

조구등이 MCAO 모델 흰쥐에서 gliosis 억제에 미치는 영향

김상우, 김선애, 송봉근
원광대학교 한의과대학 내과학교실

The Effect of the Water Extract of *Uncariae Ramulus et Uncus* on Gliosis in the Middle Cerebral Artery Occlusion(MCAO) Rats

Sang-woo Kim, Sun-ae Kim, Bong-keun Song
Dept. of Oriental Medicine, Won-Kwang University, college of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : In condition of brain infarction, irreversible axon damage occurs in central nerve system(CNS), because gliosis becomes physical and mechanical barrier to axonal regeneration. Reactive gliosis induced by ischemic injury such as middle cerebral artery occlusion is involved with up-regulation of GFAP and CD81. The current study is to examine the effect of the *Uncariae Ramulus et Uncus* on CD81 and GFAP expression in the rat brain following middle cerebral artery occlusion.

Methods : In order to study ischemic injuries on brain, infarction was induced by middle cerebral artery occlusion(MCAO) using insertion of a single nylon thread, through the internal carotid artery, into a middle cerebral artery. Cresyl violet staining, cerebral infarction size measurement, immunohistochemistry and microscopic examination were used to detect the expression of CD81 and GFAP and the effect on the infarct size and pyramidal cell death in the brain of the rat with cerebral infarction induced by MCAO.

Results : The following results were obtained

1. Measuring the size of cerebral infarction induced by MCAO in the rat after injection of *Uncariae Ramulus et Uncus* showed the size was decreased.
2. Intravenous injection of *Uncariae Ramulus et Uncus* showed pyramidal cell death protection in the hippocampus in the MCAO rat.
3. Water extract injection of *Uncariae Ramulus et Uncus* decreased GFAP expression significantly in the MCAO rat.
4. *Uncariae Ramulus et Uncus* water extract decreased CD81 expression in the MCAO rat.
5. The administration of water extract of *Uncariae Ramulus et Uncus* induced up-regulation of c-Fos expression significantly compared with MCAO.
6. The administration of water extract of *Uncariae Ramulus et Uncus* increased ERK expression significantly compared with MCAO.

Conclusion : We observed that *Uncariae Ramulus et Uncus* could suppress the reactive gliosis, which disturbs the axonal regeneration in the brain of the rat with cerebral infarction after MCAO by controlling the expression of CD81 and GFAP. The effect may be modulated by the up-regulation of c-Fos and ERK.

These results suggest that *Uncariae Ramulus et Uncus* can be a candidate to regenerate CNS injury.

Key words : *Uncariae Ramulus et Uncus*, gliosis, CD81, GFAP, MCAO

- 교신저자: 송봉근 광주시 남구 주월동 543-8
원광대학교 한방병원 6내과
TEL: 062-670-6422 FAX: 062-670-6767
E-mail: songbk@wonkwang.ac.kr
- 이 논문은 2007년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 연구되었음

I. 緒論

보통 뇌졸중(Stroke)은 크게 뇌출혈과 뇌경색(허혈성)으로 나눌 수 있으며, 대부분은 허혈성으

로 미국의 경우는 전체 뇌졸중 환자의 85 %를 차지하고, 반대측 중대뇌동맥폐쇄로 인한 반신마비가 가장 흔한 증상이다¹.

중대뇌동맥의 폐쇄는 대부분 색전에 기인하고, 또한 많은 경우들에서 색전이 용해되고 재관류가 이루어지고 있는데 본 연구에서 사용한 흰쥐의 중대뇌동맥의 폐쇄 후에 재관류시키는 MCAO(Middle Cerebral Artery Occlusion)모델이 이와 유사하며, 허혈성 뇌졸중 연구에 적절한 것으로 알려져 있다². 이에 저자는 일시적인 국소 뇌허혈을 Longa³ 등의 방법에 따라 nylon실로 middle cerebral artery (MCA)의 기시부를 일시적으로 막아 MCAO 모델을 만들어 허혈성 뇌손상을 유발하였다.

뇌와 척수의 손상과 같은 중추신경계의 손상은 말초신경계와는 달리 일반적으로 재생이 되지 않는 것으로 알려져 있다. 그 원인으로 중추신경계의 손상 후에 공통적으로 나타나는 교세포 반흔 형성 (glial scarring)과 myelin내의 억제인자의 활동으로 여겨지고 있다⁴.

중추신경계에서 손상의 마지막 단계에서 나타나는 교세포화(gliosis)는 손상에 대한 치유 반응으로서 초기에는 신경세포의 항상성을 유지하고 보호막을 형성한다. 하지만 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 양성으로 나타나는 정상신경 돌기의 성장이 신경세포 축삭의 재생에 대한 물리적 또는 분자적인 장벽으로 작용하게 되며, 이러한 반응은 대부분 비가역적으로 일어나므로 이를 회복하기가 사실상 어렵다. 아울러 중추신경계 손상 후 GFAP의 발현과 같은 양상으로 CD81의 발현 증가가 동반되는 것으로 보고되고 있다⁵.

CD81은 뇌, 척수 및 망막 등 중추 신경계에 존재하는 단백질로 중추신경계 손상 이후 급격히 발현이 증가되며, glial cell의 성장과 glial scar의 형성에 관여하는 것으로 알려져 있으며⁶, GFAP는 정상세포의 체부 및 돌기물에 분포하는 중간성 filament의 하나로써⁷, gliosis 진행시 증가하는 것으로 밝혀졌다^{5,8}.

중추신경계의 재생을 촉진하기 위한 실험적 방법으로는 glial scar 형성을 억제하거나⁹, astrocyte의 gliosis반응을 억제하기 위한 protease를 사용하거나¹⁰, 방사선을 이용하여 glial cell을 제거하는 방법이 사용되었고¹¹, 또는 hydroxycholesterol유도체를 실험적으로 사용하기도 하였으며¹², 소염제나 cytokine을 사용하거나¹³, pyrogen을 이용하는 방법¹⁴ 등이 사용되었다.

