대한한의학회지 제21권 제3호(2000년 9월)
J Korean Oriental Med 2000;21(3):88-98

원 저

Mongolian Gerbil의 Reversible forebrain ischemia모델에 미치는 補陽還五湯의 효과

최은정, 정승현, 박인식[1], 신길조, 이원철

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 한의과대학 해부학교실[1]

The Effect of *Boyanghwano-tang* Extracts on Reversible Forebrain Ischemia in Mongolian Gerbil

Eun-Jeong Choi, Sung-Hyun Jeong, In-Sick Park[1], Gil-Cho Shin, Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, Dept. of Anatomy[1], College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : This study was carried out to evaluate the effect of *Boyanghwano-tang* Extracts on Reversible Forebrain Ischemia in Mongolian Gerbils.

Methods : The water content of cerebral edema and the morphological · neurocytochemistrical change of neuron in MG were implemented to conduct this study.

Results : The change rate of water content by ischemia in the normal group was 78.90% on the third day and 79.12% on the seventh day after an attack of ischemia. The rate in the control group was 80.34% and 81.72%. In the sample group the rate was 79.85% and 80.97%. This is a significant result. According to the result of the optical microscopic examination, the cells seen to be continuous and systematic in the pyramidal cells of hippocampus were changed into discontinuous and unsystematic forms in the control group. But compared with the control group, the cells were less damaged in the sample group.

Conclusions : The data shows that the effect of *Boyanghwano-tang* Extracts on Reversible Forebrain Ischemia in MG is a significant result. *(J Korean Oriental Med 2000;21(3):88-98)*

Key Words: *Boyanghwano-tang* extracts, Reversible forebrain ischemia, Mongolian Gerbil

서 론

우리나라의 뇌졸중은 사회경제적 여건의 변화에 따라 출혈성 뇌졸중이 감소하고 허혈성 뇌졸중이 증가하는 추세이다[1].

최근 뇌허혈의 병태생리가 밝혀지기 시작하면서, 허혈상태에서 신경세포가 생존할 수 있는 시간이 극히 제한되어 있으므로 뇌허혈의 급성기에 재관류를 위한 혈전용해제와 신경세포의 손상을 줄일 수 있는 치료제를 개발하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다[2].

한의학에서 허혈성 뇌졸중은 中風의 범주에서 치료되고 있으며[3], 최근 임상연구에서도 辨證施治를 통하여 유의한 효과가 있었음[4-6]을 보고하고 있다.

補陽還五湯은 淸代 王淸任(1768~1831年)이 지은 醫林改錯(1830年)에 최초로 記載된 處方으로 益氣化瘀法의 名方이며, 半身不遂 · 口眼喎斜 · 言語蹇澁 · 口角流涎 · 大便乾燥 · 小便頻數 · 遺尿不禁 등을 치

· 접수 : 2000년 8월 14일 · 수정 : 10월 24일 · 채택 : 10월 25일
· 교신저자 : 정승현, 경북 경주시 용강동 동국대학교 한방병원
(Tel. 054-770-1253, E-mail: omdjeong@hanmail.net)

료하는데[7,8], 임상에서 허혈성뇌혈전증 · 뇌색전증 · 일과성뇌허혈발작 · 뇌동맥경화증 · 뇌출혈후유증 · 지주막하출혈회복기 등에 사용되고 있으며[8], 그밖에 급성척수염 · 자율신경실조증 · 파킨슨증후군 · 진행성근육영양불량 · 신경쇠약 · 혈소판감소성자반 등에도 응용되고 있다[9].

補陽還五湯에 대한 실험적 연구로는 혈액순환의 개선 작용[10-12], 혈액류변성(blood rheological ploblem)의 개선 작용[13-15], 抗炎[16]과 抗免疫 작용[15]에 유효함을 보고한 바 있으며, 그 외 특발성부종[17] · 소아마비[18]에도 유효함이 보고된 바 있으나, 허혈성 뇌졸중 특히 Reversible forebrain ischemia모델에 대한 실험 연구는 없었다.

이에 저자는 補陽還五湯이 Reversible forebrain ischemia모델에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 모래쥐의 일종인 Mongolian Gerbil(MG)을 이용하여, 뇌조직의 수분함량 변화 및 광학현미경에 의한 신경세포손상 정도를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 동물

동아대학교 의과대학 생리학교실에서 분양받은 수컷 Mongolian gerbils (Merious unguicalatus)(60-80g)로서 자유롭게 사료와 물을 먹을수 있게끔 하였으며 12시간 빛과 어둠을 제공하였다.

실험동물은 정상군, 가역성 전뇌허혈 모델 유발군인 대조군, 그리고 가역성 전뇌허혈 유발 후 補陽還五湯을 투여한 실험군으로 분류하였으며, 한 群 당 개체수는 15마리로 하였다.

2. 補陽還五湯 추출액의 제조

본 실험에 사용된 補陽還五湯은 동국대학교 한방병원에서 조제된 것으로 1첩의 분량은 Table 1과 같다. 補陽還五湯 추출액의 제조는 우선 2첩을 증류수 1,000㎖에 넣어 2시간 동안 전탕한 다음 원심분리 후 여과하고 그 여액을 rotary evaporator에서 100㎖로 농축하여 사용하였다.

