

## 清肺瀉肝湯이 MCAO에 의한 흰쥐의 뇌허혈 손상에 미치는 영향

정광식 · 김범희 · 황원덕\*

동의대학교 한의과대학 한의학과, 동의대학교 한의학연구소

### Effect of *Chungpaesagan-tang* on Cerebral Ischemic Damage Induced by MCAO in Rats

Gwang Sik Jung, Bum Hoi Kim & Won Duk Hwang\*

College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Research Institute of Oriental Medicine, Dong-Eui University

#### Abstract

This study aimed to validate neuroprotective effect of *Chungpaesagan-tang* on the early stage of cerebral ischemic damage. Cerebral ischemic damage was induced by the middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2 hours in the Sprague-Dawley rats. Water extract of *Chungpaesagan-tang*(8.7g/kg) was administered orally twice at 1 and 4 hours after the MCAO. Neurological score was tested at 3 and 24 hours after the MCAO and *Chungpaesagan-tang* administration. At 24 hours after the MCAO, infarct volume and edema ratio was evaluated with the TTC staining. Apoptotic cell death in cerebral cortex and caudate putamen was observed with cresyl violet staining and TUNEL labeling. Bax expression in the MCAO rat brain was stained with immunohistochemistry. *Chungpaesagan-tang* improved neurological and behavioral impairment of the MCAO rats and reduced infarct area, infarct volume and brain edema formation. *Chungpaesagan-tang* attenuated cell death percentage in cortex penumbra and reduced TUNEL positive cells in cortex penumbra and in caudate putamen of the MCAO rats. *Chungpaesagan-tang* reduced Bax positive neurons in caudate putamen and reduced c-Fos positive neurons in cortex penumbra of the MCAO rats. *Chungpaesagan-tang* intensified neuronal HSP72 expression in cortex penumbra of the MCAO rats. In results, *Chunpaesagan-tang* reduces infarct volume and edema formation through anti-apoptotic effect. This result suggests that *Chunpaesagan-tang* has an adequate neuroprotective

· 접수: 2009년 1월 16일 · 수정접수: 2009년 3월 16일 · 채택: 2009년 3월 20일

\* Corresponding author: Won Duk Hwang, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University. 45-1 Yangjung 2-dong, Busanjin-gu, Busan, 614-052. Tel: 051-850-7411 Fax: 051-853-4036

E-mail: bume@deu.ac.kr

effect on the early stage of cerebral ischemic damage.

**Key words** : *Chungpaesagan-tang*(清肺瀉肝湯), Cerebral Ischemia, MCAO, TUNEL, Bax, c-Fos, HSP72

## I. 서론

중풍은 뇌혈관의 순환장애로 인해 국소적인 신경학적 결손을 나타내는 뇌혈관질환을 포함하는 것으로서 人事不省, 手足癱瘓 口眼喎斜, 言語蹇澀, 偏身麻木 등의 임상증상을 나타내는 병증이다.<sup>1)</sup> 뇌경색, 뇌실질내 출혈, 일과성 뇌허혈 발작 및 고혈압성 뇌증 등을 포함하는 이러한 중풍은 사망률이 높을 뿐만 아니라 심각한 후유증을 남기므로 이에 대한 예방과 유의한 치료 대책의 연구 개발은 매우 중요한 사안이다.<sup>2)</sup>

중풍에 대한 치료처방의 임상연구에 의하면 清肺瀉肝湯이 급성기 중풍에 가장 빈번히 사용되는 처방 중 하나이다.<sup>3)</sup> 清肺瀉肝湯은 《東醫壽世保元》<sup>4)</sup>에서 太陰人の 肝熱太盛하고 肺燥太枯하여 발생하는 燥熱病證에 斂肺通便시킬 목적으로 創方되어 太陰人の 熱鬱, 鬱痰, 熱痰, 消渴 中風, 歷節風, 燥熱症 등에 응용되어 왔다.<sup>5)</sup> 이러한 清肺瀉肝湯의 효능에 대한 실험 연구 보고를 살펴보면, 발열 및 부종,<sup>6)</sup> 사하작용과 염증반응,<sup>7, 8)</sup> 간손상과 관절염, 당뇨<sup>9-11)</sup> 및 비만<sup>12)</sup>에 대하여 유의한 효과가 있음이 동물실험과 임상연구를 통하여 보고된 바 있다. 최근 清肺瀉肝湯이 중풍환자에 대하여 진행 억제, 운동기능 호전, 동맥경직도 감소 등의 임상적 효능이 있다는 다수의 논문이 발표된 바 있다.<sup>13-16)</sup> 그러나 치료기전에 대한 실험적 연구 보고는 여전히 미흡한 실정이다.

뇌신경세포 손상에 효과적인 치료약물 연구

의 주요사항 중 하나가 뇌경색의 임상증상과 유사하고 약물효능을 정확히 예측할 수 있는 신뢰성 있는 실험동물모형을 사용하는 것이다. 실제 중풍 환자의 임상증상을 가장 유사하게 나타내는 실험동물모형이 설치류를 사용하여 중대뇌동맥의 근위부를 폐쇄하는 중대뇌동맥 폐쇄(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 방법에 의한 뇌허혈 손상이다.<sup>17)</sup> 또한 이러한 뇌허혈 손상에서 가장 주된 뇌신경세포 사망 기전이 자연사(apoptosis) 기전이라는 것은 잘 알려져 있다.<sup>18)</sup>

그러므로 본 연구에서는 清肺瀉肝湯의 뇌허혈 손상 초기 효능을 관찰하기 위해서 중대뇌동맥을 폐쇄시켜 뇌허혈 손상을 유발하고, 清肺瀉肝湯 물추출엑기스를 투여한 다음 신경학적 행동지표와 뇌경색 및 뇌부종의 크기에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 뇌경색부위에서 신경세포 사망률과 신경세포 자연사 지표인 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL), 신경세포 자연사 유발인자인 Bax 등의 변화를 면역조직화학적 방법으로 관찰한 바 유의한 뇌신경세포손상 보호효능을 관찰할 수 있었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 연구방법

### 1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 12주령, 약 300g 전후의 Sprague-Dawley계 수

컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도(21~23°C), 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

실험에 사용한 한약물은 淸肺瀉肝湯으로 처방의 내용과 1첩 분량은 Table 1과 같다.<sup>5)</sup> 淸肺瀉肝湯 5첩 분량인 260g을 증류수 3,000ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후 완전 동결건조시켜 물추출액기스 58.2g을 얻었다. 투여량은 흰쥐 체중 100g 당 물추출액기스 193.9mg을 음용수에 녹여 중대뇌동맥 폐쇄 1시간과 4시간 후에 1회씩 총 2회 경구투여 하였다.

