

광화학적 허혈성 뇌졸중 모델에서 瀉心湯의 뇌세포 손상 보호효과

강백규¹, 윤종민¹, 문병순^{1,2}

¹원광대학교 한의과대학 내과학교실, ²원광대학교 한의학전문대학원

The Protective Effects of *Sasim-tang* on the Brain Cell Damage in Photothrombotic Ischemia Mouse Model

Baek-gyu Kang¹, Jong-min Yun¹, Byung-soon Moon^{1,2}

¹Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Won-Kwang University,

²Professional Graduate School of Korean Medicine, Won-Kwang University

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate the effects of *Sasim-tang* (SST) on proinflammatory cytokine production in a photothrombotic ischemia mouse model.

Methods : Photothrombotic ischemia was induced in stereotactically held male Balb/c mice using rose bengal (10 mg/kg) and cold light. The target of photothrombotic ischemic lesion was 1 mm anterior to bregma and 3 mm lateral to midline with 2 mm in diameter, which are decreased by oral administration of SST.

Results : SST protected ischemic death of brain cells through inhibition of pro-inflammatory cytokines production and catalytic activation of caspase-3 protease in photothrombotic ischemia mouse model.

Conclusions : The results of this study suggest that SST can have protective effects on brain cell damage in a photothrombotic ischemia mouse model.

Key words : *Sasim-tang* (*Xiexin-tang*), photothrombotic ischemia, proinflammatory cytokine production

1. 서 론

뇌혈류량의 감소는 뇌 안에서 유발된 허혈의 위치, 기간, 정도에 따라 일련의 복잡한 병리, 생리학적 과정을 발생시킨다¹. 허혈로 인해 에너지가 고갈되면 신경세포의 탈분극이 일어나고, 세포 내로 물의 유입이 증가되며, 자유라디칼이 생성됨으로써 뇌조직에 구조적인 이상을 초래하여 뇌부종이 발

생한다². 뇌세포가 뇌허혈로 인해 손상되면 글루타메이트 수용체가 활성화되고, 글루타메이트 수용체 중 ionotropic 수용체가 흥분됨으로써 신경세포에 독성을 나타내 아포토시스가 발생되며³ 다양한 생화학적 경로를 통해 형성된 자유라디칼이 혈소판 활성화인자, TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 다양한 염증매개체의 형성을 유도한다⁴.

허혈성 뇌졸중은 부위별로 세 가지 영역으로 나눌 수 있는데, 중심영역이란 뇌혈류 감소가 심하여 뇌경색으로 진행되는 부위를 말하며, 측부순환영역은 뇌혈류가 감소되기는 하였으나 측부순환 등에 의해 일부 공급받기 때문에 허혈 정도가 가벼워

· 교신저자: 문병순 전북 익산시 신용동 344-2번지
원광대학교 익산한방병원 2내과
TEL: 063-859-2802 FAX: 063-841-0033
E-mail: mbs@wku.ac.kr

궁극적으로 뇌세포가 정상으로 회복되는 곳이다. 경계영역은 허혈성 반영부(ischemic penumbra)로서 기능은 정지되어 있지만 효과적인 치료에 의해 정상 상태로 회복될 수 있는 뇌세포들이 존재하는 영역을 말하는 곳으로, 허혈성 뇌졸중 치료의 목표가 되는 부분이다⁵. 중추신경계의 허혈성 손상에 있어서 염증반응은 중요한 역할을 한다. 이러한 염증반응은 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)에 의해 매개된다⁶.

瀉心湯은 張⁷의 《金匱要略·驚悸吐血篇》에 “心氣不足, 吐血衄血, 瀉心湯主之”라 하여 처음 수록되었으며, 大黃(*Rhei Rhizoma*), 黃蓮(*Coptidis Rhizoma*), 黃芩(*Scutellariae Radix*)으로 구성된 처방으로 고혈압과 鼻出血, 便秘, 갱년기장애 및 혈관질환 등에 활용되고 있다^{8,9}.

저자는 瀉心湯이 뇌허혈시 뇌세포 손상에 어떤 영향을 미치는지, 아울러 염증과 관련된 작용기전을 규명함으로써 뇌세포 손상 보호효과를 알아보고자 마우스에서 Rose Bengal 염료를 이용한 광화학적 대뇌피질경색 모델을 만들고, 이들의 경시적인 병변 크기 및 병리조직학적 변화와 이때 염증성 사이토카인의 발현변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험방법

1. 재 료

1) 약 재

실험에 사용된 약재는 원광대학교 익산한방병원 약재과에서 감정을 받아 사용하였고, 瀉心湯의 처방내용은 《金匱要略》⁷에 의거하였으며, 한 첩의 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table1. Prescription of *Sasim-tang*.

Herbal name	Scientific name	Dosage (g)
<i>Rhei Rhizoma</i> (大黃)	<i>Rheum palmatum L.</i>	75
<i>Scutellariae Radix</i> (黃芩)	<i>Scutellaria baicalensis GEORGI</i>	37.5
<i>Coptidis Rhizoma</i> (黃蓮)	<i>Coptis japonica MAKINO</i>	37.5
Total amount		150

2) 실험동물

실험에 사용한 동물은 생후 8주령 20-25 g의 수컷 마우스(Balb/c 샘타코, 대전) 40마리로 투명한 사육장에서 그룹 당 10마리씩 특수병원 보호시설(specific pathogen free barrier) 내에서 사육하였다. 모든 동물 실험은 원광대학교 실험동물 관리위원회 규정에 의거하여 시행하였다. 사육실 평균 온도는 22±1 °C, 습도는 55%로 유지하였으며, 12시간 간격으로 명암을 조절하여 07:00부터 19:00까지 조명을 제공하였고, 물(membrane filtered purified water) 섭취는 제한하지 않았다.

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Rose Bengal, DAPI, dimethyl sulfoxide(DMSO), formaldehyde는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA) 제품을, TUNEL assay kit는 Roche사(Indiana polis ,IN, USA)에서 구입하였다. TNF-α, IL-1β, IL-6, IL13R-α, IL4R-α, caspase-3 protease, transglutaminase-2, SOD-1, SOD-2, HO-1 및 β-actin 등의 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료의 제조

실험에 사용된 藥材는 물을 용매로 사용한 추출 방법을 이용하여 이 실험에 사용하였다. 물 추출물은 瀉心湯 0.7첩 분량인 150 g을 물 1 l와 함께 냉각기를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음,

거즈로 여과하고, 3,200 rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(Rotary evaporater)로 농축한 다음, -70 °C(Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고, freeze dryer로 동결 건조시켜 17.3 g의 시료를 얻었다. 시료를 effendorf tube에 25 mg/ml이 되도록 생수로 녹여 몸무게 1 g당 10 µl씩 하루에 한번 오후 5시에 5일간 경구 투여하였다.

