome c, mGluR5, cresyl violet 염색과 ChAT 발현을 통해 세포자멸사 억제효과와 신경세포 보호효과를 관찰하여 각각의 죽력이 뇌신경세포 활성화에 미치는 영향을 살펴보았다.

실험적으로 뇌허혈을 야기하는 방법 중 백서를 이용한 중뇌동맥의 폐쇄는 비교적 시술이 용이하고, 두개의 절개도 필요 없을 뿐만 아니라 뇌허혈 중 백서의 사망을 최소화할 수 있어 널리 사용되고 있어<sup>21)</sup> 본 연구에서도 intraluminal filament 삽입술을 사용하여 좌측 중뇌동맥을 차단하여 前腦에만 국한하여 국소 허혈을 일으키는 방법을 사용하였다<sup>22,23)</sup>.

이러한 손상은 後腦에서의 혈류가 영향을 받지 않아, 호흡과 체순환에 영향을 주지 않는다는 점에서 허혈로 인한 신경손상의 연구에 다용되고 있으며<sup>24,25)</sup> 국소 허혈성 손상은 주로 hippocampus

부분의 신경세포가 손상을 입게 되는데, 5~7일이 경과되면 세포자멸사와 비슷한 세포 손상과 인지 및 학습장애를 일으키게 된다<sup>26,27)</sup>.

대뇌 허혈 모델은 산소와 포도당을 뇌조직으로 공급하는 것을 감소시키며 이 과정은 이온기울기(ionic gradient)를 유지하는데 필요한 에너지 공급을 방해하는 다양한 세포학적 및 분자학적 기전을 통하여 뇌손상을 유발한다. 에너지 상실(energy failure)로 신경세포의 탈분극이 일어나고, 이것은 글루탐산(glutamate) 수용체를 활성화시키고, 다시 Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup> 그리고 K<sup>+</sup>의 이온기울기를 변화시킨다. 세포의 공간에 글루탐산이 증가하면 과사주위의 신경세포에 탈분극화가 발생한다. 그러면 세포가 팽창하여 부종이 발생한다. 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 증가로 lipases, proteases, endonucleases와 같은 다양한 효소계가 상향조절된다. 결과적으로 산소 자유기가 다양한 생화학적 경로를 통하여 만들어지고 세포자멸사(apoptosis)가 발생한다<sup>28)</sup>.

세포의 죽음은 형태학적으로 과사(necrosis)와 세포자멸사(apoptosis)로 구분되며 세포외액의 이온들이 급격히 세포내로 유입되어 세포질 및 미토콘드리아의 팽창, 세포막의 파열 등의 특성이 보이는 과사와 달리 세포자멸사는 세포질 및 핵염색질이 응축되고 분절되어 고사체(apoptotic body)를 형성하는 특성을 보이며 과사와는 달리 여러 종류의 유전자 발현의 변동이 관여한다<sup>4,29,30)</sup>.

이들 유전자 중 Bax는 세포자멸사를 촉진하는 인자이며 BCL-2는 세포자멸사를 억제하는 인자이고<sup>31)</sup> Bcl-2의 세포자멸사 억제 효과는 Bax의 영향을 받는다고 알려져 있으며, Bcl-2와 Bax의 비율은 세포자멸사를 결정하는 중요 요소가 된다<sup>32)</sup>.

본 연구에서 Bax의 발현을 관찰해 본 결과 control군에 비해 BCL-A군(P<0.05)과 BCL-C군(P<0.01)은 유의하게 감소되었으나, BCL-B군(P<0.01)은 유의하게 증가되었다. 이를 통해 Bax 발현에 유의한 감소를 나타낸 BCL-A와 BCL-C가 뇌세포자멸사를 완화하는 작용에 유의성이 있는 것으로 생각된다.

Bcl-2의 발현을 관찰한 결과 control군에 비교해 모든 실험군들에서 유의한 변화가 나타나지 않았다.

