

원저

## 가미보양환오탕이 뇌허혈모델에서 신경세포보호를 통해 뇌경색억제에 미치는 효과

한창호\* · 박용기\*\*

\*동국대학교 일산한방병원 한방내과

\*\*동국대학교 한의과대학 본초학교실

### Abstract

#### The Effect of Modified *Boyanghwano-tang* on the Brain Infarction Through the Anti-apoptosis of Neuronal Cells in Ischemic Rats

Han Chang-ho\* and Park Yong-ki\*\*

\*Department of Oriental Internal Medicine, Dongguk University Ilsan Oriental Hospital

\*\*Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

**Objectives** : The purpose of the study is to determine the neuroprotective effect of modified *Boyanghwano-tang*(mBHT), a traditional Korean medicine, on the transient focal cerebral ischemia in rats.

**Methods** : Focal ischemia and reperfusion were induced by middle cerebral artery occlusion(MCAO) for 90 min, followed by 144 h reperfusion in rats. mBHT(200mg/kg body weight, p.o.) was administrated in rats once a day during reperfusion. At the end of treatment, brain infarction was measured by TTC staining, and histological change was observed by H&E staining. The expressions of Bax, Bcl-2 and cytochrome c in ischemic brains were determined by immunofluorescent analysis.

**Results** : mBHT significantly reduced the cerebral infarct volumes of the MCAO rats. mBHT also attenuated the neuronal cell death and the expressions of pro-apoptotic molecules, bax and cytochrome c in ischemic brains. Further, mBHT significantly increased the survival time of ischemic rats and the expression of anti-apoptotic molecule, Bcl-2 in ischemic brains.

**Conclusions** : Our results suggest that mBHT is neuroprotective and may prove to be useful adjunct in the treatment of ischemic stroke.

**Key words** : Herbal medicine, *Boyanghwano-tang*, ischemic stroke, neuroprotection

\* 본 연구는 보건복지가족부의 한의약연구개발사업 한약제제개발 연구비(B080027)의 지원에 의해 수행되었음

· 접수 : 2010. 6. 1. · 수정 : 2010. 7. 6. · 채택 : 2010. 7. 7.

· 교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 본초학교실

Tel. 054-770-2661 E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

## I. 서론

최근 우리나라는 고령화사회에 접어들어 노령인구가 증가됨에 따라 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병 등 각종 뇌질환에 의한 사망이 전체 사망원인에서 우위를 차지하면서, 사회·경제적 비용도 급격히 증가하여 뇌질환 치료제 개발에 대한 필요성이 절실히 요구되고 있다<sup>1,2)</sup>. 뇌졸중(stroke)은 뇌의 동맥이 막히거나 파열됨으로써 뇌 조직의 죽음을 초래하는 뇌혈관 질환으로 뇌손상뿐 아니라 알츠하이머병이나 간질 등의 다양한 신경학적 장애를 수반하는 중요 뇌질환 중 하나이다<sup>1-3)</sup>. 뇌졸중 치료제로는 주로 혈류를 개선시키기 위한 약물인 조직플라스미노겐활성제(t-PA), 아스피린, 페르산친정(dipyridamole), 티클로피딘(ticlopidine), NMDA (N-methyl-D-aspartic acid), 와파린(warfarin) 등이 있지만<sup>4-6)</sup>, 현재까지 조직플라스미노겐활성제만 FDA의 승인을 받은 유일한 치료제로 알려져 있을 뿐 효과적인 치료제는 개발되어 있지 않다<sup>7)</sup>. 뇌졸중에 의해 허혈상태가 되면 초기에는 뇌 신경세포에 흥분성 아미노산(glutamate)의 급격한 증가와 glutamate 수용체 중 주로 NMDA 수용체의 과도한 흥분에 의한 신경흥분독성 연속단계의 활성화 및 세포 내 미토콘드리아 전자전달계가 무너지면서 산화적 손상과 세포사멸의 연속적인 활성화가 신경세포 손상을 유발하게 된다<sup>8,9)</sup>. 따라서 허혈상태에 의한 뇌손상으로부터 신경세포를 보호하는 것은 뇌졸중 치료제 개발의 중요한 전략이 된다.

보양환오탕(補陽還五湯, *Boyanghwano-tang*; BHT)은 《醫林改錯》에 처음 수록된 한방처방으로 補氣하는 黃芪와 活血祛瘀作用이 있는 當歸尾·赤芍藥·川芎·桃仁·紅花와 通經活血하는 地龍으로 구성되어 있으며 補氣·活血化瘀·通絡하는 효능으로 氣虛로 인한 瘀血證을 치료하는 처방으로 활용되어 왔다<sup>10-13)</sup>. 한방임상에서는 보양환오탕의 方意를 이용하여 氣虛血瘀로 인한 中風 半身不遂의 치료에 활용해 오고 있으며<sup>14)</sup>, 근래에는 허혈성 뇌혈관 질환뿐 아니라 다양한 혈관 질환에도 사용하고 있는데<sup>15)</sup>, 보양환오탕에 대한 효능 연구로 뇌 혈전과 혈중지질의 개선효과<sup>16)</sup>, 국소 뇌 혈류량의 증가효과<sup>17,18)</sup>, 혈압강하<sup>19)</sup> 및 혈전 생성 억제효과<sup>20)</sup>, 고혈압 및 고지혈증 억제효과<sup>21)</sup>, 기억의 감퇴 및 치매 개선효과<sup>22)</sup>, 가역성 전뇌허혈로 인한 뇌세포 손상 감소효과<sup>23)</sup>, 항허혈 및 항염증<sup>24)</sup> 및 세포사멸억제효과<sup>25,26)</sup> 등이 있다. 그러나 보양환오탕

의 허혈성 뇌졸중 후 유발되는 세포사멸의 억제를 통한 신경보호효과 및 그 작용기전에 대한 연구는 미비한 실정이다. 또한 임상에서 뇌졸중 후에 치매증상이 동반하는 경우가 많이 나타나므로 본 연구에서는 補陽還五湯에 瘀血을 순환시키는 丹蔘·牛膝·桂枝와 뇌신경을 보호하는 것으로 알려진 遠志, 石菖蒲를 추가하여 加味補陽還五湯(modified BHT, mBHT)을 구성하였고 허혈성 뇌졸중(transient middle cerebral artery occlusion ischemic stroke) 동물모델에서 mBHT의 뇌경색 억제 및 뇌신경세포 보호기전에 대한 연구를 수행하였다.