2) 광화학적 색전술 수술 방법

실험은 20-25 g의 수컷 마우스(Balb/c mice, 샘타코) 40마리를 대상으로 Watson 등⁸의 방법을 이용하였다. ketamine(60 mg/kg)과 xylazine(10 mg/kg)을 혼합하여 근육 내 주사를 하여 마취하고, 보온방식(Homeothermic Blanket®, Harvard apparatus, USA)을 이용하여 체온을 37.0±0.5 °C로 유지하였으며, 복외위에서 두부 정위고정장치(Animal Stereotactic Frame, Harvard apparatus, USA)에 두개골을 고정하였다. 병변을 만들 부위의 두피를 0.5 cm 정도 절개하고 골막을 박리하여 두개골을 노출한 후 직경 2 mm의 광섬유 광원의 중심을 bregma 전방 1 mm, 측방 3 mm 지점에 밀착하여 열 발생이 없는 할로겐 광원(백색광, 150 W, Illuminator Halogen FOK-150X/150R, Fiber Optic, Korea Co, Cheonan, Korea)을 사용하여 강도가 1.0 W/cm²인 백색광을 조사하고, 광조사 2분 후 Rose Bengal(rose bengal, Aldrich Chemie, Germany) 10 mg/kg을 꼬리 정맥을 통해 2분간 서서히 주사하였고, 이후 12분간 광조사를 유지하였다. 광조사 후 절개부위를 봉합한 다음, 수면시간과 온도와 습도가 조절되고, 먹이에 대한 접근이 자유로운 표준 환경에서 24시간 동안 사육하였다.

3) 실험 모델 설계

광화학적 뇌경색 마우스 모델에서 瀉心湯의 효과를 알아보기 위해 4개의 실험군을 설계하였고, 실험은 그룹 당 5마리씩 독립적으로 2회 시행하였다. Group A는 할로겐 광원조사 2분 후 Rose Bengal 염료 10 mg/kg을 꼬리 정맥을 통해 2분간 서서히 주사 후 12분 동안 광원조사를 유지하였다.

瀉心湯의 효과를 관찰하기 위한 실험군 Group B는 瀉心湯 시료를 25 mg/ml 농도로 몸무게 1 g 당 하루 10 µl씩 5일간 경구 투여(SST 전처리) 한 후 할로겐 광원을 2분 동안 조사하고, Rose Bengal 염료 10 mg/kg을 꼬리 정맥을 통해 2분간 서서히 주사 후 12분 동안 광원조사를 유지하였다.

4) 조직학적 검사

마우스들은 생리식염수와 4% paraformaldehyde로 관류시킨 후 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌조직은 0.1 M PBS 및 4% paraformaldehyde 용액 속에서 3일간 고정한 후 파라핀 블록 절편으로 만들어 H&E 염색을 시행하였다.

5) TUNEL 염색

마우스들은 생리식염수와 4% paraformaldehyde로 관류시킨 후 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌조직은 4% paraformaldehyde로 4 °C에서 하루 동안 고정하였다. 다음날 PBS로 30분씩 3회 세척한 후 파라핀 포매를 하였다. 뇌조직을 4 µm로 자른 후 슬라이드에 부착하고 65 °C에서 건조시켜 xylene으로 파라핀을 녹였다. TUNEL 염색을 위해 Roche사에서 출시된 *In Situ* Cell Death Detection Kit(Cat No. 11 684 817 910)를 사용하였다. 합수과정을 마친 조직은 PBS로 세척한 후 pepsin으로 30분간 37 °C에서 반응시킨 후 label solution과 enzyme solution(TUNEL reaction mixture)을 혼합하여 조직과 반응시켰다. Negative control은 terminal transferase가 포함되지 않은 label solution을 처리하고, positive control은 DNase I recombinant와 10분간 37 °C에서 반응시켰다. 그 후 TUNEL reaction mixture를 37 °C에서 60분간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. 모든 조직은 DAPI로 counter staining을 실시하고 형광현미경(Leica MPS60, Germany)으로 관찰하였다.

6) Western blot analysis

마우스에서 적출한 뇌조직은 냉 PBS로 2회 세척한 후 glass homogenizer로 분쇄하였다. 분쇄한 조직은 파쇄용액(50 mM HEPES, pH7.4, 150 mM

NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)과 4 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 동량의 세포파쇄액(200 µg)과 2X sample buffer를 혼합하여 100 °C에서 3분 가열하여 단백질의 변성을 유도한 후 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 electrotransfer system (Ellard Inc, Seattle, WA, USA)을 이용(0.8 mA/cm)하여 nitrocellulose membrane으로 이동시키고, blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 2시간 반응시켰다. iNOS 및 β-actin에 대한 항체는 0.05%(v/v)의 tween-20이 함유된 tris-buffered saline(TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰으며, 각 항체에 대한 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase (HRP)와 anti-mouse IgG conjugated HRP는 TBS-T로 희석(1:3,000)하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence(ECL) kit(Amersham, England)를 이용하여 현상하였다.

7) 통계처리

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며, 실험결과와 통계처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였고, p-value가 최대치 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스의 뇌 병변조직에서 형태학적인 변화에 미치는 영향

Group B 에서는 총 10마리 모두 광원조사 부위에 직경 2 mm 광원의 크기보다 약간 큰 뇌경색 병변 소견이 두정엽 표면에 유발되었으나 병변 부위를 수치화하기는 불가능하였다(Fig. 1B). 그러나 group D에서는 육안적으로 약간의 차이는 있었지만 10마리 모두 Rose Bengal 단독처리군에 비해 현저하게 병변 정도가 감소하였다(Fig. 1D). 이때 group C에서는 병변 소견이 관찰되지 않았다(Fig.

1C). 따라서 병변이 육안으로 확인된 뇌조직을 실험 목적에 따라 면역화학염색 및 western blot 분석에 활용하였다(Fig. 1).

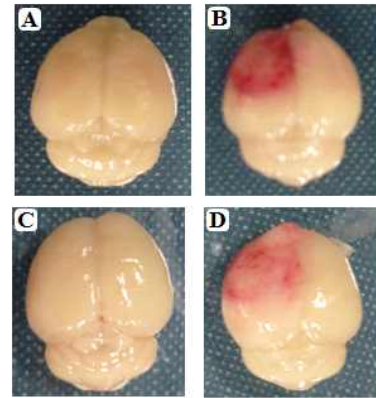


Fig. 1. Gross findings of photothrombotic ischemic lesion.

- A. Water (P.O) + Saline (I.V) + light
 - B. Water (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
 - C. SST (P.O) + Saline (I.V) + light
 - D. SST (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
- The data was one of the ten independent experiments through each group.

2. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스의 세포자멸사에 미치는 영향

각 실험군에서 광원조사 24시간 경과 후 뇌경색 병변 부위에서 조직손상의 기전과 이때 瀉心湯의 효과를 알아보기 위하여 TUNEL assay를 시행하였다. 생리식염수와 4% paraformaldehyde로 관류하여 적출한 뇌조직은 0.1 M PBS 및 paraformaldehyde 용액 속에서 3일간 고정한 후 파라핀 블록 절편으로 만들어 형광 염색하였다. group B에서는 대조군(Fig. 2A)에 비하여 핵의 파괴와 함께 TUNEL 양성 부위가 현저하게 증가되었다(Fig. 2B). 그러나 group D에서는 TUNEL 양성 부위가 감소하였다(Fig. 2D). 이때 group C에서는 대조군과 동일하게 핵의 파괴나 TUNEL 양성 부위가 관찰되지 않았다(Fig. 2C)(Fig. 2).

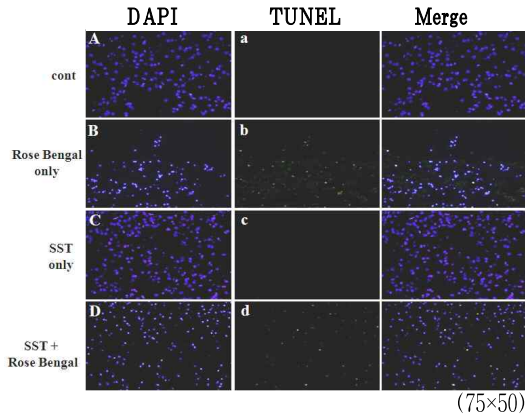


Fig. 2. Effect of *Sasim-tang* (SST) on apoptosis positive cells in photothrombotic ischemic lesion.

- A. Water (P.O) + Saline (I.V) + light
 - B. Water (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
 - C. SST (P.O) + Saline (I.V) + light
 - D. SST (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
- The data was one of the ten independent experiments through each group.

이상의 결과는 통계처리하기 위하여 각 실험군 별로 파라핀 블록 절편 3개씩을 각각 염색하여 평균 값을 구하였다. 각 실험군의 조직은 DAPI로 counter 염색하였고, TUNEL 양성인 세포의 개수를 계산하여 히스토그램으로 나타내었다. 즉 DAPI로 염색된 세포수에 대한 TUNEL 양성 세포의 수를 백분율로 표시하였다(Fig. 3). 대조군에 비하여 group B에서는 82%, group D은 39%로 유의한 감소를 보였다($p < 0.01$). 이때, 대조군과 瀉心湯 단독처리군에서는 TUNEL 양성 세포가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

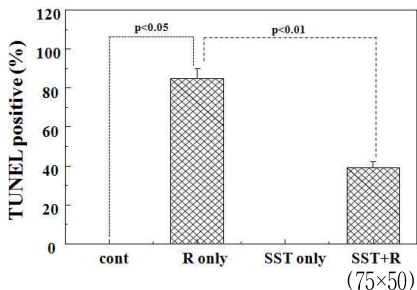


Fig. 3. Effect of *Sasim-tang* (SST) on apoptosis

positive cells in photothrombotic ischemic lesion.

3. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스의 Caspase-3 protease의 발현변화에 미치는 영향 앞에서 DNA의 분절을 TUNEL assay를 통해 확인하였으므로, 각 실험군에서 caspase-3 protease의 발현변화를 면역화학염색과 western blot 분석 방법으로 조사하였다. 광원조사 24시간 경과 후 생리 식염수와 4% paraformaldehyde로 관류하여 적출한 뇌 조직은 0.1 M PBS 및 paraformaldehyde 용액 속에서 3일간 고정한 후 파라핀 블록 절편으로 만들어 형광 염색하였다. group B에서는 대조군(Fig. 4A-a)에 비하여 핵이 파괴되었고, 파괴된 핵에 일치하게 active caspase-3 protease의 발현이 증가되어 갈색으로 진하게 발색하였다(Fig. 4A-b). 그러나 group D에서는 갈색으로 발현되는 부위가 현저하게 감소하여 active caspase-3 protease의 발현이 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 4A-d). 또한 group C에서는 대조군과 동일하게 핵의 파괴나 active caspase-3 protease의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 4A-c).

광원조사 후 동일한 방법으로 적출한 뇌는 glass homogenizer로 분쇄하여 얻은 파쇄액으로부터 western blot 방법으로 procaspase-3 protease의 발현 변화를 조사하였다(Fig. 4B). group B에서 procaspase-3 protease가 분해되었으나, group D에서는 대조군 수준으로 회복되었다. 또한 group C에서도 procaspase-3 protease의 분해는 관찰되지 않았다. 이때 단백질량은 β -actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다(Fig. 4).

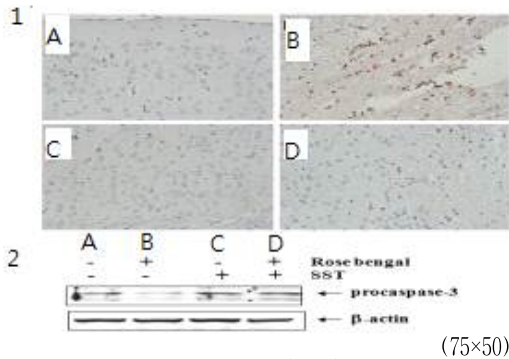


Fig. 4. Effect of *Sasim-tang* (SST) on the activation of caspase-3 protease in photothrombotic ischemic lesion.

1. Immunohistochemistry of active caspase-3 protease.
 - A. Water (P.O) + Saline (I.V) + light
 - B. Water (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
 - C. SST (P.O) + Saline (I.V) + light
 - D. SST (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light

The data was one of the ten independent experiments through each group.

2. The protein expression by western blot analysis. The lysates were separated on 10% SDS-PAGE and immunoblotted for procaspase-3 protease and β -actin. The immunoreactive signals were visualized by ECL detection kit. The data was one of the ten independent experiments through each group.

4. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스의 transglutaminase-2의 발현변화에 미치는 영향
 각 실험군에서 광원조사 24시간 경과 후 생리식 염수와 4% paraformaldehyde로 관류하여 뇌를 적출하고 0.1 M PBS 및 paraformaldehyde 용액 속에서 3일간 고정한 후 파라핀 블록 절편으로 만들어 면역화학염색법으로 TGase-2의 발현에 대한 瀉心湯의 효과를 조사하였다. group B에서는 대조군 (Fig. 5A)에 비하여 TGase-2의 발현이 증가되어 갈색으로 진하게 발색하였다(Fig. 5B). 그러나 예서는 갈색으로 발현되는 부위가 현저하게 감소하였다(Fig. 5D). 또한 group C에서는 대조군과 동일하게 TGase-2의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 5C) (Fig. 5).

