

芒硝의 瀉下作用이 MCAO 흰쥐 뇌조직의 Bax 및 HSP72 발현에 미치는 영향

김건식 · 김범희¹ · 이동은 · 양기영 · 김성준 · 강 희 · 손낙원*

경희대학교 동서의학대학원 한의과학, 1: 동의대학교 한의과대학 해부학교실

Effects of Purgative Action with Natrii Sulfas on Bax and HSP72 Expressions of the MCAO Rat Brain

Kon Sik Kim, Bum Hoi Kim¹, Dong Eun Lee, Kee Young Yang, Seong Joon Kim, Hee Kang, Nak Won Sohn*

Division of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, 1: Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

This study aimed to evaluate the effect of purgation therapy with Natrii sulfas, a therapy for stroke patients with constipation in the oriental medicine, on the ischemic brain damage of the rats. The ischemic brain damage was induced by the middle cerebral artery occlusion (MCAO), Natrii sulfas was administered once after the MCAO. After 48 hours, expressions of Bax, Bcl-2, c-Fos, and HSP72 on the brain tissues were observed by immunohistochemical methods or technique. Purgation therapy with Natrii sulfas attenuated the excess of Bax expression caused by the ischemic brain damage. It was significant statistically in the penumbra of cerebral cortex, but not in the caudate putamen, of the MCAO rats. Purgation therapy with Natrii sulfas did not attenuate the excess of Bcl-2 expression caused by the ischemic brain damage. Purgation therapy with Natrii sulfas did not attenuate the excess of c-Fos expression caused by the ischemic brain damage. Purgation therapy with Natrii sulfas attenuated the excess of HSP72 expression caused by the ischemic brain damage. It was significant statistically in the penumbra of cerebral cortex, but not in the caudate putamen, of the MCAO rats. These results suggest that purgation therapy with Natrii sulfas has a neuroprotective effect on the ischemic brain damage and an anti-apoptotic effect.

Key words : natrii sulfas, middle cerebral artery occlusion, neuroprotective effect, purgative action, Bax, HSP72

서 론

중풍은 人事不省, 蒙昧, 暴仆, 痰涎壅盛, 牙關緊急, 神志變化, 呼吸障碍, 半身不遂, 偏枯, 言語不利, 暴暗 등의 다양한 임상증상은 물론 頭痛, 眩暈, 便秘, 腹脹, 二便自流 등의 부차적인 증상들을 수반한다¹⁻³. 중풍환자의 便閉는 大小便秘結하는 中臟證의 증상 중 하나로 陽亢風動, 痰火上搖, 邪熱內積하므로 쉽게 大便秘結이 일어난다고 하였다^{4,5}. 한의학에서는 중풍 급성기 환자의 치료에 瀉下療法를 중요한 치료방법 중 하나로 응용하고 있으며^{6,7}, 실험연구에서도 瀉下療法이 인체의 혈액순환 개선과 신진대사의 촉진, 뇌부종 및 뇌압의 감소, 혈압강하, 뇌출혈의 억제 등에 효

* 교신저자 : 손낙원, 경기도 용인시 기흥구 경희대학교 전자정보관 444호

· E-mail : sohnw@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2747

· 접수 : 2009/06/02 · 수정 : 2009/07/02 · 채택 : 2009/07/16

과가 있음이 보고되어 있다⁸⁻¹¹.

한편으로, 신경세포는 허혈손상을 받으면 짧게는 수 시간, 길게는 수 주 이후에 세포가 사망하는 지연사망 (delayed cell death) 이 일어나는 것이 특징이며¹², 이러한 신경세포의 지연사망은 세포자연사 (apoptosis) 기전에 의한 것으로 설명하고 있다^{12,13}.

신경세포의 자연사는 과도하게 유입된 Ca⁺⁺에 의한 excitotoxicity와 미토콘드리아의 기능이상에 의하여 Par-4 (prostate apoptosis response-4) 단백질 발현이 증가하고, Bax, Bad, Bcl-2, Bcl-xl 등의 B-cell lymphoma (Bcl)-2 계열 단백질 발현이 증가하며, 미토콘드리아 막이 탈분극하여 cytochrome C를 세포질로 분비하고, cysteine protease인 caspase가 활성화되고, endonuclease에 의하여 DNA절단이 일어나 사망에 이르게 되는 것이다¹⁴⁻¹⁷. 또한 신경세포는 허혈 등의 스트레스자극을 받으면 즉각적인 반응으로 전사조절인자로서 c-Fos, c-Jun, Jun-B 등