## 3. 뇌허혈 손상의 유발

중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상 유발 방법은 혈관내봉합사삽입술(intraluminal method)로 보다 광범위하고 일정한 뇌허혈 유발을 위

해 poly-L-lysine 코팅법을 병행하였다.<sup>23)</sup> 수술 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 체중 약 300g 전후의 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 70% N<sub>2</sub>O와 30% O<sub>2</sub>가 섞인 혼합가스에 5%의 isoflourane으로 마취를 시작하고 수술 중에는 isoflourane의 농도를 1.5%로 유지하였다. 체온은 feedback-regulated heating pad로 수술 전과정 동안 37.0±0.5°C로 조절하였다. 마취가 된 흰쥐를 수술용 현미경(Carl Zeiss, Germany) 하에서 먼저 전경부의 근육을 정리하여 혈관을 노출시킨 후 우측의 외경동맥과 총경동맥을 잘 정리하고 외경동맥의 분지인 후두동맥과 상갑상동맥을 electric coagulator(Nazume, Japan)를 사용하여 절단하였다. 외경동맥의 원위부는 결찰하고, 수술실(5-0 silk suture)로 고정고리를 두 개 만들어 놓은 후, 내경동맥과 총경동맥은 수술실(3-0 silk suture)과 artery clamp(microvascular clip)를 사용하여 혈행을 완전 차단하였다. 미세수술가위(Microdissecting Spring Scissor)로 외경동맥의 혈관벽을 약간 절개 후 poly-L-lysine 용액(SIGMA Diagnostics, P8920, 0.1% w/v in water)으로 코팅한 끝을 등글게 만든 봉합사(4-0 nylon suture, Ethilon, England)를 18~20mm 정도 삽입하였다. 삽입 후 내경동맥과 총경동맥을 다시 판류시키고, 외경동맥

Table 1. Herbal Composition of Chungpaesagan-Tang

| 韓藥名   | 生藥名                                | 用量   |
|-------|------------------------------------|------|
| 葛根    | <i>Puerariae Radix</i>             | 16 g |
| 黃芩    | <i>Scutellariae Radix</i>          | 8 g  |
| 藥木    | <i>Angelicae Tenuissimae Radix</i> | 8 g  |
| 蘿藦子   | <i>Raphani Semen</i>               | 4 g  |
| 桔梗    | <i>Platycodi Radix</i>             | 4 g  |
| 白芷    | <i>Angelicae Dahuricae Radix</i>   | 4 g  |
| 升麻    | <i>Cimicifugae Rhizoma</i>         | 4 g  |
| 大黃    | <i>Rhei Rhizoma</i>                | 4 g  |
| total |                                    | 52 g |

의 원위부를 절단하였다. 전경부의 피부를 봉합, 소독하고 마취에서 깨어난 후 자유롭게 움직이게 하였다. 중대뇌동맥 폐쇄 120분 후 같은 방법으로 다시 마취한 상태에서 중대뇌동맥을 폐쇄하고 있던 봉합사를 후퇴시켜 혈류를 재관류시키고 피부를 봉합하였다.

혈관내봉합사삽입술을 시행한 동물들을 무작위로 나누어 재관류 후 淸肺瀉肝湯을 경구투여한 Sample군과 동일량의 saline을 경구투여한 Control군으로 분류하였다. 모든 실험군에서 수술과 중대뇌동맥의 폐쇄는 우측만을 시행하였으며, 각 군 당 실험동물은 6마리씩 배정하였다.

#### 4. Neurological score의 측정

신경학적 행동증상의 측정은 중대뇌동맥 폐쇄와 재관류 3시간 및 24시간 후에 각 군별로 실시하였다. 측정방법과 점수는 흰쥐의 자세와 행동을 관찰하여, 명확히 관찰할 수 있는 결함이 없음(0점), 꼬리를 들었을 때 반대쪽 앞다리를 굴곡시킴(1점), 꼬리를 당겼을 때 반대쪽 앞다리의 악력(grip power)이 감소함(2점), 꼬리를 당겼을 때만 반대방향 원형돌기(contralateral circling)를 나타냄(3점) 및 지속적인 반대방향 원형돌기를 나타냄(4점)으로 나누었다.<sup>19)</sup>

#### 5. 뇌경색 면적 및 체적, 뇌부종 비율의 측정

중대뇌동맥 폐쇄와 재관류 24시간 후에 실험동물을 pentobarbital sodium의 복강주사로 깊게 마취한 다음 단두로 희생시키고, 즉시 뇌를 적출하여 흰쥐용 brain matrix(ASI, USA)를 사용하여 2mm 두께의 뇌조직 절편으로 만들었다. 뇌조직 절편을 2% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride(TTC)로 염색하고, digital camera로 촬영한 다음 "NIH Image J" software를 사용하

여 각 절편으로부터 뇌경색 면적 및 체적, 뇌부종 비율을 측정하였다. 뇌경색 면적은 부종에 의하여 조직이 확장된 것을 보정하기 위하여, Fig. 1에서와 같이, 정상측 대뇌반구의 면적과 손상측 대뇌반구 정상조직 면적을 측정 한 다음 정상측 대뇌반구 면적에서 손상측 대뇌반구의 정상조직 면적을 감하는 방법으로 계산하였으며, 뇌경색 체적은 각 절편의 뇌경색 면적의 합에 조직두께 2mm를 곱하여 계산하였다. 뇌부종 비율은 각 절편에서 정상측 대뇌반구 면적에 대한 손상측 대뇌반구 총면적의 비율을 구하는 방법으로 계산하였다.

#### 6. 뇌조직의 처리

중대뇌동맥 폐쇄와 재관류 24시간 후에 실험동물을 pentobarbital sodium의 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  $-40^{\circ}\text{C}$ 의 dry ice-isophentan 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50 $\mu\text{m}$  두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

#### 7. Cresyl violet 및 TUNEL 조직염색

신경세포의 조직학적 관찰을 위하여 2% cresyl violet 염색을 실시하였으며, 신경세포의 자연사를 관찰하기 위해서는 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) 염색을 실시하였다. TUNEL 염색 과정은 TUNEL labeling kit(R&D Systems, USA)의 방법에 따라, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -PBS에서 5분간 반응시키고 working strength TdT enzyme

(70% reaction buffer+30% TdT enzyme)으로 37°C에서 2시간 반응시킨 다음, stop/wash buffer에서 15분간, anti-digoxigenin peroxidase conjugate에서 1시간 및 peroxidase substrate (DAB dilution buffer+DAB substrate)에서 10분간 반응시켰다. 이후 100% n-Butanol로 세척한 다음 봉입하였다.