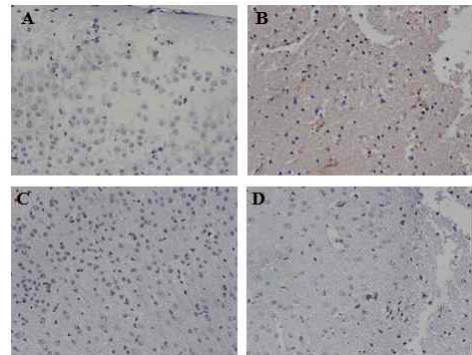


Fig. 5. Effect of *Sasim-tang* (SST) on the expression of TGase-2 in photothrombotic ischemic lesion.

- A. Water (P.O) + Saline (I.V) + light
 - B. Water (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
 - C. SST (P.O) + Saline (I.V) + light
 - D. SST (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
- The data was one of the ten independent experiments through each group.

5. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스의 TNF- α 의 발현변화에 미치는 영향
 각 실험군에서 광원조사 24시간 경과 후 생리식 염수와 4% paraformaldehyde로 관류하여 뇌를 적출하고 0.1 M PBS 및 paraformaldehyde 용액 속에서 3일간 고정한 후 파라핀 블록 절편으로 만들어 면역화학염색법으로 염증성 사이토카인 TNF- α 의 발현에 대한 瀉心湯의 효과를 조사하였다. Group B에서는 대조군(Fig. 6A)에 비하여 TNF- α 의 발현이 증가되어 갈색으로 진하게 발색하였다 (Fig. 6B). 그러나 group D에서는 갈색으로 발현되는 부위가 현저하게 감소하였다(Fig. 6D). 또한 group C에서는 대조군과 동일하게 TNF- α 의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 6C)(Fig. 6).

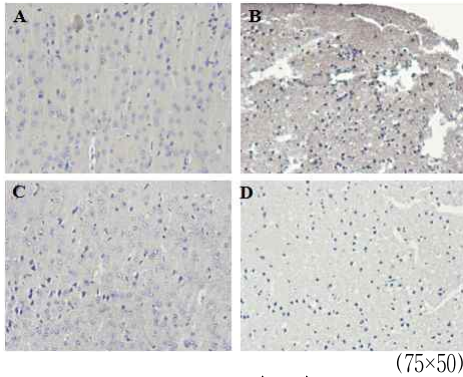


Fig. 6. Effect of *Sasim-tang* (SST) on the expression of TNF- α in photothrombotic ischemic lesion.

- A. Water (P.O) + Saline (I.V) + light
 - B. Water (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
 - C. SST (P.O) + Saline (I.V) + light
 - D. SST (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
- The data was one of the ten independent experiments through each group.

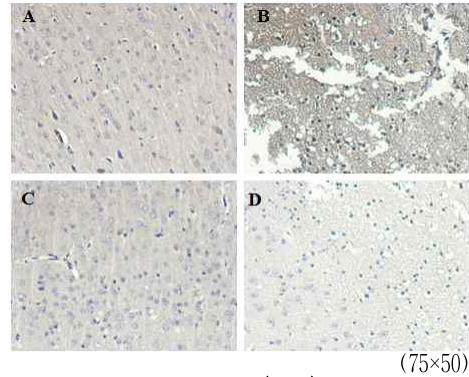


Fig. 7. Effect of *Sasim-tang* (SST) on the expression of IL-1 β in photothrombotic ischemic lesion.

- A. Water (P.O) + Saline (I.V) + light
 - B. Water (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
 - C. SST (P.O) + Saline (I.V) + light
 - D. SST (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
- The data was one of the ten independent experiments through each group.

6. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스의 IL-1 β 의 발현변화에 미치는 영향

각 실험군에서 광원조사 24시간 경과 후 생리식염수와 4% paraformaldehyde로 관류하여 뇌를 적출하고 0.1 M PBS 및 paraformaldehyde 용액 속에서 3일간 고정한 후 파라핀 블록 절편으로 만들어 면역화학염색법으로 염증성 사이토카인 IL-1 β 의 발현에 대한 瀉心湯의 효과를 조사하였다. group B에서는 대조군(Fig. 7A)에 비하여 IL-1 β 의 발현이 증가되어 갈색으로 진하게 발색하였다(Fig. 7B). 그러나 group D에서는 갈색으로 발현되는 부위가 현저하게 감소하였다(Fig. 7D). 또한 group C에서는 대조군과 동일하게 IL-1 β 의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 7C)(Fig. 7).

7. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스의 IL-6의 발현변화에 미치는 영향

각 실험군에서 광원조사 24시간 경과 후 생리식염수와 4% paraformaldehyde로 관류하여 뇌를 적출하고 0.1 M PBS 및 paraformaldehyde 용액 속에서 3일간 고정한 후 파라핀 블록 절편으로 만들어 면역화학염색법으로 염증성 사이토카인 IL-6의 발현에 대한 瀉心湯의 효과를 조사하였다. group B에서는 대조군(Fig. 8A)에 비하여 IL-6의 발현이 증가되어 갈색으로 진하게 발색하였다(Fig. 8B). 그러나 group D에서는 갈색으로 발현되는 부위가 현저하게 감소하였다(Fig. 8D). 또한 group C에서는 대조군과 동일하게 IL-6의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 8C)(Fig. 8).

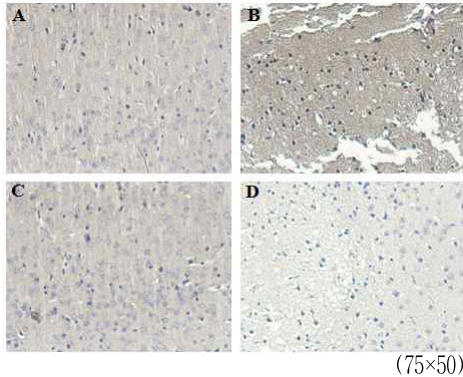


Fig. 8. Effect of *Sasim-tang* (SST) on the expression of IL-6 in photothrombotic ischemic lesion.

- A. Water (P.O) + Saline (I.V) + light
 - B. Water (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
 - C. SST (P.O) + Saline (I.V) + light
 - D. SST (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
- The data was one of the ten independent experiments through each group.

8. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스의 IL4R- α 의 발현변화에 미치는 영향

각 실험군에서 광원조사 24시간 경과 후 생리식염수와 4% paraformaldehyde로 관류하여 뇌를 적출하고 0.1 M PBS 및 paraformaldehyde 용액 속에서 3일간 고정한 후 파라핀 블록 절편으로 만들어 면역화학염색법으로 IL4R- α 의 발현에 대한 瀉心湯의 효과를 조사하였다. group B에서는 대조군(Fig. 9A)에 비하여 IL4R- α 의 발현이 증가되어 갈색으로 진하게 발색하였다(Fig. 9B). 그러나 group D에서는 갈색으로 발현되는 부위가 감소하지 않았다(Fig. 9D). 또한 瀉心湯을 전처리하고 group C에서는 대조군과 동일하게 IL4R- α 의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 9C)(Fig. 9).