의 immediate early genes (IEGs)을 발현시키며^{18,19)}, 스트레스 자극이 생산하는 변성단백질의 구조와 기능을 복원시키기 위해서 heat-shock proteins (HSPs)을 발현한다고 하였다²⁰⁾.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 10주령, 약 250 g 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

본 실험에 사용한 약물은 경회한약에서 구입한芒硝(Natrii Sulfas)로 200 g을 2,000 ml의 증류수로 전탕하고, 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조 (-70℃, 10 mmHg)하여 185.4 g의 건조된 분말엑기스를 얻었으며, 수율은 약 92.7%이었다. 투여량은 엑기스芒硝 4 g에 대한 체중비례로 계산하여 체중 100 g 당 53 mg을 1회 투여량으로 하였으며, 중대뇌동맥 폐쇄와 이후 약 10분이 지난 다음 실험동물이 마취에서 깨어나면 즉시 1회 경구투여 하였다.

3. 실험군의 구분

실험군은 뇌허혈을 유발하기 위한 준비수술과정은 시행하였으나 중대뇌동맥을 폐쇄시키지 않은 정상대조군 (Sham), 일시적인 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 손상을 유발시킨 대조군 (Control) 및 대조군과 동일한 상태에서芒硝를 경구투여한芒硝투여군 (Sample)으로 나누었다.芒硝 경구투여 48시간 후에 각각 실험동물을 희생시켜 관리지표들을 관찰하였으며, 각 군 당 실험동물은 6마리씩 배정하였다.

4. 국소뇌허혈의 유발

국소뇌허혈은 총경동맥으로 나일론 수술실을 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부를 폐쇄하는 방법을 사용하였다²¹⁾. 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 봉합부

위 외부로 약간 노출되도록 한 상태로 전경부의 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다. 혈류의 재개통을 위하여, 폐쇄 2 시간 후에 다시 마취한 상태에서 피부 봉합부위 밖으로 노출된 나일론 수술실을 조심스럽게 당겨내어 혈류를 재개통시키고 곧바로 마취에서 깨어나게 하였다.

5. 뇌조직의 처리

실험동물을 pentobarbital sodium 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05 M 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-isophentan 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50 μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

6. 면역조직화학 염색

실험동물의 뇌조직을 0.05 M 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 Bax (AB7977, 1:500 dilution, rabbit polyclonal; ABCAM, USA), Bcl-2 (SC7382, 1:500 dilution, mouse monoclonal; Santa Cruz Bio, USA), HSP72/73 (HSP01, 1:500 dilution, mouse monoclonal; Oncogene, USA) 및 c-fos (AB7963, 1:500 dilution, rabbit polyclonal; ABCAM, 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 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.

7. 면역조직화학 염색 결과의 관찰

면역조직화학적으로 염색된 Bax, Bcl-2, HSP72 및 c-Fos 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 일정한 면에서 양성반응 신경세포 수를 측정하고 100,000 μm² 당 세포 수를 계산하였다.

8. 통계분석

실험자료의 통계분석은 대조군에 대한芒硝투여군의 유의성을 p<0.05 수준에서 Student's t-test 방법을 사용하여 검정하였다.

결 과

1. Bax 발현의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 Sham군에서는 대뇌피질과 선조체 모두에서 Bax 발현을 거의 관찰할 수 없었고(Fig. 1-1, 2), 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체에서 매우 뚜렷한 Bax 양성반응의 신경세포들이 현저하게 증가하였으며(Fig. 1-3, 4), 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 芒硝를 투여한 Sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 Bax 양성반응 신경세포들의 수가 Control군에 비하여 감소하였으나(Fig. 1-5), 선조체에서는 큰 변화가 없었다(Fig. 1-6). 뇌조직 일정면적 내에서 Bax 양성반응의 세포 수를 측정된 결과는, 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 Sham군은 1.2 ± 0.5 , Control군은 73.7 ± 5.6 , Sample군은 51.8 ± 6.1 개/100,000 μm^2 로 Sample군은 Control군에 비하여 유의성 ($P < 0.05$) 있는 감소를 나타내었고, 선조체에서는 Sham군은 1.7 ± 0.8 , Control군은 44.0 ± 5.9 , Sample군은 30.2 ± 3.3 개/100,000 μm^2 로 Sample군이 Control군에 비하여 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 1, 2).