3. Reversible forebrain ischemic stroke의 유발 및 약재 투여

가역성 전뇌허혈의 유발을 위하여 Benveniste 등[19]이 언급한 방법을 이용하여 총경동맥을 일시적으로 결찰한 후 혈액을 재관류시켰다.

실험동물은 자발적으로 room air에서 호흡하게 하였으며 필요에 따라 인공호흡을 시행하였다. pentobarbital sodium(40mg/kg)으로 마취시켰으며, 마취 중 발생되는 저체온증을 예방하기 위하여 자동으로 조절되는 보온판을 이용하여 37℃로 체온을 유지시켰다.

동물의 목의 정중선을 절개하여 양쪽의 총경동맥을 노출시키고 미주신경(vagus nerve)과 분리시킨 후 미세혈관클립을 이용하여 양쪽의 총경동맥을 동시에 5분동안 결찰(bilateral carotid artery ligation)시켜 일시적인 전뇌의 허혈(transient forebrain ischemia)을 유발시켰다. 그 후 혈관으로부터 미세혈관클립을 분리시키고 혈류의 재순환을 확인한 후 봉합하였다.

본 연구를 위하여 가역성 전뇌허혈을 유발시킨 실

Table 1. The Amount and Composition of *Boyanghwano-tang* extracts

Species	Part used	Latin name	Weight(g)
Astragalus membranaceus Bunge.	Roots	*Astragali Radix*	120.0
Angelica gigas Nakai	Roots	*Angelicae Gigantis Radix*	6.0
Paeonia lactiflora Pall.	Roots	*Paeoliae Radix Rubra*	4.5
Pheretima aspergillum	Body	*Lumbricus*	3.0
Cnidium officinale Makino.	Roots	*Cnidii Rhizoma*	3.0
Prunus persica(L.) Batsch.	Seeds	*Persicae Semen*	3.0
Carthamus tinctorius L.	Petals	*Carthami Flos*	3.0

험동물들을 대조군과 실험군으로 나누었다. 먼저 대조군은 보통의 조건하에서 7일 동안 생존시켜 실험에 사용하였고, 실험군은 補陽還五湯 추출액 1.65 *ml*/kg을 1일 2회, 7일간 구강투여한 후 희생시켜 실험에 사용하였다.

4. 뇌실질의 수분함량 변화 측정

가역성 전뇌허혈의 실험에 의해서 야기되는 뇌실질의 수분함량은 wet-dry weight method[20]로 측정하였다. 먼저 뇌조직표본의 중량(wet weight)을 얻기 위하여 화학저울에서 무게를 0.1mg 단위까지 측정하고, 그 조직을 dessicating oven에서 120℃로 48시간 동안 건조시키고, 다시 dessicating jar에 넣고 20분동안 진공상태(vacuum)하에 방치한 후 그 조직의 건조중량(dry weight)을 측정하였다. 젖은 조직 kg당 liter로 표시되는 수분함량은 (W-D)/W × 100(%)로 계산하였다.

5. 조직화학적 염색을 위한 표본제작

신선한 뇌조직 표본을 얻기 위해서 심장을 통한 관류고정(cardiac perfusion fixation)을 실시하였다. 외과적 수술 72시간 후 생존한 모든 동물을 복강으로 sodium pentobarbital(40mg/kg)을 주사하여 마취시키고, 전흉벽을 열고 좌심실에서 대동맥쪽으로 카테타를 삽입한 후 30*ml*의 생리식염수를 주입하면서 우심방의 심방귀부분을 열어 혈관내의 혈액을 제거하였다. paraffin 포매용으로는 500*ml* 10% neutral buffered formalin(pH 7.4, 4 ℃)으로 관류고정시켰으며, 뇌를 적출하여 다시 동일고정액으로 24시간 동안 후고정을 실시하였다. 후고정 후에 Tap water에서 충분히 세척하고, 통상적인 방법으로 탈수과정을 거치고 paraffin에 포매한 후 조직절편기(Microtome, American optical Co.)를 이용하여 제작된 연속 조직절편에서 30㎛마다 한 장씩 5㎛두께의 조직을 취하여 gelatin을 입힌 slide glass에 얹어 신전기(slide warmer)에서 2~4시간 동안 건조시킨후 염색에 이용하였다.

6. 신경세포의 조직화학적 염색

(1) Cresyl violet 염색

5㎛두께의 조직절편을 xylene에 담구어 paraffin을 제거하고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% 그리고 30%의 EtOH용액에서 각각 20분씩 두어 가수(hydration)시키고 최종적으로 증류수로 가수시켰다. 그 후 실온에서 조직절편을 cresyl violet용액에서 2분간 염색한 후 증류수로 세척한 다음 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%및 absolute alcohol로서 탈색 및 탈수과정을 거친 후에 xylene에 2번 처리한 다음 봉입하여 관찰하였다.

(2) Phloxine 염색

5㎛두께의 조직절편을 증류수로 가수시킨 다음 5~10분 동안 Mayer's hematoxylin으로 염색을 실시하였다. Tap water에서 15분간 씻은 다음 phloxine으로 30분간 염색 후 증류수로 세척하였다. tartrazine용액으로 대조염색 후에 탈수하여 봉입한 다음 관찰하였다.

