

당뇨흰쥐의 국소뇌허혈에 대한 凉膈散火湯의 면역조직화학적 연구

부일권 · 김연섭*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Immunohistochemical Study of Yanggyuksanhwa-tang on Focal Cerebral Ischemia of Diabetic Rats

Il Gwon Boo, Youn Sub Kim*

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

This study evaluated neuroprotective effects of Yanggyuksanhwa-tang (YST), which have been known to be efficacy in the treatment of the stroke and diabetes. on focal cerebral ischemia of diabetic rats. On primary experiment, diabetic condition in rats was induced by streptozotocin injection, then, focal cerebral ischemia was induced by the middle cerebral artery occlusion (MCAO) under the diabetic condition. Then neuroprotective effect of YST was observed with changes of infarct size and volume, expressions of c-Fos, Bax, and hypoxia inducible factor (HIF)-1 α in the brain tissues by using 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and immunohistochemistry. YST treatment showed a significant decrease of infarct size and volume induced by MCAO in diabetic rats. YST treatment showed a significant decrease of c-Fos and Bax positive neurons in cortex penumbra. YST treatment showed a decrease of HIF-1 α positive neurons in cortex penumbra, but it was not significant statistically. These results suggest that YST has effects on neuroprotection against cerebral infarct under diabetic condition. And it is supposed that neuroprotective effect of YST reveals by anti-apoptosis mechanism.

Key words : Yanggyuksanhwa-tang, c-Fos, Bax, HIF-1 α

서 론

당뇨병은 심장병, 고혈압, 뇌중풍, 동맥경화증 등과 함께 대표적인 성인병의 하나이며, 장기간의 당뇨병은 대부분 당뇨병성 합병증의 유발로 인하여 삶의 질 저하는 물론 주요 사망원인이 된다. 당뇨병성 합병증은 망막병증 (retinopathy), 신병증 (nephropathy), 신경병증 (neuropathy) 및 혈관질환으로 이환율 (morbidity)과 사망률 (mortality) 증가의 주원인이 되는 물론 허혈성 심장질환, 뇌중풍 등 각종 급·만성질환 발생의 주요 위험 원인으로 알려져 있다.^{1,4)}

한편으로, 허혈성 뇌중풍의 60-80%는 고혈압, 혈중 cholesterol, 흡연, 경동맥 협착 및 당뇨병과 관련되어 있다고 하였으며, 특히 당뇨병은 허혈성 뇌중풍의 유발을 1.8배에서 6배가

지 증가시킨다고 하였다.^{5,6)} 뇌중풍 환자의 치료에 있어서도 뇌중풍의 형태와 정도뿐만 아니라 고혈압이나 당뇨와 같은 합병증을 고려하여야 한다고 하였으며, 당뇨병을 동반한 뇌중풍 환자는 보다 악화된 신경학적 지표를 나타내는 것은 물론, 당뇨가 심한 경우 뇌중풍의 사망률 또한 증가한다고 하였다.^{6,8)} 실험적으로도 고혈당증은 뇌허혈 손상과 신경세포 사망을 증가시킨다고 보고되어 있다.^{9,10)}

凉膈散火湯은 清熱涼血, 瀉火解毒, 除煩解鬱, 祛風解表, 勝濕解痙하는 효능으로 少陽人 胸膈熱症을 치료하는 처방이며,¹¹⁾ 清熱, 解鬱, 祛風하는 中風의 치료 처방^{12,13)} 또는 上消, 당뇨병의 초기에 응용되는 처방이라 하였다.^{14,15)} 이러한 凉膈散火湯은 뇌중풍의 임상에서 가장 빈번히 사용되는 처방 중 하나로 보고되어 있으며,^{16,17)} 실험연구로도 뇌혈관질환과 관련하여 혈압 상승 및 국소뇌허혈류 증가 효능, 뇌허혈 손상 억제효능이 보고되었다.^{18,19)} 또한 凉膈散火湯은 당뇨병에 대한 효능과 관련하여 alloxan 또는 streptozotocin으로 유발된 흰쥐의 당뇨병에 대하여 유의한 혈당 감소 효능이 보고된바 있다.^{20,21)}

* 교신저자 : 김연섭, 경기 성남시 수정구 복정동 산65 경원대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2007/03/15 · 채택 : 2007/05/16

본 연구에서는 위와 같이 뇌허혈 손상 모형에 대한 실험과 당뇨병 모형에 대한 실험 각각에서 유의한 효능이 있는 것으로 보고된 涼膈散火湯의 효능을 복합적인 당뇨상태에서의 뇌허혈 손상 모형을 통하여 재확인 하고자 하였다. 이를 위해서 streptozotocin으로 유발된 당뇨상태에서 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌경색을 유발시키고 뇌경색 면적 및 체적의 변화, c-Fos, Bax 및 HIF-1 α 발현의 변화를 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

실 험

1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 10주령, 약 250g 전후의 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

1) 처방 조성

실험에 사용한 약물 처방의 내용은 아래와 같다. (Table 1)