### 8. Bax, c-Fos, HSP72의 면역조직화학염색

면역조직화학염색 과정을 간단히 설명하면 아래와 같다. 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10~15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum(Vectastain, USA)과 bovine serum albumin(Sigma, USA)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 각각 Bax(anti-mouse, 1:200, Santa Cruz, USA), c-Fos(anti-mouse, 1:200, Oncogene Science, USA) 및 HSP72(anti-rabbit, 1:50, Santa Cruz, USA)를 사용하였으며, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 overnight으로 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, avidin-biotin immunoperoxidase의 방법(ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 Bax와 c-Fos 염색에는 NiCl<sub>2</sub>(Sigma, USA)를 섞은 diaminobenzidine tetrachloride (DAB, Sigma, USA)에서, HSP72 염색에는 DBA에서 5~10분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2~3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

### 9. 조직염색 결과의 관찰

Cresyl violet으로 염색된 신경세포와 TUNEL

및 Bax의 면역조직화학염색의 결과는 뇌조직의 영상을 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고 “NIH Image J” software를 사용하여, 뇌경색이 유발된 대뇌반구 쪽 대뇌피질의 뇌경색 중심부(infarct core)와 뇌경색 경계부위(penumbra) 및 선조체(caudate putamen)에서 동일한 일정한 면적(120,000 $\mu$ m<sup>2</sup>) 내에 나타나는 양성반응 신경세포 수를 측정하였으며, c-Fos와 HSP72 면역조직화학염색의 결과는 정성적으로 분석하였다.

### 10. 통계처리

실험결과의 분석은 Student T-test를 이용하여 위험도 P<0.05 및 P<0.01로 유의성을 검증하였다.

## III. 연구결과

### 1. Neurological score의 변화

신경학적 행동증상 성적의 변화는, 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 3시간 후에 3.3±0.3, 24시간 후에 3.1±0.2를 나타내어 편마비에 의한 현저한 반대방향 원형돌기 증상을 나타내었다. 중대뇌동맥 폐쇄 후 淸肺瀉肝湯을 투여한 Sample군은 3시간 후에 3.1±0.2을 나타내고, 24시간 후에는 2.6±0.1을 나타내어 3시간 및 Control군에 비하여 유의한 신경학적 행동증상의 개선을 나타내었다(P<0.05).

### 2. 뇌경색 면적의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군의 뇌경색 면적은 interaural line 12mm 절편에서부터 interaural line 2mm 절편까지 2mm 간격의 6개 절편에서 각각 17.2±1.2mm<sup>2</sup>, 29.1±1.8mm<sup>2</sup>, 31.3±2.3mm<sup>2</sup>,

22.9±1.5mm<sup>2</sup>, 12.8±1.3mm<sup>2</sup> 및 6.6±1.3mm<sup>2</sup>를 나타내었다. 중대뇌동맥 폐쇄 후 清肺瀉肝湯을 투여한 Sample군은 각각 18.1±1.6mm<sup>2</sup>, 27.9±2.1mm<sup>2</sup>, 28.3±2.0mm<sup>2</sup>, 16.3±1.7mm<sup>2</sup>, 6.5±1.5mm<sup>2</sup> 및 3.5±1.1mm<sup>2</sup>를 나타내어 뇌의 전반부 보다는 후반부에서 뇌경색 면적이 감소하였으며, 대조군의

동일 절편에 비하여 특히 interaural line 6mm에서 유의한 뇌경색 면적의 감소를 나타내었으며(P<0.05), 또한 4mm 절편에서도 유의성 있는 뇌경색 면적의 감소를 나타내었다(P<0.01. Table 2, Fig. 1).

Table 2. Effect of Chungpaesagan-tang on Infarct Area of Brain Sections of the MCAO Rats

(mm<sup>2</sup>)

|         | Brain Sections (Interaural Line) (mean±SE) |          |          |           |           |         |
|---------|--|----------|----------|-----------|-----------|---------|
|         | 12 mm                                      | 10 mm    | 8 mm     | 6 mm      | 4 mm      | 2 mm    |
| Control | 17.2±1.2                                   | 29.1±1.8 | 31.3±2.3 | 22.9±1.5  | 12.8±1.3  | 6.6±1.3 |
| Sample  | 18.1±1.6                                   | 27.9±2.1 | 28.3±2.0 | 16.3±1.7* | 6.5±1.5** | 3.5±1.1 |

Control : Ischemia group induced by the middle cerebral artery occlusion(n=6)

Sample : Chungpaesagan-tang treatment group after the middle cerebral artery occlusion(n=6)

Statistical significancy was calculated between the control and the sample with Student's t-test(\*; P<0.05, \*\*; P<0.01 ).

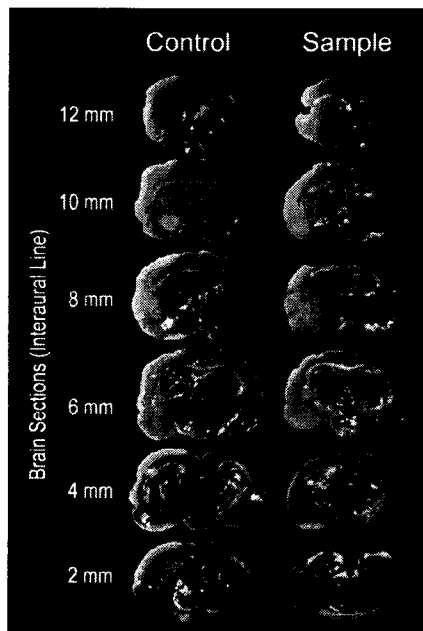


Fig. 1. Representative TTC-stained brain sections of the MCAO rats. Chungpaesagan-tang treatment group(sample) demonstrated significant decrease of infarct area in the interaural line 6 and 4 mm brain sections at 24 hours after the MCAO compared to control group.