최근의 연구에 따르면 실험적으로 척수손상을 가한 쥐에 항 CD81 항체를 투여한 결과 신경이 회복되었던 보고도 있었고¹⁵, astrocyte에서 GFAP를 제거한 결과 신경의 성장 및 재생이 촉진된 결과도 있었다¹⁶.

조구등(*Uncariae Ramulus et Uncus*)은 꼭두서니과 식물로서 고혈압이나 경풍 및 두통에 널리 사용되고 있으며¹⁷ 혈압강하 작용이나 항경련, 진정 작용이 있음이 보고되었다. 최근에는 조구등이 뇌신경세포와 척수신경세포의 허혈성 손상이나 산화적 손상에 대한 방어효과를 가지고 있음도 보고되고 있다¹⁸⁻¹⁹.

이에 저자는 조구등이 중추신경의 신경세포에 대한 산화적 손상이나 허혈성 손상에 보호 작용이 있음에 주목하고 중대뇌동맥폐쇄로 유발된 일시적 뇌허혈 모델에서의 조구등이 뇌신경의 보호 및 재생을 촉진할 수 있는 가능성을 관찰하기 위하여, 뇌허혈 부위의 크기와 해마의 세포사의 변화 그리고 GFAP 및 CD81, c-Fos, ERK의 발현의 변화를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 실험 동물

본 실험에 동물은 6주령의 200-300 g의 웅성 Sprague-Dawley 흰쥐(샘타코)를 구입하여 일주일 정도 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 cage 당 3-4 마리씩 넣어두었으며

물과 사료를 자유로이 섭취하도록 하였다. 아울러 모든 실험은 NIH 동물실험 윤리규정에 따라 진행하였다. 동물은 조작을 가하지 않고 물과 식이를 공급한 대조군, 일과성 뇌허혈 유발을 위한 수술을 실시하고 생리식염수를 공급한 허혈군, 그리고 뇌허혈 유발 후 조구등을 투여한 조구등 투여군으로 구분하였다.

2. 약물제조 및 약물의 투여 방법

1) 약물제조

본 실험에 사용한 조구등은 원광대학교 광주한방병원에서 구입한 후 정선하여 실험에 사용하였다. 검액의 조제를 위해 조구등 250 g을 증류수 1,000 ml에 넣고 3시간 동안 끓인 다음 고속원심분리기로 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 다시 감압 농축하였으며 농축된 검액을 동결건조기로 건조시켜 최종적으로 얻은 분말을 실험에 사용하였다.

2) 투여방법

약물의 투여는 조구등 추출물을 0.9 % 생리식염수에 녹여 여과한 다음 100 mg/kg의 용량을 미정맥으로 1일 2회 투여하였다. 약물의 투여는 수술 1시간 전에 투여하고 수술 후 1시간에 투여하였으며 수술 다음 날부터는 1일 2회 오전 9시와 오후 5시에 7일간 투여하였다. 허혈군에는 동량의 생리식염수를 투여하였다.

3. MCAO에 의한 국소적 뇌허혈 손상의 유발

일시적인 국소 뇌허혈은 Longa 등의 방법³에 따라 중대뇌동맥을 폐색시켜 만들었다. 실험동물은 70 % N₂O, 30 % O₂가 혼합된 5 % isoflurane을 이용하여 흡입마취를 유도한 후 2 % isoflurane으로 마취상태를 계속 유지시켰다.

중대뇌동맥을 폐색하기 위하여 경부 정중선을 따라 피부를 절개하고 흉골허근과 흉골저작근 사이의 총경동맥을 노출시킨 후 총경동맥을 절찰하여 폐색시키고 내경동맥과 외경동맥 분지 사이에

27G 주사침을 이용하여 작은 구멍을 낸 다음 내경동맥내로 치과 인상재(Durelon, Germany)가 발라진 4-0 nylon의 intraluminal filament(직경 0.28 mm, rounded tip)을 18.5-19.0 mm 정도 삽입하여 그 끝이 중대뇌동맥의 기시부를 지나 전대뇌동맥의 근위부까지 도달하도록 하였다. 다음 총경동맥과 외경동맥은 절찰한 후 수술 부위를 봉합하였으며 혈류차단 2시간이 지난 후 intraluminal filament를 제거하여 측부 순환을 통하여 재관류를 시켰다. 모든 수술조작기간 및 마취회복기간에는 동물의 직장온도를 37±0.5 °C로 유지하였다. 실험 동물은 상처를 봉합한 다음 백열 전등을 비춘 다음 heating pad에서 두어 회복하도록 하였다. 중대뇌동맥 폐색 후 실험동물이 마취에서 깨어나면 신경학적 검사를 하여 동맥폐쇄를 확인하였다.

4. 고정액의 관류

약물 투여 7일 후 흰쥐를 ketamine(50 mg/kg)과 xylazine(10 mg/kg)을 섞은 마취액을 복강으로 주사하여 마취를 유도한 다음 흉벽을 제거하고 왼쪽 심실에서 대동맥 방향으로 18개이지 주사바늘을 삽입하였다. 그 다음 오른쪽 심방귀를 가위로 절단한 뒤 50 ml/min의 속도로 연동펌프(peristaltic pump)를 이용하여 phosphate buffered saline(PBS)으로 관류시켜 혈액을 제거하였다. 그리고 4 % paraformaldehyde 용액 250-300 ml를 관류시켜 고정을 시행하였다. 적출한 뇌조직은 4 °C에서 24시간동안 4 % paraformaldehyde 용액에 고정을 시행한 후 30 % sucrose 용액에 4 °C에서 하루 이상 보관하였다. 다음 적출한 대뇌의 정수리점(bregma)에서 뒤로 3.0 mm에서 4.5 mm 떨어진 곳에 해당하는 부위를 동결절편기를 이용하여 두께가 40 μm가 되게 관상으로 박절한 후, 조직 절편을 보존액(cryoprotectant solution)이 들어 있는 24-well 배양기에 조직 절편을 매 절편마다 각 well에 순차적으로 반복하여 넣은 후 영하 20 °C에서 보존하였다.