Table 1. Herbal Components of Yanggyuksanhwa-tang

한약명	생약명	중량
生地黃	REHMANNIAE RADIX PREPARAT	8.0 g
忍冬藤	LONICERAE CAULIS	8.0 g
連翹	FORSYTHIAE FRUCTUS	8.0 g
山梔子	GARDENIAE FRUCTUS	4.0 g
薄荷	MENTHAE HERBA	4.0 g
知母	ANEMARRHENAE RHIZOMA	4.0 g
石膏	GYPSUM FIBROSUM	4.0 g
防風	LEDEBOURIELLAE RADIX	4.0 g
荊芥	SCHIZONEPETAE HERBA	4.0 g
total		48.0 g

2) 약물의 조제

약물의 조제는 일반적인 물추출물 제조방법에 의하여, 10첩 분량 480 g을 3,000 ml의 물과 함께 냉각기가 장착된 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축 후 동결건조하여 1첩 분량 당 17.3 g의 물추출물을 얻었다. 실험동물의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100g 당 체중비례 계산량의 10배인 57.6 mg으로 하였다. 약물투여는 뇌경색 유발 3시간 전 1회 및 뇌경색 유발 후 1일 1회 5일간 경구투여 하였다.

3. 실험군의 구분

당뇨상태의 뇌허혈 손상에 대한 涼膈散火湯의 효능을 관찰하기 위하여 streptozotocin을 복강주사한 다음 2주 동안 혈당이 250 mg/dl 이상을 계속 유지하는 실험동물만을 선택하고, 뇌허혈을 유발하기 위한 준비과정은 시행하여 중대뇌동맥을 폐쇄시키지 않은 정상대조군 (Sham), 동일한 상태에서 일시적인 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 손상을 유발시킨 대조군

(Control) 및 동일한 상태에서 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 유발 후 涼膈散火湯 물추출물을 경구투여한 涼膈散火湯군 (Sample)으로 나누었다. 涼膈散火湯 투여 5일 후에 각각 실험동물을 희생시켜 관련지표들을 관찰하였으며, 각 군 당 실험동물은 12마리씩 배정하고 6마리는 뇌경색 면적 측정용으로, 6마리는 뇌조직의 면역조직화학염색을 위하여 사용하였다.

4. 당뇨의 유발

공복상태의 흰쥐에 streptozotocin을 10 mM citrate buffer에 녹여 60 mg/Kg이 되도록 복강주사하고, 2주간 혈당을 측정하여 250 mg/dl 이상인 실험동물만을 사용하였다.

5. 국소뇌허혈의 유발

국소뇌허혈은 Zea Longa²²⁾ 등의 방법 즉, 총경동맥으로 나일론 수술실을 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부를 폐쇄하는 방법을 사용하였다. 마취는 70% N₂O와 30% O₂의 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℃로 조절하였다. 전경부의 피부를 절개하고 총경동맥과 외경동맥 및 내경동맥의 분지 부위를 찾아 주위조직을 잘 정리하였다. 외경동맥에 나일론 수술실을 삽입할 수 있도록 입구를 만들고 절단한 다음, 총경동맥의 혈류를 일시적으로 차단한 상태에서, 약 4 cm 길이의 나일론 수술실 (4-0 monofilament, Ethicon, Edinburgh, Scotland)을 내경동맥을 통하여 약 20 mm 까지 천천히 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부가 폐쇄되도록 하였다. 나일론 수술실의 삽입부 끝은 약 0.3 mm 크기로 둥글게 만들었으며, 실험 당일에 0.1% poly-L-lysine으로 코팅하여 사용하였다. 삽입된 나일론 수술실은 혈관과 함께 고정하고, 한쪽 끝은 피부 봉합부위 외부로 약간 노출되도록 한 상태로 전경부의 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다. 혈류의 재개통을 위하여, 폐쇄 2시간 후에 다시 마취한 상태에서 피부 봉합부위 밖으로 노출된 나일론 수술실을 조심스럽게 당겨내어 혈류를 재개통시키고 곧바로 마취에서 깨어나게 하였다.

6. 뇌경색 면적 및 체적의 측정

실험동물을 pentobarbital sodium 복강주사로 깊게 마취한 다음 단두로 희생시키고, 즉시 뇌를 적출하여 흰쥐용 brain matrix (ASI, USA)를 사용하여 2 mm 두께의 뇌조직 절편으로 만들었다. 뇌조직 절편을 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)로 염색하고, digital camera로 촬영한 다음 "NIH Image J" software를 사용하여 각 절편으로부터 뇌경색 면적을 측정하고, 측정값으로부터 총체적을 계산하였다²³⁾.