## II. 방법

### 1. 시료 및 기기

본 실험에 사용된 가미보양환오탕의 처방은 Table 1과 같은 12가지 한약재로 구성되어 있으며, 구성 한약재는 모두 규격에 적합한 원료성적서가 첨부된 한약재를 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입하여 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 검정하고 정선한 것을 사용하였다.

실험에 사용되어진 시약은 methanol(Merck Co, Germany), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-tetrazolium bromide ; MTT, Sigma, St Louis, CA, USA), acrylamide solution(BioRad Laboratories Inc, CA, USA), anti-Bax(SantaCruz Co, Ltd, SantaCruz, CA,

Table 1. mBHT의 구성 한약재

韓藥名	生藥名	용량(g)
黃芪	Astragali Radix	192.0
當歸尾	Angelicae Gigantis Radix	38.0
芍藥	Paeoniae Radix	28.8
川芎	Cnidii Rhizoma	19.2
蚯蚓	Lumbricus	19.2
桃仁	Percicae Semen	19.2
紅花	Carthami Flos	19.2
土牛膝	Achyranthis Radix	28.8
丹蔘	Salviae Miltiorrhizae Radix	77.0
桂枝	Cinnamomi Ramulus	19.2
遠志	Polygalae Radix	19.2
石菖蒲	Acori Graminei Rhizoma	19.2

USA), anti-Bcl2(SantaCruz), anti-Cytochrome c (Santa-Cruz), X-ray film(Kodak Co, Ltd, Burnaby, British Columbia), ECL solution(Pierce Co, IL, USA), protein assay solution(BioRad Laboratories, Inc, CA, USA) 등이며, 실험에 사용된 기기로는 microplater reader(Asys, Sunnyvale, CA, USA), deepfreezer advantage(Queue, USA), thermal cycler(Bio-Rad Laboratories Inc), orbital shaker(Finemould Precision IN, Co, Gyenggi-do, Korea), BioDoc It™ Imaging System(UVP, Cambridge, UK), UV-VIS Spectrophotometer(Shimadzu, Japan), fluorescence microscopy(Olympus Imaging America Inc, Center Valley, PA 18034-0610, USA), luminescence spectrometer(Perkin-Elmer LS50, USA), heating pad(FHC Inc, ME, USA) 등이다.

## 2. mBHT 추출물 제조

mBHT의 구성약제를 정량하여 총 499g을 세말한 다음, 추출기에 투입하고 물 2L를 사용하여 98℃에서 3시간 동안 추출하였으며 이를 700mmHg, 55℃에서 15시간 감압 건조하여 건조엑스를 수득하였다(yield of 34.8%). mBHT 건조엑스는 밀폐용기에 넣어 -20℃ 냉동보관하면서 실험직전 1x PBS에 녹여 동물실험을 위한 약물시료로 사용하였다.

## 3. 일시적 국소 뇌허혈 동물모델 제작

SD 흰쥐를 80% N<sub>2</sub>O와 20% O<sub>2</sub>에 혼합한 1.5% isoflurane으로 흡입하여 마취시키고, 보온패드와 보온랩트를 사용하여 체온을 약 37±0.5℃로 유지하면서 중대뇌동맥을 폐색하였다. 즉 마취하에서 목의 정중선을 따라 경부를 절개하고 미주신경에 손상을 주지 않도록 주의하면서 좌측 총경동맥(Common carotid artery; CCA), 내경동맥(Internal carotid artery; ICA), 외경동맥(External carotid artery; ECA)을 분리한 다음, 총경동맥과 외경동맥을 결찰하고 내외경동맥의 분지점으로부터 내경동맥 내로 probe를 삽입하고 그 바로 위쪽을 결찰하였다. Probe는 4-0 nylon surgical thread의 한쪽 끝을 가열하여 구형으로 만든 다음 20~25mm 길이로 잘라서 사용하였다. 90분간 결찰(occlusion)한 후 probe를 제거하여 144시간 동안 재관류(reperfusion)시켰다. 동물이 마취에서 회복된 다음,

Bederson 등<sup>30)</sup>의 방법에 따라 꼬리를 중심으로 들었을 때, 몸의 불균형, 앞발의 좌우모양, 왼쪽 선회 등으로 신경증상을 확인하였다.

## 4. 검액의 투여

실험동물을 대조군(vehicle)과 실험군(sample group)으로 나누고, 실험군은 다시 서로 다른 농도(200mg/kg)의 mBHT를 경구투여한 군과 양성 대조약물로 항산화제인 Edaravone(1mg/kg)을 복강 투여한 군으로 나누었다. 대조군은 약물 대신 1×PBS를 투여하였으며, 실험군은 1×PBS에 mBHT를 녹여 폐색 24시간 후부터 매 24시간마다 총 5회 경구투여하였다.