(3) Silver impregnation 염색

동결절편에 의하여 얻어진 40㎛두께의 조직을 gelatin이 입혀진 slide glass에 붙인 다음 40℃에서 4시간 동안 건조한 후 3차 증류수로서 3회 이상 세척한 후 염색에 사용하였다. 조직의 전처리는 alkaline hydroxylamine(pH 13)에서 10분간 처리한 후 0.5% acetic acid로 3분간 3회 처리하였다. 은입자의 침적(impregnation)은 ferric nitrate와 silver nitrate용액에서 25℃를 유지하면서 45분동안 조직의 색이 적황색이 될 때까지 수행하였으며, 1% citric acid로 2분씩 4회 세척한 후 0.5% acetic acid로 5분간 세척하였다. Physical developer 처리는 옅은 회색이 될 때까지 수행후 0.5% acetic acid에서 10분동안 3회 세척한 후 봉입하여 관찰하였다.

7. 결과분석

본 실험에서 얻어진 결과의 통계처리와 유의성 검정은 Sigma Plot program 4.0(Sigma. USA)에 의하여 처리하였다.

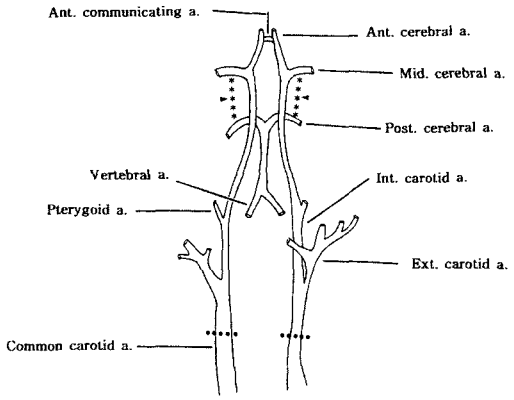

Fig. 1. Arteries of Mongolian Gerbil brain.
Solid triangle(▶) is deletion of posterior communicating artery.
Solid circle(●) is global forebrain occlusion site.

결 과

본 연구에서 MG를 pentobarbital sodium으로 마취하여 미주신경(vagus nerve)을 분리한 총경동맥을 결찰하고, 5분 후 결찰을 해제하기 위한 시간은 약 20~30분 정도가 소요되었으며 실험동물들은 수술 후 2~3시간 내에 마취로부터 깨어났다.

실험군으로 사용한 실험동물의 약 20%는 수술도중 및 회복기간에 사망하였다. 수술 후의 신경학적인 행동변화를 관찰하였는데 별다른 큰 변화를 보이지 않았다. 신경학적인 관찰은 다음과 같이 2단계의 간격으로 나누었다. 0단계는 현저한 결손이 없을 때, 1단계는 수술 후 양측의 눈에만 이상이 있을 경우로 나눌 수 있었다.

1. 뇌조직의 수분함량의 변화

총경동맥을 5분동안 결찰한 후 혈액을 재관류시킨 MG를 각각 3일과 7일간 둔 후 희생시켜 뇌조직의 수분함량 정도를 측정한 결과, 정상군의 수분함량은 3일째에 평균 78.90%, 7일째에 79.12%로 나타났으며, 대조군은 80.34%와 81.72%로 각각 나타나 정상군보다 훨씬 증가하였다. 실험군은 79.85%와 80.97%로 각각 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 감소효과를 나타내었다($P < 0.05$) (Table 2).

2. 광학현미경 소견

정상군에서 광학현미경으로 관찰한 해마형성체(hippocampal formation)부위는 고유 해마부위 전체와 치아이랑(dentate gyrus) 부위로 나눌 수 있었다. 고유해마부위는 다시 위쪽인 CA1 지역과 아래쪽인 CA3 지역으로 나눌 수 있었으며, 치아이랑 부위는 과립세포층과 분자층으로 나눌 수 있었다. 그러므로 해마형성체는 CA1 지역에서 CA3 지역으로 이어지는 돌기가 많은 피라미드 세포층(pyramidal cell layer)과 치아이랑 부위의 과립세포층으로 나눌 수 있었는데, 이들이 주로 많은 가지돌기를 가진 다극성 신경세포층을 이루고 있었다. CA1 지역에서 약 5층의 둥근 세포체와 많은 돌기를 가진 피라미드 세포층이 규칙적으로 배열됨을 관찰할 수 있었으며, CA3 지역에서는 외측으로 갈수록 세포층이 증가되어 나타나

Table 2. Effect of *Boyanghwano-tang* Extracts on Water Contents Change(%) in the Reversible Forebrain Ischemia of Mongolian Gerbil

Group	3days(%)	7days(%)
Normal	78.90±0.425a)	79.12±0.761
Control	80.34±0.652	81.72±0.544
Sample	79.85±0.532*	80.97±0.462*

a) Mean ±Standard Error
Normal : Normal mongolian gerbil
Control : Reversible forebrain ischemia elicited mongolian gerbil
Sample : Reversible forebrain ischemia elicited mongolian gerbil with *Boyanghwano-tang* extracts treatment
* $P < 0.05$ compared with control group

는 것을 볼 수 있었다. 그리고 치아이랑의 과립세포층은 cresyl violet에 진하게 염색되는 약 8~10층의 세포들을 관찰할 수 있었다. 해마의 전반에 걸쳐서 짙게 염색되는 사이신경의 모습도 관찰할 수 있었다(Fig. 2, 5, 8).