7. 뇌조직의 면역조직화학염색

1) 뇌조직의 처리

실험동물을 pentobarbital sodium 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를

적출한 다음 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 담귀 침전시켰다. 다음 뇌를 -40℃의 dry ice-isopentane 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50µm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

2) c-Fos, Bax 및 HIF-1a의 염색

실험동물의 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10-15분 정도 반응시킨 다음 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. Primary antibody는 각각 c-Fos (anti-mouse, 1:200, Oncogene Science, USA), Bax (anti-mouse, 1:200, Santa Cruz, USA) 및 HIF-1a (anti-rabbit, 1:50, Santa Cruz, USA)를 사용하였으며, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4℃에서 overnight으로 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immuno-peroxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl₂·H₂O (Sigma, USA)를 섞은 diaminobenzidine tetrachloride (Sigma, USA)에서 5-10분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

8. 면역조직화학염색 양성반응 신경세포의 관찰

면역조직화학적으로 염색된 c-Fos, Bax 및 HIF-1a 발현의 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여, 면역조직화학적으로 염색된 뇌조직의 영상을 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고 "NIH Image J" software를 사용하여, 뇌경색이 유발된 대뇌반구 쪽 대뇌피질의 뇌경색 경계부위 (cortex penumbra)와 선조체 (caudoputamen)에서 동일한 일정면적 (137,600 µm²) 내에서 양성반응 신경세포 수를 측정하였다²³⁾.

실험성적

1. 뇌경색 면적 및 체적의 변화

각 군의 TTC 염색된 뇌조직 절편에서 뇌경색이 유발된 부위의 면적을 측정할 때, 정상대조군에서는 뇌의 전방에서부터 후방으로 각각 2 mm 두께의 뇌조직절편 모두에서 뇌경색이 관찰되지 않았다. 당뇨상태에서 뇌허혈 손상이 유발된 대조군은 뇌조직의 6개 절편에서의 뇌경색 면적이 각각 88.8±6.8 mm², 98.3±7.5 mm², 100.2±6.5 mm², 90.7±6.6 mm², 79.6±6.2 mm² 및 58.1±4.8 mm²이었다. 당뇨상태에서 뇌허혈 손상을 유발한 후 涼膈散火湯군은 뇌조직의 6개 절편에서의 뇌경색 면적이 각각 61.2±5.3 mm², 90.6±8.3 mm², 88.4±5.7 mm², 80.8±5.8 mm², 47.8±5.8 mm² 및 20.8±4.2 mm²로 1번 절편과 5번 및 6번 절편에서 대조군에 비하여 각각 유의성 있는 뇌경색 면적의 감소(P<0.01, P<0.001)를 나타내었다 (Fig. 1, 2).

또한 뇌경색의 총체적은 대조군은 1031.6±36.2 mm³ 이었으며, 涼膈散火湯군은 779.2±32.1 mm³으로 대조군에 비하여 24.5%

감소하였으며, 유의성 있는 뇌경색 총체적의 감소(P<0.001)를 나타내었다 (Fig. 3).

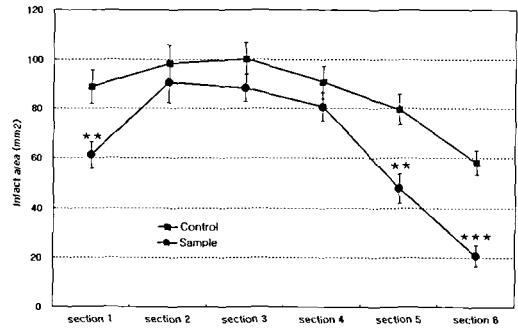


Fig. 1. Effect of YST on TTC-stained infarct area in brain sections of MCAO rats treated with streptozotocin. YST treatment demonstrated significant decrease of the infarct area in 1st, 5th and 6th brain sections as compared to the control (**, P<0.01, ***, P<0.001). Control: Group treated with streptozotocin (60 mg/kg) i.p. injection. Sample: Group treated with water-extract (56.7 mg/100 g body weight) of Yanggyuksanhwa-tang after streptozotocin (60 mg/kg) i.p. injection.

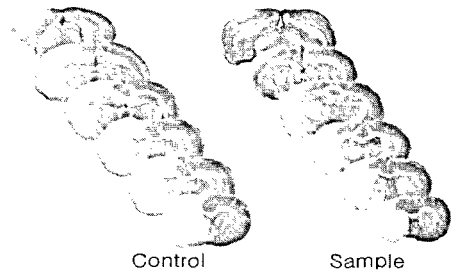


Fig. 2. Representative TTC-stained brain sections of MCAO rats treated with streptozotocin. YST treatment (sample) demonstrated significant decrease of the infarct area as compared to the control.

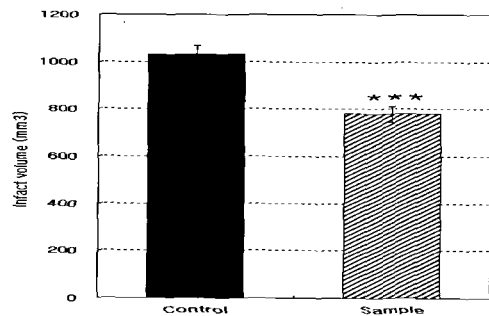


Fig. 3. Effect of YST on TTC-stained infarct volume of MCAO rats treated with streptozotocin. YST treatment demonstrated significant decrease of the infarct volume as compared to the control(***,P<0.001).