## 5. 허혈성 뇌손상 부위의 뇌경색 면적 측정

중대뇌동맥 폐색 144시간 경과 후 흰쥐를 1.5% isoflurane으로 흡입마취시킨 다음 뇌를 적출하고 뇌주형틀을 이용하여 frontal pole에서 2mm 두께로 잘라 7개의 뇌 관측 절편을 만들었으며 0.9% 생리식염수에 녹인 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 염색약으로 실온에서 10분간 염색하였다. TTC 용액으로 붉게 염색된 뇌 절편을 4% paraformaldehyde 용액으로 고정시킨 후 각 절편의 뒤편 영상을 카메라로 촬영하고 경색면적을 경색을 일으킨 반구의 전체면적에서 염색이 되지 않은 경색면적을 백분율로 나타내어 각 7개의 절편들의 평균을 계산하였다.

## 6. 조직 염색

중대뇌동맥 폐색 24시간 후 1.5% isoflurane으로 흡입마취시킨 다음 뇌를 적출하여 4% paraformaldehyde 용액으로 4℃에서 2~3일간 고정하였다. 고정이 완료된 뇌 조직은 paraffin 용액을 이용하여 블록을 만든 후 microtome을 이용하여 선조체 부위의 위아래 축을 중심으로 7μm 두께로 coronal section을 수행하였다. Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 위하여 뇌 조직절편 슬라이드표본을 xylene으로 파라핀을 제거한 다음 순차적인 알코올에 수화시키고 hematoxylin으로 5분간 염색한 후 eosin으로 2분간 염색하였다.

## 7. 생존율 측정

중대뇌동맥 폐색 24시간 후 mBHT를 200mg/kg/body weight 용량으로 하루에 한 번 총 5회 경구투여 하면서 실험동물의 생존율을 조사하였다.

## 8. 면역조직형광염색

면역조직형광염색(immunofluorescence)을 위해 뇌 조직절편 슬라이드표본을 xylene으로 파라핀을 제거하고 순차적인 알코올에 수화시킨 후, 뇌경색에 의한 세포사멸을 확인하기 위해 Bax, Bcl<sub>2</sub>, Cytochrome C에 대한 단일클론항체와 실온에서 2시간 반응시켰다. 이를 1×PBS로 3회 세척한 후 Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG 또는 FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG와 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 1×PBS 용액으로 10분씩 3회 세척한 다음 DAPI가 포함된 mounting 시약으로 봉입하고 cover glass를 씌운 후 형광현미경으로 관찰하였다. 각 항체에 염색된 세포를 계수하고 target antibody positive cells/

DAPI positive cells(%)로 표시하였다.

## 9. 통계학적 검정

결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean)±표준오차(standard error; SE)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 GraphPad Prism program의 Student *t*-test를 수행하여 *p*값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

# III. 결 과

## 1. 뇌경색에 대한 효과

뇌졸중 발병 후 나타나는 뇌경색(infarction)에 대한 mBHT의 감소효과를 조사하기 위하여 90분 중대 뇌동맥 폐쇄 후 144시간 재관류한 뇌조직에서 뇌경색의 부피를 측정하였다.

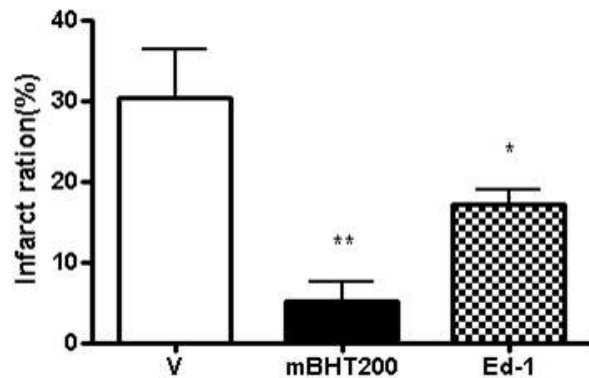


Fig. 1. The effect of mBHT on the infarction in rats administrated with mBHT(200mg/kg) or Edaravone 1mg/kg after disease onset

Brain sections from rats subjected to 90 min occlusion and 144 h reperfusion.

A : The sections were stained with 2% TTC.

B : The infarct volumes in saline-treated vehicle group and mBHT treated group (n=5, respectively) are expressed as the percentage of hemisphere volumes and are presented as the means±SD.

\*\* : *p*<0.01 compared to the vehicle-treated group.

Ed-1, Edaravone-treated group.

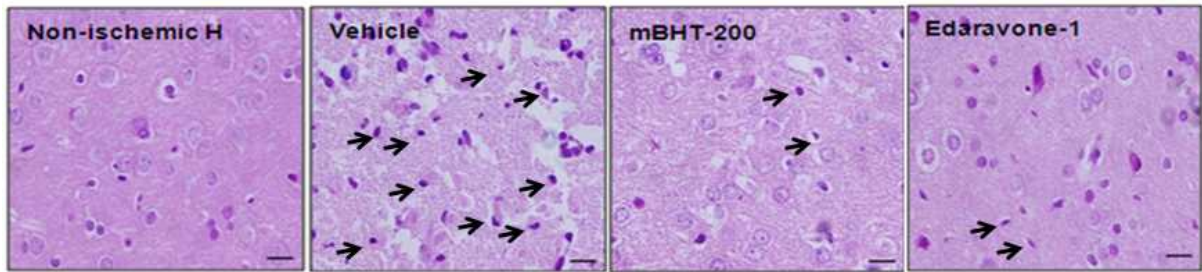


Fig. 2. Histological profiles of ischemic brain in Non-ischemic H, Vehicle, administrated mBHT(200mg/kg) and Edaravone(1mg/kg)

Brain sections from rats subjected to 90min occlusion and 144h reperfusion.

Non-ischemic H, it show the normal structure with neuronal cells.