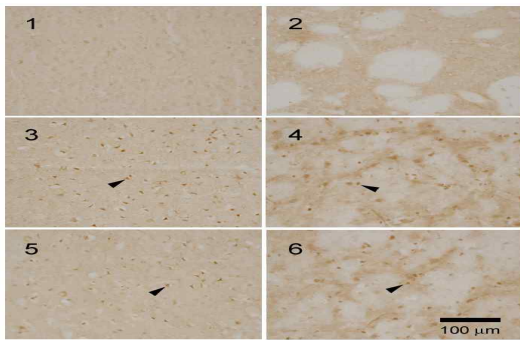


Fig. 1. Representative brain sections of the MCAO rats immunolabeled against Bax antibody (sections 1, 3, and 5, cortex penumbra; sections 2, 4, and 6, caudate putamen; sections 1 and 2, Sham group; sections 3 and 4, Control group; sections 5 and 6, Sample group). Purgation therapy with Natrii sulfas attenuated the increase of Bax positive cells in the cortex penumbra significantly, but not in the caudate putamen, compared to the control group. Arrowheads indicate Bax positive cells.

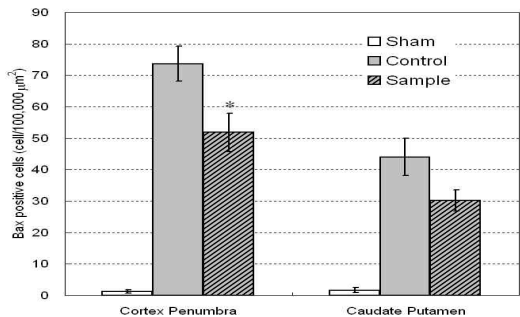


Fig. 2. Effect of purgation therapy with Natrii sulfas on Bax positive cells of the MCAO rat brain. Purgation therapy with Natrii sulfas attenuated the increase of Bax positive cells in the cortex penumbra significantly, but not in the caudate putamen, compared to the control group ($n=6$; *, $P < 0.05$).

2. Bcl-2 발현의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 Sham군에서는 대뇌피질과 선조체 모두에서 Bcl-2 발현을 거의 관찰할 수 없었고(Fig. 3-1, 2), 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체에서 매우 뚜렷한 Bcl-2 양성반응의 신경세포들이 현저하게 증가하였으며(Fig. 3-3, 4), 중대뇌동맥 폐쇄 후 芒硝를 투여한 Sample군에서도 Bcl-2 양성반응은 Control군과 큰 차이가 없었다(Fig. 3-5, 6). 뇌조직 일정면적 내에서 Bcl-2 양성반응의 세포 수를 측정된 결과는, 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 Sham군은 1.0 ± 0.5 , Control군은 53.5 ± 7.0 , Sample군은 56.7 ± 5.3 개/100,000 μm^2 로 Sample군은 Control군에 비하여 유의한 변화가 없었으며, 선조체에서는 Sham군은 2.2 ± 1.0 , Control군은 46.5 ± 4.9 , Sample군은 44.3 ± 6.2 개/100,000 μm^2 로 Sample군이 Control군에 비하여 역시 유의한 변화가 없었다(Fig. 3, 4).

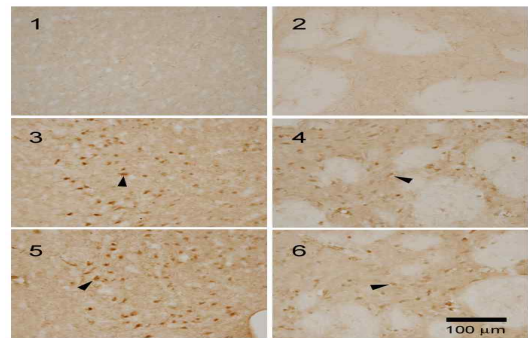


Fig. 3. Representative brain sections of the MCAO rats immunolabeled against Bcl-2 antibody (sections 1, 3, and 5, cortex penumbra; sections 2, 4, and 6, caudate putamen; sections 1 and 2, Sham group; sections 3 and 4, Control group; sections 5 and 6, Sample group). Bcl-2 positive cells were not different between Sample and Control groups. Arrowheads indicate Bax positive cells.