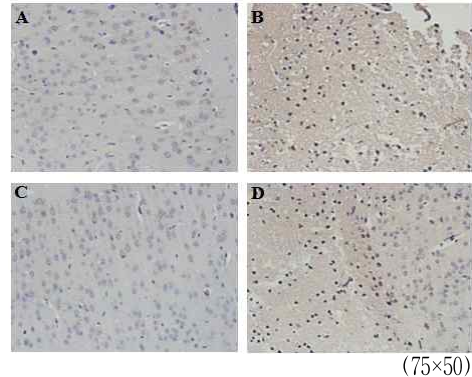


Fig. 9. Effect of *Sasim-tang* (SST) on the expression of IL4R- α in photothrombotic ischemic lesion.

- A. Water (P.O) + Saline (I.V) + light
 - B. Water (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
 - C. SST (P.O) + Saline (I.V) + light
 - D. SST (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
- The data was one of the ten independent experiments through each group.

9. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스의 IL13R- α 의 발현변화에 미치는 영향

각 실험군에서 광원조사 24시간 경과 후 생리식염수와 4% paraformaldehyde로 관류하여 뇌를 적출하고 0.1 M PBS 및 paraformaldehyde 용액 속에서 3일간 고정한 후 파라핀 블록 절편으로 만들어 면역화학염색법으로 IL13R- α 의 발현에 대한 瀉心湯의 효과를 조사하였다. Group B에서는 대조군(Fig. 10A)에 비하여 IL13R- α 의 발현이 증가되어 갈색으로 진하게 발색하였다(Fig. 10B). 그러나 group D에서는 갈색으로 발현되는 부위가 현저하게 감소하였다(Fig. 10D). 또한 group C에서는 대조군과 동일하게 IL13R- α 의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 10C)(Fig. 10).

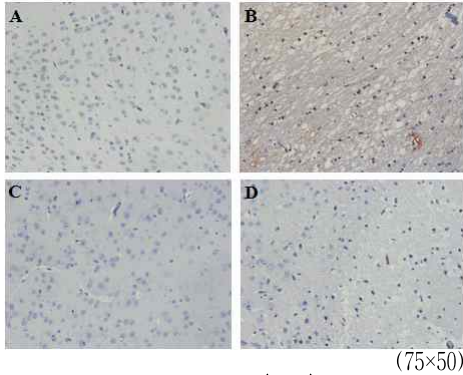


Fig. 10. Effect of *Sasim-tang* (SST) on the expression of IL13R- α in photothrombotic ischemic lesion.

- A. Water (P.O) + Saline (I.V) + light
 - B. Water (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
 - C. SST (P.O) + Saline (I.V) + light
 - D. SST (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
- The data was one of the ten independent experiments through each group.

10. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스의 심장 및 심장조직에서 IL13R- α 의 발현변화에 미치는 영향

각 실험군에서 광원조사 24시간 경과 후 생리식염수와 4% paraformaldehyde로 관류하여 심장과 신장을 각각 적출하고 0.1 M PBS 및 paraformaldehyde 용액 속에서 3일간 고정한 후 파라핀 블록 절편으로 만들어 면역화학염색법으로 IL13R- α 의 발현에 대한 瀉心湯의 효과를 조사하였다. group B에서는 IL13R- α 의 발현변화가 없었다(Fig. 11). 그러나 뇌졸중 마우스 심장조직에서는 대조군(Fig. 12A)에 비하여 IL13R- α 의 발현이 증가되어 갈색으로 진하게 발색하였다(Fig. 12B). 그러나 group D에서는 갈색으로 발현되는 부위가 감소하였다(Fig. 12D). 또한 group C에서는 대조군과 동일하게 IL13R- α 의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 12C)(Fig. 11)(Fig. 12).

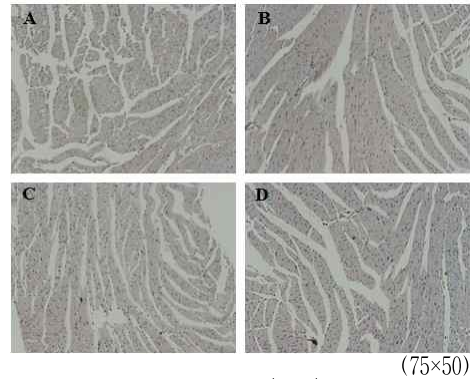


Fig. 11. Effect of *Sasim-tang* (SST) on the expression of IL13R- α in heart tissue from photothrombotic ischemic mice.

- A. Water (P.O) + Saline (I.V) + light
 - B. Water (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
 - C. SST (P.O) + Saline (I.V) + light
 - D. SST (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
- The data was one of the ten independent experiments through each group.

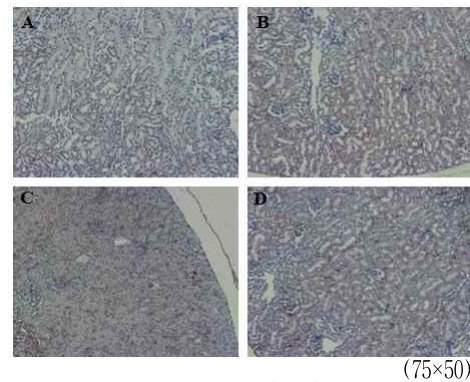


Fig. 12. Effect of *Sasim-tang* (SST) on the expression of IL13R- α in kidney tissue from photothrombotic ischemic mice.

- A. Water (P.O) + Saline (I.V) + light
 - B. Water (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
 - C. SST (P.O) + Saline (I.V) + light
 - D. SST (P.O) + Rose Bengal (I.V) + light
- The data was one of the ten independent experiments through each group.

11. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스에서 SOD-1, SOD-2 및 catalase 단백질의 발현변화에 미치는 영향

각 실험군에서 광원조사 24시간 경과 후 생리식염수와 4% paraformaldehyde로 관류하여 적출한 뇌는 glass homogenizer로 분쇄하여 얻은 파쇄액으로부터 western blot 방법으로 SOD-1, SOD-2 및 catalase(CAT)의 발현변화를 조사하였다(Fig. 13). SOD-1 단백질은 group B에서 발현이 감소하지 않았으나, group D에서는 대조군에 비하여 감소된 발현 양상을 보였다(Fig. 13A). SOD-2 단백질은 group B에서 발현이 증가하였으며, group D에서도 대조군에 비하여 증가된 발현 양상을 보였다. 또한 group C에서도 발현이 증가된 양상을 보였다(Fig. 13B). 그러나 CAT 단백질은 group B에서 발현이 감소하였으나, group D에서 대조군 수준으로 발현이 증가하였으며, group C에서도 대조군 수준의 발현 양상을 나타내었다(Fig. 13C). 이때 단백질량은 β -actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다(Fig. 13D)(Fig. 13).