Vehicle, it show the abnormal structure with necrosis and apoptotic neuronal cells.

mBHT-200 show the normal-like brain structure(x400 ; bar=20μm).

허혈 유발 24시간 후 생리식염수를 투여한 흰쥐 (Vehicle)의 뇌절편에서는 허혈에 의한 손상으로 뇌경색과 혈관손상이 유발됨으로써 상당부분 TTC 용액에 염색되지 않은 반면(30.3±13.7%), mBHT를 투여한 경우에는 200mg/kg 농도에서 5.8±5.2%로 유의적으로 뇌경색의 부피가 감소하였다( $p < 0.01$ ). 그리고 항산화제인 edalavone의 뇌경색 감소효과(17.1±4.15%)보다 우수한 것으로 나타났다(Fig. 1).

## 2. 신경세포 손상에 대한 효과

허혈에 의해 손상된 뇌 조직에서 mBHT의 신경세포 보호효과를 조사하기 위해서 중대뇌동맥 폐쇄에 의해 허혈을 유발시킨 흰쥐로부터 뇌를 적출하여 H&E 염색을 수행하였다.

정상적인 대뇌피질(non-ischemic hemisphere ; Non-Ishchemic H)의 경우에는 정상적인 형태의 뇌신경세포와 주위조직이 관찰되는 반면, 경색이 일어난 부위의 대뇌피질군(Vehicle)에서는 세포사멸로 인해 많은 뇌신경세포가 형태를 유지하지 못하고 변형되었으며 주위 조직 역시 치밀하지 못한 모습을 관찰 할 수 있었다. 하지만 mBHT 투여군(mBHT-200)과 edaravone 투여군(Edaravone-1)에서는 뇌신경세포와 주위 조직이 비교적 정상적인 형태를 나타내며 손상된 뇌신경세포의 수가 감소하는 것을 관찰하였다(Fig. 2).

## 3. 생존율에 대한 효과

뇌경색에 의한 실험동물의 생존율에 대한 mBHT의 효과를 조사하기 위하여 허혈을 유발시킨 후 5일 동안 mBHT를 경구투여하면서 생존율을 측정하였다.

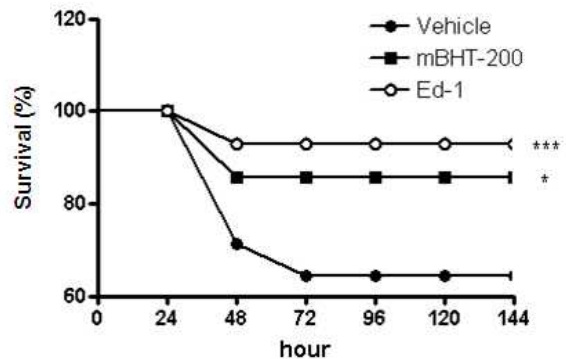


Fig. 3. The effect of mBHT on the survival time in rats administrated with mBHT(200mg/kg) or Edaravone 1mg/kg for 144h after disease onset

\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.001$  compared with vehicle.

허혈 유발 24시간 후 생리식염수를 투여한 군(Vehicle)은 허혈에 의한 뇌경색과 혈관손상으로 생존율이 저하되어 144시간 후 생존율이 64.29%로 나타난 반면, mBHT를 투여한 경우에는 85.71%로 생존율이 증가하였다. 또한 edaravone 투여군(Edaravone-1)에서도 생존율이 92.86%로 증가되었다(Fig. 3).

## 4. 신경세포사멸에 대한 효과

허혈에 의해 손상된 뇌 조직에서 신경세포사멸(apoptosis)에 대한 mBHT의 억제효과를 조사하기 위하여 세포사멸 조절인자인 Bax, Bcl-2, cytochrome c에 대한 면역형광염색(immunofluorescence)을 수행하였다.

먼저 세포사멸인자인 Bax의 경우 생리식염수를 투여한 군(Vehicle)에서는 정상적인 대뇌피질(Non-Ishchemic H)에 비해 증가되었으며, mBHT와 edaravone을 투여한 군에서는 감소되었다(Fig. 4A). 또한 Bax를 발현

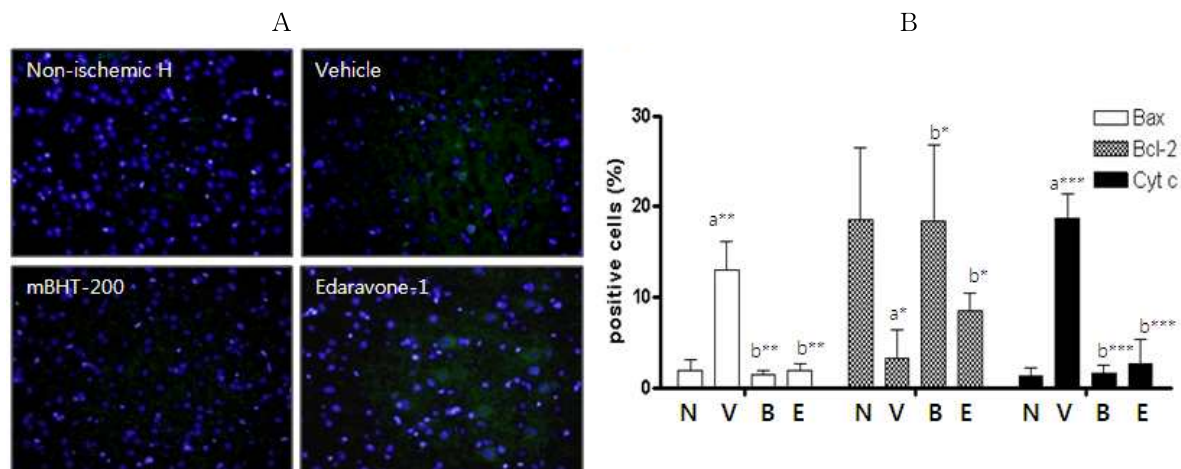


Fig. 4. Immunofluorescent analysis of Bax after tMCAO-144h

A : Non-ischemic H, Bax immuno-fluorescence was barely detectable. Vehicle, markedly increased Bax immuno-fluorescence(see inset, double-labeled of Bax, green, and DAPI, blue) was detected throughout the cortex. mBHT-200 shows the effect of mBHT treatment on ischemia-induced Bax induction in the cortex. Markedly decreased Bax immunofluorescence was detected throughout the cortex in dose dependent manner. magnification  $\times 200$ .