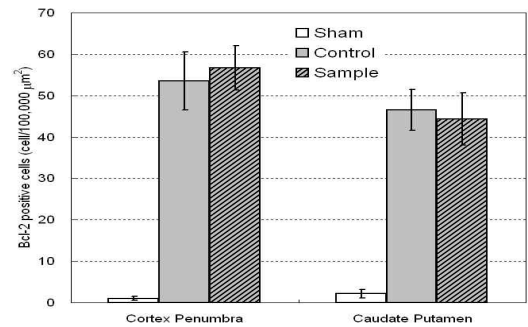


Fig. 4. Effect of purgation therapy with Natrii sulfas on Bcl-2 positive cells of the MCAO rat brain. Bcl-2 positive cells were not different between Sample and Control groups. Arrowheads indicate Bax positive cells ($n=6$).

3. c-Fos 발현의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 Sham군에도 대뇌피질과 선조체 모두에서 미약한 c-Fos 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 5-1, 2). 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체에서 매우 뚜렷한 c-Fos 양성반응의 신경세포들이 현저하게 증가하였으며(Fig. 5-3, 4), 중대뇌동맥 폐쇄 후 芒硝를 투여한 Sample군에서도 c-Fos 양성반응은 Control군과 큰 차이가 없

었다(Fig. 5-5, 6). 뇌조직 일정면적 내에서 c-Fos 양성반응의 세포 수를 측정된 결과는, 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 Sham군은 20.7±2.7, Control군은 47.0±5.2, Sample군은 45.3±6.9 개/100,000 μm²로 Sample군은 Control군에 비하여 유의한 변화가 없었으며, 선조체에서는 Sham군은 9.2±1.9, Control군은 31.7±3.9, Sample군은 31.2±3.8 개/100,000 μm²로 Sample군이 Control군에 비하여 역시 유의한 변화가 없었다(Fig. 5, 6).

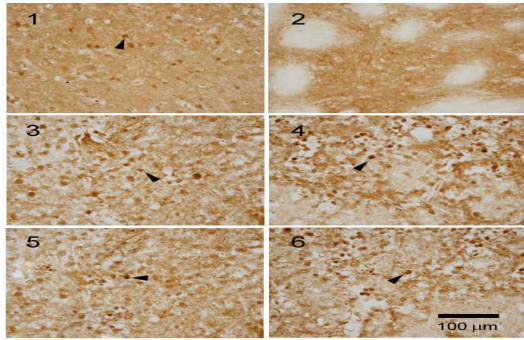


Fig. 5. Representative brain sections of the MCAO rats immunolabeled against c-Fos antibody (sections 1, 3, and 5, cortex penumbra; sections 2, 4, and 6, caudate putamen; sections 1 and 2, Sham group; sections 3 and 4, Control group; sections 5 and 6, Sample group). c-Fos positive cells were not different between Sample and Control groups. Arrowheads indicate c-Fos positive cells.

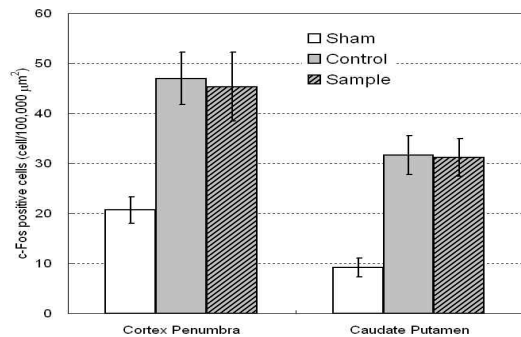


Fig. 6. Effect of purgation therapy with Natrii sulfas on c-Fos positive cells of the MCAO rat brain. c-Fos positive cells were not different between Sample and Control groups. Arrowheads indicate Bax positive cells (n=6).

4. HSP72 발현의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 Sham군에서도 대뇌피질과 선조체 모두에서 미약한 HSP72 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 7-1, 2). 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체에서 매우 뚜렷한 HSP72 양성반응의 신경세포들이 현저하게 증가하였으며(Fig. 7-3, 4), 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 芒硝를 투여한 Sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체 모두에서 HSP72 양성반응 신경세포들의 수가 Control군에 비하여 감소하였다(Fig. 7-5, 6). 뇌 조직 일정면적 내에서 HSP72 양성반응의 세포 수를 측정된 결과는, 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 Sham군은 23.0±3.3, Control군은 52.2±4.1, Sample군은 40.3±3.0 개/100,000 μm²로 Sample군은 Control군에 비하여 유의성 (P<0.05) 있는 감소를 나타내었고, 선조체에서는

Sham군은 25.8±2.8, Control군은 55.8±6.4, Sample군은 49.3±5.2 개/100,000 μm²로 Sample군이 Control군에 비하여 감소는 하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 7, 8).