대조군에서 해마형성체를 관찰하면 cresyl violet 염색에서는 CA1 지역에서 피라미드세포는 전체적으로 염색성이 떨어지고 있었고, 세포배열의 규칙성도 떨어지고 불연속적이었으며 세포사이의 간격도 넓어지고 있었다. 그리고 세포의 크기가 많이 증가하여 나타났으며 핵의 염색성은 증가되는 경향을 나타내고 있었다. 이 세포들은 세포질에 액포가 형성되어 팽창되고 부분적으로 선택적 괴사의 형태를 나타내고 있었다. 특히 CA1 지역과 CA3 지역에서 위축되어 있는 세포들이 많이 관찰되고 세포층이나 규칙성 정도가 많이 파괴되어 가장 많은 상해를 입는 것으로 관찰되었다. 그러나 치아이랑의 세포에서는 그 상해의 정도가 CA1 지역이나 CA3 지역에 비하여 미약한 것으로 관찰되었다(Fig. 3, 6, 9).

실험군에서 해마형성체를 관찰하면 CA1 지역에서 대조군에 비하여 세포층이 규칙적으로 배열되어 나타나고 있었고, 상대적으로 세포질의 확장되는 정도가 낮아져 세포자체의 크기가 감소하여 나타났으며 염색성도 더 증가되어 나타나고 있었다. 그러나 역시 핵이 응축되거나 세포질이 팽창된 세포가 피라미드세포층을 비롯하여 전층에서 많이 발견되었다. 그리고 CA3 지역에서도 많은 세포들이 상해를 입은 것으로 나타났으나 대조군에 비하여 괴사 정도가 약하였다(Fig. 4, 7, 10).

고 찰

뇌졸중은 Oxfordshire Community Stroke Project[21]에 따르면 30일간 사망율이 19%로 매우 높아 종

Legend for Figures

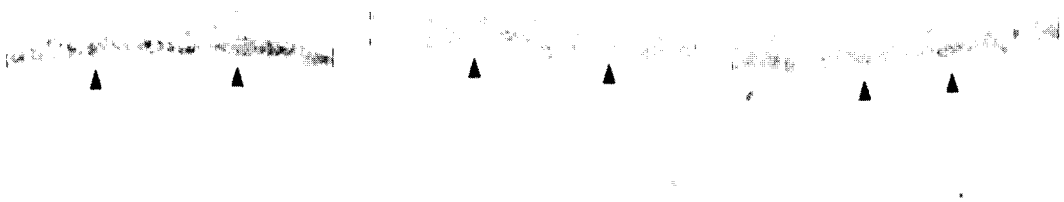

Fig. 2. Parallel sections through the CA1 region of hippocampus, stained with cresyl violet. This photograph represent normal group. Note the CA1 pyramidal cells (arrowhead) are well preserved under light microscopy. ×100.

Fig. 3. Parallel sections through the CA1 region of hippocampus, stained with cresyl violet. This photograph represent control group. Note the CA1 pyramidal cells (arrowhead) were arranged irregular form. ×100.

Fig. 4. Parallel sections through the CA1 region of hippocampus, stained with cresyl violet. This photograph represent sample group. Note the CA1 pyramidal cells (arrowhead) were arranged more regular form than that of control group. ×100.

Fig. 5. Parallel sections through the CA1 region of hippocampus, *stained with Phloxine. This* photograph represent normal group. ×400.

Fig. 6. Parallel sections through the CA1 region of hippocampus, *stained with Phloxine. This* photograph represent control group. ×400.

Fig. 7. Parallel sections through the CA1 region of hippocampus, *stained with Phloxine. This* photograph represent sample group. ×400.

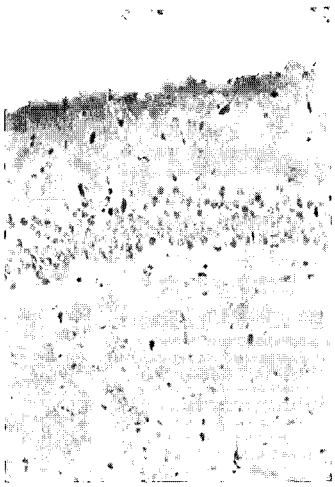

Fig. 8. Parallel sections through the *CA1 region of hippocampus,* stained with Silver stain. This photograph represent normal group. Note the CA1 pyramidal cells (arrowhead) are well preserved under light micro scopy. ×100.

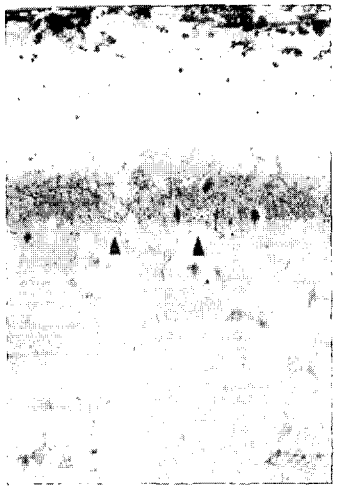

Fig. 9. Parallel sections through the *CA1 region of hippocampus,* stained with Silver stain. This photograph represent control group. Note the CA1 pyrami dal cells (arrowhead) were arranged irregular form. × 100.