5. Cresyl violet 염색

적출된 뇌조직의 관상절편을 만든 다음 0.05 M PBS으로 3회 세척하였다. 다음 절편을 xylene에 5분 100 % alcohol에 2분 그리고 95 % alcohol 1분 담고 다시 70 % alcohol에 1분 담근 다음 증류수에 2분 세척하여 탈지와 탈수 과정을 거쳤다. 그리고 0.5 % cresyl violet 용액으로 30분간 염색하였다. 염색이 끝난 조직은 광학현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

6. 뇌허혈 부위의 크기 측정

재관류 후 48시간 후에 실험동물을 희생시킨 후 즉시 단두하여 2 mm간격으로 관상절편을 얻어 2 % 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(Sigma Chemical Co.)용액에 20분간 담가 두어 염색하였고, 염색된 조직을 10 % 포르말린에서 고정한 후, 염색된 조직은 스캐너를 이용하여 전체 뇌반구 크기와 허혈 영역의 크기를 산출하였다. 이때 뇌허혈이 온 부위는 반대측의 정상 뇌반구의 넓이에서 허혈 손상 부위의 넓이를 뺀 크기로 하여 부중으로 인한 변화를 최소화하였다. 각 절편에서의 뇌허혈 손상의 넓이에 절편두께인 2 mm를 곱하여 전체 뇌허혈의 부피(mm³)를 산출하였다.

7. 면역조직화학

조직절편을 24-well 배양기에 5-10개씩 넣고, 0.05 M PBS 용액으로 10분씩 3회 교반기를 이용하여 세척하였다. 15-20분간 1.0 % H₂O₂로 반응시키고 같은 방법으로 세척한 후 0.2 % Triton X-100 용액에 20분 반응시키고 PBS 용액으로 세척하였다. 이어서 여기에 말 혈청과 정상 염소 혈청을 1:100으로 희석시킨 차단항체를 실온에서 0.5-1시간 반응시킨 후 PBS 용액으로 세척하고, 48시간 동안 4°C에서 일차항체(GFAP, CD81, c-Fos, ERK)를 가한 후 PBS 용액으로 세척하였다. 그리고 2시간 실온에서 이차항체(horse anti-mouse IgG, goat anti-rabbit IgG, 1:100)를 가한 후 PBS 용액으로

세척하였다. Avidin-biotin peroxidase complex와 실온에서 1시간 반응시키고 PBS 용액으로 세척한 후 0.05 % 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA)로 발색시켰다. 그 다음 조직 절편을 30분 전에 꺼내놓은 gelatin coated slide에 올린 후 실온에서 두 시간 말렸다. 이어서 슬라이드를 증류수에 10분 동안 담근 후 alcohol로 탈수 시키고 xylene으로 투명화한 후 캐나다 발삼으로 봉입시키고 광학현미경으로 관찰하였다.

8. 광학현미경적 검사

염색된 조직은 슬라이드에 부착하였으며 광학현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 해마의 피라미드세포수를 CA1의 내측과 외측 두 부위, CA2 한 부위를 400배 배율로 양측에서 각각 측정하여 평균치를 이용하였다.

9. 통계 분석

본 연구에 사용한 숫자는 mean±SEM으로 이루어졌다. 각 그룹 간의 차이는 t-검정 및 one-way ANOVA를 실시하였으며 통계학적으로 p값이 0.05 이하이면 의미가 있는 것으로 간주하였다.

III. 實驗結果

1. 조구등의 투여가 뇌허혈 부위의 감소에 미치는 영향

중대뇌동맥 폐쇄에 의한 일시적 뇌허혈 유발 흰쥐에서 조구등 투여가 뇌허혈 부위의 감소에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 조구등 투여 후 뇌조직을 적출하여 뇌허혈 부위의 크기를 관찰하였다. 그 결과 생리식염수만을 투여한 허혈군에서 뇌허혈 손상부위의 크기는 521±21.5 mm³이었으나 조구등 투여군에서는 416±19.4 mm³으로 허혈군 28 %에서 조구등 투여군 22 %로 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

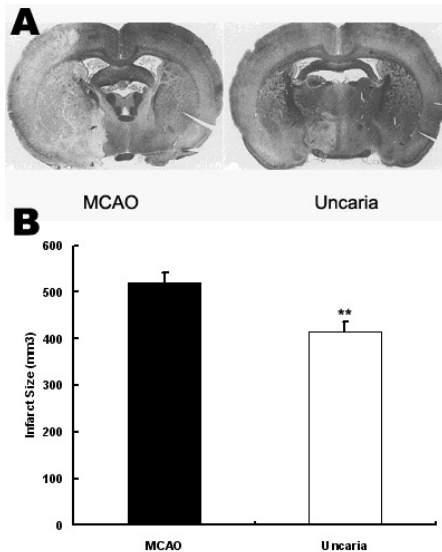


Fig. 1. Representative photomicrograph of TTC-stained coronal slices demonstrating infarcts (nonstained region) in the ipsilateral(left) cortex and striatum shows significant reduction in infarct size in Uncaria group compared with MCAO rats (A).

The size of infarction in the MCAO group was $521 \pm 21.5 \text{ mm}^3$ which was 28% and in the Uncaria group the size of infarction was $416 \pm 19.4 \text{ mm}^3$ which was 22%. The size of cerebral infarction was significantly decreased in the Uncaria group compared with MCAO group (B). Bar graphs depict infarct size in all the animals. Results are given mean \pm sem $^{**}p < 0.01$ vs MCAO.

