

祛風至寶丹이 Mongolian Gerbil의 가역성 전뇌허혈 모델에 미치는 영향

정완우, 정승현, 박인식*, 신길조, 이원철

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 해부학교실*

The Effect of Geupoongjibo-dan Extracts on Reversible Forebrain Ischemia in Mongolian Gerbil

Wan-Woo Jeong, Sung-Hyun Jeong, In-Sick Park*, Gil-Cho Shin, Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, Dept. of Anatomy*, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : The purpose of this investigation is to evaluate the effect of Geupoongjibo-dan Extracts on Reversible Forebrain Ischemia in Mongolian Gerbils.

Methods : The change rate of water content in cerebral tissues, the numerical change of the CA1 pyramidal neuron in the hippocampus, the change of delayed neuronal death(necrosis · apoptosis) through light microscopy, the reactivity change of glycoprotein in neuronal membrane and the ultrastructural change of pyramidal neuron through electron microscopy caused by delayed neuronal death were investigated.

Results :

1. The change rate of water content in the normal group showed 78.90% on the third day, and 79.12% on the seventh day after an attack of ischemia. The rate in the control group showed 82.25% and 85.13%, respectively. The rate in the sample group showed a significant decrease: 81.72% and 83.66%.
2. Light microscopy revealed that the cells, continuous and systematic forms in the pyramidal cells of hippocampus, changed into discontinuous and unsystematic forms in the normal group when compared with the control group. The cells were less damaged in the sample group.
3. The mean of the numerical change of the CA1 pyramidal neurons in the hippocampus was 104 in the normal group. The mean of the control group was decreased to 27. The mean of the sample group was 44.
4. TUNEL staining examination reveals that the whole part of the hippocampus of the normal group had negative reactivity. As far as CA1 pyramidal neurons in the hippocampus, the control group had positive reactivity. The sample group was more positive than the control group.
5. Electron microscopy reveals that the ischemic injury of the control group had both necrotic and apoptotic morphology. The sample group was less necrotic, and more apoptotic morphology than the control group.
6. Lectin histochemical examination reveals that the normal group had positive reactivity to PNA and SBA in interneuron, and weak positive reactivity to WGA · Con A · LCA in intercellular space. The reactivity to PNA and WGA decreased in the control group. The reactivity to PNA and WGA tended to increase in the sample group.

Conclusions : The data shows that the effect of Geupoongjibo-dan Extracts on Reversible Forebrain Ischemia in MG is a significant result.

Key Word : Geupoongjibo-dan extracts, Reversible forebrain ischemia, Mongolian Gerbil

I. 緒 論

中風은 주로 風·火·濕痰·瘀血·虛等[1]이 原因으로, 그 輕重에 따라 中經絡·中腑·中臟으로 나뉜다.[2] 中臟腑는 閉證과 脫證으로 분류되며, 閉證은 熱象

의 有無에 따라 陽閉와 陰閉로 세분되는 데, 특히 陽閉증은 辛涼開竅·清肝熄風·清熱化痰 등의 治法[3]을 사용한다.

祛風至寶丹은 明代 朱의 丹溪心法(1481年)에 수록된 처방으로,喻는祛風至寶丹이 中風의 專方이라고 하여 그 중요성을 강조

하였다[3]. 本方은 防風通聖散에 補氣하는 人蔘, 益血하는 熟地黃, 除熱하는 黃柏·黃連, 祛風하는 羌活·獨活·天麻·細辛·全蝎을 加하여 구성된 處方으로 祛風清熱의 효능이 있어, 臨床에서 中風昏倒·精神蒙昧 등에 救急處方으로 活用되고 있다.[4]

腦血管疾患時 血流障礙로 인한 虛血은 신경세포 손상을 일으키는데, 원인 인자로는 acidosis, 칼슘 향상성의 변화,

접수: 2001년 6월 30일 채택: 2001년 7월 21일
교신저자: 정승현 (경북 경주시 용강동 357 동국대학교 경주한방병원 3내과, 전화: 054-770-1577, H·P: 011-505-2382,
E-mail: omdjeong@hanmail.net)

Table 1. The Amount and Composition of Geupoongjibo-dan

Species	Part used	Latin name	Weight(g)
Talcum	Mg ₃ (Si ₄ O ₁₀)(OH) ₂	Talcum	3.0
Cnidium officinale MAKINO	Roots	Cnidii Rhizoma	2.5
Angelica gigas NAKAI	Roots	Angelicae Gigantis Radix	2.5
Glycyrrhiza uralensis FISCH.	Roots	Glycyrrhizae Radix	2.0
Lebedouriella seseloides(HOFFM.) WOLF.	Roots	Lebedouriellae Radix	1.5
Paeonia lactiflora PALL.	Roots	Paeoliae Radix	1.5
Atractylodes macrocephala KOIDZ.	Roots	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	1.3
Gypsum	CaSO ₄ · 2H ₂ O	Gypsum Fibrosum	1.0
Scutellaria baicalensis GEORG.	Roots	Scutellariae Radix	1.0
Platycodon grandiflorum A. DC.	Roots	Platycodi Radix	1.0
Rehmannia glutinosa LIBOSCHITZ	Roots	Rehmanniae Radix	1.0
Gastrodia elata Bl.	Rhizomes	Gastrodiae Rhizoma	1.0
Panax ginseng C.A. MEY.	Roots	Ginseng Radix	1.0
Ostericum koreanum KITAGAWA	Rhizomes	Rhizoma Notopterygii	1.0
Aralia continentalis KITAGAWA	Roots	Angelicae Pubescens Radix	1.0
Gardenia jasminoides ELLIS.	Fruits	Fructus Gardeniae	0.6
Forsythia koreana NAKAI.	FruitsFructus	Forsythiae	0.5
Schizonepeta tenuifolia var. japonica KITAG.	Herb	Herba Schizonepetae	0.5
Mentha arvensis var. piperascens MAK	Herb	Herba Menthae	0.5
Ephedra sinica STAPF	Herb	Ephedrae Herba	0.5
Mirabilite	Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	Natrii Sulfas	0.5
Coptis japonica MAKINO	Rhizomes	Rhizoma Coptidis	0.5
Rheum coreanum NAKAI	Roots	Rhei Rhizoma	0.5
Phellodendron amurense RUPRECHT	Barks	Phellodendri Cortex	0.5
Asarum sieboldii MIQUEL	Roots	Asiasari Radix	0.5
Buthus martensi KARSCH	Body	Scorpio	0.5
Total			27.8

glutamate의 과도한 방출 및 glutamate 수용체의 과다한 흥분에 의한 홍분독성, 산소자유기 등이 있다⁵. 이들은 급성신경세포사(acute neuronal death) 및 지연성신경세포사(delayed neuronal death) 모두와 관련^{5,6}이 있는데, 최근에는 뇌조직의 괴사과정(necrotic process) 외에 apoptosis가 뇌허혈의 실험모델에서 신경세포사의 원인이 된다는 보고⁶가 증가하고 있다.