2. c-Fos 양성반응 신경세포 수의 변화

뇌조직에서 대뇌피질 뇌경색의 경계부위 (penumbra)와 선조체 (caudoputamen)에서 c-Fos 양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정할 때, sham군에서는 뇌경색이 관찰되지 않았으나 c-Fos 양성반응을 나타낸 신경세포는 대뇌피질 penumbra에서 23.8±2.5 개, caudoputamen에서는 10.3±2.6 개가 관찰되었다. 당뇨상태에서 뇌허혈 손상이 유발된 대조군은 penumbra에서 245.1±26.7 개, caudoputamen에서 65.0±7.6 개의 c-Fos 양성반응

신경세포가 관찰되었다. 당뇨상태에서 뇌허혈 손상을 유발한 후 凉膈散火湯군은 penumbra에서 161.7±20.6 개, caudoputamen에서 48.3±5.8 개의 c-Fos 양성반응 신경세포가 관찰되어 대조군에 비하여 penumbra에서 유의성 있는 c-Fos 양성반응 신경세포 수의 감소(P<0.05)를 나타내었다 (Fig. 4, 5).

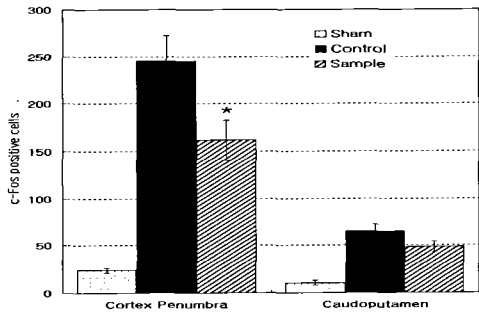


Fig. 4. Effect of YST on c-Fos positive neurons in cortex penumbra and caudoputamen of MCAO rats treated with streptozotocin. YST treatment demonstrated significant decreases of c-Fos positive cells in cortex penumbra as compared to the control(*, P<0.05).

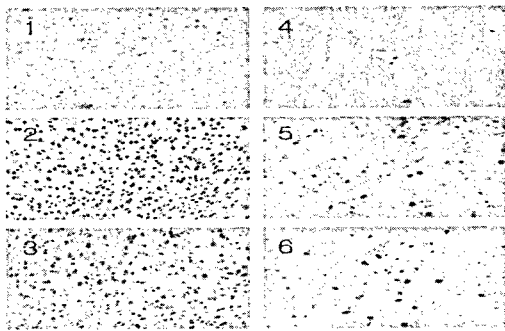


Fig. 5. Representative brain sections of c-Fos immunohistochemistry of MCAO rats treated with streptozotocin (section 1, sham-cortex penumbra; section 2, sham-caudoputamen; section 3, control-cortex penumbra; section 4, control-caudoputamen; section 5, sample-cortex penumbra; sections 6, sample-caudoputamen). YST treatment demonstrated significant decreases of c-Fos positive cells in cortex penumbra (section 5) as compared to the control (section 3).

3. Bax 양성반응 신경세포 수의 변화

뇌조직에서 대뇌피질 뇌경색의 경계부위 (penumbra)와 선조체 (caudoputamen)에서 Bax 양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정할 때, 정상대조군에서는 뇌경색이 관찰되지 않았으며 Bax 양성반응을 나타낸 신경세포 또한 관찰되지 않았다. 당뇨상태에서 뇌허혈 손상이 유발된 대조군은 penumbra에서 26.5±2.8 개, caudoputamen에서 16.2±2.2 개의 Bax 양성반응 신경세포가 관찰되었다. 당뇨상태에서 뇌허혈 손상을 유발한 후 凉膈散火湯 군은 penumbra에서 16.0±3.6 개, caudoputamen에서 10.8±2.1 개의 Bax 양성반응 신경세포가 관찰되어 대조군에 비하여 penumbra에서 유의성 있는 Bax 양성반응 신경세포 수의 감소(P<0.05)를 나타내었다 (Fig. 6, 7).

4. HIF-1α 양성반응 신경세포 수의 변화

뇌조직에서 대뇌피질 뇌경색의 경계부위 (penumbra)와 선조체 (caudoputamen)에서 HIF-1α 양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정할 때, sham군에서는 뇌경색이 관찰되지 않았으나

HIF-1α 양성반응을 나타낸 신경세포는 대뇌피질 penumbra에서 6.2±1.5 개, caudoputamen에서는 4.3±1.3 개가 관찰되었다. 당뇨상태에서 뇌허혈 손상이 유발된 대조군은 penumbra에서 105.2±12.9 개, caudoputamen에서 46.2±8.9 개의 HIF-1α 양성반응 신경세포가 관찰되었다. 당뇨상태에서 뇌허혈 손상을 유발한 후 凉膈散火湯 군은 penumbra에서 81.7±8.6 개, caudoputamen에서 30.3±6.9 개의 HIF-1α 양성반응 신경세포가 관찰되어 대조군에 비하여 모두 감소하는 경향을 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 8, 9).