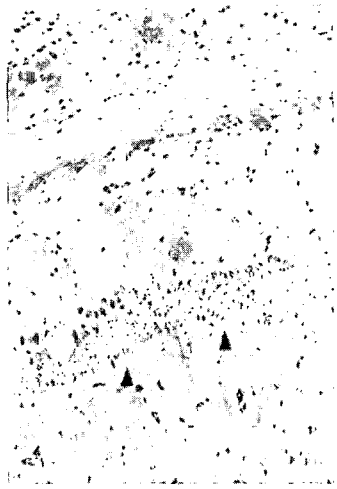

Fig. 10. Parallel sections through the *CA1 region of hip*pocam pus, stained with Silver stain. This photograph repre sent sample group. Note the CA1 pyramidal cells (arrow head) were arranged more regular form than that of control group. ×100.

양 · 심장질환과 더불어 3대 사망 원인이 되며, 사지마비 · 언어장애 · 치매 등의 심각한 후유증을 남긴다. 우리나라에서도 얼마전까지만 해도 출혈성 뇌졸중이 차지하는 비율이 높았지만, 식생활의 서구화 및 류마티스열과 고혈압의 적절한 관리에 따라 출혈성 뇌졸중의 발생이 점차 감소하는 반면 허혈성 뇌졸중은 증가 추세에 있으며, 20년전의 30%정도이던 허혈성 뇌졸중의 발생이 50%이상을 차지하는 것[22]으로 알려져 있다.

인간에서 대뇌허혈(cerebral ischemia)은 두부외상(head trauma), 지주막하출혈(subarachnoid hemorrhage), 뇌경색(stroke), 심장마비(cadiac arrest) 등으로 뇌조직의 혈액공급을 제한받아 발생한다.

대뇌허혈의 메커니즘은 혈액동력학적(hemodynamic) · 신경생리학적(neurophysiological) · 생화학적(biochemical) 변화에 의하여 발생하며, 그것은 기능적 장해(functional disturbances)와 연계되고, 결국 뇌의 구조적 통합성의 손실(a loss of the structural integrity of brain)과 연계되는 것[23]으로 알려져 있다.

즉, 뇌조직의 혈액 공급이 제한을 받으면 해당부위 신경조직의 산소와 포도당의 공급이 제한되어 신경세포내의 energy dependent ion pump의 기능에 장애를 유발한다. 그 결과 세포막을 통하여 칼슘과 같은 양이온들이 대량으로 유입되어[24] 신경세포는 탈분극(depolarization)되며, 신경말단에서 신경독성의 잠재력을 가진 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 신경연접부위에 쌓이게 된다[26]. 이처럼 glutamate가 세포내에 과도하게 축적되면, 이온성 수용체인 NMDA, AMPA, kainate 수용체의 활성에 의해 신경세포의 사멸을 일으킨다. 그리고 허혈 후 혈액의 재순환으로 free radical 생성으로 인한 상해 등[26]이 관여하는 것으로 여겨지고 있다. 이러한 보고들에 기초하여 NMDA 저해제, 칼슘 channel blocker 등을 이용한 허혈에 의한 뇌세포 손상 보호 효과 연구가 되고 있다[27-29].

王淸任은 <醫林改錯 · 半身不遂論>에서 素問 · 靈樞 · 傷寒論은 中風의 病因病理를 "風"으로 인식하였다고 하였고, 劉河間의 "主於火", 李東垣의 "肥白氣虛"(本氣虛外受風邪), 朱丹溪의 "氣血先虛, 濕生痰, 痰生熱, 熱生風", 張景岳의 "氣虛" 등 각 諸家들의 장단점을 지적하였다. 이에 王은 補氣活血法을 창안하여 "周身之氣通而不滯, 血活而不留瘀, 氣通血活, 何患疾病不除"라는 치료목적을 세웠는데, 이의 대표적인 처방이 補陽還五湯이다[7].

補陽還五湯에서 黃芪는 大補元氣, 使氣旺血自行, 瘀不傷正한다. 當歸尾는 和血活血하여 輔藥이 되며, 活血祛瘀하여 不傷正한다. 川芎 · 赤芍藥 · 桃仁 · 紅花를 써서 活血祛瘀하며, 地龍을 써서 通經活絡하였다. 王淸任은 中風으로 인한 半身不遂의 病因病理를 "氣虛血瘀"로 인식하였으며, 氣虛를 本, 血瘀를 標로 보았기 때문에 黃芪를 重用하였으며 특히 氣血이 서로 관계한다는 "氣爲血帥"의 관점을 응용하였다[8].

최근 補陽還五湯의 개개의 약물에 대한 약리 연구가 진행되고 있는데, 黃芪는 組織免疫力增强 · 組織代謝促進 · 强心 · 血管擴張 · 皮膚血液循環 및 營養狀態 改善 · 降壓 · 利尿 · 抗炎 · 抗菌 · 補肝 等의 작용이 있다. 當歸 · 川芎은 抗菌 · 抑菌 · 抗Vitamin-E 缺乏症이 있으며, 當歸는 헤모글로빈과 적혈구의 생성을 促進시키고 血淸脂肪을 下降시킨다. 川芎 · 地龍의 降壓과 血管擴張作用은 관련성이 있으며, 赤芍藥은 鎭靜 · 鎭痛 · 體外試驗上 杆菌과 球菌에 대한 抑制作用이 있다. 紅花 · 地龍은 腸管 · 血管 · 氣管支等의 平滑筋을 興奮시키며, 또한 小量의 紅花는 心臟에 대한 興奮作用이 있고, 大量의 紅花는 抑制作用이 있다[9].