뇌허혈에 대한 한약제제의 실험적 연구로는 星香正氣散⁷ · 蘇合香元⁸ · 六一順氣湯⁹ · 補陽還五湯¹⁰ · 大造丸¹¹ · 黃連解毒湯¹² 등이 보고된 바 있으나, 中風의 急症에 사용되는 祜風至寶丹이 가역성 전뇌허혈 모델에 미치는 영향에 대한 연구는 없었다.

이에 著者는 祜風至寶丹의 허혈성 뇌

졸중에 대한 효능을 실험적으로 규명하기 위하여, 모래쥐의 일종인 Mongolian Gerbil(MG)을 이용하여 광학현미경상 해마형성체 内 pyramidal neuron의 수적 변화, 뇌조직의 수분함량 변화, 투과전자현미경상 지연성신경세포사로 인한 pyramidal neuron의 미세구조 변화, 지연성신경세포사의 변화 및 neuronal membrane의 당단백질 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 動物

실험동물은 동아대학교 의과대학 생리학교실에서 분양받은 수컷 Mongo-

lian gerbils(Merious unguicalatus, 60-80g)로서, 사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있게 하였으며, 빛과 어둠을 12시간씩 제공하였다.

실험동물은 정상군, 가역성 전뇌허혈 모델 유발군인 대조군 및 가역성 전뇌허혈 유발 후 祜風至寶丹을 투여한 실험군으로 각각 분류하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용된 祜風至寶丹의 處方 내용은 朱의 丹溪心法¹³에 의거하였으며, 약물의 제조는 동국대학교 한방병원에서 10첩 분량을 분쇄한 후 꿀을 이용하여 조제하였다(Table 1).

2. 方法

1) 가역성 전뇌허혈의 유발 및 악재 투여

가역성 전뇌허혈을 유발하기 위하여 Benveniste 등¹³이 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 온도가 자동으로 조절되는 보온판을 사용하여 37°C로 체온을 유지시켰다.

동물의 목의 정중선을 절개하여 양쪽의 총경동맥(common carotid artery)을 노출시키고 미주신경(vagus nerve)과 분리시킨 후 미세혈관 clip을 이용하여 양쪽의 총경동맥을 동시에 5분동안 결찰(bilateral carotid artery ligation)시켜 일시적인 전뇌허혈(transient forebrain ischemia)을 유발시켰다. 그 후 혈관에서 미세혈관 clip을 분리시킨 후 혈류의 재순환을 확인하고 봉합하였다.

본 연구를 위하여 가역성 전뇌허혈을 유발시킨 실험동물을 대조군과 실험군으로 각각 나누었다. 먼저 대조군은 보통의 조건하에서 7일동안 생존시켜 실험에 사용하였고, 실험군은 禦風至寶丹(0.1g)을 종류수 (0.8 ml)에 녹여 1.67g/kg을 1일 2회, 7일간 구강투여한 후 희생시켜 실험에 사용하였다.

2) 뇌실질의 수분함량 변화 측정

가역성 전뇌허혈 실험에 의해서 야기되는 뇌실질의 수분함량은 wet-dry weight method¹⁴로 측정하였다. 먼저 뇌조직표본의 중량(wet weight)을 얻기 위하여 화학저울에서 무게를 0.1mg 단위까지 측정하고, 그 조직을 dessica-

ting oven에서 120°C로 48시간동안 건조시킨 후, 다시 dessicating jar에 넣고 20분동안 진공상태(vacuum)하에 방치하고 그 조직의 건조중량(dry weight)을 측정하였다. 젖은 조직 kg당 liter로 표시되는 수분함량은 $(W-D)/W \times 100(\%)$ 로 계산하였다.

3) 조직화학 염색을 위한 표본제작

신선한 뇌조직 표본을 얻기 위해서 심장을 통한 관류고정(cardiac perfusion fixation)을 실시하였다. 외과적 수술 72시간 후 생존한 모든 동물의 복강에 sodium pentobarbital(40mg/kg)을 주사하여 마취시킨 후 전흉벽을 열어 좌심실에서 대동맥으로 카테터를 삽입하고 30ml의 생리식염수를 주입하면서 우심방의 심방귀부분을 열어 혈관내의 혈액을 제거하였다. Paraffin 포매용으로는 500ml 10% neutral buffered formalin(pH 7.4, 4°C)으로 관류고정시켰으며, 뇌는 적출하여 다시 동일고정액으로 24시간 동안 후고정을 실시하였다. 후고정 후 tap water에서 충분히 세척하고, 통상적인 방법으로 탈수과정을 거친 다음 paraffin에 포매하고 조직절편기(Microtome, American optical Co.)를 이용하여 제작된 연속 조직절편에서 30μm마다 한 장씩 5μm 두께의 조직을 취하여 gelatin을 입힌 slide glass에 얹어 신전기(slide warmer)에서 2~4시간 동안 건조시킨 후 염색에 이용하였다.

4) Apoptosis 관찰을 위한 면역조직화학 염색

조직의 apoptosis 발현을 확인하기 위해 모든 표본은 TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 방법¹⁵을 수정, 보완하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. 5μm 두께의 paraf-

fin 절편을 xylene으로 paraffin을 제거하고 100%, 95%, 85%, 70% 및 50% ethanol로 처리한 후 중류수에 담구어 가수시켰다. Peroxidase는 이 실험에서 발색을 일으키는 효소로 조직 내에 존재하는 endogenous peroxidase를 방치할 경우 거짓양성반응이 나타나게 된다. 이 효소의 활성을 방지하기 위해 0.5% 과산화수소가 혼합된 100% methanol로 처리한 후 PBT[PBS (phosphate buffered saline)에 0.1% Triton X-100을 녹인 용액]로 씻어 내었다. 조직 내의 단백질은 50mM Tris-HCl, 5mM의 EDTA(pH 8.0) 및 77g/ml의 proteinase K가 혼합된 용액을 10분간 처리함으로서 그 기능을 억제시킨 후, Tdt(Terminal deoxynucleotidyl transferase) buffer(Boeringer Mannheim, Germany)로 씻어 내었다. 그 후, Tdt enzyme(Boeringer Mannheim, Germany)과 biotinylated dUTP (Boeringer Mannheim, Germany)가 혼합된 용액(Tdt enzyme, Tdt buffer, 25mM Cobalt chloride, biotinylated dUTP)을 조직에 처리한 후 plastic coverslip으로 덮고, 37°C humidified chamber에서 1시간동안 방치하였다. 효소 처리를 마친 조직은 TB buffer (300mM NaCl, 30mM Sodium citrate) 용액에 실온에서 15분간 방치한 후, 2% BSA(Bovine serum albumin) 용액으로 실온에서 10분간 방치하고 PBS로 씻어 낸 즉시 peroxidase ABC(VectastainABC kit, Veftor Laboratories, Inc., Burlingame, CA 94010, USA) 용액을 조직 위에 가하여 37°C humidified chamber에서 1시간 동안 incubation하였다. 발색은 0.02% 과산화수소를 함유한 DAB(diaminobenzidine, Sigma Chemical Co., St.