B : Percentage of Bax, Bcl-2 and Cytochrome c-positive cells/total cells. N, non-ischemic H; V, vehicle; B, mBHT-200 and E, edaravone-1. a compared with non-ischemic H, b compared with vehicle.

\* :  $p < 0.05$ . \*\* :  $p < 0.01$ . \*\*\* :  $p < 0.001$ .

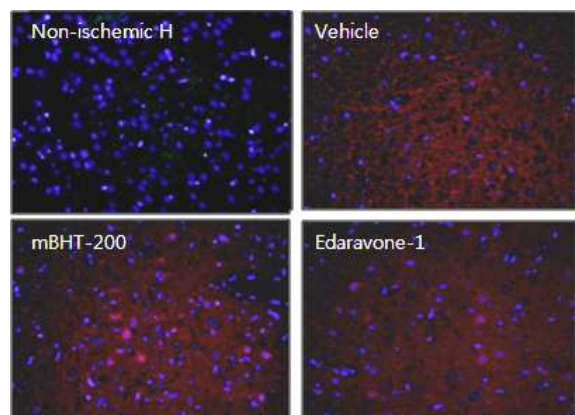


Fig. 5. Immunofluorescent analysis of Bcl-2 after tMCAO-144h

Non-ischemic H : Bcl-2 immunofluorescence was not detected in cortex. Vehicle : markedly increased Bcl-2 immunofluorescence(double-label of Bcl-2, red, and DAPI, blue) was detected throughout the cortex. mBHT-200 shows the effect of mBHT treatment on ischemia-induced Bcl-2 induction in the cortex. Markedly increased Bcl-2 immunofluorescence was detected throughout the penumbra in dose dependent manner. magnification  $\times 200$ .

하는 세포의 수(Bax-positive cells)를 측정 한 결과, 정상적인 대뇌피질에서는  $1.92 \pm 1.10\%$ 였으며, 경색이 일어난 부위의 대뇌피질에서는  $13.02 \pm 3.16\%$ 로 증가하였다. 반면 mBHT를 투여한 군에서는  $1.44 \pm 0.40\%$ 로 Bax를 발현하는 세포의 수가 유의적으로 감소하였다 (Fig. 4B). 한편, edaravone-1 처리군에서도 Bax를 발

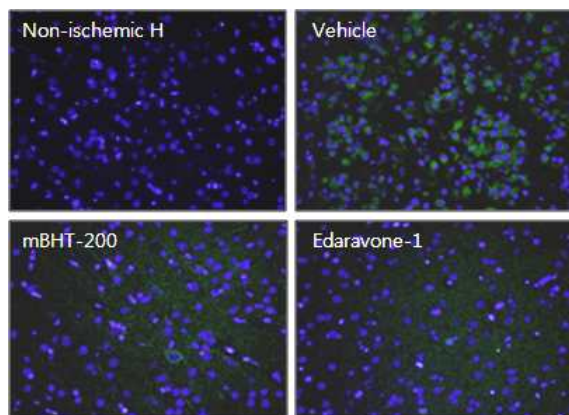


Fig. 6. Immunofluorescent analysis of Cytochrome c after tMCAO-144h

Non-ischemic H : Cytochrome c immunofluorescence was barely detectable. Vehicle : markedly increased Cytochrome c immunofluorescence(double-label of Bax, green, and DAPI, blue) was detected throughout the penumbra. mBHT-200 : shows the effect of mBHT treatment on ischemia-induced Cytochrome c induction in the cortex penumbra. Markedly decreased Cytochrome c immunofluorescence was detected throughout the penumbra in dose dependent manner. magnification  $\times 200$ .

현하는 세포의 수가  $1.88 \pm 0.71\%$ 로 감소하였다.

항세포사멸인자(anti-apoptotic molecule)인 Bcl-2의 발현은 생리식염수를 투여한 군(Vehicle)에서는 정상적인 대뇌피질(Non-Ishchemic H)에 비해 감소하였으나, mBHT와 edaravone 처리군에서는 증가하였

다(Fig. 5). 즉 Bcl-2를 발현하는 세포의 수(bal-2-positive cells)를 측정된 결과, 정상적인 대뇌피질에서는  $18.52 \pm 7.99\%$ 였으며, 경색이 일어난 부위의 대뇌피질에서는  $3.19 \pm 3.20\%$ 로 감소하였다. 반면 mBHT와 edaravone을 투여한 군에서는 각각  $18.44 \pm 8.30\%$ 와  $8.54 \pm 1.86\%$ 로 증가하였으며, mBHT 투여군이 edaravone 투여군에 비해 Bcl-2의 발현이 증가된 것으로 나타났다(Fig. 4B).