補陽還五湯은 실험적으로 첫째, 腦血管擴張 · 腦血流量增加 · 腦血液循環改善 · 血栓 溶解 및 血栓再發豫防 · 腦虛血改善作用[10-12], 둘째, 血液流變性改善 · 血液粘度降下 · 血液脂肪降下 · 血小板凝集抑制機能[13-15], 셋째, 抗炎 · 抗免疫機能[15,16] 등이 있다는 사실이 증명되고있다. 이와같이 藥理 實驗의 지속적인 연구와 臨床辨證의 연구에 따라 內 · 外 · 婦人 · 小兒 · 五官 · 肛腸科의 각종 질병뿐만 아니라, 腦幹損傷 · · 파킨슨증후군 · 自律神經失調症 · 血小板減少性紫斑 · 特發性浮腫 · 小兒麻痺 등의 병에도 쓰이고 있어, 임상적으로 가치는 높다고 할 수 있다[9].

본 실험에 사용한 MG는 흰쥐나 햄스터와 같이 설

치류에 속하는 실험동물이며, 해부학적으로는 뇌에 혈액을 공급하는 대뇌동맥륜이 불완전하게 형성되어 있고, 기능적으로는 수분대사 및 지방대사 등에서 설치류와 차이있는 것이 특징이다. 최근 들어 총경동맥의 결찰을 통하여 허혈자극에 의한 뇌경색 및 간질 등의 실험동물모델로서 신경계통의 연구분야에 많이 이용되고 있다[30,31].

MG는 뇌허혈을 유발시키면 뇌허혈 기간에 따라 뇌세포의 형태학적 차이가 발생한다[32]. MG의 뇌혈류를 지속적으로 차단할 경우 측부순환(collateral circulation)이 없으므로 전뇌가 급성 뇌경색에 빠진다[33]. MG에서 양쪽 경동맥을 2분동안 차단하면 뇌세포의 변성은 일어나지 않지만, 5분간 차단하였을 때는 해마의 CA1 지역만 3일 후에 선택적으로 지연성 신경세포사가 관찰된다[32,33]. 그러므로 전뇌허혈 모델에서 동물을 희생시키는 시기는 연구자에 따라 차이가 있는데, 과거 연구결과들에 의하면 허혈 3~4일 후에는 해마형성체내 CA1 지역의 피라미드 세포가 파괴되는 것을 관찰할 수 있는 등[34] 죽어가는 신경세포의 변화가 뚜렷해지는 것으로 알려져 있다.

지연성신경세포사(delayed neuronal death or maturation phenomenon)는 설치류의 해마에서 처음 관찰되어 해마 신경세포의 특징적인 소견[35]으로 생각되고 짧은 기간의 국소허혈에서도 발생되는 것[32]으로 보고되었다. 이러한 지연성신경세포사는 허혈후 일정기간 동안 신경세포의 괴사가 진행되지 않는 것을 의미하므로 그 기간을 "therapeutic window"로 이용할 수 있는 가능성을 시사하였다[36].

지연성신경세포사에 관여하는 기전은 아직은 확실하지 않으나, 허혈 후 주어진 자극에 대한 예민성의 증가에 의한 신경세포의 과활동(hyperactivity), 미토콘드리아의 손상, 허혈후 칼슘과 글루탐산 평형의 파괴 등이 거론되었다[37]. 그 발생기전은 아직 분명히 밝혀져 있지 않으나 현재까지 제시되어 있는 가설은 다음 몇가지로 요약[38]할 수 있는데 (1) 칼슘을 매개로 하는 글루탐산염 흥분독성(excitotoxicity), (2) 단백질 합성의 장애 (3) 열충격단백질(heat shock protein) (4) 지질대사 및 유리산소기(free radical)에 의한 손상 (5) 에너지대사이상 (6) Apoptosis (7) 미토콘드리아 유전자 및 대사의 이상 등이다.

이에 저자는 임상에서 多用하고 있는 補陽還五湯이 Reversible forebrain ischemia모델에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, MG의 총경동맥을 5분동안 결찰시킨 후 수술 7일째 동물을 희생시켜 뇌조직의 수분함량 측정, 광학현미경 소견을 기초로 한 해마형성체와 대뇌피질의 신경세포의 활성화 정도를 관찰하였다.

뇌허혈에 의한 뇌부종은 여러원인의 상해에 의하여 초기에 세포막의 energy dependent ion pump가 제기능을 못하게 되고, 이러한 저해작용에 의하여 신경세포의 세포외공간(extracellular space)으로부터 ions · water 등이 세포내공간(intracellular space)내로 과도하게 유입되는데 이 과정은 뇌허혈에 의한 신경독성물질인 glutamate의 유리로 인한 sodium ion의 투과성 증대때문에 더욱 증가되어진다[38]. 이에 따라 신경세포의 세포막의 안전성에 변화가 발생하여 투과성의 변화가 오며, 세포외공간에 존재하는 거대분자들이 세포공간과 모세혈관내공간(intravascular space)의 밀도차이에 의한 물리적인 확산으로 자유롭게 이동하게 된다. 이러한 large molecular compounds, ions, water의 이동은 extracellular edema를 유발시키고 결국 infarction이 발생한다[24].