2. 조구등의 투여가 해마의 뇌세포사 보호효과

일시적 뇌허혈 후 조구등의 투여가 해마의 뇌세포사 보호효과를 관찰하기 위하여 피라미드세포의 사멸을 관찰하였다. 일시적 뇌허혈 손상 후 7일에서는 CA1의 내측에서 피라미드세포핵의 신경세포가 허혈군에서 감소되었음을 볼 수 있었다. 양측 해마의 CA1에서 고배율($\times 400$)로 측정된 평균 피라미드세포 수는 대조군에서는 172 ± 6.1 이고, 허혈군에서는 127 ± 7.6 으로 유의하게 감소하였으며 조구등 투여군에서는 153 ± 9.4 로 허혈군에 비하여 증가하였다. 그리고 CA2에서 평균 피라미드 세포 수는 대

조군, 허혈군, 조구등군에서 각각 189 ± 8.1 , 120 ± 8.7 , 166 ± 7.1 으로 조구등군에서 허혈군에 비하여 증가하였다. 조구등 투여군이 허혈군에 비하여 CA1에서 16%, CA2에서 25%의 신경세포사가 감소됨을 관찰할 수 있었다.

3. 조구등의 투여가 GFAP 활성화에 미치는 영향

뇌허혈 손상 후 중추신경계에 발생하는 gliosis의 억제에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 적출된 뇌조직을 세척한 다음 염색을 실시하여 GFAP의 발현여부를 관찰하였다. GFAP 면역염색에 의하여 정상세포질이 갈색으로 염색이 되었으며 특히 대조군에 비하여 허혈군에서 GFAP는 발현의 증가가 뚜렷하였으나 조구등 투여군에서는 허혈군에 비하여 발현의 감소가 관찰되었다. 즉 대조군에서 발현 정도는 $43 \pm 2.3\%$, 허혈군 $67 \pm 5.3\%$, 조구등군 $51 \pm 4.2\%$ 로 조구등 투여군에서 유의하게 감소하였다 (Fig. 2).

4. 조구등의 투여가 CD81 활성화에 미치는 영향

뇌허혈 손상 후 나타나는 gliosis 과정에서 GFAP의 발현 증가와 더불어 동반되는 CD81의 발현 증가 억제 현상을 관찰하기 위하여 적출된 뇌조직을 세척한 다음 염색을 실시하여 CD81의 발현여부를 관찰하였다. 그 결과 대조군, 허혈군, 조구등 투여군은 각각 $55 \pm 2.3\%$, $69 \pm 4.5\%$, $61 \pm 4.3\%$ 으로 조구등 투여군은 허혈군에 비하여 CD81의 발현 감소를 나타냈다.

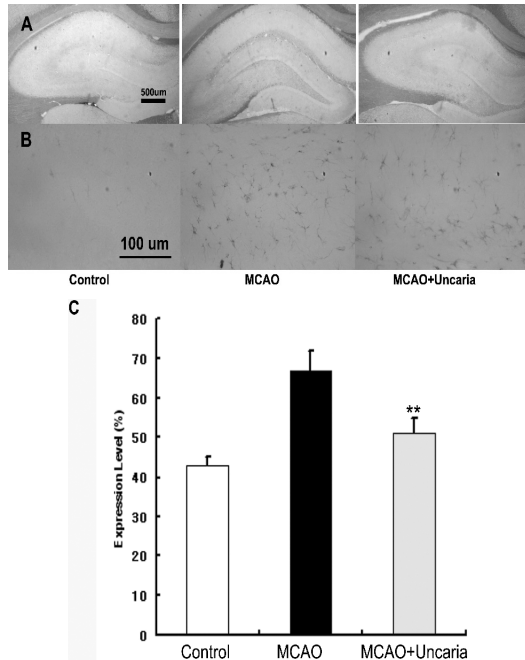


Fig. 2. Effects of *Uncariae ramulus et Uncus* water extract injection on GFAP expression following ischemic injury by MCAO in SD rats.

Coronal sections were rinsed and probed with GFAP antibody on the 7th day following MCAO. The sections were taken pictures using microscope. GFAP expression in hippocampus was increased after MCAO with darker staining and decreased with *Uncaria* injection. Photomicrographs were taken at X40 (A) and X400 (B). GFAP expression was 43±2.3%, 67±5.3%, 51±4.2% in the control, MCAO, *Uncaria* group respectively. GFAP expression was measured from coronal sections of the rat and converted into graphs (C). Data show mean and standard deviation between MCAO and control or *Uncaria* group with significant difference. * p<0.01 MCAO vs *Uncaria*. Scale bar = 500µm (A), 100µm (B)

5. 조구등의 투여가 c-Fos 활성화에 미치는 영향

조구등 투여가 허혈성 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 적출된 뇌조직에서 c-Fos의 발현을 관찰하였다. 그 결과 c-Fos는 대조군에서 208±3 U 이었고 허혈군에서는 197±7 U 이었으나 조구등 투

여군에서는 211±4 U로 허혈군에 비하여 유의한 증가가 보였다(Fig. 3).

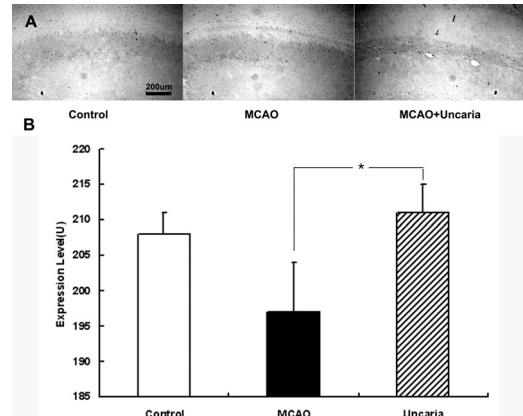


Fig. 3. The effect of *Uncaria* administration on c-Fos expression in the MCAO rats.

c-Fos expression in cortical layers was decreased after MCAO and increased with *Uncaria* administration representing darker staining (A). The expression was measured from coronal sections of the rat and converted into graphs (B). Intravenous administration of *Uncaria* water extract increased c-Fos expression significantly compared with MCAO. Data show mean and standard deviation between MCAO and *Uncaria* group with significant difference. * p<0.05. Scale bar = 200µm

6. 조구등의 투여가 ERK 활성화에 미치는 영향

허혈 손상 후 조구등 투여가 어떠한 경로를 통하여 작용을 발현하는가를 규명하기 위하여 적출된 뇌조직에서 ERK 발현을 관찰하였다. 그 결과 ERK의 발현은 대조군에서 200±2 U이었고 허혈군에서 206±4 U였으나 조구등 투여군에서는 218±3 U으로 발현이 허혈군에 비하여 유의하게 증가되었다(Fig. 4).