세포사멸인자인 cytochrome c는 생리식염수를 투여한 군(Vehicle)에서는 정상적인 대뇌피질(Non-Ishchemic H)에 비해 증가하였으나, mBHT와 edaravone 투여군에서는 감소되었다(Fig. 6). 즉 cytochrome-C를 발현하는 세포의 수(cytochrome c-positive cells)를 측정된 결과, 정상적인 대뇌피질에서는  $1.20 \pm 1.03\%$ 였으며, 경색이 일어난 부위의 대뇌피질에서는  $18.60 \pm 2.91\%$ 로 증가하였으나, mBHT와 edaravone 투여군에서는 각각  $1.65 \pm 0.76\%$ 와  $2.64 \pm 2.61\%$ 로 감소되었다(Fig. 4B). 따라서 mBHT의 투여는 허혈에 의한 손상된 뇌 조직에서 세포사멸인자인 Bax와 cytochrome c의 발현을 감소시키고, 항세포사멸인자인 Bcl-2의 발현은 증가시킴으로써 신경세포를 보호하는 것으로 나타났다.

#### IV. 고 찰

뇌졸중은 뇌의 혈액순환장애에 의하여 일어나는 급격한 의식장애와 운동마비를 수반하는 증후군으로 최근 인구의 노령화와 더불어 뇌졸중의 사회적·경제적 중요성도 커지고 있다. 통계에 의하면, 35세 이상의 인구 중 뇌졸중을 앓고 있는 사람이 382,000명으로 추산되고 있으며, 2004년 사망통계를 근거로 할 때, 우리나라의 원인별 사망률 중에서 뇌졸중은 암에 이어 두 번째이고, 인구 100,000명당 70.3명인 것으로 보고되고 있는데 이는 전체 사망 원인의 13.9%에 해당하는 것이다<sup>1,2)</sup>.

한의학에서 뇌졸중은 中風 혹은 腦中風이라고 칭하며, 서양의학에서 뇌졸중으로 분류하지 않는 질환도 포함하고 있어 뇌졸중과 뇌중풍은 구분하여 사용하기도 한다<sup>27)</sup>.

중풍은 暴仆, 卒暴僵仆, 人事不省, 暈倒, 昏不知人, 精神蒙昧 등의 意識障礙와 偏枯, 四肢不舉, 手足癱瘓, 半身不遂, 口眼歪斜 등의 運動障礙, 舌強不語, 暴瘖, 言語蹇澀 등의 言語障礙 등의 증상이 나타나는 病證으

로 정의되는데<sup>28)</sup>, 《金匱要略·中風歷節病脈證病治<sup>29)</sup>》에서 “夫風之爲病 但半身不遂 惑但臂不遂者 此爲痺脈微而數者 中風使然”이라 하며 오늘날의 中風에 해당하는 개념이 文獻上에 처음 기록된 이래 歷代 醫家들이 中風의 原因, 分類, 治法 등에 대해 다양하게論하였다. 한의학에는 중풍의 後遺障礙 치료와 개선을 위한 많은 治療方法과 處方들이 있으며 그 중 淸時代의 王淸任이 소개한 補陽還五湯은 대표적인 偏麻痺 치료처방 중 하나이다<sup>30)</sup>.

보양환오당은 淸代 王淸任의 《醫林改錯》에 처음 수록된 처방으로 補氣하는 黃芪와 活血祛瘀作用이 있는 當歸尾·赤芍藥·川芎·桃仁·紅花와 通經活血하는 地龍으로 구성되어 있으며, 補氣·活血化瘀·通絡하는 效能으로 氣虛로 인한 瘀血證을 치료하는 處方으로 活用 되어 있다<sup>10-13)</sup>. 보양환오당에 대한 실험적 연구로는 腦血栓과 血中脂質에 대한 改善作用<sup>19)</sup>, 局所 腦血流量의 增加效果<sup>17,18)</sup>, 血壓降下 作用<sup>19)</sup>, 血栓生成 抑制效果<sup>20)</sup>, 高血壓 및 高脂血症에 대한 抑制 效果<sup>21)</sup>, 學習과 記憶의 減退 및 치매억제에 대한 增加 效果<sup>22)</sup>, 可逆性 前腦虛血로 인한 腦細胞 損傷을 減少效果<sup>23)</sup>, 抗瘀血 作用, 免役調節 作用, 抗炎症 作用<sup>24)</sup>, 神經膠細胞의 apoptosis 抑制 效果<sup>25,26)</sup> 등의 보고가 있다. 그러나 현재까지 虛血性 腦卒中에 대한 效果 및 藥理的 기전에 대한 연구는 미비하다.

따라서 본 연구에서는 補陽還五湯을 보다 효과적인 뇌졸중 한약제제로 개발하기 위해서 기본 처방에 瘀血을 순환시키는 丹蔘·牛膝·桂枝와 뇌신경을 보호하는 것으로 알려진 遠志, 石菖蒲를 첨가하여 加味 補陽還五湯(mBHT)을 구성하고 허혈성 뇌졸중 동물 모델(MCAO ischemic rat model)에서 mBHT의 뇌경색 억제 및 뇌신경세포 보호기전에 대한 연구를 수행하였다.