Bax/Bcl-2 ratio를 관찰한 결과 control군에 비해 BCL-A군(P<0.01)과 BCL-C군(P<0.01)은 유의하게 감소되었고, BCL-B군(P<0.01)은 유의하게 증가되었다. Bax의 세포자멸촉진 기능과 Bcl-2의 세포자멸 억제기능은 서로 길항작용을 일으키는 것으로 알려져 있으며<sup>33)</sup> Bax/Bcl-2 ratio의 감소는 세포자멸이 줄어들고 세포생존을 촉진시켜 뇌손상을 감소시키는 것을 의미한다. 이를 통해 BCL-A와 BCL-C가 뇌세포자멸사를 완화하는 작용이 있음을 유추해 볼 수 있다.

Cytochrome c는 세포자멸사를 유발하는 인자로 Bax와 Bcl-2와 밀접한 관계를 맺고 있으며 이<sup>34)</sup> 등의 실험에서 cytochrome c의 세포내 미세주입으로 세포자멸사가 매우 빠르게 진행됨이 관찰되어서 세포자멸사의 주요한 지표가 된다. 본 연구에서 hippocampal CA1 부위의 cytochrome c 발현정도를 관찰한 결과, control군에 비해 BCL-C군(P<0.05)만이 유의하게 감소되었다. 이에 Bax와 Bcl-2 그리고 cytochrome c 발현의 결과를 종합해 세포자멸사 억제효과를 살펴보면 BCL-A와 BCL-C에서 세포자멸사 억제효과가

나타나고 있음으로 사료되었는데 BCL-C에서는 cytochrome c의 분비감소를 통해 세포자멸사 억제효과가 나타난 것으로 보이며 BCL-A는 cytochrome c 분비감소와는 달리 다른 기전에 의해 세포자멸사의 억제효과가 나타난 것으로 사료된다.

뇌허혈로 인한 신경세포의 손상에 흥분성 신경전달물질의 역할이 중요함은 잘 알려져 있으며 그 중 glutamate는 흥분성 신경독성발현에 중요한 역할을 하고 있다<sup>35)</sup>.

뇌에 혈액 공급이 중단돼 산소와 포도당이 고갈되어 세포가 호흡을 할 수 없게 되면 시냅스 간극에 과량의 glutamate가 축적되면서 과량의 Ca<sup>2+</sup>이 세포안으로 유입되어 세포사멸과 조직의 손상이 일어난다<sup>36)</sup>.

mGluR5(metabotropic glutamate receptors)는 뇌에 있어서 주요한 신경독성 물질인 glutamate의 수용체 아형 단위로 group I 에 속하며 glutamate 유리를 억제하며 계획된 세포사를 억제하고 산소결핍이나 nitric oxide 독성에 대하여 신경보호 작용을 한다고 보고되었다<sup>35,37,38)</sup>.

본 연구에서 hippocampal CA1 부위의 mGluR5 발현 변화를 관찰한 결과 control군에 비해 BCL-C군(P<0.05)이 유의하게 증가되었다. 이를 통해 BCL-C가 mGluR5의 활성을 통하여 뇌신경 독성기전을 완화하는 작용에 유의성이 있는 것으로 생각된다.

Hippocampal CA1 부위를 cresyl violet에 염색하여 신경세포의 밀도를 측정하여 손상방어 효과를 관찰한 결과, control군에 비해 모든 실험군들(P<0.01)이 유의하게 증가되었다. 이를 통해 모든 죽력이 hippocampal CA1 부위 신경세포 손상 방어 효과가 있음을 관찰 할 수 있었다.

Choline acetyltransferase(ChAT)는 신경전달 물질인 acetylcholine의 합성효소로써 신경계가 원활하게 작용하는데 매우 중요한 역할을 하게 된다<sup>39,40)</sup>.

항체를 이용하여 ChAT-immunoreactive 신경세포의 밀도를 관찰해본 결과 control군에 비해 BCL-A군(P<0.05)과 BCL-C군(P<0.05)이 유의하게 증가되었다. 이는 BCL-A와 BCL-C가 ChAT를 효과적으로 발현시켜 신경계의 활성에 주요한 영향을 미쳤음을 의미한다고 사료되며, cresyl violet에 염색하여 신경세포의 밀도를 측정하여 손상방어 효과를 관찰한 결과와도 부합된다고 평가된다.