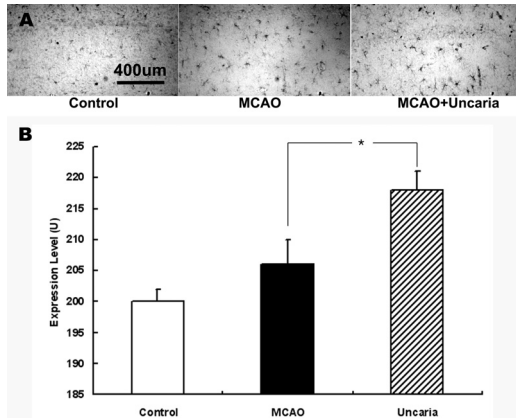


Fig. 4. The effect of Uncaria administration on ERK expression in the MCAO rats.

ERK expression was increased in Uncaria group with dark staining (A). The expression was measured from coronal sections of the rat and converted into graphs (B). Intravenous administration of Uncaria water extract increased ERK expression in cortical layers significantly compared with MCAO. * p<0.05. Scale bar=400 μ m

IV. 考 察

뇌혈관 질환은 선진국의 경우 심장질환, 암 다음으로 세 번째 사망원인을 차지하며 전체 이환율은 10만 명당 794명이며, 미국의 경우 매년 40만 명 이상의 뇌졸중 환자들이 발생한다. 그리고 이런 환자들은 직장을 잃게 되고 회복하기까지 장기간 입원이 필요하므로 사회적, 경제적 손실이 매우 크다.

국내의 경우 통계청의 2006년도 전국 사망원인 통계연보를 보면 암, 순환기계질환 다음으로 뇌혈관질환이 세 번째로 높은 사망원인을 차지하고 있고, 그 사망자수가 매년마다 무려 3만 명에 이를 정도이다.

보통 뇌졸중(Stroke)은 크게 뇌출혈과 뇌경색(허혈성)으로 나눌 수 있으며, 대부분은 허혈성으로 뇌세포에 혈액공급이 차단되는 뇌허혈이 일어나면 산소를 공급받지 못한 신경세포는 흥분성 신

경전달물질인 glutamate를 방출하여 세포내 Ca²⁺의 유입을 증가시키며, 많은 세포내 효소들이 활성화되어 세포괴사를 일으켜 뇌신경세포는 비가역성 손상을 입게 된다²⁰.

뇌허혈은 뇌조직에서 다양한 생리학적, 생화학적, 형태학적 변화를 일으키며 이때 해마와 대뇌피질의 피라미드신경세포, 선조체의 중간크기의 신경세포들에서 선택적으로 퇴화가 일어난다²¹. 이들 가운데 대표적인 것이 대뇌피질과 해마의 피라미드 신경세포들이며 그 중에서 허혈에 가장 손상받기 쉬운 해마 CA1 영역에서의 신경세포의 선택적 감소는 결과적으로 심한 기억의 장애를 초래하게 된다²².

뇌의 신경세포의 손상은 허혈이 일어나는 시간 뿐만 아니라 재관류가 이루어진 이후에도 발생하며, 환자들의 회복 지연 및 후유증 발생의 원인이 되고 있다. 그리고 신경 손상의 많은 부분이 몇 시간에서부터 며칠에 이르기까지 점진적으로 진행된다.

본 연구에서는 일시적인 국소 뇌허혈 모델은 Longa³ 등의 방법에 따라 nylon실로 middle cerebral artery (MCA)의 기시부를 막아 MCAO 모델을 만들었다. 이때 nylon실을 그대로 놔두면 permanent MCAO 모델이 되고, 특정시간 후 실험동물을 다시 마취하여 실을 빼내면 transient MCAO 모델이 되는데, 본 연구에서는 일시적 뇌허혈 모델에 대한 연구이므로 2시간 후 실을 빼내었다.

흰쥐의 중대뇌동맥을 일시적으로 차단한 후 재관류시키면, 주로 해마부분의 신경세포가 손상되고 5-7일이 경과되면 apoptosis와 비슷한 세포손상이 발생되어 인지 및 학습장애를 일으키게 된다²³. 이러한 MCAO 흰쥐모델은 허혈이 전반적이지 않고 전뇌에만 제한되어 후뇌에서의 혈류가 영향을 받지 않아 호흡과 체순환에 영향을 주지 않는다는 점에서 허혈로 인한 신경손상의 연구에 전반적인 허혈보다 널리 사용되고 있다. 즉 중대뇌동맥폐쇄에 의한 일시적인 전뇌허혈(transient forebrain ischemia)은 전뇌부위의 세포의 glutamate와 K⁺의 농도 및 세포내 Ca²⁺의 증가로 인한 독성을 일으키고 신경

세포들로 하여금 조직으로부터 탈분극하게 하나 다시 재관류시에는 정상으로 회복된다²⁰. 이때 뇌의 심피질, 해마내 CA1영역에서 선택적으로 신경세포의 손실을 가져오고, 그 중에서 허혈에 가장 손상받기 쉬운 해마내 CA1 pyramidal neuron은 재관류 후 3-4일이 지나면 죽기 시작한다²⁴.

말초신경계와 중추신경계는 손상에 대한 회복반응의 양상이 다르다. 중추신경계의 손상에서는 gliosis가 야기되는데, 이것은 glial cell 증식으로 결국 glial scar가 형성된다. glial scar 자체가 구조적 장벽을 형성하므로, glial scar의 생성으로 축삭 성장체의 성장이 억제 된다. glial cell은 다른 환경적 조건과 자극에 반응하여 성장 촉진 요인 또는 성장 억제 요인으로 작용하게 되고, 중추신경계 손상시 주위 세포의 물질들과 치밀하게 결합하여 gliosis를 생성하고 결과적으로 신경재생은 억제 된다²⁵.