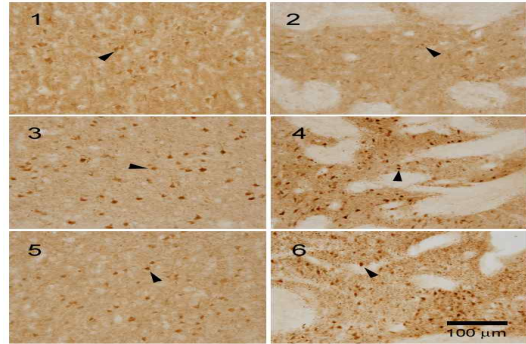


Fig. 7. Representative brain sections of the MCAO rats immunolabeled against HSP72 antibody (sections 1, 3, and 5, cortex penumbra; sections 2, 4, and 6, caudate putamen; sections 1 and 2, Sham group; sections 3 and 4, Control group; sections 5 and 6, Sample group). Purgation therapy with Natrii sulfas attenuated the increase of HSP72 positive cells in the cortex penumbra, but not in the caudate putamen, compared to the control group. Arrowheads indicate HSP72 positive cells.

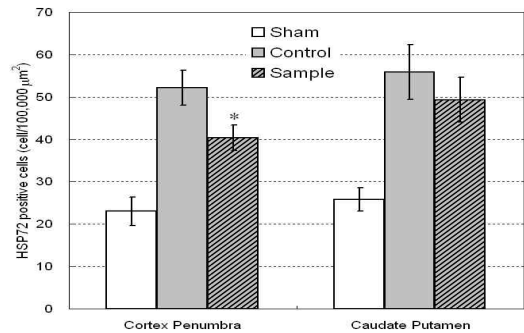


Fig. 8. Effect of purgation therapy with Natrii sulfas on HSP72 positive cells of the MCAO rat brain. Purgation therapy with Natrii sulfas attenuated the increase of HSP72 positive cells in the cortex penumbra significantly, but not in the caudate putamen, compared to the control group (n=6; *, P<0.05).

고 찰

중풍은 人事不省, 半身不遂, 偏枯와 함께 大便秘結하는 부차적인 증상을 수반하며, 이때 瀉下療法를 사용한다. 그러므로 한약재 중에서 瀉熱通便, 潤燥軟堅, 清火消腫의 효능으로 大便秘結에 사용되는 芒硝¹⁸⁾에 의한 瀉下作用이 신경세포의 허혈손상에 미치는 영향을 관찰하고자, 흰쥐에 중대뇌동맥을 폐쇄하는 방법으로 뇌허혈 손상을 유발하고 芒硝를 투여한 다음 48시간 후에, 뇌조직에서 Bax, Bcl-2, c-Fos 및 HSP72 발현의 변화를 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

뇌허혈 손상에서 신경세포의 자연사망 기전은 자연사 기전과 동일하게, 미토콘드리아의 손상에 의하여 시작되어 DNA절단에 의하여 사망하며, 이러한 과정에서 가장 중요하게 관여하는 인자가 cyteine aspartate protease인 caspase계열 단백질과 Bax와 Bcl-2의 Bcl-2계열 단백질들이다¹⁴⁻¹⁷⁾. 이들 중 Bax는

pro-apoptotic molecule로, Bcl-2는 anti-apoptotic molecule로 알려져 있다²³). 허혈 손상을 받은 신경세포에 Bax 발현이 증가하여 신경세포의 자연사를 유도하였다는 보고는 매우 많다²⁴⁻²⁶). 역으로 Bax와 상호작용하는 단백질에 대한 억제제가 신경세포 손상 보호효능이 있으며²⁷, Bax 유전자를 제거한 실험동물에서는 자연사 기전에 의한 신경세포의 사망이 현저하게 억제되었다는 보고로 그 작용을 확실히 설명하고 있다²⁸). 허혈 손상을 받은 신경세포에서의 Bcl-2 발현은 감소와 증가 등 매우 다양한 양상을 나타낸다고 하였으며, 그러므로 Bax와 Bcl-2 발현의 상대적인 비율이 세포의 사망과 생존을 결정한다고 하였다²⁹). 그러나 Bcl-2 발현 자체가 신경세포를 손상으로부터 보호한다는 것은 명확하다²⁹).