### 3. 뇌경색 체적 및 뇌부종 비율의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군의 뇌경색 체적은  $239.8 \pm 11.5 \text{ mm}^3$  이었고, 중대뇌동맥 폐쇄 후 淸肺瀉肝湯을 투여한 Sample군은  $201.2 \pm 9.7 \text{ mm}^3$ 로 Control군에 비하여 약 16.1% 감소하여  $P < 0.05$ 의 유의성 있는 뇌경색 체적의 감소를 나타내었다. 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군의 뇌부종 비율은  $16.8 \pm 1.8\%$  이었고, 중대뇌동맥 폐쇄 후 淸肺瀉肝湯을 투여한 Sample군은  $11.3 \pm 1.6\%$ 로 Control군에 비하여 약 32.7% 감소하여 역시 유의성 있는 뇌부종의 감소를 나타내었다( $P < 0.05$ , Fig. 2).

### 4. 신경세포 사망율의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군에서 24시간

후 대뇌피질에서 신경세포 사망률은 뇌경색 중심부에서  $81.3 \pm 5.0\%$ , 뇌경색 경계부위에서  $35.5 \pm 2.7\%$ 를 나타내었다. 중대뇌동맥 폐쇄 후 淸肺瀉肝湯을 투여한 Sample군은 뇌경색 중심부에서는  $71.4 \pm 3.5\%$ 로 신경세포 사망률이 Control군에 비하여 약 12.3% 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었으며, 뇌경색 경계부위에서는  $25.3 \pm 2.3\%$ 로 신경세포 사망률이 Control군에 비하여 약 28.6% 감소하여 유의성 있는 감소를 나타내었다( $P < 0.05$ , Fig. 3).

### 5. TUNEL 양성방응 신경세포의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄한 24시간 후 Control군의 TUNEL 양성방응 신경세포는 대뇌피질의 뇌경색 경계부에서  $115.0 \pm 9.1$ 개, 선조체에서  $78.0 \pm 5.2$ 개가 관찰되었다. 중대뇌동맥 폐쇄 후 淸肺

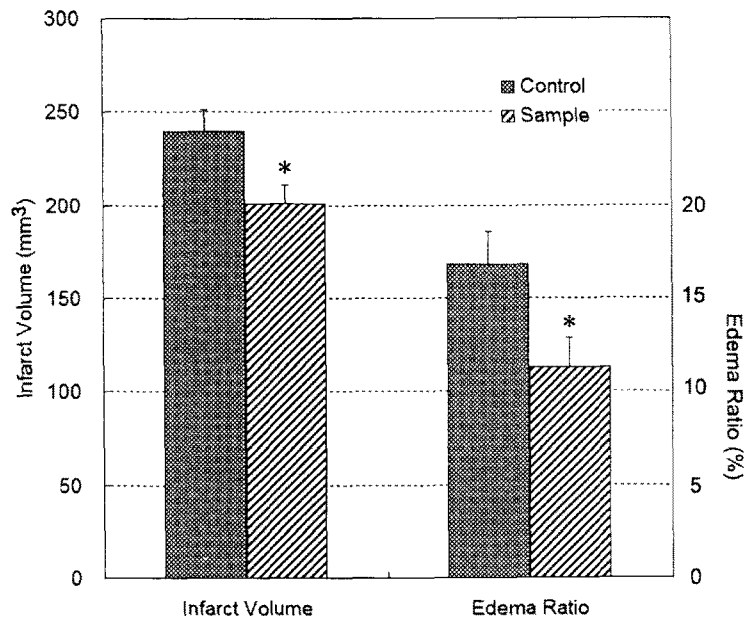


Fig. 2. Changes of infarct volume and edema ratio of the MCAO rats. Chungpaesagan-tang treatment group(sample) demonstrated significant decrease of infarct volume and edema ratio at 24 hours after the MCAO compared to control group(\*;  $P < 0.05$ ,  $n=6$ ).

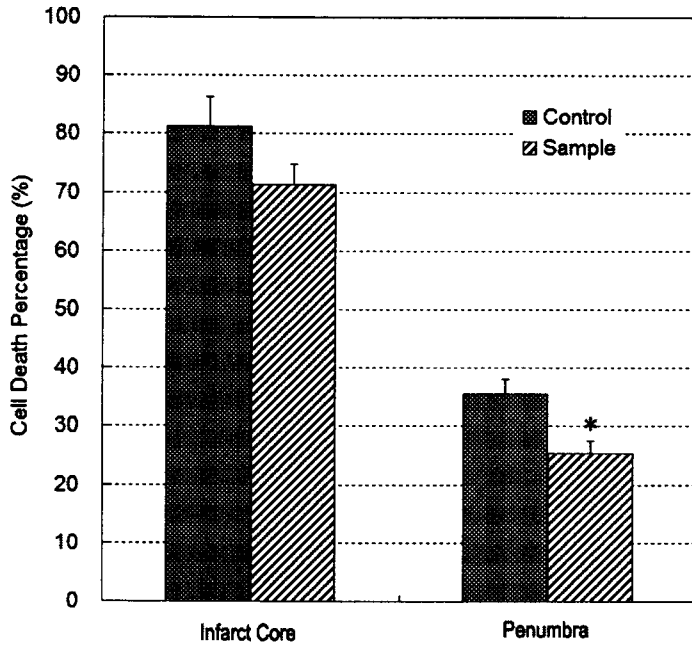


Fig. 3. Changes of cell death ratio in cerebral cortex of the MCAO rats. Chungpaesagan-tang treatment group(sample) demonstrated significant decrease of cell death ratio in penumbra, but not in infarct core at 24 hours after the MCAO compared to control group(\*;  $P < 0.05$ ,  $n=6$ ).

瀉肝湯을 투여한 Sample군은 뇌피질의 뇌경색 경계부에서  $79.2 \pm 5.5$ 개로 Control군에 비하여 약 31.2%로 유의하게 감소하였으며( $P < 0.01$ ), 선조체에서는  $58.8 \pm 4.5$ 개로 역시 Control군에 비하여 약 24.6%로 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ , Fig. 4).

#### 6. Bax 양성반응 신경세포의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄한 24시간 후 Control군의 Bax 양성반응 신경세포는 대뇌피질의 뇌경색 경계부에서  $56.5 \pm 9.2$ 개, 선조체에서  $46.3 \pm 3.6$ 개가 관찰되었다. 중대뇌동맥 폐쇄 후 瀉肝湯을 투여한 Sample군은 뇌피질의 뇌경색 경계부에서  $49.2 \pm 4.2$ 개로 Control군에 비하여 약 13.0% 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었

으며, 선조체에서는  $33.8 \pm 3.2$ 개로 Control군에 비하여 약 27.0% 감소하여  $P < 0.05$ 의 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 5).