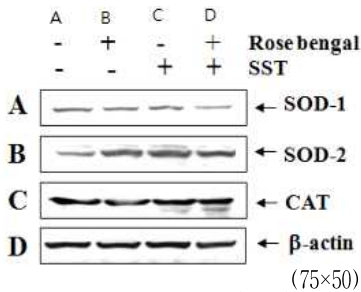


Fig. 13. Effect of *Sasim-tang* (SST) on expression SOD-1, SOD-2 and catalase protein in photothrombotic ischemic lesion.

The protein expression by western blot analysis. The lysates were separated on 12% SDS-PAGE and immunoblotted for SOD-1 (A), SOD-2 (B), catalase (C) and β -actin (D). The immunoreactive signals were visualized by ECL detection kit. The data was one of the ten independent experiments through each group.

12. 瀉心湯이 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스에서 NOS 및 HO-1 단백질의 발현변화에 미치는 영향

각 실험군에서 광원조사 24시간 경과 후 생리식염수와 4% paraformaldehyde로 관류하여 적출한 뇌는 glass homogenizer로 분쇄하여 얻은 파쇄액으로부터 western blot 방법으로 iNOS, eNOS, nNOS 및 HO-1의 발현 변화를 조사하였다(Fig. 14). iNOS 단백질의 발현은 미미하여 변화를 관찰하기가 어려웠다(Fig. 14A). eNOS 단백질은 group B에서 발현이 현저하게 증가하였으나, group D에서는 대조군 수준으로 감소된 발현 양상을 보였다. 그러나 group C에서도 발현이 증가된 양상을 보였다(Fig. 14B). nNOS 단백질은 group B에서 발현이 증가하였으나, group D에서도 대조군에 비하여 증가된 발현 양상을 보였다. 또한 group C에서도 발현이 증가된 양상을 보였다(Fig. 14C). 마지막으로 HO-1 단백질은 group B에서 발현변화가 미미하였으나 group C에서 대조군에 비해 HO-1 단백질의 발현이 증가하였고, group D에서는 대조군에 비해 뚜렷한 발현 증가를 보였다(Fig. 14D). 이때 단백질량은 β -actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다(Fig. 14E)(Fig. 14).

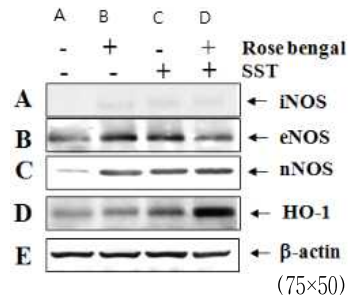


Fig. 14. Effect of *Sasim-tang* (SST) on expression iNOS, eNOS, nNOS and HO-1 protein in photothrombotic ischemic lesion.

The protein expression by western blot analysis. The lysates were separated on 12% SDS-PAGE and immunoblotted for iNOS (A), eNOS (B), nNOS (C), HO-1 (D) and β -actin (E). The immunoreactive signals were visualized by ECL detection kit. The data was one of the ten independent experiments through each group.

IV. 고 찰

뇌혈관질환은 크게 출혈성 뇌졸중과 허혈성 뇌졸중으로 나눌 수 있으며, 세계적으로 뇌졸중의 80%가 뇌경색에 해당하는 허혈성 뇌졸중이다¹⁰. 뇌졸중은 갑작스럽게 발병하며 정상적인 신경학적 기능의 상실을 동반하고, 급격하게 질병의 경과가 진행되어 사망의 위험성이 높으며 사망하지 않더라도 지속적인 심각한 후유장애로 인하여 개인의 삶의 질을 저해시켜 경제적, 사회적으로 큰 손실이 되고 있다¹¹.

한의학중풍표준화위원회(2005년)에서는 중풍이란 “뇌혈관의 순환장애로 인해 국소적인 신경학적 결손을 나타내는 뇌혈관질환을 포함하는 것으로서 人事不省, 手足癱瘓, 口眼喎斜, 言語蹇澁, 半身癱痺 등의 임상증상을 나타내는 병증이다”라고 정의하고 있으며, 발병이 갑작스럽고 변화가 급속함이 자연계의 “善行而數變”하는 風邪의 특성과 유사하여 중풍이라 이름 하였다¹². 중풍의 원인에 대해 唐宋代까지는 중풍의 원인을 주로 “外風”으로 인식하였으나, 金元代 이후부터는 이론연구의 발전 및 학문적 성과와 더불어 外因보다는 內因의 개념으로 火, 氣, 濕痰, 瘀血 등을 원인으로 인식하게 되었다¹³.

瀉心湯은 《金匱要略》⁷에 수록된 처방으로 心氣不足, 吐血衄血을 주치한다 하였다. 瀉心湯은 大黃 8 g, 黃芩 4 g, 黃蓮 4 g으로 구성되어 있으며, 大黃은 性味が 苦, 寒, 無毒하고 攻積導滯, 瀉下解毒, 行瘀通經, 清利濕熱 등의 효능이 있다¹³. 《神農本草經》¹⁴에서 “味苦寒 主下瘀血 血閉 寒熱 破癥瘕積聚 留飲宿食 蕩滌腸胃 推陳致新 通利水穀 調中化食 安和五臟”이라고 처음 수록되어 있으며, 《本草綱目》¹⁵에서는 “主治下痢赤白 裏急腹痛 小便淋瀝 實熱燥結 潮熱譫語 黃疸 諸火瘡”이라 하였다. 黃芩은 性味が 苦, 寒, 無毒하고 清熱燥濕, 瀉火解毒, 止血, 安胎 등의 효능이 있다¹³. 《神農本草經》¹⁴에서 “味苦平 主諸熱黃疸 腸癰泄痢 逐水下血閉 治腰瘡疽蝕 火瘡”이라고 처음 수록되어 있으며, 《本草綱

目》¹⁵에서는 “治風熱濕熱頭疼 奔豚熱痛 火咳 肺痿 喉腥 諸失血”이라 하였다. 黃蓮은 性味が 苦, 寒, 無毒하고 清熱燥濕, 清心除煩, 瀉火解毒 등의 효능이 있다¹². 《神農本草經》¹⁴에는 “主熱氣目痛 眦傷 泣出眇目 腸癰腹痛下痢 婦人陰中腫痛”이라고 처음 수록되어 있으며, 《本草綱目》¹⁵에는 “解服藥過剩 煩悶 及轉粉毒”이라 하였다.