흰쥐에서 중대뇌동맥을 폐쇄하여 허혈성 뇌손상을 유발하고 芒硝를 투여한 후 48시간 후에 Bax와 Bcl-2 발현의 변화를 관찰한 본 실험의 결과, Control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체에서 매우 뚜렷한 Bax 양성반응의 신경세포들이 현저하게 증가하였으며, 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 芒硝를 투여한 Sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 Bax 양성반응 신경세포 수가 Control군에 비하여 유의하게 감소하였으나, 선조체에서는 감소하는 경향은 있었으나 유의성은 없었다. Bcl-2 발현 역시 Control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체에서 매우 뚜렷한 Bcl-2 양성반응의 신경세포들이 현저하게 증가하였으며, 중대뇌동맥 폐쇄 후 芒硝를 투여한 Sample군에서도 Bcl-2 발현이 증가한 것으로 관찰되어 Control군과 유의한 차이가 없었다. 면역조직화학적 연구방법의 제한점으로 인하여 Bax와 Bcl-2 발현의 비율을 직접적으로 측정할 수는 없으나, 芒硝에 의한 瀉下作用이 Bax 발현은 감소시키고 Bcl-2 발현은 여전히 높게 유지하는 것으로 보아 뇌허혈에 의한 신경세포의 손상을 보호하는 효능이 있음을 추측하게 한다.

다양한 자극이 중추신경계 조직에서 IEGs 발현을 유발시킨다. 정상적인 상태에서는 IEGs 발현이 아주 낮은 상태이나, 자극이 있을 경우 그 자극에 기능적으로 관련된 뇌부위에서만 IEGs 발현의 증가가 나타난다고 하였다³⁰). 하지만 뇌허혈은 강력한 IEGs 자극요인으로 광범위 뇌부위에서 발현이 증가한다. 전뇌허혈의 경우 손상받기 쉬운 뇌부위에서 강하게 발현되고³¹), 미약한 국소뇌허혈에서는 IEGs 발현이 허혈영역에 제한되나, 심한 국소뇌허혈에서는 허혈영역 밖에서도 발현이 관찰된다고 하였다³²). 또한 뇌허혈 시간이 30분에서 90분으로 증가되거나, 영구적인 중대뇌동맥 폐쇄의 경우에는 중대뇌동맥이 혈액공급을 하는 영역은 물론, 반대측 뇌부위에서도 관찰된다고 하였다^{33,34}). 흰쥐에서 중대뇌동맥을 폐쇄하여 허혈성 뇌손상을 유발하고 芒硝를 투여한 후 48시간 후에 c-Fos 발현의 변화를 관찰한 본 실험의 결과, 芒硝의 瀉下作用은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체 모두에서 c-Fos 발현을 유의하게 변화시키지 못하였다. 이러한 결과는, 소장의 운동도 뇌에 c-Fos를 발현한다는 보고³⁵)와 같이 생각할 때, 瀉下作用 그 자체가 생리적 자극으로 뇌에 영향을 미친 때문으로 생각된다.

뇌허혈 또는 변성단백질을 생산하는 모든 스트레스에 대한 반응으로 HSP72 발현이 증가된다³⁶). 국소뇌허혈 후 혈류량이 매

우 낮은 부위를 제외한 모든 허혈손상 세포에서 HSP70 mRNA가 발현되었다고 보고되어 있으며, 뇌경색 바깥영역의 신경세포와 뇌경색 가장자리의 신경교세포에서도 발현되는 것으로 알려져 있다^{36,37}). 또한 뇌경색 바깥영역에서 특징적으로 잘 발현되므로 뇌경색의 경계영역 (penumbra)를 규정하거나 뇌허혈 영역에서 단백질변성구역 (zone of protein denaturation)을 결정하는 지표로도 사용된다³⁸). 흰쥐에서 중대뇌동맥을 폐쇄하여 허혈성 뇌손상을 유발하고 芒硝를 투여한 후 48시간 후에 HSP72 발현의 변화를 관찰한 본 실험의 결과, Control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체에서 매우 뚜렷한 HSP72 양성반응의 신경세포들이 현저하게 증가하였으며, 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 芒硝를 투여한 Sample군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서는 Control군에 비하여 유의하게 감소하였고, 선조체에서는 HSP72 양성반응 신경세포들의 수가 감소는 하였으나 유의성은 없었다.