이상의 결과를 바탕으로 3종의 죽력 구강투여가 뇌허혈 모델에 미치는 영향을 종합해 보면, BCL-C는 Bax, Bax/Bcl-2 ratio, cytochrome c, mGluR5, cresyl violet 염색을 통한 신경세포 손상방어 효과 그리고 ChAT의 발현에서 모두 유의한 증가가 관찰되어 세포자멸사 및 신경세포 손상 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 이처럼 BCL-C를 투여한 실험군에서 Bcl-2 발현을 제외한 모든 분야에서 유의성 있는 효과를 나타낸 것으로 보아 BCL-C의 구강투여가 세포자멸사를 억제하며 신경세포 손상을 억제하는 효과가 본 실험에서 사용된 죽력 중 가장 탁월한 것으로 평가된다.

BCL-A의 경우 Bax, Bax/Bcl-2 ratio에서 유의성 있는 감소가 나타나 세포자멸사 억제효과 있음을 알 수 있었으며, cresyl violet 염색을 통한 신경세포 손상방어 효과와 ChAT의 발현에서 유의한 결과가 관찰되어 신경세포 손상 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 하지만 cytochrome c와 mGluR5의 발현에 있어서는

유의성이 나타나지 않았는데 이를 통해보면 BCL-A가 BCL-C보다 세포자멸사 억제효과나 신경세포 보호효과가 다소 떨어지는 것으로 평가된다.

BCL-B는 Bax, Bax/Bcl-2 ratio가 오히려 증가하는 경향을 보였으며, cresyl violet 염색을 통한 신경세포 손상방어 효과는 증가하였으나, mGluR5와 ChAT의 발현에서는 유의성이 나타나지 않았다. 이를 통해 유추해보면 cresyl violet 염색을 통한 신경세포 손상방어 효과는 증가는 BCL-A나 BCL-C에서와 같이 세포자멸사를 통한 기전이 아니라 밝혀지지 않은 다른 경로를 통해 이루어진 것으로 사료되며, 3종의 죽력 가운데 가장 효과가 미미한 것으로 평가된다.

이처럼 전기가마에서 죽력을 얻은 후 활성탄으로 흡착시킨 후 여과과정을 거친 BCL-A가 항아리에 대나무를 넣은 후 왕겨를 연료로 400℃ 이하로 가열하여 얻은 전통적 제조방식의 죽력인 BCL-C보다 효과가 떨어진 것은 전기가마와 항아리라는 생산설비 차이와 유해성분을 제거하기 위한 흡착과 여과 과정에서 유효성분의 일부가 함께 제거된 것으로 사료된다. 이는 BCL-C가 다른 죽력들에 비해 phenolic compounds와 methanol이 다량 함유된 것을 통해 유추해 볼 수 있다. 또한 황토가마에서 1000℃ 이상의 고온으로 가열하여 대나무 숯을 얻으면서 부산물로 채취한 죽력을 활성탄으로 흡착시킨 후 여과과정을 거친 후 다시 108℃ 에서 상압 증류하여 유출되는 액 가운데 중간의 80%만을 취한 증류액인 BCL-B가 항아리에 대나무를 넣은 후 왕겨를 연료로 400℃ 이하로 가열하여 얻은 전통적 제조방식의 죽력인 BCL-C보다 효과가 떨어진 것은 고온으로 가열할 때 유기물 대신에 무기물만 대부분 남게 되는 가열온도 차이와 유해성분을 제거하기 위한 흡착, 여과 그리고 증류 과정에서 유효성분의 일부가 함께 제거된 것에 기인되는 것으로 사료되며 앞으로 이에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 평가된다.