Louis, USA) 용액으로 염색하고 증류수로 수세한 후 Mayer's hematoxylin으로 1분간 대조염색을 시행하고 암모니아수로 처리하여 canada balsam (Hayashi Pure Chemical Industries, Japan)으로 봉입하였다. TUNEL 면역 조직화학 염색 양상들을 비교하기 위해 대조군을 양성, 음성 대조군으로 나누어 각각의 경우 다음과 같이 처리하였다. 양성대조군은 paraffin을 제거한 후, DN buffer(30 mM Trizma base, pH 7.2, 140 mM Potassium cacodylate, 4mM MgCl₂, 0.1 mM Dithiothreitol)로 전처리한 후, 각 절편에 DN buffer에 녹인 DNase I(17g/ml-100ng/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 첨가하여 15분간 실온에서 incubation을 시행한 후, 절편을 이차증류수로 씻어내고 TUNEL 방법에 의해 염색하였다. 음성 대조군은 TUNEL 방법 중 Tdt 효소만을 뺀 sham stain을 시행하였다.

5) 전자현미경 관찰을 위한 표본 제작 실험동물을 sodium pentobarbital 용액으로 마취시킨 후 37°C의 생리식염수 20ml로 심장 관류시켜 혈관 속의 혈액을 제거하고, 150ml의 half karnovsky (0.5% paraformaldehyde와 2% glutaraldehyde) 용액으로 심장관류과정을 시행하였다. 그 후 뇌를 적출하고 hippocampus 부위를 trimming한 다음, 1×1×3 mm의 크기로 세절하고 동일고정액에 2시간 더 고정하였다. 그 후 osmium tetroxide에 2시간동안 후고정을 시행하였다. 후고정된 조직은 2% uranyl acetate 용액에서 90분동안 block 염색을 시행한 후, 알코올의 농도 상승순으로 50%, 60%, 70%, 80%, 95% 및 100%에 두어 탈수시킨 후

Table 2. Sugar Specificities of Lectins

Lectin	Optimum dilution	Sugar specificity
Con-A	5g/ml	α-mannose
LCA	20g/ml	α-mannose
PNA	10g/ml	galactosyl-1,3-N-acetylgalactosamine
SBA	4g/ml	D-N-acetylgalactosamine
UEA I	0.5 g/ml	α-galactose
WGA	2g/ml	N-acetylglucosamine

Con-A, Concanavalin A; LCA, Lens Culinaris Agglutinin; PNA, Peanut Agglutinin; SBA, Soybean agglutinin; UEA I, Ulex europaeus agglutinin; WGA, Wheat germ agglutinin

propylene oxide에서 1시간, propylene oxide와 epon 수지(1:1의 비율)에서 1시간, epon 수지에서 하루밤동안 둔 뒤 epon 수지(EMbed 812, EMS, USA)로 포매하여 60°C 배양기에서 중합시켰다. 그 후 중합된 epon block은 ultramicrotome(Sorval, Germany)을 이용하여 1μm 두께로 박절편(semithin section)을 만들어 1% toluidin blue 액으로 염색하고, 그 염색표본을 광학현미경(Axiokope, zeiss Germany)으로 관찰하여 목적부위를 선택하였다. 목적부위만을 남기고 모두 trimming하고 다시 ultramicrotome(Nova, Germany)을 이용하여 60-90nm 두께의 초박절편을 만들어 nickel grid 위에 올린 뒤 전조시킨 후 전자염색을 시행하였다. 전자염색은 2% uranyl acetate 용액에 15분간 둔 뒤 증류수로 잘 세척하고 lead citrate 용액에 8분간 둔 뒤 다시 증류수로 잘 세척하여 시행하였다. 그 후 전자현미경(JEM-1200 EX, Jeol, Japan)으로 80 KV에서 관찰하였다.

6) Lectin 조직화학 염색

허혈로 인한 hippocampus의 복합당질(glycoconjugate) 변화 및 약제의 효과를 관찰하기 위하여 concanavalin A(Con-A), lens culinaris agglutinin(LCA), peanut agglutinin(PNA), soybean agglutinin(SBA), ulex

europaeus agglutinin I(UEA I) 및 wheat germ agglutinin(WGA) 등 6종의 lectin을 이용한 면역조직화학적 염색¹⁶을 실시하였다. 실험방법은 우선 paraffin으로 포매하여 만들어진 조직표본을 반응액인 0.1 mM의 CaCl₂, MnCl₂ 및 MgCl₂를 함유한 0.01 M PBS(pH 7.0)용액으로 끓기고, 3% H₂O₂를 함유한 methanol액으로 30분간 반응시켜 내인성 peroxidase의 활성을 저해시킨 후 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 5% 정상 토끼 혈청(normal rabbit serum)으로 30분동안 처리하였다.

본 연구에 사용한 lectin(Vector Lab., USA)의 종류를 Table II에 나타내었다. 모든 lectin은 비오틴화(biotinylated)한 것을 사용하였으며, 각 lectin들을 반응액에 10~40g/ml의 농도로 회석하여 실온에서 2시간동안 반응시켰다. PBS로 3차례 수세한 후 avidin-biotin-horseradish peroxidase 복합체(Vector Lab., USA)로 실온에서 1시간동안 반응시켰다. PBS로 수세한 후 0.01% H₂O₂와 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(Sigma, USA)이 포함된 0.05M tris-HCL완충 용액(pH 7.4)으로 발색시켰으며, hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. Lectin반응의 강도는 -(음성), +(약한 양성) 및 ++(중정도의 양성) 등

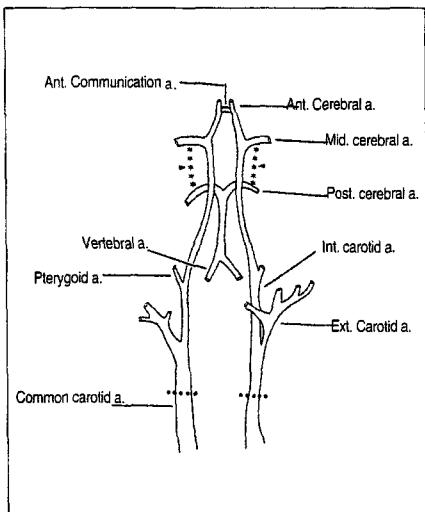


Fig. 1. Arteries of mongolian gerbil brain.
Solid triangle(▶) is deletion of posterior communicating artery.
Solid circle(●) is global forebrain occlusion site.

으로 표시하였다.