#### 7. c-Fos 및 HSP72 양성반응 신경세포의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄한 24시간 후 Control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부에서 현저한 c-Fos 양성반응 신경세포의 증가를 나타내었으며, 중대뇌동맥 폐쇄 후 瀉肝湯을 투여한 Sample군은 Control군에 비하여 c-Fos 양성반응 신경세포의 수가 현저히 감소하였다. 한편으로 대뇌피질의 뇌경색 경계부에서 HSP72 양성반응 신경세포는 Control군과 Sample군 모두 수적인 변화는 없었으나 Sample군이 Control군



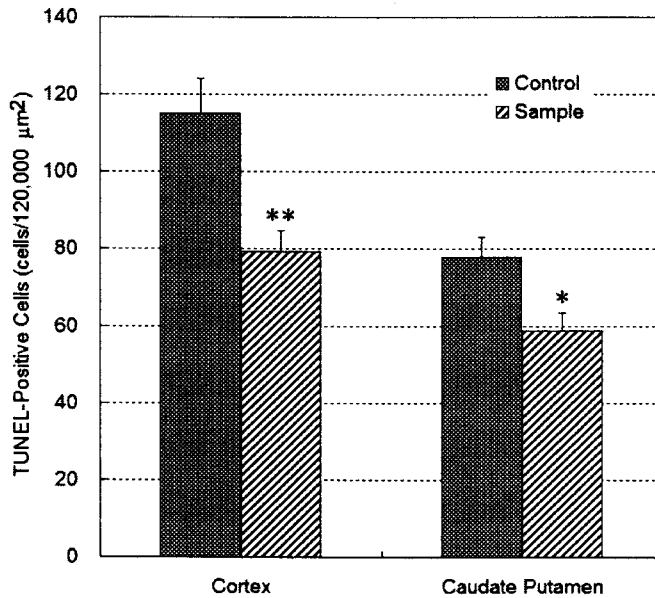


Fig. 4. Changes of TUNEL positive cells in cerebral cortex and caudate putamen of the MCAO rats. Chungpaesagan-tang treatment group(sample) demonstrated significant decrease of TUNEL positive cells in both cerebral cortex and caudate putamen at 24 hours after the MCAO compared to control group(\*;  $P < 0.05$ , \*\*;  $P < 0.01$ ,  $n=6$ ).

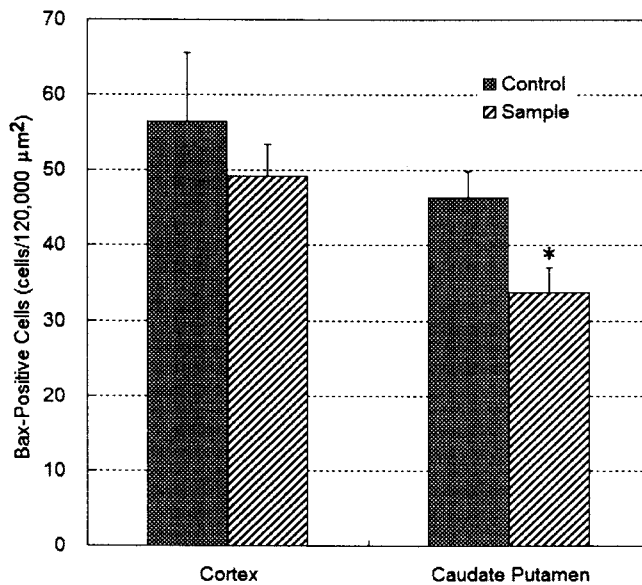


Fig. 5. Changes of Bax positive neurons in cerebral cortex and caudate putamen of the MCAO rats. Chungpaesagan-tang treatment group(sample) demonstrated significant decrease of Bax positive neurons in caudate putamen, but not in cerebral cortex at 24 hours after the MCAO compared to control group(\*;  $P < 0.05$ ,  $n=6$ ).

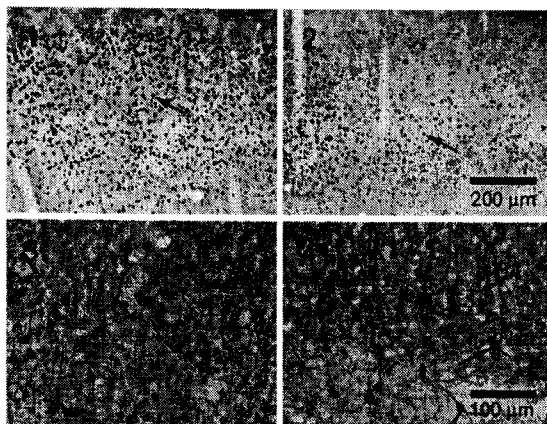


Fig. 6. Representative c-Fos and HSP72-labeled cortical sections of the MCAO rats(1; c-Fos-labeled section of Control; x200, 2; c-Fos-labeled section of Sample; x200, 3; HSP72-labeled section of Control; x400, 4; HSP72-labeled section of Sample, x400). Chungpae sagan-tang treatment group(sample) demonstrated significant decrease of c-Fos positive neurons and significant increase of HSP72 positive intensity at 24 hours after the MCAO compared to control group. Arrows indicate c-Fos or HSP72-labeled neurons.

에 비하여 현저히 강한 면역양성반응을 나타내었다(Fig. 6).

#### IV. 고찰

淸肺瀉肝湯은 <太陰人 肝受熱 裏熱病論>에 기재된 熱多寒少湯에 大黃을 가미한 처방으로 《東醫四象新編》에서 처음 기재된 후 太陰人の 肝熱太盛하고 肺燥太枯하여 발생하는 燥熱病證에 斂肺通便시키는 효능으로 太陰人の 熱鬱, 鬱痰, 熱痰, 消渴, 中風, 歷節風, 燥熱症 등에 응용되어 왔다.<sup>4)</sup> 淸肺瀉肝湯의 구성약물은 葛根, 黃芩, 蘘本, 蘿服子, 桔梗, 升麻, 白芷, 大黃으로 發散解肌, 生津止渴, 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 發表散寒, 祛風除濕, 止痛, 行氣消脹, 消食化痰, 宣肺祛痰, 發散風熱, 祛風除濕, 通竅止痛, 瀉下攻積, 瀉火濕熱, 行瘀通經 등의 본초학적인 효능<sup>20)</sup> 이외에 특히 葛根,<sup>21)</sup> 黃芩,<sup>22)</sup> 桔梗<sup>23)</sup> 등

은 최근 실험연구에서 뇌허혈 손상에 대하여 유의한 효능이 있는 것으로 보고된 바 있다.