일시적인 국소 뇌허혈 흰쥐모델은 흰쥐의 중뇌 동맥폐쇄모델(middle cerebral artery occlusion; MCAO)으로써<sup>31)</sup> 나일론 봉합사를 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부를 폐쇄하는 방법으로 허혈 유발 후 중심부에서 신경세포들이 산발적으로 죽어 나가고, 1시간 유발 시 중심부에 괴사가 일어나는 것이 특징인 것으로 알려져 있다. 또한 폐쇄 후 3시간이 지나면 경색이 시작되고, 24시간이 되면 뇌경색이 마무리되며 3일이 되면 최대에 이르게 된다. 뇌경색 중심부(core)에서는 대부분 괴사성 세포사멸이 있다. 또한 뇌경색의 주변부(penumbra)는 지연성 세포사멸(apoptosis)이 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>32)</sup>. 본 연구에 사용한 MCAO

모델은 지연성 세포사멸이 특징인 전뇌허혈과는 달리 허혈 중심부의 피사가 주변부로 퍼지는 지연성 세포 사멸이 모두 공존하는 모델로 임상적인 중풍환자의 병태와 유사하고, 행동양상이 비슷한 특징이 있어 사람의 중풍 실험모델로 널리 사용되고 있다<sup>33)</sup>. 신경세포사멸 신경허혈 직후부터 급격하게 발생하는데, 이를 막는 방법은 발병 3시간 이내에 재관류를 하는 것으로 알려져 있지만 임상적으로는 거의 불가능하여 손상된 신경세포의 치료 목표는 주변부의 지연성 세포사멸을 막는 것으로 신경세포 보호제 개발이 주요 타겟이다<sup>34)</sup>. 이것은 신경세포사멸에 대한 방어효과가 신경허혈 치료에 매우 중요하다는 것을 의미한다.

본 연구에서는 mBHT의 신경보호효과를 검증하기 위해 신경허혈로 인한 뇌경색의 부피변화를 조사하였으며 중대뇌동맥 폐쇄 후 나타나는 뇌경색이 mBHT 투여에 의해 유의적으로 줄어드는 것을 확인하였다. 또한 mBHT는 뇌허혈로 인한 사망률을 대조군에 비해 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났는데, 이것은 mBHT가 뇌경색을 억제함으로써 생존기간을 연장시킬 수 있음을 의미한다. 이전 연구에 따르면 보양환오당은 신경세포사멸을 억제할 수 있으며<sup>35)</sup>, MCAO에 의해 뇌졸중이 유발된 동물의 뇌손상 부위에서 염증반응을 유발하는 뇌신경교세포(microglia)의 활성을 억제함으로써 대뇌피질 주변부의 지연성 신경세포사멸을 막을 수 있다고 보고되었다<sup>36)</sup>. 본 연구결과는 mBHT가 허혈성 뇌졸중 환자의 뇌경색을 효과적으로 억제시킴으로써 이를 통해 뇌졸중 환자의 생존기간을 연장할 수 있음을 의미한다.

신경세포사멸은 다양한 뇌질환의 병태생리에 직접 연관되며, 정상적인 발생과정 중에도 이미 생성되었던 많은 여분의 세포들이 자연적으로 사멸하는 과정을 거치게 되므로 신경세포사멸은 발생 프로그램 진행의 중요한 과정이기도 하다. 또한 이러한 과정을 우연적인 사멸과 구분하기 위해서 programmed cell death(PCD)라고도 한다<sup>37)</sup>. 신경세포사멸은 형태적으로는 apoptosis의 특징을 지니면서 생화학적으로는 caspase 계열 효소의 활성을 필요로 하는 특징을 보이며, 특히 caspase 효소의 활성은 mitochondria pathway와 cytosolic pathway에 의하여 매개될 수 있으나, 전형적인 PCD의 과정은 mitochondria pathway에 의하여 매개되며 Bcl-2 family가 세포사멸을 관장하는 중요한 인자인 것으로 알려져 있다<sup>38)</sup>. 또한 신경세포사멸은 mitochondria로부터 caspase 효소의 작용기전을 활성화시키는 cytochrome c의 유리, caspase

계열의 cysteine 단백질해 효소의 활성화, 혈장 막 인지질의 변형, 핵 DNA의 응축과 절편화가 일어나는 복잡한 과정이 포함된다.

항세포사멸인자인 Bcl-2는 세포손상 자극에 의한 유리의 과생산 반응에 반대작용을 하거나, 세포 내 항산화 방어기전을 강화시킴으로써 세포사멸을 억제하는 반면, 세포사멸인자인 Bax는 세포사멸을 오히려 자극하여 cytochrome c 유리에 관여하며 caspase 효소의 작용기전을 활성화시키게 된다<sup>39)</sup>. 따라서 뇌경색이 발생하면 세포 내 칼슘농도의 변화, pH의 저하, Fas 수용체의 활성화, ROS 생성 등을 통해 Bcl-2의 발현은 억제되는 반면, Bax의 발현이 증가되어 cytochrome c를 mitochondria로부터 유리시키고 caspase 효소들을 활성화하여 세포사멸을 유도하게 된다<sup>40)</sup>. 본 연구에서 mBHT는 허혈과 재관류로 인해 손상된 뇌조직에서 세포사멸 유도분자인 Bax와 cytochrome c의 발현은 억제하면서, 항세포사멸유도분자인 Bcl-2의 발현은 증가시킴으로써 세포사멸로부터 신경세포를 보호할 수 있는 것으로 나타났다. 이는 mBHT가 뇌졸중 환자에서 허혈성 손상에 의한 뇌경색의 발생을 줄이고, 세포사멸로부터 신경세포를 보호함으로써 효과적인 뇌졸중 치료제가 될 수 있음을 의미한다.

## V. 결 론

본 연구에서는 허혈성 뇌졸중 흰쥐모델(MCAO)을 이용하여 가미보양환오당의 뇌경색 억제 및 뇌신경보호 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 가미보양환오당은 뇌허혈로 인해 증가하는 뇌경색의 부피를 유의적으로 감소시켰다.
2. 가미보양환오당은 허혈성 뇌졸중 흰쥐의 생존율을 유의적으로 증가시켰다.
3. 가미보양환오당은 뇌허혈로 인해 손상된 뇌조직에서 신경세포의 손상은 감소시키고, Bax와 cytochrome c의 발현을 억제하였으며, Bcl-2의 발현은 증가시켰다.