7) 결과분석

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

III. 結 果

본 연구에서 MG를 pentobarbital sodium으로 마취하여 미주신경(vagus nerve)을 분리하여 총경동맥을 결찰하고, 5분 후 결찰을 해제하였다(Fig. 1). 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 변화는 보이지 않았다.

1. 뇌조직의 수분함량 변화

총경동맥을 5분동안 결찰한 후 혈액

Table 3. Effect of Geupoongjibo-dan on Water Contents Change(%) in the Reversible Forebrain Ischemia of Mongolian Gerbil

Group	3 days(%)	7days(%)
Normal	78.90±0.42*	79.12±0.76
Control	82.25±0.23	85.13±0.76
Sample	81.72±0.11*	83.66±0.21*

a) Mean ± Standard Error

Normal : Normal mongolian gerbils

Control : Reversible forebrain ischemia elicited mongolian gerbils

Sample : Reversible forebrain ischemia elicited mongolian gerbils with Geupoongjibo-dan treatment

* P < 0.05 compared with control group

을 재관류시킨 MG를 3일과 7일간 각각 둔 후 희생시켜 뇌조직의 수분함량 정도를 측정한 결과, 정상군에서는 3일째에 평균 78.90%, 7일째에 79.12%로 각각 나타났으며, 대조군에서는 82.25%와 85.13%로 각각 나타나 정상군보다 훨씬 증가하였다. 실험군에서는 81.72%와 83.66%로 각각 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타내었다(P < 0.05)(Table 3. Fig. 2).

2. 광학현미경 소견

조직화학 염색법을 이용한 본 연구의 결과를 보면 다음과 같다.

정상군(Fig. 4) : 해마형성체의 CA1 지역은 약 5층 정도의 pyramidal neuron으로 구성되어 있었다. Pyramidal neuron은 대뇌피질 부위로 축삭을 내고 치아이랑 부위 쪽으로 많은 가지들기를 내는 것으로 알려져 있는데, 광학현미경으로 관찰한 결과 pyramidal layer에는 다극성의 전자밀도가 낮은 큰 핵을 가진 신경세포가 위치하고 있었으며 많은 가지들기의 모습도 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

대조군(Fig. 6) : CA1지역의 pyramidal neuron의 수가 정상군에 비하여 적었으며 불연속적으로 나타나고 있었다. 피라미드층 속에 변형·소실되는 많은 신경세포를 관찰할 수 있었는데, 이들은 toluidine blue 용액에 질게 염색되고

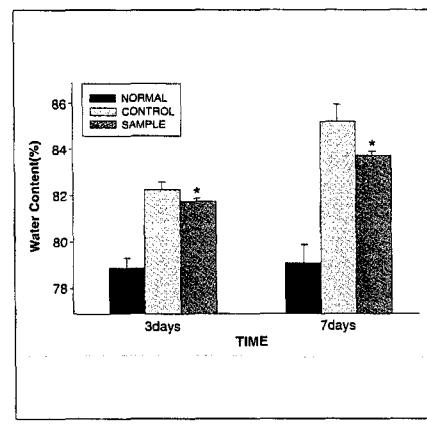


Fig. 2. Effect of geupoongjibo-dan on water contents change(%) in the reversible forebrain ischemia of mongolian gerbils

Normal : Normal mongolian gerbils

Control : Reversible forebrain ischemia elicited mongolian gerbils Sample : Reversible forebrain ischemia elicited mongolian gerbils with geupoongjibo-dan treatment

* P < 0.05 compared with control group

일부는 세포의 모습이 수축되어 나타나기도 하였다. 이 세포들은 세포질에 vacuole이 형성되어 팽창되었으며, 부분적으로 선택적 괴사의 형태를 나타내고 있었다(Fig. 7).

실험군(Fig. 8) : CA1지역의 pyramidal neuron은 대조군에 비하여 세포층이 규칙적으로 배열되어 나타나고 있었으며, 확장되는 세포질의 정도가 상대적으로 낮아져 세포자체의 크기가 감소되어 나타났다. 그러나 핵이 응축되거나 세포질이 팽창된 세포가 피라미드층을

Table 4. Effect of Geupoongjibo-dan on Number Change of Pyramidal neuron in CA1 area of Hippocampus in the Reversible Forebrain Ischemia of Mongolian Gerbil

	Normal	Control	Sample
Cell count	104.0±5.8310	27.4±6.1887	44.0±6.3246*

a) Mean ± Standard Dev.

Normal : Normal mongolian gerbils

Control : Reversible forebrain ischemia elicited mongolian gerbils

Sample : Reversible forebrain ischemia elicited mongolian gerbils with Geupoongjibo-dan treatment

* P < 0.05 compared with control group

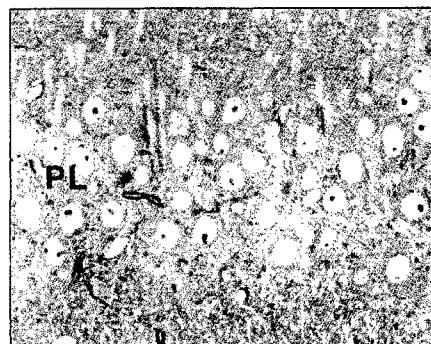


Fig. 4. Light micrograph of coronal section of normal hippocampus CA1 area of the Mongolian gerbil. PL ; pyramidal layer, Semithin section, Toluidine stain. ×200

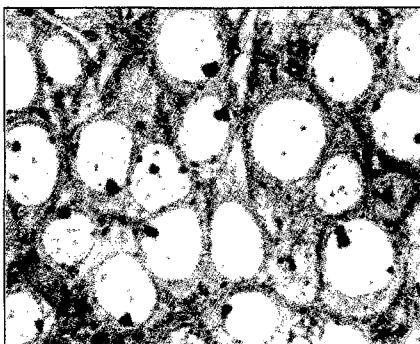


Fig. 5. Enlargement of Fig. 3. Semithin section, Toluidine stain. ×1,000

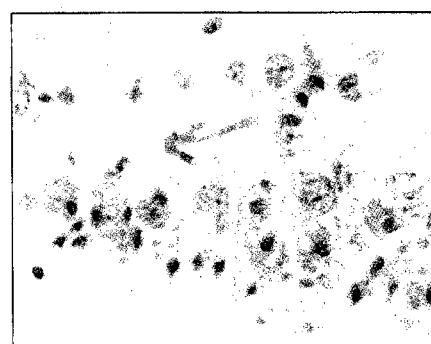


Fig. 6. Light micrograph of coronal section of control hippocampus CA1 area of the Mongolian gerbil. Note the number of neuron were decreased. Semithin section, Toluidine stain. ×200