이러한 결과는 芒硝에 의한 瀉下作用이 신경세포의 자연사를 억제하는 효과와 더불어 뇌경색 경계영역과 단백질변성구역을 축소시키는 작용이 있는 것을 추측하게 한다.

본 실험의 결과들을 총괄하면, 芒硝에 의한 瀉下作用은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 신경세포의 허혈손상에 대하여 Bax 발현을 억제하고 Bcl-2 발현을 억제하지 않는 것으로 세포자연사를 억제하였으며, HSP72 발현을 억제하는 것으로 보아 뇌경색의 경계영역을 축소시키는 작용이 있는 것으로 판단된다.

결 론

芒硝에 의한 瀉下作用이 신경세포의 허혈손상에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 흰쥐의 중대뇌동맥을 폐쇄하는 방법으로 뇌허혈 손상을 유발하고 芒硝를 투여한 다음 48시간 후에, 뇌조직에서 Bax, Bcl-2, c-Fos 및 HSP72 발현의 변화를 면역조직화학적 방법으로 관찰한 바 아래와 같은 결과를 얻었다.

芒硝의 瀉下作用은 대뇌피질 뇌경색 경계영역에서 허혈손상에 의한 신경세포의 Bax 발현 증가를 유의하게 ($P < 0.05$) 억제하였다. 芒硝의 瀉下作用은 허혈손상에 의한 신경세포의 Bcl-2 발현 증가를 억제하지 않았다. 芒硝의 瀉下作用은 허혈손상에 의한 신경세포의 c-Fos 발현 증가에는 유의한 영향이 없었다. 芒硝의 瀉下作用은 대뇌피질 뇌경색 경계영역에서 허혈손상에 의한 신경세포의 HSP72 발현 증가를 유의하게 ($P < 0.05$) 억제하였다.

이상의 결과로 보아, 芒硝에 의한 瀉下作用은 허혈손상 신경세포의 자연사를 억제하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 김영석. 임상중풍학. 서울, 서원당, pp 311-312, 349-350, 432-436, 1997.
2. 손동혁, 장인수, 유경숙, 이진규, 윤희석, 이영구, 강현철. 급성기 뇌졸중 환자에 대한 임상적 고찰. 대한한방내과학회지 21(2):203-212, 2000.
3. 서운교, 정지천, 이원철. 노인 뇌졸중에 대한 임상적 고찰. 대