본 연구에서 MG의 총경동맥을 5분 동안 결찰시킨 후, 수술 3일째와 7일째 동물을 희생시켜 뇌부종의 정도를 관찰한 결과, 대조군의 뇌실질 내 수분함량이 증가하였고, 실험군의 뇌실질 내 수분함량은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으므로, 補陽還五湯은 뇌부종을 제거하는 효과가 있는 것으로 생각되었다.

뇌허혈은 뇌조직의 다양한 생리학적 · 생화학적 · 형태학적 변화를 일으키며, 이때 해마의 피라미드세포, 선조체의 중간크기의 신경세포, 대뇌피질의 피라미드세포들은 선택적으로 퇴화가 일어난다[38]. 이들 가운데 대표적인 것이 대뇌피질과 해마의 피라미드세포들이며, 특히 해마의 CA1 지역에서의 신경세포의 선택적 감소는 결과적으로 심한 기억의 장애를 초래하게 된다[39]. 하지만 흥미롭게도 CA1 피라미드

세포는 일시적인 허혈 이후 바로 사망하지 않고 며칠이 지난 후 지연성으로 사망에 이르게 된다[37]. 그러나 CA3 지역과 치상회 지역(dentate gyrus)은 비교적 신경세포의 손상이 심하지 않다[40].

손상받은 신경세포들의 형태학적 변화는 두가지 형태로 나눌 수 있는데 반응성 변화(reactive change)와 허혈성 세포변화(ischemic cell change)가 그것이다. 전자의 경우는 Nissl소체의 호반융해(chromaatolysis)를 초래하는 세포손상의 초기변화이며, 후자는 신경세포손상의 전형적인 병리학적 변화를 초래하는 것이다. 그러나 아직까지 이러한 신경세포의 취약성의 차이에 대해 명확하게 그 기전이 밝혀진 것은 없다.

본 연구에서는 총경동맥 결찰 수술 후 7일이 지난 후의 MG의 해마의 변화를 관찰하였는데 CA1 지역과 CA3 지역을 중심으로 피라미드세포의 상해를 관찰할 수 있었다. 상해정도를 관찰해 보면 피라미드세포의 배열이 불연속적이고 세포질은 부어서 세포의 크기가 증가되어 있고 핵은 수축되어 있는 전형적인 괴사의 형태를 취하고 있었다. 그러나 실험군에서는 허혈로 인한 CA1 지역의 상해정도가 대조군에 비하여 현격히 줄어들었고 세포의 상해정도도 많이 향상된 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 본 연구의 의의를 특정 취약 신경세포의 보호를 위한 적절한 치료체계의 개발이라는 의미에서도 찾을 수 있을 것이며, 補陽還五湯은 Mongolian gerbil의 가역성 전뇌허혈로 인한 뇌세포 손상을 감소시키는 것으로 생각된다.

결 론

補陽還五湯이 Reversible forebrain ischemia모델에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 모래쥐의 일종인 Mongolian Gerbil(MG)을 이용하여, 뇌조직의 수분함량 변화 및 광학현미경에 의한 신경세포손상 정도를 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 뇌조직의 수분함량 변화는 정상군이 3일째와 7일째에 각각 78.90%, 79.12%였으며, 대조군이 80.34%와 81.72%로 증가하였다. 실험군은 79.85%와 80.97%로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.
2. 광학현미경적 소견으로는 해마형성체의 피라미드 세포층에서 연속적이고 규칙적으로 나타나던 세포들이 대조군에서는 불연속적이고 불규칙적으로 바뀌어졌고, 실험군에서는 대조군보다 상해정도가 미약하였다.

참고문헌

1. 경제기획원 조사통계국. 사망원인통계연보(인구동태신고에 의한 집계). 1989;91.
2. 이용석, 윤병우, 노재규. Gerbil의 일과성 전뇌허혈모델에서 Lamotrigine에 의한 해마의 지연성 신경세포 손상 감소효과. 대한신경과학회지. 1998;16(2):113-117.
3. 김영석. 임상중풍학. 서울;서원당. 1997;498-509.
4. 강화정, 황치원. 중풍초기환자에 대한 방풍통성산의 임상적 연구. 한·중 중풍병 학술대회 참가 논문집. 1994;259-291.
5. 김민석, 정승현, 신길조, 이원철. Functional Independence Measure를 이용한 뇌졸중 환자의 임상적 관찰. 대한한방내과학회지. 1998;19(1):97-113.
6. 김동웅. 졸중풍 후유증에 의한 운동장애 환자의 치료를 위한 通用方으로서 萬金湯과 補陽還五湯의 효과에 관한 비교 연구. 대한한의학회지. 1994;15(2);233-240.
7. 王清任. 醫林改錯. 北京;中國中醫學出版社. 1995;34,40-41.
8. 中國中醫研究院廣安門醫院. 活血化瘀名家王清任. 北京;中國科學技術出版社. 1988;25, 44-45,56-57.
9. 王臨江, 王佩芳. 補陽還五湯的臨床及實驗研究進展. 上海中醫藥雜誌. 1995;3:39-42.
10. 李安國, 賀石林, 鄭常青, 彭延古. 補陽還五湯對血管壁抗血栓功能的影響. 中西醫結合雜誌. 1989;9;545-547
11. 段登志, 薛朝霞, 陳黎明, 鄒蓮芳, 龔華學, 史玉蓉. 加減補陽還五湯的抗血栓形成和溶血栓作用. 雲南中醫雜誌. 1992;13:23-25.
12. 譚峰, 歐正武, 李安國, 李暉, 賀石林, 虞佩蘭, 張寶林, 彭隆祥, 文幷連. 補陽還五湯對實驗性腦水腫氧自由基與細胞超微結拘變化的影響. 中國中西醫結合雜誌. 1992;12:538-540.
13. 何保儀. 補陽還五湯降血液粘度臨床64例报告. 河南中