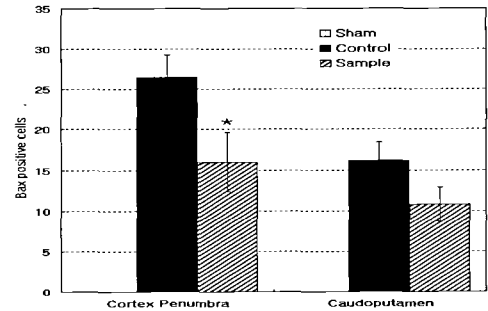


Fig. 6. Effect of YST on Bax positive neurons in cortex penumbra and caudoputamen of MCAO rats treated with streptozotocin. YST treatment demonstrated significant decreases of Bax positive cells in cortex penumbra as compared to the control(*, P<0.05).

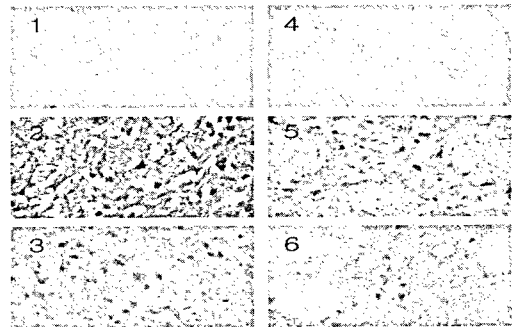


Fig. 7. Representative brain sections of Bax immunohistochemistry of MCAO rats treated with streptozotocin (section 1, sham-cortex penumbra; section 2, sham-caudoputamen; section 3, control-cortex penumbra; section 4, control-caudoputamen; section 5, sample-cortex penumbra; sections 6, sample-caudoputamen). YST treatment demonstrated significant decreases of Bax positive cells in cortex penumbra (section 5) as compared to the control (section 3).

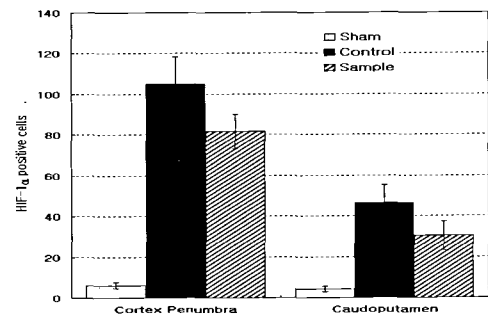


Fig. 8. Effect of YST on HIF-1α positive neurons in cortex penumbra and caudoputamen of MCAO rats treated with streptozotocin. YST treatment demonstrated decrease of HIF-1α positive cells as compared to the control, but it was not significant statistically.

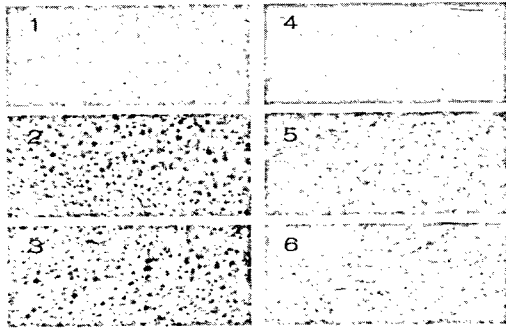


Fig. 9. Representative brain sections of HIF-1α immunohistochemistry of MCAO rats treated with streptozotocin (section 1, sham-cortex penumbra; section 2, sham-caudoputamen; section 3, control-cortex penumbra; section 4, control-caudoputamen; section 5, sample-cortex penumbra; sections 6 sample-caudoputamen). YST treatment demonstrated decrease of HIF-1α positive cells as compared to the control, but it was not significant statistically.

고찰

涼膈散火湯은 李¹¹⁾의 東醫壽世保元에서 少陽人의 胃受熱裡熱病을 치료하며 胸膈熱證을 제거하는 처방이라고 하였다. 中風痰盛, 中風熱證, 歷節風, 痰滯, 頭痛, 面熱, 風熱, 咽喉諸症 등을 적응증으로 하고 있으며, 心火上盛, 中焦燥實한 多渴頭昏, 目赤, 舌腫, 大小便秘, 譫語, 發狂 등에 사용한다 하였다.^{12,13)} 涼膈散火湯의 구성약재 중 生地黃은 瀉心火, 清肺熱하고, 忍冬藤과 連翹역시 心肺二經의 熱을 내리고 解毒하며, 梔子和 薄荷는 宣滯解鬱하고, 石膏는 肺와 胃 및 三焦의 熱을 제거하고, 知母와 함께 除渴止煩한다. 防風과 荊芥는 散風濕하며, 頭目滯氣한 것과 四肢攣急한 症을 치료하고, 生地黃과 知母는 補腎水 및 滋陰하는 효능이 있다. 그러므로 본 처방은 清熱涼血, 瀉火解毒, 除煩解鬱, 祛風解表, 勝濕解痙하는 효능으로 清熱, 解鬱, 祛風하는 中風의 치료 처방이라 하였다.¹²⁻¹⁵⁾ 한편으로 涼膈散火湯은 上焦熱을 다스리거나, 上·中二焦의 實火를 瀉하는 효능으로 一切火鬱之證을 치료하는 처방이며, 上消와 당뇨병의 초기에 응용되는 처방이라고 하였다.^{14,15)}