- 한한방내과학회지 14(2):50-68, 1993.
4. 임성우. 중풍환자의 변비증에 관한 임상적 고찰. 대한정보학회지 3(1):7-11, 1997.
 5. 강재춘. 변비에 관한 문헌적 고찰 (원인, 종류, 치법, 처방을 중심으로). 대한한방내과학회지 15(2):165-173, 1994.
 6. 이원철. 뇌졸중 급성기에 응용되는 하법에 대한 연구. 대한한의학회지 19(1):385-390, 1998.
 7. 황치원, 변 일. 內科急症의 應急處置 및 投藥方法에 關한 文獻的 考察 - 中風急症을 中心으로. 해화의학, 1(3):16-45, 1994.
 8. 구분수, 김영석, 이대식, 문상관, 고창남, 조기호, 배형섭, 이경섭. 중풍환자의 변비에 대한 대승기탕의 임상적 연구. 대한한의학회지 21(2):3-13, 2000.
 9. 강영록, 김연진, 황치원. 대승기탕 보유관장을 시행한 중풍 변폐 환자 45례에 대한 임상적 고찰. 대한한방내과학회지 21(2):329-336, 2000.
 10. 김상진, 김민수, 서부일, 구덕모, 서해경, 안희덕. 중풍으로 유발된 배뇨·배변 장애에 양격산화당을 위주로 한 치험 1례. 대한본초학회지 18(3):1-8, 2003.
 11. 정재욱, 서상호, 이은형, 김종득, 홍수현, 김원일. 중풍환자의 변비에 대한 소풍순기원의 효능에 관한 고찰. 대한한방내과학회지 26(4):776-784, 2005.
 12. Kirino, T. Delayed neuronal death. *Neuropathology*. 20: 595-97, 2000.
 13. Padosch, S.A., Böttiger, B.W. Neuronal apoptosis following cerebral ischaemia: pathophysiology and possible therapeutic implications. *Curr Opin Anaesthesiol*. 16(5):439-445, 2003.
 14. Putcha, G.V., Deshmukh, M. Johnson, E.M.Jr. BAX translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, Bcl-2, and caspases. *J Neurosci*. 19: 7476-7485, 1999.
 15. Neame, S.J., Rubin, L.L., Philpott, K.L. Blocking cytochrome c activity within intact neurons inhibits apoptosis. *J Cell Biol*. 142: 1583-1593, 1998.
 16. Chan, S.L., Mattson, M.P. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res*. 58: 167-190, 1999.
 17. Kruman, I., Bruce-Keller, A.J., Bredesen, D.E., Waeg, G., Mattson, M.P. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci*. 17: 5089-5100, 1997.
 18. Morley, P., Hogan, M.J., Hakim, A.M. Calcium-mediated mechanisms of ischemic injury and protection. *Brain Pathol*. 4(1):37-47, 1994.
 19. Yamaguchi, T., Miyata, K., Shibasaki, F., Isshiki, A., Uchino, H. Effect of cyclosporin a on immediate early gene in rat global ischemia and its neuroprotection. *J Pharmacol Sci*. 100(1):73-81, 2006.
 20. Nowak, T.S.Jr., Jacewicz, M. The heat shock/stress response in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol*. 4(1):67-76, 1994.
 21. 전국한의과대학 본초학교수 공저. 본초학. 서울, 영림사, pp 244-245, 1991.
 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. Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Develop*. 13: 1899-1911, 1999.
 24. Krajewski, S., Mai, J.K., Krajewska, M., Sikorska, M., Mossakowski, M.J., Reed, J.C. Upregulation of Bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci*. 15: 6364-6376, 1995.
 25. Hara, A., Iwai, T., Niwa, M., Uematsu, T., Yoshimi, N., Tanaka, T., Mori, H. Immunohistochemical detection of Bax and Bcl-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 711: 249-253, 1996.
 26. MacGibbon, G.A., Lawlor, P.A., Sirimanne, E.S., Walton, M.R., Connor, B., Young, D., Williams, C., Gluckman, P., Faull, R.L., Hughes, P., Dragunow, M. Bax expression in mammalian neurons undergoing apoptosis, and in Alzheimer's disease hippocampus. *Brain Res*. 750: 223-234, 1997.
 27. Cao, G., Minami, M., Pei, W., Yan, C., Chen, D., O'Horo, C., Graham, S.H., Chen, J. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: Implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab*. 21: 321-333, 2001.
 28. Gibson, M.E., Han, B.H., Choi, J., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., Parsadanian, M., Holtzman, D.M. BAX contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia: evidence for distinct apoptosis pathways. *Mol Med*. 7(9):644-655, 2001.
 29. Martinou, J.C., Dubois-Dauphin, M., Staple, J.K., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten, M., Albertini, P., Talbot, D., Catsicas, S., Pietra, C., et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*. 13(4):1017-1030, 1994.
 30. Akins, P.T., Liu, P.K., Hsu, C.Y. Immediate Early Gene Expression in Response to Cerebral Ischemia; Friend or Foe? *Stroke*. 27: 1682-1687, 1996.
 31. 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.
32. An, G., Lin, T-N., Liu, J-S., Xue, J-J., He, Y-Y., Hsu, C.Y. Expression of c-fos and c-j-f family genes after focal cerebral ischemia. *Ann Neurol.* 33: 457-464, 1993.
33. Kiessling, M., Stumm, G., Xie, Y., Herdegen, T., Aguzzi, A., Bravo, R., Gass, P. Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 13: 914-924, 1993.
34. Collaco-Moraes, Y., Aspey, B.S., de Belleruche, 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.
35. Castex, N., Fioramonti, J., Ducos de Lahitte, J., Luffau, G., More, J., Bueno, L. Brain Fos expression and intestinal motor alterations during nematode-induced inflammation in the rat. *Am J Physiol.* 274: G210-216, 1998.
36. 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: 327-333, 1993.
37. 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.
38. Hossmann, K.A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol.* 36: 557-565, 1994.