뇌졸중에 대한 한방임상 통계연구에 의하면, 입원시 폐쇄성 뇌졸중 환자에 대한 투약처방 중 淸肺瀉肝湯이 32.3%로 가장 빈번히 사용되는 처방 중 하나이다.<sup>3,24)</sup> 급성기 중풍환자 88례를 대상으로 淸肺瀉肝湯을 2주간 투여한 임상연구에서 중풍 진행을 억제시키고, 유의하게 운동기능을 호전시켰다는 결과가 보고된바 있으며,<sup>16)</sup> 내경동맥과 동측 중대뇌동맥의 동맥경화성협착으로 중대뇌동맥 경색을 유발한 左半身 不全麻痺 환자에서 淸肺瀉肝湯이 제반 임상증상과 CAVI(Cardio-ankle vascular index)를 호전시켰다고 보고되었고,<sup>14)</sup> CAVI가 9.0 이상으로 정상 이상의 동맥경직도를 가진 급성기 중풍환자들을 대상으로 2주간 淸肺瀉肝湯을 투여한바 동맥경직도와 맥압이 유의하게 감소됨을 임상연구를 통하여 보고되었다.<sup>15)</sup>

또한 淸肺瀉肝湯에 대한 in vivo 실험연구로

는 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류시킨 흰쥐에서 뇌경색과 뇌부종을 유의하게 감소시켰다는 보고가 있으며,<sup>25)</sup> 糖尿誘發 흰쥐의 腦虛血損傷에 대하여 뇌경색 크기의 감소와 TNF- $\alpha$  및 cytokine 관련 염증반응 감소의 효능<sup>26)</sup>이 보고되었을 뿐이다. 이외에 in vitro 실험연구로 PC12세포 및 mouse neuroblastoma 2a cell 등에서 세포손상 보호 효과가 보고된 바 있다.<sup>27, 28)</sup>

본 연구에서는 동물실험을 통하여 淸肺瀉肝湯이 뇌허혈 손상 초기에 나타내는 효능을 관찰하기 위해서, MCAO 방법에 의하여 뇌허혈 손상을 유발하고 신경학적 행동지표와 뇌경색 및 뇌부종의 크기, 신경세포 사망률과 신경세포 자연사 지표인 TUNEL 양성반응, 신경세포 자연사 유발인자인 Bax 등을 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 손상에서는 혈관 폐쇄 후 3시간에서 12시간 사이에 뇌경색이 처음으로 관찰되기 시작하여 6시간에서 24시간 후에 거의 최대 크기에 이르며, 24시간 후에도 점차적으로 뇌경색이 증가하기는 하지만 그 확장속도는 매우 느리다고 하였다.<sup>29)</sup> 그러므로 중대뇌동맥을 폐쇄하여 뇌경색을 유발한 다음 淸肺瀉肝湯 투여 3시간과 24시간 후에 신경학적 행동증상을 관찰하였다. 그 결과 24시간 후 측정치는 3시간 또는 Control군에 비하여 유의성 있는 신경학적 행동증상의 개선을 나타내었다. 24시간 후의 뇌조직 절편에서 TTC 염색을 통하여 측정된 뇌경색 면적이 청폐사간탕 투여에 의하여 유의하게 감소하였고, 뇌경색 체적 역시 Control군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 淸肺瀉肝湯이 뇌경색의 악화를 억제하는 효능이 있음을 보여주는 것이다.

뇌허혈이 일어나면 뇌혈관의 투과성이 항진되고, 뇌혈관장벽(blood-brain barrier, BBB)이 느슨해지게 되어 혈관성 뇌부종이 유발된다.<sup>30)</sup> 뇌부종은 두 개강 내압을 증가시키고, 뇌혈류

와 산소공급의 장애를 일으켜 이차적인 뇌허혈 손상을 유발하게 되므로 뇌질환의 유병률과 사망률을 증가시키는 위험요소이다.<sup>31)</sup> 뇌부종 비율을 측정된 결과, 淸肺瀉肝湯은 중대뇌동맥의 폐쇄로 인한 뇌부종을 유의하게 감소시키는 효능을 발휘하였다. 위와 같은 결과들은 淸肺瀉肝湯이 급성기 중풍환자에 유의한 처방이며, 중대뇌동맥 경색을 유발한 左半身不全痲痺 환자의 제반 증상을 호전시켰다는 임상연구 보고들을 실험적으로 뒷받침하는 결과라고 생각된다.

중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 손상은 뇌혈류 감소의 정도에 따라 뇌조직 손상의 정도가 차이가 난다. 혈관 폐쇄에 의하여 뇌혈류가 정상치의 15% 이하로 낮아지고, ATP가 정상치의 25% 이하로 낮아진 부위는 뇌경색 중심부(infarct core)를 형성하고,<sup>32)</sup> 뇌경색 중심부에서 신경세포들은 약 6~12시간에 현저한 자연사 기전이 나타나고, 약 7일 이후에는 사망으로 뇌조직에서 신경세포들이 완전히 사라지는 범괴사현상(pan-necrosis)이 나타난다.<sup>33)</sup> 중심부 주변의 대뇌피질과 선조체에서 뇌혈류가 15%~40%, ATP치가 50%~70%의 정도를 유지하는 부위는 뇌경색 경계부위(penumbra)로 분류되며,<sup>32)</sup> 이곳 신경세포들은 자연사기전(apoptosis)에 의한 지연사망(delayed neuronal death)이 일어나며, 뇌경색 경계부위에서 신경세포의 지연사망을 억제하는 것이 뇌경색의 확장을 억제하는 대책이 된다.<sup>34)</sup> 본 실험에서 일차적으로 cresyl violet 염색에 의하여 뇌경색이 유발된 대뇌피질에서 뇌경색 중심부와 뇌경색 경계부위에서 신경세포의 사망률을 관찰하였다. 중대뇌동맥 폐쇄 후 淸肺瀉肝湯을 투여한 Sample군은 뇌경색 중심부에서는 신경세포 사망률이 Control군에 비하여 약 12.3% 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었지만, 뇌경색 경계부위에서는 신경세포 사망률이 Control군에 비하여 약 28.6% 감소하여 유의성 있는 신경세포 사

망 억제효능을 나타내었다. 이러한 결과는 淸肺瀉肝湯이 뇌경색 중심부의 심한 신경세포 사멸을 유의하게 억제하지는 못하지만 경계부의 신경세포의 지연사멸을 억제하는 효능에 의하여 뇌경색의 확장을 억제하는 것으로 생각된다.