瀉心湯의 구성약물에 대한 약리학적 성분을 살펴보면, 大黃은 글리코사이드인 aloemodin monoglucoside, rhein-8-monoglucoside, physcion monoglucoside, emodin monoglucoside, chrysophenol monoglucoside와 sennoside A, B 및 C 등이 있고, 또한 rheum yannic acid, gallic acid와 calechin 등으로 구성된다. 黃芩은 몇 가지의 활성성분을 함유하고 있으며, 그 중에서 주요 활성 성분은 baicalein, biacalin, woginin 및 β-sitosterol 등으로 구성된다. 黃蓮은 중량의 약 7~8%는 berberine이 주성분이며, 이 외에 소량의 coptistine, urbenine, worenine, palmatine, jatrorrhizine 및 columbamine 등을 함유하고 있다¹⁶.

이러한 瀉心湯은 瀉下작용을 통한 解毒작용이 돋보이는 方劑라고 볼 수 있으며, 苦寒한 약물로써 實熱의 邪氣를 배설하는 효능이 있고, 변증논치의 관점에서 三焦의 實火를 清泄하는 효능으로 頭暈, 眼花, 肩凝, 耳鳴, 頭重, 失眠, 不安을 수반하는 고혈압증과 鼻出血, 便秘, 갱년기장애 및 혈관질환에 활용된다¹⁷.

본 연구에서는 瀉心湯의 뇌세포 손상 보호효과를 알아보기 위하여 마우스에서 Rose Bengal 염료를 이용한 광화학적 대뇌피질경색 모델을 통해, 이들의 경시적인 병변 크기 및 병리조직학적 변화와 이때 염증성 사이토카인의 발현변화를 관찰하였다. 광화학적 뇌경색 모델은 Rose Bengal 같은 빛에 의해 활성화되는 화학물질을 혈관에 주입하고 뇌의 국소부위에 직접 광원을 조사하여 화학반응을 유도, 생성된 산소라디칼에 의해 혈관내피 세포가 손상되고 이로 인해 혈전증이 발생, 뇌경색이 초래되는 방법이다¹⁸. 본 연구에서도 Watson 등¹⁹의 방

법을 이용하여 Rose Bengal 염료 10 mg/kg을 꼬리 정맥에 주사하고 광원을 직접 조사하여 광화학적 뇌졸중 마우스 모델을 만들고, 이에 대한 瀉心湯의 효과를 확인하였다. Rose Bengal 대신 생리식염수를 주사하고 광원을 조사한 대조군의 경우 뇌조직의 손상은 없었으며, 瀉心湯을 전처리한 후 Rose Bengal로 광화학적 뇌경색을 유발한 실험군의 뇌조직의 병변은 현저하게 감소하였다(Fig. 1).

세포자멸사(apoptosis : programmed cell death)는 외부 자극에 대해서 세포 내부에 이미 존재하는 일련의 프로그램에 의해 세포가 사멸하는 과정을 의미한다. 또한 세포나 장기의 항상성(homeostasis) 유지를 위해 중요한 기전으로서 1980년대 후반기부터 세포 생물학 영역에서 발전되어 왔으며, 특히, 신경계와 면역계에서 세포의 생성, 분화 및 기능 등에 그 중요성이 밝혀졌다^{20,21}. 세포자멸사는 빠른 세포탈수 현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질 내의 칼슘농도의 증가, 염색체의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양 분절, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 아포토틱 소체(apoptotic body)의 형성을 동반하며, caspase family cysteine protease의 신호 전달계를 활성화시킨다²².

본 연구에서는 TUNEL assay와 caspase-3 protease의 활성을 조사하여 세포사멸의 특성을 조사하였다. Rose Bengal을 주사하고 광원을 조사한 뇌졸중 마우스에서는 핵의 파괴와 함께 TUNEL 양성 부위가 현저하게 증가되었으나 瀉心湯을 전처리하고 Rose Bengal을 주사하여 뇌경색을 유발한 실험군에서는 TUNEL 양성 부위가 감소하였고, 이때 Rose Bengal 대신 생리식염수를 주사하여 광원을 조사한 실험군에서는 대조군과 동일하게 핵의 파괴나 TUNEL 양성 부위가 관찰되지 않았다(Fig. 2). 통계처리 후 DAPI로 염색된 세포수에 대한 TUNEL 양성 세포의 수를 백분율로 조사한 결과 대조군에 비하여 Rose Bengal에 의해 뇌경색이 유발된 실험군에서는 82%, 瀉心湯을 전처리한 후 뇌경색을 유

발한 실험군은 39%로 유의한 감소를 보였다($p < 0.01$) (Fig. 3). 동일한 부위에 active caspase-3 protease의 발현을 조사한 결과 Rose Bengal을 주사하고 광원을 조사한 뇌졸중 마우스에서 active caspase-3 protease의 발현이 증가하였으며, 瀉心湯 전처리 후 뇌경색 유발 실험군에서는 active caspase-3 protease의 활성이 감소하였다(Fig. 4). 따라서 瀉心湯은 active caspase-3 protease의 활성을 감소시켜 세포자멸사를 억제하였다. Caspase-3 protease의 상방단백질인 caspase-8 protease나 caspase-9 protease의 발현 변화는 본 연구의 조건에서는 관찰하지 않았으나, 이는 caspase-3 protease보다 이른 시간 활성화와 관련이 있을 것으로 판단되며, caspase-3 protease의 활성 및 DNA의 분절이 확인되었으므로 caspase family 신호전달계의 활성화에 의해 세포자멸사를 초래한 것으로 판단된다. 칼슘이온 의존적 혈액응고인자인 TGase-2 단백질은 염증성 질환, 암 및 퇴행성 뇌질환에서 과발현되며, 세포자멸사 기전에서 활성화된다. 본 연구에서도 Rose Bengal에 의한 뇌졸중 마우스의 병변 부위에서 TGase-2 단백질의 발현이 증가되었다. 그러나 瀉心湯 전처리 시 TGase-2의 발현이 대조군 수준으로 감소하였다(Fig. 5). 따라서 瀉心湯은 TGase-2 단백질의 발현을 감소시켜 세포자멸사를 억제하였다.

사이토카인은 면역반응 중에 나타나는 세포간의 상호작용을 일으키는 세포가 분비한 단백질로서, 이러한 단백질들은 자연면역에서 매개 조절자로서 염증반응을 조절하는 역할을 하기도 하며, 획득면역에서도 특정항원을 인식하여 T 세포에 의해 분비되고 염증반응을 강하게 하거나 특수화하는데 관여하는 매개 조절자의 기능 등 면역반응 및 염증반응에서 다양한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다²³. 본 연구에서 Rose Bengal 염료에 의해 유발된 광화학적 뇌경색 마우스에서 병변 부위의 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL4R- α 및 IL13R- α 의 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과 瀉心湯을 전처리하고 Rose Bengal로 병변을 유발한 실험군에서 TNF- α ,

IL-1 β , IL-6 및 IL13R- α 의 발현 증가가 억제되었다(Fig. 6,7,8,10). 또한 Rose Bengal 염료에 의해 유발된 광화학적 뇌경색 마우스의 심장 및 신장에서 IL13R- α 발현 변화를 관찰한 결과의 瀉心湯이 신장조직에서 IL13R- α 단백질의 발현 증가를 억제하였다(Fig. 12).