涼膈散火湯에 대한 실험연구를 통하여, alloxan 또는 streptozotocin으로 유발된 원쥐의 당뇨병 모형에서 혈당을 감소시키는 효능이 입증되었으며,^{20,21)} 또한 뇌허혈 손상에 대하여 유의한 억제 효능이 있을 것으로 보고되었다.^{18,19)} 이외에도 지주막하 출혈 이후의 혈관경련에 대하여 혈관내피세포의 손상과 혈관내막의 비후를 회복시키고, 평활근의 수축을 감소시키는 동시에 과사를 호전시키는 등 제반 병리적 변화를 회복시키는 효과가 있다고 보고되었으며, 그 기전과 관련하여 혈관확장에 관여하는 신경전달물질과 신경 peptide의 활성화에 기여하며, 혈관확장에 관여하는 인자들을 유의하게 조절하는 것으로 보고되어 있다.^{24,25)}

본 실험에서 당뇨병상태의 뇌허혈 손상에 대한 涼膈散火湯의 효능을 관찰하기 위하여 streptozotocin을 복강주사한 다음 2주 동안 혈당이 250 mg/dl 이상을 계속 유지하는 실험동물만을 선택하여 일시적인 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 손상을 유발시킨 후 涼膈散火湯 물추출물을 5일간 투여한 다음 실험동물을 희생시켜 관련지표들을 관찰하였다. 각 군의 TTC 염색된 뇌

조직 절편에서 뇌경색이 유발된 부위의 면적을 측정할 바, 당뇨병상태에서 뇌허혈 손상을 유발한 후 涼膈散火湯을 투여한 군은 대조군에 비하여 1번 절편과 5번 및 6번 절편에서 유의성 있는 뇌경색 면적의 감소를 나타내었으며, 매우 유의성 있는 뇌경색 총체적 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 涼膈散火湯이 기존의 연구보고와 같이 선행질환 또는 복합적인 요인이 없는 상태의 뇌허혈 손상은 물론 당뇨병상태의 뇌허혈 손상에 대해서도 유의한 뇌허혈 손상 보호효능을 보여주는 결과이다.

涼膈散火湯의 뇌허혈 손상 보호효능의 기전을 알아보기 위하여, 세포에 대한 스트레스작용에 의하여 즉시적으로 반응을 나타내는 immediate early genes (IEGs)의 일종인 c-Fos와 신경세포의 자연사 기전에 관련된 Bax, 저산소 상태에 대한 조절인자인 hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α)의 발현을 면역조직화학적 염색을 통하여 관찰하였다.

경련이나 허혈은 중추신경계의 광범위한 부위에서 IEGs 발현의 증가를 나타내며, 직접적으로 손상받은 부위에서 발현되는 물론 손상부위 바깥영역에서도 역시 발현되게 된다. 실험연구에 의하면 IEGs 발현 증가가 뇌허혈에 가장 민감한 것으로 알려진 뇌부위에서 가장 심한 것으로 보고되었다.^{26,27)} 본 연구에서는 대뇌피질 뇌경색의 경계부위 (penumbra)와 선조체 (caudoputamen)에서 c-Fos 양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정할 바, 당뇨병상태에서 뇌허혈 손상을 유발한 후 涼膈散火湯을 투여한 군은 선조체에서는 큰 변화를 나타내지 않았으나 대뇌피질의 뇌경색 경계영역에서 대조군에 비하여 유의성 있는 c-Fos 양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다.

Bax는 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)와 함께 세포자연사를 조절하는 인자이다. Bax가 과도하게 발현될 경우 mitochondria로부터 cytochrome C를 분비하게 하여 세포가 자연사 과정을 일으키게 한다는 것은 잘 알려진 사실이다.^{28,29)} 특히 뇌허혈과 같은 다양한 세포 외부로부터의 유해자극에 대하여 신경세포의 손상 가능성 여부를 결정하거나, 자연사가 일어나는 신경세포에서 잠자 신경세포가 사망할 것이라는 것을 판별할 수 있는 중요한 지표로 사용되고 있다.³⁰⁾ 본 연구에서는 대뇌피질 뇌경색의 경계부위 (penumbra)와 선조체 (caudoputamen)에서 Bax 양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정할 바, 당뇨병상태에서 뇌허혈 손상을 유발한 후 涼膈散火湯을 투여한 군은 선조체에서는 큰 변화를 나타내지 않았으나 대뇌피질의 뇌경색 경계영역에서 대조군에 비하여 유의성 있는 Bax 양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다. 이는 c-Fos 발현에 대한 효능과 유사한 양상의 결과로, 涼膈散火湯이 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 허혈에 의한 신경세포의 자연사를 억제하는 효능이 있음을 보여주는 결과이다.