뇌허혈 손상에 의한 신경세포의 사망에는 괴사(necrosis)와 자연사(apoptosis) 모두가 관여하지만 신경세포 지연사멸의 주요 기전은 자연사로 알려져 있다.<sup>34)</sup> 자연사 세포의 조직학적 특징은 세포가 응축되고, 염색질이 응축된 다음 응집된 염색질이 다양한 크기의 조각으로 나누어져 apoptotic body를 형성하게 되며, DNA가 180-200 base 길이로 일정하게 절단되어 특징적인 ladder pattern의 band로 관찰된다.<sup>35)</sup> 이러한 apoptotic body와 ladder pattern의 DNA 절단이 세포의 자연사를 확인하는 가장 특이적인 소견이 되며, TUNEL 염색에 의하여 자연사 신경세포를 관찰한바, 중대뇌동맥 폐쇄 후 淸肺瀉肝湯을 투여한 Sample군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서는 약 31.2% 감소하였고, 선조체에서는 약 24.6% 감소하여 모두 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 淸肺瀉肝湯이 뇌허혈 손상에 의한 신경세포의 자연사를 억제하는 효능이 있음을 보여주는 결과이다.

중대뇌동맥 폐쇄 후 淸肺瀉肝湯을 투여한 Sample군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부에서는 약 13.0% 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었으며, 선조체에서는 Control군에 비하여 약 27.0% 감소하여 유의성 있는 감소를 나타내었다. 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 유의성이 없는 결과는 Bax염색 조직에서 경계부위 영역의 구분이 불분명한 때문으로 생각되며, 선조체에서의 유의한 Bax 발현의 억제작용과 TUNEL 염색의 결과를 통합으로 살펴볼 때 淸肺瀉肝湯이 Bax 발현 억제에 의한 신경세포 자연사 억제 효능을 가지고 있는 것으로 생각된다.

c-Fos는 immediate early genes(IEGs)의 일종으로 다양한 자극에 의하여 중추신경계 조직에서 발현된다. 뇌허혈은 강력한 IEGs 자극요인으로 광범위 뇌부위에서 발현이 증가되며,<sup>36)</sup> 뇌허혈에 의하여 손상받기 쉬운 뇌부위에서 강하게 발현되고,<sup>37)</sup> 미약한 국소뇌허혈에서는 c-Fos 발현이 허혈영역에 제한되나, 심한 국소뇌허혈에서는 허혈영역 밖에서도 발현이 관찰된다고 하였다.<sup>38)</sup> 또한 heat-shock proteins(HSPs) 중 HSP72는 뇌허혈을 비롯하여 변성단백질을 생산하는 모든 스트레스에 대한 반응으로 발현이 증가된다.<sup>39)</sup> 국소뇌허혈의 경우 혈류량이 매우 낮은 부위를 제외한 모든 허혈 손상 세포에서 HSP72 mRNA가 발현되며, 발현된 HSP72는 변성단백질의 효소적 역할과 3차구조의 복원을 통하여 변성단백질의 구조와 기능을 회복시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>40)</sup> 본 실험의 결과 중대뇌동맥 폐쇄 후 淸肺瀉肝湯을 투여한 Sample군은 Control군에 비하여 c-Fos 양성반응 신경세포의 수가 현저히 감소하였으며, 대뇌피질의 뇌경색 경계부에서 HSP72 양성반응 신경세포는 Control군과 Sample군 모두 수적인 변화는 없었으나 Sample군이 Control군에 비하여 현저히 강한 면역양성반응을 나타내었다. 이러한 결과는 淸肺瀉肝湯이 뇌조직에 대한 유해스트레스 자극을 완화하는 작용이 있는 것을 추측하게 하는 결과이다.

본 실험에서 얻어진 뇌허혈 손상에 대한 淸肺瀉肝湯의 효능을 총괄하면, 淸肺瀉肝湯은 뇌경색 초기에 신경세포의 사망을 억제하여 뇌경색의 확장을 억제함과 동시에 뇌부종을 억제하므로 신경학적 행동지표를 개선하는 것으로 생각된다. 또한 이러한 淸肺瀉肝湯의 신경세포 사망 억제기전은 Bax 발현 억제를 통하여 신경세포 자연사를 억제한 때문으로 생각되며, 추가적으로 IEGs의 발현 억제와 HSPs 발현 증가에 의한 손상회복 효능도 추측할 수

있다고 생각된다.

## V. 결 론

淸肺瀉肝湯이 뇌허혈 손상 초기에 나타내는 효능을 관찰하기 위해서, MCAO 방법에 의하여 뇌허혈 손상을 유발하고 淸肺瀉肝湯 물추출액기스를 투여한 다음 신경학적 행동지표와 뇌경색 및 뇌부종의 크기에 미치는 영향과 신경세포 사망률과 신경세포 자연사 지표인 TUNEL 염색, 신경세포 자연사 유발인자인 Bax 등을 면역조직화학적 방법으로 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

淸肺瀉肝湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상 흰쥐의 신경학적 행동증상을 유의하게 개선시켰고, 뇌경색 면적과 체적 및 뇌부종을 유의하게 감소시켰다. 또한, 대뇌피질 뇌경색 경계부위에서 신경세포 사망률을 유의하게 감소시켰으며, 뇌경색 경계부위와 선조체에서 TUNEL 양성반응 신경세포 수를 유의하게 감소시켰고, 선조체에서 Bax 양성반응 신경세포 수를 유의하게 감소시켰다. 淸肺瀉肝湯은 뇌경색 경계부위에서 c-Fos 양성반응 신경세포 수를 유의하게 감소시켰으며, HSP72 발현을 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 淸肺瀉肝湯은 뇌허혈 손상 초기에 신경세포 자연사 기전을 억제하고, 뇌경색과 뇌부종을 억제하는 효능이 있는 것으로 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 2005학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음.