## 결론

생산공정 차이에 따른 竹瀝이 세포자멸사 및 신경세포 보호 효과에 미치는 影響을 관찰하기 위하여 저온추출죽력(BCL-A), 고온추출죽력(BCL-B), 그리고 저온추출죽력(BCL-C) 등 3종의 영구적 국소 뇌허혈을 일으킨 백서에 투여하여 hippocampal CA1 부위의 세포자멸사 억제효과 및 신경세포 보호효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

전기가마에서 저온으로 추출한 후 여과과정을 거친 죽력을 투여한 실험군(BCL-A)에서는 Bax, Bax/Bcl-2 ratio가 유의성 있게 감소되었고, cresyl violet 염색과 ChAT의 발현은 유의성 있게 증가되었다. 황토가마에서 고온으로 추출한 후 여과와 정제과정을 거친 죽력을 투여한 실험군(BCL-B)에서는 cresyl violet 염색을 통해 신경세포 밀도의 발현이 유의성 있게 증가되었다. 항아리에서 저온으로 추출한 죽력을 투여한 실험군(BCL-C)에서는 Bax, Bax/Bcl-2 ratio, cytochrome c 는 유의성 있게 감소되었고, mGluR5의 발현, cresyl violet 염색, ChAT의 발현 등이 유의성 있게 증가되었다.