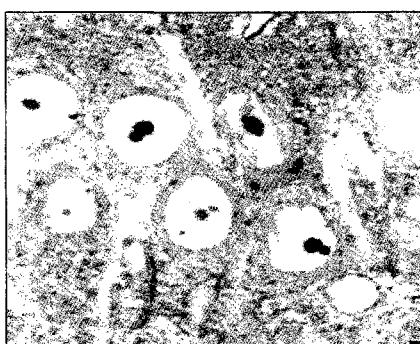


Fig. 7. Enlargement of Fig. 5. Semithin section, Toluidine stain. ×1,000

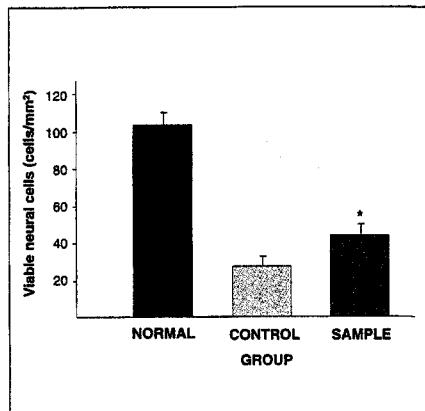


Fig. 3. Effect of geupoongjibo-dan on number change of pyramidal neuron in CA1 area of hippocampus in reversible forebrain ischemia of mongolian gerbils

a) Mean ± Standard Dev.

Normal : Normal mongolian gerbils

Control : Reversible forebrain ischemia elicited mongolian gerbils

Sample : Reversible forebrain ischemia elicited mongolian gerbils with geupoongjibo-dan treatment

* P < 0.05 compared with control group



Fig. 8. Light micrograph of coronal section of sample hippocampus CA1 area of the Mongolian gerbil. Note the dense stained neuron that were seemed to be damaged. Semithin section, Toluidine stain. ×200

비롯하여 전층에서 많이 발견되었다 (Fig. 9).

3. 해마형성체 CA1지역에 존재하는 pyramidal neuron의 개체수 변화

일시적인 뇌허혈에 의한 해마형성체 내의 pyramidal neuron의 생존여부를

조사하기 위하여 정상군, 대조군 및 실험군의 생존세포수를 세어 개체수의 변화를 조사하였다. 해마형성체 CA1지역 내의 pyramidal neuron의 세포수는 CA1지역의 중간부위를 선택하여 측정

Table 5. Lectin Binding Patterns in CA1 Area of Hippocampus

		pyramidal cell	interneuron	intercellular space(pyramidal layer)	intercellular space(extrapyramidal layer)
PNA	Normal	-	++	-	-
	Control	-	++	+	+
	Sample	-	++	-	-
WGA	Normal	+	+	+	+
	Control	+/-	+/-	+/-	+/-
	Sample	+	+	+	+
UEA I	Normal	-	-	-	-
	Control	-	-	-	-
	Sample	-	-	-	-
Con-A	Normal	+	+	+	+
	Control	+	+	+	+
	Sample	+	+	+	+
SBA	Normal	-	++	-	-
	Control	-	++	-	-
	Sample	-	++	-	-
LCA	Normal	+	-	+	-
	Control	+	-	+	-
	Sample	+	-	+	-

-: negative; +: weak positive; ++: moderate positive



Fig. 9. Enlargement of Fig. 7. Semithin section, Toluidine stain. $\times 1,000$

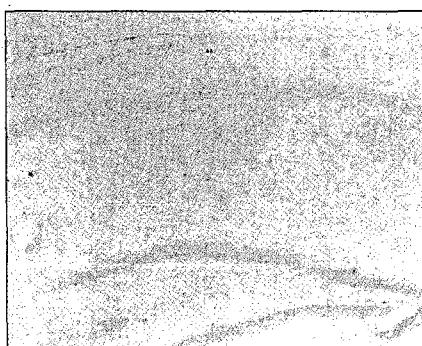


Fig. 10. Light micrograph of coronal section of normal hippocampus CA1 area of the Mongolian gerbil. There are no positive reaction in hippocampal complex. TUNEL stain. $\times 50$

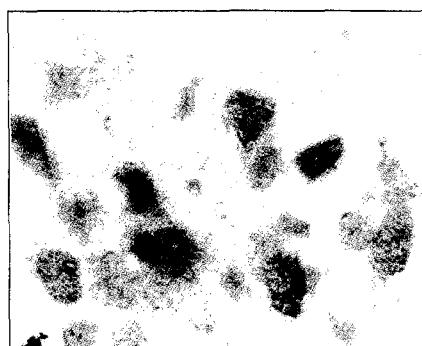


Fig. 11. Enlargement of control hippocampal CA1 area. Note the positive reaction of TUNEL were appeared in damaged pyramidal neuron. TUNEL stain. $\times 1,000$

하였다. 세포수 측정은 $1\mu\text{m}$ 의 두께로 절단한 semithin 표본에서 시행하였으며, 가로길이 1mm내의 살아 있다고 추정되는 세포수를 직접 세어서 나타내었다.

정상군에서 해마형성체 CA1지역에 존재하는 pyramidal neuron의 수는 가로길이 1mm내에 평균 104개의 세포가 존재하고 있었다. 대조군에서는 많은 세포가 없어지고 단지 평균 27개의 세포만이 살아 있는 것으로 관찰되었으나,

생존하고 있는 세포들의 세포질에서 그 물상의 vacuolation 등 세포의 모양이 많이 흘트려져 관찰되었다. 실험군에서는 평균 44개의 세포가 살아 있었는데, 살아있는 세포들 사이에 염색성이 높고 형태적으로 변형된 죽어가는 세포들을 많이 관찰할 수 있었으며, 살았다고 판정한 세포들 대부분은 정상세포의 모습으로 관찰되었다. 실험군은 평균 개체수

의 변화가 대조군에 비하여 유의성있게 관찰되었다($P<0.05$)(Table 4, Fig. 3).

4. TUNEL염색에 의한 Apoptosis 소견

TUNEL 방법을 이용하여 일시적인 뇌허혈 후 해마형성체에서의 신경세포 apoptosis를 조사한 결과는 다음과 같다.