따라서 가미보양환오당은 허혈성 뇌졸중에서 뇌경색 발생을 억제하고 생존율을 증가시키며 신경세포손상을 막음으로써 뇌졸중을 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다.



## VI. 참고문헌

1. 박선영, 구영덕, 김원기. 뇌질환 치료제 II, 뇌졸중 치료제 개발동향 및 전략. 미래유망 사업아이템 이슈분석(BA407). 한국과학기술정보연구원. 2005 : 1-63.
2. 김은선, 박동운, 이종은. 뇌질환 치료제 I, 산업시장분석. 한국과학기술정보연구원. 2006 : 25-55.
3. Butler TL, Kassed CA, Pennypacker KR. Signal transduction and neurosurvival in experimental models of brain injury. *Brain Res Bull.* 2003 ; 59(5) : 340-9.
4. Cucchiara B, Ross M. Transient ischemic attack : risk stratification and treatment. *Ann Emerg Med.* 2008 ; 52(2) : S27-39.
5. Adibhatla RM, Hatcher JF. Tissue plasminogen activator(tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008 ; 7(3) : 243-53.
6. Catarzi D, Colotta V, Varano F. Competitive Gly/NMDA receptor antagonists. *Curr Top Med Chem.* 2006 ; 6(8) : 809-21.
7. Shinohara Y. Clinical guidelines for stroke. *Nippon Naika Gakkai Zasshi.* 2004 ; 93(11) : 2449-55.
8. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 1992 ; 23 : 1261-76.
9. Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem and Molecular Bio.* 2002 ; 35(1) : 67-86.
10. 남경중의학원. 중의방제대사전. 북경 : 인민위생출판사. 1995 ; 5 : 891.
11. 신민교. 임상본초학. 서울 : 영림사. 1986 : 169-71, 221-3, 249-50, 300-1, 464-8, 662-3.
12. 신길구. 신씨본초학. 서울 : 수문사. 1988 : 9-12, 80-4, 448-50, 521-2, 554-6, 562-4, 600-3.
13. 김창민. 중약대사전. 서울 : 정담. 1998 : 592-9, 1159-1168, 1353-8, 4839-45, 5258-65, 6357-62, 6460-71.
14. 강극명. 간명방제사전. 상해 : 상해과학기술출판사. 1990 : 571.
15. 전영수. 보양환오탕과 가미보양환오탕이 endotoxin으로 유발된 백서의 혈전증에 미치는 영향. 동의병리학회지. 1993 ; 8 : 157-76.
16. 김남용. 보양환오탕이 혈압 및 국소뇌혈류량에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1985.
17. 정하나. 한약재 경구투여에 의해 Th1/Th2 type 면역반응의 선택적인 조절에 관한 研究. 전북대학교 대학원. 2004.
18. 문병형. 보양환오탕진탕액이 가토의 혈압강하에 미치는 영향. 원광대학교. 1985.
19. 탁의주. 보양환오탕이 실험적 혈전에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 1990.
20. 김성훈. 복원활혈탕 및 보양환오탕이 endotoxin으로 유발된 혈전생성억제에 미치는 영향. 동의대학교 대학원. 1994.
21. 정우상. 고혈압 및 고지혈증에 대한 보양환오탕의 실험적 연구. 경희대학교 대학원, 1998.
22. 설인숙. 가미보양환오탕이 고지혈증, 혈전, 고점도혈증, 고혈압, 및 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1998.
23. 최은정. Mongolian gerbil의 reversible forebrain ischemia 모델에 미치는 보양환오탕의 효과. 동국대학교 대학원. 1999.
24. 김영현. 항어혈 치료제인 보양환오탕의 면역조절 작용. 전주대학교 대학원. 2002.
25. 정용준. 보양환오탕이 LPS와 PMA에 의해 손상된 신경교세포에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1999.
26. HS Han, JA Lee, YK Park. Protective effects of modified Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang on H2O2-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuronal cells. *Kor J Herbology.* 2006 : 21(4) : 85-92.
27. 김영석. 임상중풍학. 서울 : 書苑堂. 1997 ; 303-8.
28. 전국한의과대학 심계내과학교실. 동의심계내과학(상하). 서울 : 서원당. 1995 : (상)107-8, 203, (하) 72-3.
29. 장중경. 금궤요략. 서울 : 한성사. 1975 ; 31, 133-5.
30. 류완소. 상한삼육서. 서울 : 성보사. 1976 ; 281-2.
31. 왕청임. 의림개작. 대북 : 대련국풍출판사. 1975 ; 40-4.
32. Cechetto DF. Experimental cerebral ischemic lesions and autonomic and cardiac effects in cats and rats. *Stroke.* 1993 ; 24(12) : I6-9.
33. Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke :

- past, present and future. *Neuropharmacology*. 2008 ; 55(3) : 363-89.
34. Kriz J. Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Crit Rev Neurobiol*. 2006 ; 18(1-2) : 145-57.
35. 박용기, 한형수. 가미보양환오탕의 SH-SY5Y 뇌 신경세포에서 산화적 손상에 의한 세포사멸에 대한 보호효과. *대한본초학회지*. 2006 ; 21(4) : 85-92.
36. 임진승. 가미보양환오탕의 뇌졸중 동물에서의 뇌 신경보호효과. *동국대학교 대학원*. 2008.
37. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 1991 ; 14 : 453-501.
38. 선웅. Bcl-2 family의 신경세포 사멸 조절과 신경계 발달. *생화학분자생물학뉴스*. 2005 ; 3 : 419-26.
39. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neuro Rx*. 2004 ; 1(1) : 17-25.
40. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008 ; 55(3) : 310-8.