## 참고문헌

1. 전국한외과대학 심계내과학교실. 심계내과학. 서울, 군자출판사. pp 331-332, 2006.
2. 김영석. 임상중풍학. 서울, 서원당. pp 303-308, 317-329, 1997.
3. 권도익, 고창남, 조기호, 김영석, 배형섭, 이경섭. 한방병원 심계내과 입원 환자에 대한 임상연구. 경희의학 12(2):200-213, 1996.
4. 李濟馬. 東醫壽世保元. 서울, 행림출판사. pp 7-13, 115, 137-138, 1986.
5. 廉泰煥. 東醫四象處方集. 서울, 행림출판사. pp 86-87, 114-115, 1991.
6. 尹炳洙. 太陰人 淸肺瀉肝湯의 效能에 對한 實驗的 研究. 사상의학회지 2(1):135-147, 1990.
7. 김정진, 박은경, 배형섭, 문상관, 김영석, 이경섭, 김동현, 조기호. 淸肺瀉肝湯과 大黃의 瀉下效果에 관한 실험적 연구. 大韓韓醫學會誌 20(3):87-93, 1999.
8. 홍성길, 강봉주, 조동욱. 허혈/재관류 환경하에서 청폐사간탕의 염증 관련 반응 억제 효과. 韓國韓醫學研究院論文集 6(1):81-87, 2001.
9. 김정열, 신미란, 허운영, 김달래, 전종원. 淸肺瀉肝湯이 CCl4로 誘發된 흰쥐의 肝損傷에 미치는 影響. 사상체질의학회지 17(1):130-141, 2005.
10. 김주희, 박성식. 淸肺瀉肝湯이 생쥐의 Lipo-polysaccharide 유발 關節炎에 미치는 影響. 사상체질의학회지 14(3):114-131, 2002.
11. 具眞淑, 金璋顯. 淸肺瀉肝湯이 Streptozotocin 으로 誘發된 흰쥐의 實驗的 糖尿에 미치는 影響. 大韓韓方小兒科學會誌 11(1):227-247, 1997.
12. 김은영, 설유경, 최재중, 전수형, 김 훈, 김

- 중원. 태음인 청폐사간탕이 lipase 활성저해 및 db/db mouse의 체중감량, 혈장지질, UCP 1, 2 발현에 미치는 영향. 사상체질의학회지 19(1): 171-185, 2007.
13. 송미연, 이종수, 김성수, 신현대. 節食療法施行 후 太陰人肥滿에 대한 淸肺瀉肝湯과 太陰調胃湯의 臨床的 研究. 韓方再活醫學科學會誌 8(1): 34-56, 1998.
14. 윤효진, 이재화, 이선우, 김영선, 이성근, 이기상. 淸肺瀉肝湯을 투여한 중대뇌동맥영역의 뇌경색환자 치험 1례. 대한한방내과학회지 28(1): 199-207, 2007.
15. 박영민, 홍진우, 신원준, 정동원, 김석민, 배형섭, 김영석, 조기호, 문상관, 정우상. 淸肺瀉肝湯이 급성기 중풍환자의 동맥경직도 및 맥압에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 27(2): 416-428, 2006.
16. 최동준, 정우상, 문상관, 조기호, 김영석, 배형섭. 급성기 중풍 환자에 대한 청폐사간탕의 임상적 효능. 大韓韓醫學會誌 23(4): 9-14, 2002.
17. Ginsberg M.D., Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. Stroke 20(12): 1627-1642, 1989.
18. Kirino T. Delayed neuronal death. Neuro-pathology 20: S95-97, 2000.
19. Bederson J.B., Pitts L.H., Tsuji M., Nishimura M.C., Davis R.L., Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke 17: 472-476, 1986.
20. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울, 영림사. pp 129-131, 132-133, 148-149, 151-152, 178-179, 242-244, 373-374, 460-461, 1991.
21. Yan B., Wang D.Y., Xing D.M., Ding Y., Wang R.F., Lei F., Du L.J. The anti-depressant effect of ethanol extract of radix puerariae in mice exposed to cerebral ischemia reperfusion. Pharmacol Biochem Behav 78(2): 319-325, 2004.
22. Shang Y.Z., Miao H., Cheng J.J., Qi J.M. Effects of amelioration of total flavonoids from stems and leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi on cognitive deficits, neuronal damage and free radicals disorder induced by cerebral ischemia in rats. Biol Pharm Bull 29(4): 805-810, 2006.
23. Son I.H., Park Y.H., Lee S.I., Yang H.D., Moon H.I. Neuroprotective activity of triterpenoid saponins from *Platycodi radix* against glutamate-induced toxicity in primary cultured rat cortical cells. Molecules 12(5): 1147-1152, 2007.
24. 배철환, 조기호, 이원철, 김영석, 배형섭, 이경섭, 구본홍. 폐쇄성 뇌졸중에 대한 임상적 연구. 경희한의대논문집 10: 665-687, 1987.
25. 오연환, 정승현, 박인식, 신길조, 이원철. 淸肺瀉肝湯이 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 22(2): 161-174, 2001.
26. 정춘근, 김은영, 신정원, 손영주, 이현삼, 정혁상, 손낙원. 淸肺瀉肝湯이 糖尿誘發 흰쥐의 腦虛血損傷에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌 26(2): 217-230, 2005.
27. 문하경. 淸肺瀉肝湯과 單味들이 hypoxia-reoxygenation에 의해 손상 받은 mouse neuroblastoma 2a cells에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지 16(2): 89-112, 2005.
28. 소윤조. 저산소/재관류로부터 청폐사간탕의 PC12 세포 보호 효과. 생약학회지 36(2): 151-157, 2005.
29. Garcia J.H., Yoshida Y., Chen H., Li Y., Zhang Z.G., Chopp M. Progression from ischemic injury to infarct following middle

- cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 142: 623 - 635, 1993.
30. Abbott N.J., Ronnback L., Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7(1): 41-53, 2006.
  31. Unterberg A.W., Stover J., Kress B., Kiening K.L. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129(4): 1021-1029, 2004.
  32. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M. Focal cerebral ischaemia in the rat. 2: Regional cerebral blood flow determined by <sup>14</sup>C iododantipyrene autoradiography followed by middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 61-69, 1981.
  33. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79(4): 1431-1568, 1999.
  34. Du C., Hu R., Csermanky C.A., Hsu C.Y., Choi D.W. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 195 - 201, 1996.
  35. Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(2): 267-282, 2003.
  36. Collaco-Moraes Y., Aspey B.S., de Belle-roche J.S., Harrison M.J. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to MK-801. *Stroke* 25: 1855-1860, 1994.
  37. Jorgensen M.B., Deckert J., Wright D.C., Gehlert D.R. 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.
  38. An G., Lin T.N., Liu J.S., Xue J.J., He Y.Y., Hsu C.Y. Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. *Ann Neurol* 33: 457-464, 1993.
  39. Kinouchi H., Sharp F.R., Hill M.P., Koistinaho J., Sagar S.M., Chan P.H. Induction of 70-kDa heat shock protein and hsp70 mRNA following transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 105-115, 1993.
  40. Welch W.J. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 339: 327-33, 1993.