정상군(Fig. 10)에서는 해마형성체의

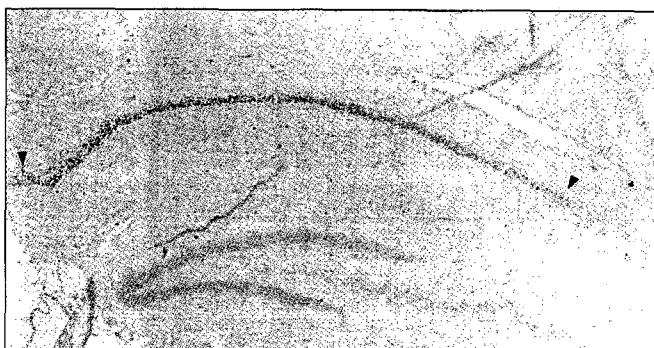


Fig. 12. Light micrograph of coronal section of control hippocampus of the Mongolian gerbil. Pyramidal neuron in CA1 region(~) only were positive reaction. TUNEL stain. $\times 50$

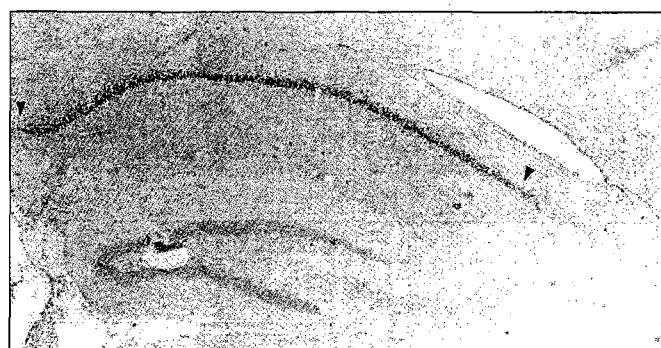


Fig. 13. Light micrograph of coronal section of sample hippocampus of the Mongolian gerbil. Pyramidal neuron in CA1 region(~)only were positive reaction. TUNEL stain. $\times 50$

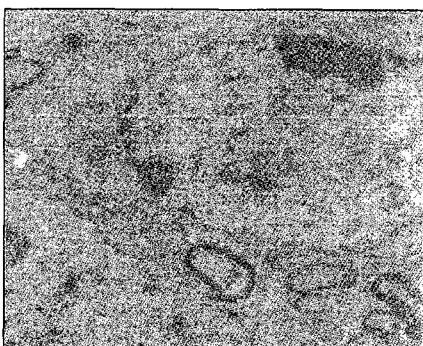


Fig. 14. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of normal group. $\times 6,000$

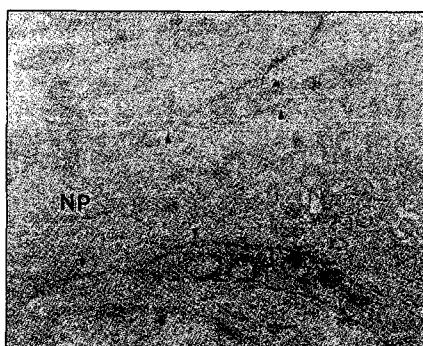


Fig. 15. Electron micrograph showing CA1 nerve process(NP) of normal group. Many neuronal filament were observed in nerve process. arrowhead ; cell membrane. $\times 8,000$

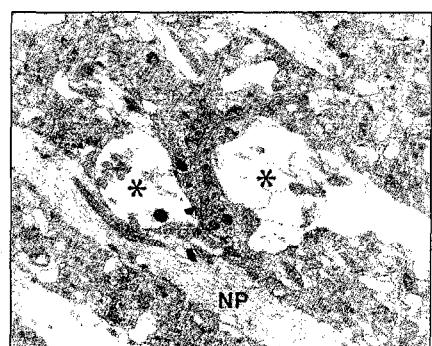


Fig. 16. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of control group(7days following 5 min transient ischemia). The necrosis of nerve process(*) were observed. The normal process(NP) contained mitochondria and neuro filament. $\times 5,000$

전반에 걸쳐서 음성반응을 나타내고 있었다.

대조군(Fig. 12)에서는 해마형성체의 CA1지역 pyramidal neuron에 국한하여 양성반응을 나타내고 있었는데, 신경세포의 세포질뿐만 아니라 핵질에서도 골고루 반응이 나타났으며, 반응양상이 과립모양(Fig. 11)을 하고 있어 핵과 세포질의 분절화현상으로 추정할 수 있었다.

실험군(Fig. 13)에서는 대조군에서와 같이 CA1지역의 pyramidal neuron에 국한하여 양성반응을 나타내고 있었으나, 대조군에 비하여 그 세포의 수가 증

가되어 있었다.

5. 전자현미경 소견

해마형성체내의 pyramidal neuron을 중심으로 주변조직에 대한 전자현미경 소견을 관찰하였다.

pyramidal neuron의 세포체(Fig. 14)는 타원형 또는 난원형이었다. 전반적인 핵의 모양은 난원형이었고 크기는 세포의 절반 이상이었으며 세포체의 중앙에 위치하고 있어 세포질이 핵의 주변부위로 몰려 있었다. 핵질은 주로 퍼진 염색질(euchromatin)로 구성되어 있었

으며 높은 전자밀도를 보이는 구형의 핵소체가 핵의 한쪽에 편재되어 나타났다. 한편 pyramidal neuron의 세포질내에는 과립세포질세망(rough endoplasmic reticulum), 골지복합체(Golgi complex), 사립체(mitochondria) 및 자유리보소체(free ribosome) 등의 세포소기관이 잘 발달되어 있었고, 용해소체(lipozyme) 및 리포푸신과립(lipofuscin granule)도 소수 관찰되었다. 이들 소기관 중에서 막대모양의 사립체는 세포질내에 비교적 고루 산재되어 있었고, 과립세포질세망 및 골지복합체도 세포



Fig. 17. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of control group(7days following 5 min transient ischemia). The swelling of cytoplasm and the nucleus shrinkage were observed. arrowhead ; cell boundary,N ; nucleus. $\times 5,000$

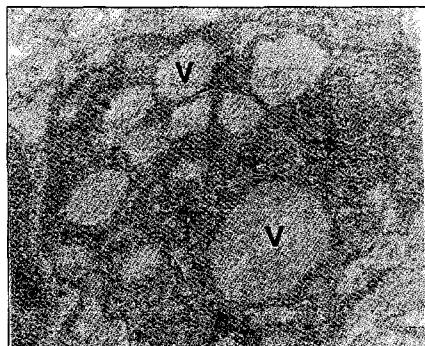


Fig. 18. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of control group(7days following 5 min transient ischemia). The cytoplasm of neuron are darkly stained and very irregular in shape and shrunken. These neurons are contained many large vacuoles(V). $\times 20,000$

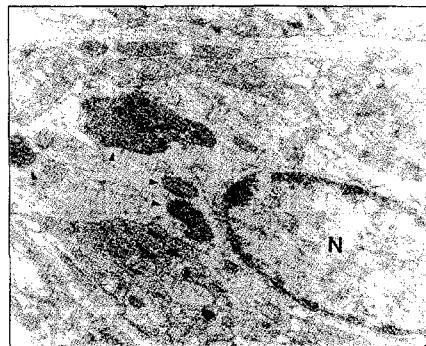


Fig. 19. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of control group(7days following 5 min transient ischemia). One pyramidal neuron shows very dark and shrunken cytoplasm which looks like apoptosis. N ; nucleus, arrowhead ; apoptotic body. $\times 8,000$