## 참고문헌

- 張伯與. 中醫內科學. 上海, 上海科學技術出版社, p 212, 1988.
- 洪性範. 高血壓 中風의 漢方療法. 서울, 醫藥社, p 305, 306, 1983.
- 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사, p 33, 34, 1218, 1995.
- 조연희, 김종근, 김경근, 김명규, 조기현, 김세종. 흰쥐 대뇌구 소허혈시 BCL-2, BAX 및 ICE 유전자 발현의 변동. 대한신경과학회지 17(4):568-573, 1999.
- 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, p 303, 1966.
- 王裕生 外. 中藥藥理與應用. 北京, 人民衛生出版社, p 109, 198, 264, 424, 442, 460, 483, 723, 767, 853, 1983.
- 辛民教. 臨床本草學. 서울, 永林社, pp 128-132, 169, 221, 372-374, 400-406, 509-511, 1992.
- 이경섭. 竹瀝湯, 加味竹瀝湯이 血壓 및 血糖에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 博士學位論文, 1980.
- 김영안, 변일. 중풍치료에 응용되는 竹瀝과 地龍의 효능에 대한 문헌적 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집, 2(1):91-104, 1993.
- 정태호. 秋石 및 竹瀝이 白鼠의 血壓降下에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 碩士學位論文, 1982.
- 孫錫慶. 十宣穴 鍼刺와 竹瀝의 併用이 白鼠의 血壓降下에 미치는 影響. 慶熙韓醫大 論文集 4卷, pp 27-38, 1981.
- 최건기, 장경선, 오영준, 최찬헌. 생산공법차이에 따른 竹瀝의 성분 및 혈당강하효능 비교. 동의생리병리학회지 19(1):152-158, 2005.
- 장경선, 오영준, 최찬헌, 전용석. 생산공법 차이에 따른 竹瀝이 streptozotocin으로 유발된 당뇨생쥐에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 16(6):1253-1259, 2002.
- 장경선, 정동주, 최찬헌, 오영준. 생산 공법차이에 따른 竹瀝과 누에가루를 배합한 약물이 db/db mouse의 혈당강하에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 17(5):1217-1223, 2003.
- 윤대환, 이봄비, 심인섭, 나창수. 足三里에 施術된 竹瀝 藥鍼이 Intraluminal Filament 插入術에 의하여 誘發된 白鼠의 虛血性 局所 腦損傷에 미치는 影響. 대한경락경혈학회지 22(2):25-41, 2005.
- 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.
- 진형석, 남상경, 이원철. 中風의 時代的 發展變化와 文獻的 考察. 경산대학교 제한동의학술원. 동서의학, 17(2):22-39, 1992.
- 노현태, 김병탁. 中風의 誘發因子에 대한 文獻的 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집, 5(2):305-317, 1997.
- 정현우, 오찬호, 은재순. 竹瀝 물분획이 생쥐 면역세포의 cytokine 분비에 미치는 영향. 동의병리학회지 13(1):79-83, 1999.
- 김해진, 김선민, 오영준, 정기상, 장경선. 정제 방법에 따른 竹瀝의 물리·화학적 특성 연구 (I). 동의생리병리학회지 15(3):473-476, 2001.
- 김인세, 박두진, 권재영, 김해규, 백승완, 신상욱. 백서의 중대 뇌동맥 폐쇄에 의한 허혈성 뇌손상 모델에서 Dexamethasone과 MK-801이 뇌부종 형성에 미치는 영향. 대한마취학회지 37: 327-333, 1999.
- Gill, R., Foster, A., Woodruff G. MK-801 is neuroprotective in gerbils when administered during the post-ischemic period. Neuroscience, 25: 847-855, 1988.
- Buchan, A.M., Pulsinelli, W.A. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. J Neurosci. 11: 1049-1050, 1990.
- Petito, C.K., Feldmann, E., Pulsinelli, W.A., Plum, F. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. Neurology. 37(8):1281-1286, 1987.
- Herguido, M.J., Carceller, F., Roda, J.M., Avendano, C. Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rat. A critical assessment. Neuroscience. 93: 71-80, 1999.
- Buchan, A., Pulsinelli, W.A. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. J Neurosci. 10(1):311-316, 1990.
- Foster, A.C., Gill, R., Woodruff, G.N. Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. J Neurosci. 8(12):4745-4754, 1988.
- 이민섭, 안영준, 최기용, 강구, 강성식, 정일영, 이진재, 김근우. Nicotinamide의 투여가 일싹거인 국소허혈로 유발된 흰쥐의 뇌경색에 미치는 영향. The Korean Journal of Pathology 40: 93-102, 2006.
- Wyllie, A.H. Cell Death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: Bowen ID, Lockshin RA, eds, Cell Death in Biology and Pathology London: Chapman & Hall, pp 9-34, 1981.
- Schwartzman, A.R., Cidlowski, A.J. Apoptosis The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Reviews, 14(2):133-151, 1993.
- Chong, M.J., Murray, M.R., Gosink, E.C., et al. Atm and Bax cooperate in ionizing radiation-induced apoptosis in the central nervous system. Proc Natl Acad Sci. 97: 889-894, 2000.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. Bcl heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerate programmed cell death. Cell 74: 609-619, 1993.
- 선웅. Bcl-2 family의 신경세포 사멸 조절과 신경계 발달 Control of neuronal cell death by Bcl-2 family molecules. 한국생화학분자생물학회, 26(1):9-17, 2006.
- Lee, M.S., Kang, G. A study fo apoptosis induced by microinjection of cytochrome c protein into mouse 3T3 fibroblast. The Korean journal of pathology 36: 1-6, 2002.
- 김해규, 김평주, 백승완, 김인세, 정규섭. 흰쥐에서 뇌허혈시

- 해마의 Glutamate Receptor(mGluR5) 변화에 대한분자생물학적 연구. 대한중환자의학회지 15(2):75-81, 2000.
36. Arundine, M., Tymianski, M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci.* 61: 657-668, 2004.
37. Copani, A., Casabona, G., Bruno, V., Knopfel, T., Kuhn, R., Messina, A. mGluR5 receptor and apoptosis by trophic deprivation in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacol* 35(6):A9, 1996.
38. Maiese, K., Swiriduk, M., TenBroeke, M. Cellular mechanisms of protection by metabotropic glutamate receptors during anoxia and nitric oxide toxicity. *J Neurochem* 66: 2419-2428, 1996.
39. Eduardo, E.B., et al. *Medical neurosciences*. fourth edition, LW&W, Minnesota, U.S.A. p 361, 1999.
40. Kang, W.S., Chun, M.H. Morphology and synaptic connectivity of cholinergic amacrine cells in the mouse retina. *Korean J. Electron Microscopy* 34(4):285-294, 2004.