본 연구에서는 瀉心湯이 항산화단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SOD-1, SOD-2, catalase, NOS 및 HO-1 단백질의 발현변화를 관찰하였다. SOD-1, SOD-2, catalase는 세포 내에서 활성산소종(Reactive oxygen species : ROS)을 제거하기 위한 생리적 방어기전으로, 과도한 활성산소종은 이들 방어체계를 초과하여 세포손상을 초래한다. 활성산소종은 세포손상에 중요한 역할을 하는 물질로서, 활성화된 호중구, xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡 및 아라키돈산 대사 과정을 통해서 생성되며, SOD는 세포 내 superoxide anion을 H₂O₂로 변화시키고, H₂O₂는 catalase 단백질에 의해 세포 내 무해한 물질로 변화된다²⁴. 실험 결과, Rose Bengal에 의한 허혈성 뇌경색 모델에서 SOD-2 단백질의 발현은 증가하였으나 CAT의 발현은 감소하였다(Fig. 13B, 13C). 그러나 瀉心湯 전처리 시 Rose Bengal에 의해 발현 감소된 CAT의 발현은 대조군 수준으로 증가하였으며 SOD-2 단백질 발현에는 변화가 없었고, SOD-1 단백질의 발현은 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다(Fig. 13). 또한, iNOS 단백질의 발현 변화는 관찰할 수 없었으나 Rose Bengal에 의한 뇌경색 유발 실험군에서 eNOS와 nNOS 단백질의 발현이 증가하였다(Fig. 14). 瀉心湯 전처리 시 Rose Bengal에 의해 발현이 증가된 eNOS의 단백질 발현은 현저히 감소하였고, 또한 HO-1 단백질의 발현이 증가하였다(Fig. 14). 따라서 Rose Bengal에 의한 뇌경색은 세포 내 항산화 단백질의 발현 변화에 따른 활성산소종의 생성과 밀접한 연관이 있을 것으로 판단되며, 항산화단백질의 발현 조절을 통해 뇌손상 보호효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 요약하면, 瀉心湯은 Rose Bengal에 의한 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스에서 caspase-3 protease, transglutaminase-2의 단백질 발현을 억제시키고, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL13R- α 등 염증성 사이토카인의 발현을 조절함으로써 세포사멸에 대한 보호효과를 나타내었으며, SOD-1, HO-1 단백질의 발현을 증가시키고, catalase 단백질의 발현 감소를 억제하여 항산화를 유도하는 효과를 나타내었다. 따라서 瀉心湯의 염증반응 억제효과에 대한 정확한 조절 기전 연구를 통해 뇌경색 예방 및 치료제로서의 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스 모델에서 瀉心湯 물 추출물을 경구 투여하고 뇌세포 손상 보호효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 瀉心湯의 물추출물은 대조군에 비해 현저하게 뇌손상의 크기를 감소하였다.
2. 瀉心湯의 물추출물은 세포자멸사를 억제하였다.
3. 瀉心湯의 물추출물은 caspase-3 protease의 발현 증가를 억제하였다.
4. 瀉心湯의 물추출물은 transglutaminase-2 단백질의 발현 증가를 억제하였다.
5. 瀉心湯의 물추출물은 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IL13R- α 단백질의 발현 증가를 억제하였다.
6. 瀉心湯의 물추출물은 광화학적 허혈성 뇌졸중 마우스의 신장조직에서 IL13R- α 단백질의 발현 증가를 억제하였다.
7. 瀉心湯의 물추출물은 SOD-1 단백질의 발현을 감소하였으며, catalase 단백질의 발현 감소를 억제하였다.
8. 瀉心湯의 물추출물은 HO-1 단백질의 발현 증가를 유도하였다.

이상의 결과에서 瀉心湯은 광화학적 허혈성 뇌졸

중 마우스에서 caspase-3 protease, transglutaminase-2의 단백질 발현을 억제시키고, 염증성 사이토카인 및 항산화단백질의 발현을 조절함으로써 뇌세포 손상 보호효과를 나타내었으므로 향후 임상에서 뇌경색의 예방 및 치료에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨

참고문헌

1. Drinagl U, Ladecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischemic stroke : An integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22(9):391-7.
2. 서울대학교 의과대학 방사선학교실. 신경방사선 과학. 서울: 일조각; 2004. p. 153.
3. Narayanan U, Chi OZ, Liu X, Weiss HR. Effect of AMPA on cerebral cortical oxygen balance of ischemic rat brain. *Neurochem Res* 2000;25(3):405-11.
4. Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20(4):171-81.
5. 방오영. 허혈성 뇌졸중의 원인 및 발병기전. *대한뇌졸중학회지* 2009;11(2):47-52.
6. Clark WM. Cytokines and reperfusion injury. *Neurology* 1977;49(4):10 - 4.
7. 張仲景. 金匱要略(中國醫學大系Ⅱ). 서울: 驪江出版社; 1986. p. 43.
8. 譚日強. 金匱要略淺述. 北京: 人民衛生出版社; 1981. p. 310-2.
9. 高山宏世 原著(趙蘊坤, 長文劍, 殷苦寒 編譯). 中
醫方劑病症圖解. 山西: 山西科學技術出版社; 1991. p. 84-5.
10. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008;371(9624):1612-23.
11. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울: 중앙기획사; 2002. p. 263.
12. 전국한의과대학심계내과학교실. 심계내과학. 서울: 군자출판사; 2006. p. 331-42, 393-408.
13. 신민교. 임상본초학. 서울: 영림사; 1997. p. 400-1, 402-3, 785-6.
14. 吳晉. 神農本草經. 서울: 醫道韓國社; 1976. p. (I卷):12, (II卷):12, (III卷):7.
15. 李時珍. 本草綱目. 台北: 文友書局; 1960. p. 447.
16. 김형균. 한약의 약리. 서울: 고려의학; 2000. p. 211, 329, 333.
17. 윤용갑. 동의방제와 처방해설. 서울: 의성당; 1998. p. 537.
18. Schroeter M, Jander S, Stoll G. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels. characterization of inflammatory responses. *J Neurosci Methods* 2002;117:43-9.
19. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 1985;17(5):497-504.
20. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;17:229-59.
21. Solary E, Droin N, Bettaieb A, Corcos L, Dimanche-Boitrel MT, Garrido C. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia* 2000;14:1833-49.
22. Cohen JJ. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract*. 1993;28:35-43.

23. 김광혁. 세포분자 면역학. 서울: 정문각; 1998, p. 34, 297.
24. Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide

theory of oxygen toxicity. In Free radicals in biology and medicine. 2nd Ed. Oxford: Clarendon Press; 1999, p. 86-9.