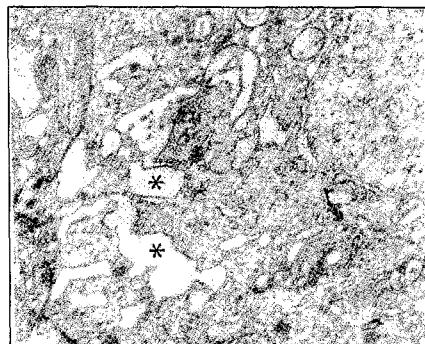


Fig. 20. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of control group(7days following 5 min transient ischemia). The rough endoplasmic reticulum(*) were slightly swelled. $\times 10,000$

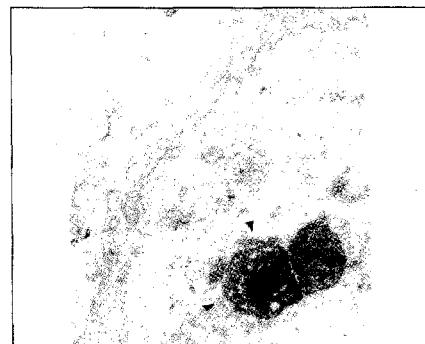


Fig. 21. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of control group(7days following 5 min transient ischemia). Some pyramidal neuron had wheel shaped electron dense material(arrowhead). $\times 5,000$

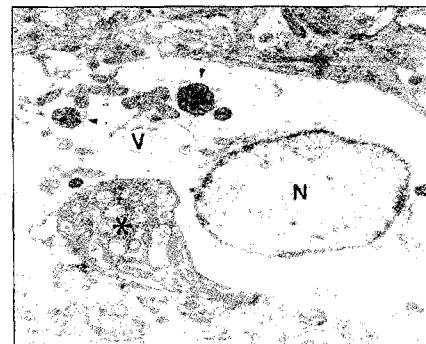


Fig. 22. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of sample group(7days following 5 min transient ischemia + Geupoon gjibo-dan treatment). Dying pyramidal neuron had vacuolation(V), and electron dense cytoplasm(*). Electron dense particular looks like apoptotic body (arrowhead). $\times 5,000$

질 전반에서 관찰되었으나, 과립세포질 세망은 주로 세포질 주변부에 세포막과 연계되어 나타났다. 골지복합체는 핵주변부위에서 주로 핵막과 연계되어 나타나고 있었으며, 과립세포질세망은 수조(cisterna)의 충판배열이 덜 발달된 반면 골지복합체에서는 상대적으로 납작하게 배열된 수조들이 여러층으로 잘 발달되어 있었으며, 수조의 주변부위에는

전자밀도가 높은 소포들이 다수 관찰되었다.

해마형성체에서 발견되는 신경섬유(Fig. 15)는 pyramidal neuron에서 바깥쪽으로 뻗고 있는 축삭(axon)과 안쪽으로 뻗고 있는 가지돌기(dendrite)들로 구성되어 있었는데, 축삭의 시작부위는 과립세포질세망이 잘 발달되어 있었고, 축삭의 내부에는 많은 신경세사(neuro-

filament) 및 막이 잘 발달된 사립체를 관찰할 수 있었다. 가지돌기는 수초신경섬유(myelinated nerve fiber)와 무수초신경섬유(unmyelinated nerve fiber)가 나타났는데, 수초는 전자밀도가 아주 높았으며 가지돌기들에서도 그 내부에 많은 신경세사와 막이 잘 발달된 사립체를 관찰할 수 있었다.

대조군에서는 산소와 영양의 공급부

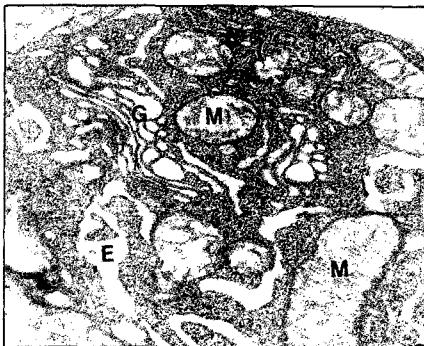


Fig. 23. This photograph were appeared the electron dense cytoplasm(*) of Fig. 21. Electron dense cytoplasm of dying pyramidal neuron included many intercellular organ such as mitochondria (M), rER(E), Golgi complex(G). $\times 20,000$



Fig. 24. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of sample group(7days following 5 min transient ischemia + Geupoongjibo-dan treatment). A pyramidal neuron appear similar to normal, but had some electron dense vacuole looks like apoptosis(arrowhead). $\times 5,000$

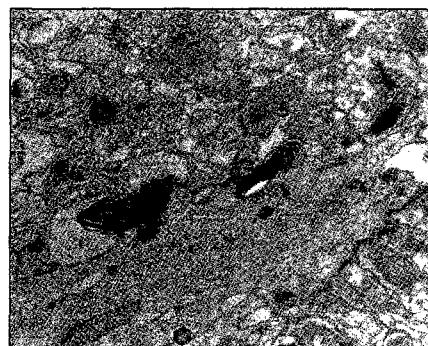


Fig. 25. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of sample group(7days following 5 min transient ischemia + Geupoongjibo-dan treatment). It showes degenerating nerve process (arrowhead) in intercellular space. The dendrite looks like lesser damaged has small vacuole(V) and well developed neuro filaments. $\times 10,000$

족으로 인한 신경세포의 변성소견을 많이 관찰할 수 있었다. 먼저 핵과 세포질에서 나타나는 공포의 형성으로 인한 부종성 변화를 볼 수 있었다. 핵은 핵막이 부풀어 오르고 핵질이 수축되는 경향을 나타내었으며, 핵질내의 전자밀도가 높아져 풍친 염색질 형태를 보였고, 핵의 특정부위로 편재되어 있던 핵소체가 마차바퀴모양으로 변함을 관찰할 수 있었다(Fig. 21).

세포질내는 공포화현상(vacuolarization)으로 인하여 세포질이 부풀고 팽창되어 핵을 비롯한 세포소기관이 한 쪽으로 편재되거나 고립되어 나타났다 (Fig. 17). 특히 세포막과 연계된 과립세포질세망을 중심으로 작은 공포들이 나타났으며(Fig. 20), 편재된 세포질의 전자밀도는 증가하였다. 또한 전자밀도가 높은 사립체를 관찰할 수 있었는데, 이들은 사립체 능선이 파괴된 부정형의 모습을 하고 있었다. 세포질내에 골고루 분포하던 미세소관은 줄어들어 거의 찾을 수 없었다. 아울러 광학현미경에서 괴사 소견을 보이지 않던 많은 신경세포

들도 세포내 부종 현상 등 상해소견을 가지고 있었다(Fig. 19).

일부 가지돌기(Fig. 16)에서는 사립체의 능선의 확장되고 수조의 파괴가 보였으며, 전체적으로 불룩해지고 불균일한 전자밀도와 미세소관의 감소 등 부종성 변화를 나타내었다. 일부 가지돌기에서는 세포막 주변부위에서 많은 미세공포(microvacuole)의 생성과 많은 가지돌기의 수축, 높은 전자밀도와 일부에서는 공포에 의한 확장 현상을 관찰할 수 있었다. 그리고 관찰되는 많은 신경종말(nerve terminal)에서는 부종 소견이 보였으며 연접소포(synaptic vesicles)의 탈락을 관찰할 수 있었다.