뇌손상, 중추신경계감염, 치매 등 중추신경계 손상이 일어나면 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로 GFAP(glial fibrillary acidic protein)를 들 수 있다. GFAP는 8-9nm, 52kDa 정도의 크기로 type III intermediate filament(IF)로 중추신경계에서 성숙 astrocyte의 glial filament의 주성분이다. GFAP는 cytoskeletal protein에 속하는 단백질로 astrocyte의 성장에 구조적 안정화를 제공함으로써 astrocyte의 운동성과 형태를 조절하는데 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다. 고위 척추동물의 중추신경계에서 직접적인 외상, 질병, 유전자에 혹은 화학적 손상 후에 astrocyte는 astrogliosis라는 전형적인 방식으로 반응한다. Astrogliosis는 특징적으로 GFAP의 빠른 합성이 나타나고, 이것은 GFAP antibody를 통해서 증명할 수 있다²⁶.

CD81은 중추신경계 손상 후 급격히 발현이 증가하는 tetraspanin계에 속하는 포면단백질로서 중추신경계에서도 뇌, 척수, 망막 등에 존재하는 것으로 밝혀져 있다⁶. 성인 생쥐의 뇌에서 CD81은 astrocyte와 oligodendrocyte를 포함하는 glial cell에서 잘 발현된다. 중추신경계와 망막색소상피 손상

후 CD81은 발현이 증가되며, 시험관내 실험에서 이 단백질에 대한 항체처리하는 세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. CD81이 세포증식의 조절에 관여하는 증거로 CD81 knock out 생쥐가 control 군에 비해 뇌를 구성하는 glial cell이 현저히 증가되었고, 망막에서도 RPE세포가 증가한다는 것이 실험적으로 밝혀졌다²⁷. 이상의 내용으로 살펴볼 때, 중추신경계의 손상시 CD81, GFAP의 발현을 억제함으로써 신경재생을 가능케 할 수 있으리라 생각 된다.

조구등(*Uncariae Ramulus et Uncus*)은 西草科(*Rubiaceae*)에 속하는 常綠 木質藤本인 鈎藤(*Uncaria rhynchophylla*) 또는 大葉鈎藤(*U. macrophylla*), 華鈎藤(*U. sinensis*), 毛鈎藤(*U. hirsuta*), 無柄果鈎藤(*U. sessifructus*)의 가시를 포함한 줄기를 햇볕에 말리거나 찌서 건조한 藥材이다. 性味가 甘苦微寒 無毒하고 清熱, 平肝, 熄風, 鎮驚의 효능이 있어 中風癱瘓, 四肢痲痺, 口顏喎斜, 頭昏目眩, 驚癇, 筋脈拘攣, 客忤胎風, 小兒驚 등의 제 증상에 사용되어 왔다¹⁷. 『東醫寶監』²⁸에서는 조구등이 '主小兒十二驚癇, 及客忤, 胎風, 專治驚熱'이라 하였다.

조구등의 생리활성에 대한 연구로는 동물모델에서 alkaloid성분의 혈압강하 혹은 혈관확장 작용에 관한 것이 다수 보고되었고^{29,30}, 鎮痛, 鎮靜, 항경련 작용에 대한 실험적 연구 결과도 보고되었다^{31,32}.

한편 조구등이 신경세포나 중추신경의 손상에 대한 보호 작용도 최근 보고 되고 있다. glutamate에 의해 유도된 소뇌의 granule cell의 neuronal death에 대해 조구등이 세포내로의 Ca²⁺의 유입을 억제함으로써 세포보호효과를 나타냄을 보고하였다³³. 또한 은 혈관성치매환자 60명에 대한 대조군 연구에서 조구등이 주된 재료로 함유된 鈎藤散이 임상 증상을 개선시켰다고 보고하였다³³. 강 등¹⁸은 조구등이 H₂O₂로 유도된 척수감각신경절세포의 산화적 손상에 대해 보호 작용이 있음을 보고 하였고, 김 등¹⁹은 치매의 원인 인자로 부각되고 있는 CT105 단백질의 절편을 이용하여 신경세포의 손상

을 유도하고 조구등이 신경 보호 효과가 있음을 보고하였다. 석 등³⁴은 뇌동맥을 결찰하여 뇌의 허혈 손상을 유도한 후에 조구등이 해마의 신경세포에 대해 보호 작용이 있음을 보고하였다. 이²⁶는 조구등이 중추신경 손상시 CD81, GFAP 그리고 MAG의 발현을 감소시켜 gliosis를 억제하는 작용이 있음을 보고 하였다. 김 등³⁵은 ibotenic acid로 흰쥐에서 기억상실증을 유도한 후 조구등이 기억을 향상시키고 septohippocampal cholinergic cell의 손상을 보호하는 효과가 있음을 보고 하였다.

이상의 연구 결과를 살펴보면 조구등은 혈압강화 작용과 진경 항경련 진통 작용이 있음이 입증되었고, 최근 신경세포나 중추신경 조직에서 산화적 손상이나 허혈성 손상 등에 대해 보호효과와 기억력 개선에 효과가 있음이 밝혀지고 있다. 이에 저자는 조구등의 신경세포에 대한 보호 작용에 주목하고, 조구등 투여가 중대뇌동맥의 폐쇄로 인한 일시적 허혈과 재관류 후에 상황에서 gliosis에 미치는 영향을 조사하였다.