HIF-1α는 저산소 상태에서 특이적으로 발현되는 전사인자 (transcription factor)로서, 뇌허혈에 대한 보호효능과 함께 apoptosis를 유발하는 유해한 작용이 있다는 상반된 연구가 보고되어 있다.^{31,32)} 저산소 상태는 HIF-1α와 함께 여러 종류의 glycolytic enzyme들과 glucose transporter들, erythropoietin, VEGF 등의 발현을 촉진한다.³³⁾ HIF-1α의 neuroprotective 효능은 사전적응 (preconditioning) 상태에서 위의 gene들 중 특히

erythropoietin과 VEGF의 보상적인 작동에 관련되어 나타나는 것으로 알려져 있다.³⁷⁾ 반대로, 뇌허혈에 의하여 뇌신경세포에 손상이 일어나는 동안과 그 이후에 나타나는 HIF-1 α 의 작동과 대상 gene들에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀지지는 않았지만, HIF-1 α 발현의 심한 증가는 HIF-1 α -p53 복합체를 형성하고 신경세포의 자연사를 유도하는 것으로 알려져 있다.³⁴⁾ 특히 지속적으로 고도 심한 HIF-1 α 의 발현은 proapoptotic 인자인 Nip3 발현을 촉진하고, p53과 결합하여 caspase-9과 caspase-3을 발현하게 하고 mitochondria로부터 cytochrome C를 분비하게 하여 신경세포의 자연사를 일으키는 것으로 보고되어 있다.^{35,36)} 본 연구에서는 대뇌피질 뇌경색의 경계부위 (penumbra)와 선조체 (caudoputamen)에서 HIF-1 α 양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정한 바, 당뇨상태에서 뇌허혈 손상을 유발한 후 涼膈散火湯을 투여한 군은 선조체와 대뇌피질의 뇌경색 경계영역 모두에서 대조군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다. 이는 涼膈散火湯이 저산소에 대한 보상적 작용에는 유의한 효능을 나타내지 못하는 것으로 생각할 수 있다.

본 연구의 결과를 총괄하면, 涼膈散火湯은 신경세포의 유해 스트레스 및 자연사를 억제하는 기전에 의하여 발휘되는 것으로 생각된다.

결론

당뇨를 선행질환으로 가지고 있는 뇌경색에 대한 涼膈散火湯의 효능을 실험적으로 관찰하기 위해서, streptozotocin으로 유발된 당뇨상태에서 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌경색을 유발시킨 다음 涼膈散火湯을 투여하고 뇌경색 면적 및 체적의 변화, c-Fos, Bax 및 HIF-1 α 발현의 변화를 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

涼膈散火湯 투여는 streptozotocin에 의한 당뇨상태에서 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌경색 면적 및 체적을 유의하게 감소시켰다. 涼膈散火湯 투여는 streptozotocin에 의한 당뇨상태에서 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 cortex penumbra의 c-Fos 양성반응 신경세포의 증가를 유의하게 감소시켰다. 涼膈散火湯 투여는 streptozotocin에 의한 당뇨상태에서 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 cortex penumbra의 Bax 양성반응 신경세포의 증가를 유의하게 감소시켰다. 涼膈散火湯 투여는 streptozotocin에 의한 당뇨상태에서 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 HIF-1 α 양성반응 신경세포의 증가를 감소시키는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다.

이상의 결과로 보아 涼膈散火湯의 뇌허혈 손상에 대한 보호 효능은 신경세포 유해 스트레스와 자연사를 억제하는 기전에 의한 것으로 추측된다.

참고문헌

1. Vinik, A.I., Vinik, E. Prevention of the complications of diabetes. *Am J Manag Care.* 9: S63-80, 2003.
2. Candido, R., Srivastava, P., Cooper, M.E., Burrell, L.M.