醫雜誌. 1991;11:23.
14. 曹波. 補陽還五湯在腦卒中的應用. 福建中醫藥. 1988;2:61.
15. 王行洁, 周孝達, 錢可久. 補陽還五湯治療腦血栓形成的臨床及血液流變學觀察. 中醫雜誌. 1984;6:434.
16. 王存民. 補陽還五湯加味治療無精症7例. 新中醫. 1992;9:38.
17. 緱强. 補陽還五湯治特發性水腫. 新中醫. 1987;8:47.
18. 劉玉英. 補陽還五湯治愈小兒偏風1例. 中醫雜誌. 1987;10:30.
19. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. Neurochemistry. 1984;43:1369-1374.
20. Toru Matsui, Hiroshi Sinyama, Takao Asano. Beneficial effect of prolonged administration of albumin on ischemic cerebral edema and infartion after occlusion of middle cerebral artery in rats. Neurosurgery. 1993;33:293-300.
21. Bamford J, Dennis M, Sandercock PAG, Burn J, Warlow C. The frequency, causes and Timing of Death within 30 Days of a First Stroke: The Oxfordshire Community Stroke Project. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1990;53:824-829.
22. 명호진, 이상복, 노재규, 윤병우, 이원용, 김명호, 김주한, 위봉애, 정진상, 권오상. 최근 국내 뇌졸중의 역학적 동향에 대한 연구. 대한신경과학회지. 1989;7:179-187.
23. Hideaki Hara, Takayuki Sukamoto, Kyuya Kogure. Mechanism and Pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. Progress in Neurobiology. 1993;40:645-670.
24. Walter J Koroshetz, Michael A Moskowitz. Emerging treatments for stroke in humans. TiPS. 1996;17:227-233.
25. Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calciumrelated pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. J Cereb Blood Flow Metab. 1989;9:127-140.
26. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NS. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. J Neurochem. 1984;43:1369-1374.
27. Park CK, Nehls DG, Graham DI, Teasdale GM, Mcculloch J. The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. Ann Neurol. 1988;24:543-551.
28. Woodruff GN, Foster AC, Gill R, Kemp JA, Wong EH, Iversen LL. The interaction between MK-801 and receptors for N-methyl-D-aspartate: functional consequences. Neuropharmacology. 1987;26:903-909.
29. Mohamed AA, Gotoh O, Graham DI, Osborne KA, McCulloch J, Mendelow AD, Teasdale GM, Harper AM. Effect of pertreatment with the calcium antagonist nimodipine on local cerebral blood flow and histopathology after middle cerbral artery occlusion. Ann Neurol. 1985;18:705-711.
30. Son EI, Cho HJ, Hong HS, Kang J. The distribution of substance P, neurotensin or vasoacive intrestinal polypeptide containing neu-rons and axon terminals in the periaqueductal gray of the rat. Kor J Anat. 1995;28(1):107-116.
31. Vallet P, Bouras C, Barberis C, Dreifuss JJ, Dubois DM. Vasopressin binding in the cerebral cortex of the Mongolian gerbil is reduced by transient cerebral iscemia. J Comp Neurol. 1995;362(2):223-232.
32. Nakano S, Kogure K, Fujikura H. Ischemia-induced slowly progressive neuronal damage in the rat brain. Neuroscience. 1990;38:115-124.
33. Kirino T, Sano K. Fine structural nature of deleyed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. Acta Neuropathol. 1984;62:209-218.
34. Yamamoto K, Hayakawa T, Mogami H, Akai F, Yanagihara T. Ultrastructural investigation of the CA1 region of the hippocamupus after transient cerebral ischemia in gerbil. Acta Neuropathol. 1990;80:487-492.
35. Kirino T, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. Acta Neuropathol. 1984;62:201-208.
36. Van Harreveld A, Fifkova E. Effect of metabolic inhibitors on the release of glutamate from the retina. Neurochem. 1972;19:1439-1450.
37. Pulsinelli WA, brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain

ischemia. Ann Neurol. 1982;11:491-498.

38. Petito CK, Feldmann E, Pilsinelli WA, Plum F. Deleyed hippocampal demage in humans following cardiorespiratory arrest. Neurology. 1987;37:1281-1286.
39. Traft WC, Clifton GL, Blair RE. Phenytoin protects against ischemia-produced neuronal cell death. Brain Res. 1989;483:143-148.
40. Hideaki H, Takayuki S, Kyuya K. Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. Progress in Neurobiology. 1993;40:645-670.