MCAO에 의한 일시적 뇌허혈 유발 흰쥐에서 조구등 투여가 뇌허혈 부위의 감소에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 뇌허혈 부위의 크기를 관찰하였다. 조구등 투여군의 뇌허혈 부위의 크기가 생리식염수만 투여한 허혈군에 비해 유의하게 감소되었다. 그리고 양측 해마의 CA1에서 고배율($\times 400$)로 측정된 평균 피라미드세포수가 조구등 투여군은 CA1에서 허혈군에 비하여 16 %, CA2에서 25 %의 신경세포수가 감소되었다. 뇌허혈 손상 후 중추신경계에 발생하는 gliosis의 억제에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 GFAP 발현여부를 관찰하였다. GFAP 면역염색에 의하여 별아교세포질이 갈색으로 염색이 되었으며 특히 대조군에 비하여 허혈군에서 GFAP는 발현의 증가가 뚜렷하였으나 조구등 투여군에서는 허혈군에 비하여 유의하게 발현이 감소되었다. Gliosis 과정에서 GFAP의 발현과 더불어 동반되는 CD81의 발현 증가를 관찰한 결과 대조군에 비하여 허혈군에서 CD81의 발현 증가

양상을 보였으나, 조구등 투여 후 허혈군에 비하여 대조군과 유사한 양상으로 CD81의 발현 감소 현상을 나타냈다.

아울러 c-Fos는 신경세포의 사망과 증식에 영향을 미치는 단백질로 성장인자 등의 다양한 자극에 의하여 발현이 증가된다³⁶. 또한 신경 활동의 증가에 의하여도 c-Fos는 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다. 특히 c-Fos는 뇌조직 손상 후 6-12시간에 최대로 발현이 증가하다가 72시간 까지 발현이 지속되는 것으로 나타났으며 허혈성 뇌손상에서도 같은 양상으로 c-Fos가 발현된다³⁷. 본 실험에서 c-Fos는 대조군에 비하여 허혈군에서는 발현이 감소되었고 다시 조구등 투여 후 발현이 증가하였다. 이는 약물 투여 후 다양한 기전에 의하여 신경 세포 활동이 증가하면서 c-Fos의 발현이 증가한 것으로 풀이 된다. 특히 허혈군에서 발현이 감소된 것은 MCAO에 의한 허혈성 뇌손상을 가한 후 7일 후에 뇌조직을 적출하였으므로 c-Fos가 최대로 발현 되는 시간을 지난 데서 나타난 현상으로 이해된다. 아울러 허혈성 뇌손상 후에 나타나는 산소자유기의 활성은 c-Fos의 발현을 억제한다는 보고³⁸에 비추어 보면 조구등 투여 후 산소자유기의 활성이 억제되었을 수도 있음을 간접적으로 제시한다 하겠다.

ERK(extracellular signal-regulated protein kinase)는 protein kinase의 세포내 신호전달계로 감수분열, 유사분열 및 유사 분열 후 기능에 영향을 미친다. 아울러 성장인자나 사이토카인 및 바이러스 감염 등 다양한 자극에 의하여 활성화 되는 것으로 알려져 있다. 특히 ERK는 gliosis와 관련되는 것으로 알려져 있으며 항산화제 투여시 활성화 되고 뇌세포 손상 후 회복기 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다³⁹.

본 실험에서 ERK 발현은 허혈군에 비하여 조구등 투여군에서는 유의하게 발현이 증가되었다. 따라서 조구등 투여는 ERK 발현 증가와 관련되어 gliosis와 관계하는 것으로 사료되나 앞으로 정확한

기전에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각 된다.

이상의 실험 결과를 종합해보면 조구등 투여가 뇌허혈로 발생하는 뇌손상 부위의 크기 감소, 해마의 세포사 억제, gliosis 억제 등에 효과가 있음을 관찰하였으며, 이는 c-Fos 및 ERK 경로와 관련되어 있을 것으로 사료된다. 따라서 향후 지속적인 연구가 필요하리라 생각되며, 이상의 결과는 조구등이 향후 허혈성 뇌혈관질환의 치료에 유용하게 활용할 수 있는 가능성을 시사한다고 생각된다.

V. 結 論

일시적 뇌허혈 후 회복에 미치는 영향을 규명하기 위하여 중대뇌동맥폐쇄를 유발시킨 흰쥐에 조구등을 투여하고 뇌경색 부위의 크기 감소, 피라미드 세포의 수 그리고 GFAP 및 CD81, c-Fos, ERK의 발현 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 조구등 투여는 MCAO 모델 흰쥐의 뇌허혈 부위의 크기를 감소시켰다.
2. 조구등 투여는 해마의 세포사를 억제하였다.
3. 조구등 투여는 GFAP 발현을 감소시켰다.
4. 조구등 투여는 CD81 발현을 감소시켰다.
5. 조구등의 투여는 c-Fos 발현을 증가시켰다.
6. 조구등의 투여는 ERK 발현을 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 조구등 투여는 뇌허혈 손상으로 발생하는 경색부위의 감소, 세포사 억제, gliosis 억제 등에 효과가 있음을 관찰하였으며, 향후 뇌혈관질환의 치료에 유용하게 활용할 수 있는 가능성을 시사한다 하겠다.

參考文獻

1. Mosby international Ltd. CRASH COURSE Neurology. 서울: 한우리; 2000, p. 179-88.
2. 박인식. 중간대뇌동맥폐쇄가 해마형성체의 피라미드 신경세포에 미치는 영향. 대한해부학회지. 2001;34(2):113-22.
3. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989;20:84-91.
4. Caroni P, Schwab ME. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurotrophic growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. Neuron. 1998;1:85-96.
5. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and CNS repair. Brain Res Bull. 1999;49(6):377-91.
6. Dijkstra S, Geisert EJ, Gipsen WH, Bar PR, Joosten EA. Up-regulation of CD81(target of the antiproliferative antibody; TAPA) by reactive microglia and astrocytes after spinal cord injury in the rat. J Comp Neurol. 2000;428:266-77.
7. Ludwin SK, Kosek JC, Eng LF. The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. J Comp Neurol. 1976;165(2):197-207.
8. Eng LF, Reier PJ, Houle JD. Astrocyte activation and fibrous gliosis: glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. Prog Brain Res. 1987;71:439-55.
9. Asher RA, Fidler PS, Morgenstern DA, Adcock KH, Oohira A, Rogers JH, Fawcett JW. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. J. Neurosci. 2000;20:2427-38.
10. Guth L, Albuquerque EX, Deshpande SS, Barrett