- Diabetes mellitus: a cardiovascular disease. *Curr Opin Investig Drugs.* 4(9):1088-1094, 2003.
3. Piechowski-Jozwiak, B., Maulaz, A., Bogousslavsky, J. Secondary prevention of stroke with antiplatelet agents in patients with diabetes mellitus. *Cerebrovasc Dis.* 20: 15-23
4. Bloomgarden, Z.T. Diabetic retinopathy and neuropathy. *Diabetes Care.* 28(4):963-970, 2005.
5. Kurukulasuriya, L.R., Govindarajan, G., Sowers, J. Stroke prevention in diabetes and obesity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 4(4):487-502, 2006.
6. Goldstein, L.B., Adams, R., Alberts, M.J., Appel, L.J., Brass, L.M., Bushnell, C.D., Culebras, A., DeGraba, T.J., Gorelick, P.B., Guyton, J.R., Hart, R.G., Howard, G., Kelly-Hayes, M., Nixon, J.V., Sacco, R.L. American Heart Association; American Stroke Association Stroke Council. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation.* 113(24):e873-923, 2006.
7. Frizzell, J.P. Acute stroke: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *AACN Clin Issues.* 16(4):421-440, 2005.
8. Hankey, G.J. Potential new risk factors for ischemic stroke: what is their potential? *Stroke.* 37(8):2181-2188, 2006.
9. Britton, M., Rafols, J., Alousi, S., Dunbar, J.C. The effects of middle cerebral artery occlusion on central nervous system apoptotic events in normal and diabetic rats. *Int J Exp Diabesity Res.* 4(1):13-20, 2003.
10. Muranyi M, Fujioka M, He Q, Han A, Yong G, Csiszar K, Li PA. Diabetes activates cell death pathway after transient focal cerebral ischemia. *Diabetes.* 52(2):481-486, 2003.
11. 李濟馬. 東醫壽世保元, 서울, 신일문화사, p 70, 1964.
12. 元持常. 東醫四象新編, 서울, 綜合醫苑社, pp 20-54, 66, 1974.
13. 송일병. 사상의학적 중풍관리의 임상적 연구. *사상의학회지* 8(2):117-129, 1996.
14. 李泰浩. 東醫四象診療醫典, 서울, 杏林出版社, p 253, 1983.
15. 洪淳用, 李乙浩. 四象醫學原論, 서울, 杏林出版社, pp 274-301, 1985.
16. 배철환, 조기호, 이원철, 김영석, 배형섭, 이경섭, 구분홍. 폐쇄성 뇌졸중에 대한 임상적 연구. *경희한의대논문집.* 10: 665-687, 1987.
17. 윤진구, 조기호, 김영석, 이경섭. 뇌졸중에 관한 임상통계적 연구. *대한한방내과학회지* 10(1):25-38, 1989.
18. 김진성, 송일병. 涼膈散火湯의 효능에 관한 실험적 연구. *경*

- 희한의대논문집. 7: 273-285, 1984.
19. 이기주, 김경요. 십이미관중탕, 涼膈散火湯, 형방사백산이 백서의 혈압 및 국소 뇌혈류량에 미치는 영향. 한국전통의학지 9(2):259-268, 1999.
 20. 홍성범, 홍순용. 소양인에 응용되는 涼膈散火湯이 백서의 당뇨병에 미치는 영향. 사상의학회지 3(1):201-217, 1991.
 21. 최병일, 고병희, 송일병. 소양인 涼膈散火湯과 인동등지골피탕 및 숙지황고삼탕이 Allxan 투여 고혈당 백서에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 15: 113-133, 1992.
 22. Zea Longa, E.L., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *stroke*. 20: 84-91, 1989.
 23. Swanson, R.A., Morton, M.T., Tsao-Wu, G., Savalos, R.A., Davidson, C., Sharp, F.R. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab*. 10(2):290-293, 1990.
 24. 이동원, 이원철. 지주막하출혈에 의한 뇌기저동맥의 형태학적 변화에 미치는 涼膈散火湯의 효과. 대한한의학회지 20(2):146-156, 1999.
 25. 이동원, 이원철. 지주막하출혈 후 뇌기저동맥벽에 존재하는 면역양성 신경섬유의 변화에 미치는 涼膈散火湯의 효과. 한의학연구소논문집 8(1):117-131, 1999.
 26. Neumann-Haefelin, T., Wiessner, C., Vogel, P., Back, T., Hossmann, K.A. 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.
 27. 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.
 28. Nicholson, D.W. Mechanisms of apoptotic control. *Nature*. 407: 810-816, 2000.
 29. 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*. 192: 85-88, 1995.
 30. Hara, A., Iwai, T., Niwa, M. Immunohistochemical detection of BAX and BCL-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 711: 249-253, 1996.
 31. Bergeron, M., Yu, A.Y., Solway, K.E., Semenza, G.L., Sharp, F.R. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischemia in rat brain. *Eur J Neurosci*. 11: 4159-4170, 1999.
 32. Brune, B., Brune, B., von Knethen, A., Sandau, K.B. Transcription factors p53 and HIF-1alpha as targets of nitric oxide. *Cell Signal*. 13(8):525-533, 2001.
 33. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med*. 7(8):345-350, 2001.
 34. Moritz, W., Meier, F., Stroka, D.M., Giuliani, M., Kugelmeier, P., Nett, P.C., Lehmann, R., Candinas, D., Gassmann, M., Weber, M. Apoptosis in hypoxic human pancreatic islets correlates with HIF-1alpha expression. *FASEB J*. 16(7):745-747, 2002.
 35. Halterman, M.W., Federoff, H.J. HIF-1alpha and p53 promote hypoxia-induced delayed neuronal death in models of CNS ischemia. *Exp Neurol*. 159(1):65-72, 1999.
 36. Piret, J.P., Mottet, D., Raes, M., Michiels, C. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol*. 64(5-6):889-892, 2002.