- CP, Donati EJ, Warnick JE. Ineffectiveness of enzyme therapy on regeneration in the transected spinal cord of the rat. *J Neurosurg.* 1980; 52(1):73-86.
11. Zhang SX, Geddes JW, Owens JL, Holmberg EG. X-irradiation reduces lesion scarring at the contusion site of adult rat spinal cord. *Histol Histopathol.* 2005;20(2):519-30.
 12. Gimenez Y, Ribotta M, Rajaofetra N, Morin-Richaud C, et al. Oxysterol(7beta-hydroxycholesteryl-3-oleate) promotes serotonergic reinnervation in the lesioned rat spinal cord by reducing glial reaction. *J Neurosci Res.* 1995;41(1):79-95.
 13. Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Loo K, Green J, Dietrich WD. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* 1999;16(10):851-63.
 14. Puchala E, Windle WF. The possibility of structural and functional restitution after spinal cord injury. A review *Exp Neurol.* 1977;55(1):1-42.
 15. Dijkstra S, Duis S, Pans IM, Lankhorst AJ, Hamers FP, Veldman H, Bar PR, Gispen WH, Joosten EA, Geisert EE Jr. Intraspinal administration of an antibody against CD81 enhances functional recovery and tissue sparing after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2006;202(1):57-66.
 16. Menet V, Gimenez Y, Ribotta M, Sandillon F, Privat A. GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia.* 2000;31(3):267-72.
 17. 이성우, 노승현. 조구등(釣鉤藤)에 관한 문헌적 연구. *본초학회지.* 1987;2(1):53-8.
 18. 강형원, 박진성, 류영수, 정진모, 이진목. 조구등이 산소자유기에 의하여 손상된 배양척수감각 신경절세포에 미치는 영향에 관한 연구. *동의신경정신과학회지.* 2000;11(1):1-18.
 19. Kim ST, Kim JD, Lyu YS, Lee MY, Kang HW. Neuroprotective effect of some plant extracts in cultured CT105-induced PC12 cells. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(10):2021-4.
 20. 헤리슨내과학 편찬위원회. 헤리슨내과학. 서울: 정담; 1997, p. 2384.
 21. Brierley JB. Cerebral hypoxia. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1976, p. 43-85.
 22. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral G : Human amnesia and the me-dial temporal region: enduring memory impairment following abilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci.* 1986;6:2950-267.
 23. Buchan AM, Pulsinelli WA: Hypothemia but not the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci.* 1990;11:1049-50.
 24. 정봉교, 윤병수, 박순권 : 흰쥐의 내측 중격핵 손상이 Morris 수중미로 과제의 학습에 미치는 효과, *한국심리학회지.* 1993;5:29-44.
 25. Berry M, Maxwell WL, Logan A, Mathewson A, McConnell P, Ashhurst DE, Thomas GH. Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta Neurochir Suppl.* 1983;32:31-5.
 26. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein : GFAP-thirty-one-years(1969-2000). *Neurochemical Research.* 2000;25:1439-51.
 27. Dijkstra S, Geisert EE, Jr., Dijkstra CD, Bar PR, Joosten EA. CD81 and microglial activation in vitro proliferation, phagocytosis and nitric oxide production. *J Neuroimmunol.* 2001;114:151-9.

28. 허준. 동의보감. 서울: 법인문화사; 1999. p. 1989-90.
29. Goto H, Shimada Y, Tanigawa K, Sekiya N, Shintani T, Terasawa K. Effect of *Uncaria ramulus* et *Uncus* on endothelium in spontaneously hypertensive rats. *Am J Chin Med.* 1999; 27(3-4):339-45.
30. Goto H, Sakakibara I, Shimada Y, Kasahara Y, Terasawa K. Vasodilator effect of extract prepared from *Uncaria ramulus* on isolated rat aorta. *Am J Chin Med.* 2000;28(2):197-203.
31. 김정현, 송춘호. 조구등수침이 진통 및 진경효과에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 1995;12(1):310-19.
32. Hsieh CL, Chen MF, Li TC, Li SC, Tang NY, Hsieh CT, Pon CZ, Lin JG. Anticonvulsant effect of *Uncaria rhynchophylla*(Miq) Jack. in rats with kainic acid-induced epileptic seizure. *Am J Chin Med.* 1999;27(2):257-64.
33. Shimada Y, Goto H, Kogure T, Shibahara N, Sakakibara I, Sasaki H, Terasawa K. Protective effect of phenolic compounds isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death. *Am J Chin Med.* 2001;29(1):173-80.
34. Suk K, Kim SY, Leem K, Kim YO, Park SY, Hur J, Baek J, Lee KJ, Zheng HZ, Kim H. Neuroprotection by methanol extract of *Uncaria rhynchophylla* against global cerebral ischemia in rats. *Life Sci.* 2002;70(21):2467-80.
35. Kim JH, Chung JY, Lee YJ, Park S, Kim JH, Hahm DH, Lee HJ, Shim I. Effects of methanol extract of *Uncariae Ramulus et Uncus* on ibotenic acid-induced amnesia in the rat. *J Pharmacol Sci.* 2004;96(3):314-23.
36. Herrera DG, Robertson HA. Activation of *c-fos* in the brain. *Prog. Neurobiol.* 1997;50(2-3):83-107.
37. Onodera H, Kogure K, Ono Y, Igarishi K, Kiyota Y, Nagaoka A. Proto-oncogene *c-fos* is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. *Neurosci. Lett.* 1989; 98:101-4.
38. Kamii H, Kinouchi H, Sharp FR, Epstein CJ, Sagar SM, Chan PH. Expression of *c-fos* mRNA after a mild focal cerebral ischemia in SOD-1 transgenic mice. *Brain Res.* 1994;662:24-244.
39. Masuhara K, Ohmichi M, Kurachi H, Tasaka K, Kanzaki T, Kimura A, Hayakawa J, Hisamoto K, Koike K, Murata Y. Involvement of extracellular signal-regulated protein kinase in gliosis induced during recovery from metabolic inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:892-6.