일부 상해를 입은 신경세포에서 apoptosis의 소견(Fig. 18)을 관찰할 수 있었다. 이들은 형태학적으로 세포의 부피가 감소하고 핵질 및 세포질이 축합되어 전자밀도가 치밀한 핵분열(nuclear fragmentation)과 세포분열(cellular fragmentation)이 일어나 apoptotic body가 형성되고 있었으며, 일부

apoptotic body들은 주변의 세포들이나 포식세포들에 의해 포식(phagocytosis) 되는 것이 관찰되었다.

실험군에서는 전반적으로 대조군과 비슷하게 해마형성체 CA1지역의 pyramidal neuron들에서 많은 신경세포의 상해현상을 관찰할 수 있었으나, 대조군과 비교할 때 상대적으로 그 수가 적었다. 대조군과 마찬가지로 핵과 세포질에 부종현상을 동반하는 괴사 소견(Fig. 22)과 apoptosis 소견을 나타내는 세포들이 많이 나타나고 있었다(Fig. 23). 특히 전형적인 apoptosis의 소견으로 세포질내의 특정부위부터 전자밀도가 증가하기 시작하거나(Fig. 27) 전자밀도가 높은 구형의 소포가 생성되어 점점 커지는 모습을 하고 있었다(Fig. 24). 괴사나 apoptosis 현상이 많이 일어남에도 불구하고, 실험군의 해마형성체내 CA1지역에 존재하는 pyramidal neuron들은 거의 정상세포 모습을 갖추고 있었다. 핵과 세포질의 부종소견도 대조군에 비하여 훨씬 줄어들었으며, 세

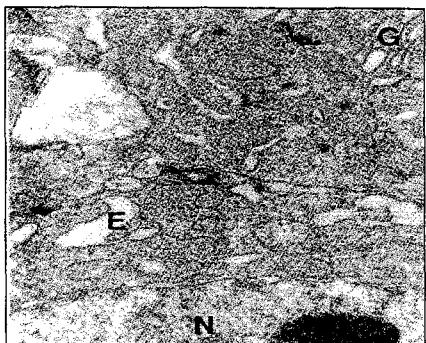


Fig. 26. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of sample group(7days following 5 min transient ischemia + Geupoongjibo-dan treatment). Neural damage such as shrunken nucleus(N), swelled rER(E) and golgi complex(G) were decreased than that of control neuron. $\times 10,000$

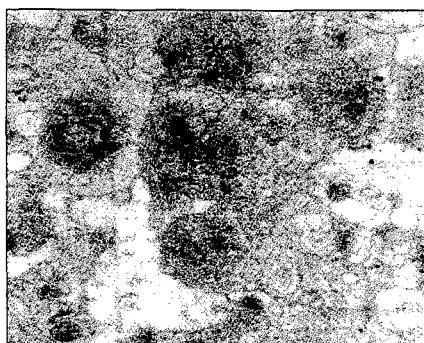


Fig. 27. Electron micrograph showing CA1 pyramidal neuron of sample group(7days following 5 min transient ischemia + Geupoongjibo-dan treatment). Electron dense region(*) in cytoplasm of pyramidal neuron were appeared which seemed apoptosis. $\times 10,000$

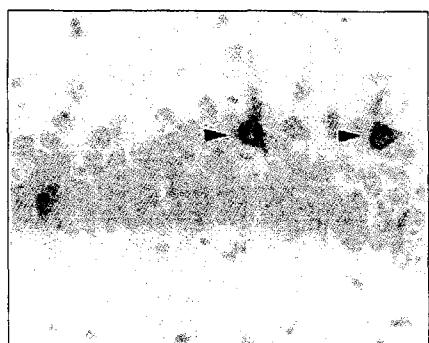


Fig. 28. Lectin binding pattern of normal group . Some interneuron were shown strong positive reaction (arrowhead) on PNA. Lectin histochemistry. $\times 100$

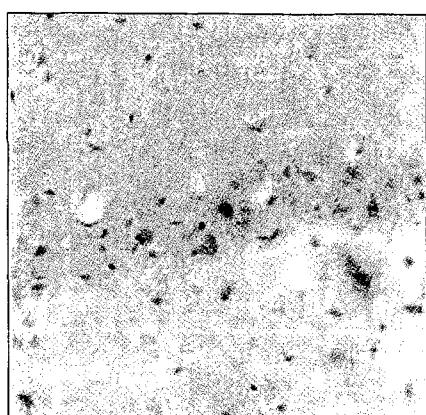


Fig. 29. Lectin binding pattern of control group.PNA are weak positive in intercellular space of pyramidal layer. Lectin histochemistry. $\times 100$

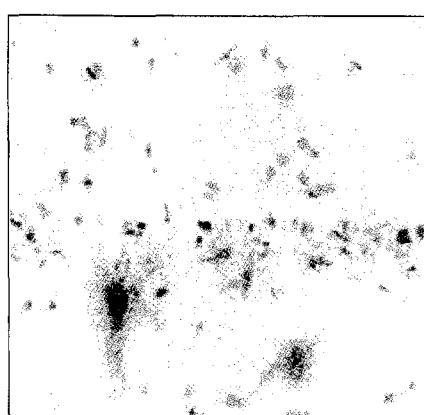


Fig. 30. Lectin binding pattern of sample group. PNA positive reaction were disappeared in intercellular space of pyramidal layer. Lectin histochemistry. $\times 100$

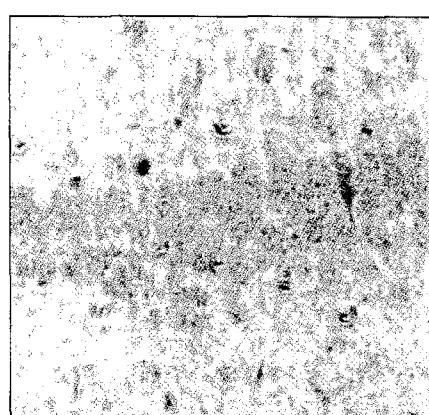


Fig. 31. Lectin binding pattern of normal group. WGA are weak positive in hippocampus. Lectin histochemistry. $\times 100$

포사이공간내에 많은 가지돌기의 사면체(Fig. 25)가 수초모양으로 존재함에도 불구하고 거의 정상적인 가지돌기들이 많이 나타나고 대조군의 세포사이 공간에서 흔히 발견되는 공포화현상이 많이 감소되고 있었다. pyramidal neuron의 세포질내에도 과립세포질세망의 확장 및 사립체의 파괴현상들이 줄어들었으며, 핵질의 상태도 비교적 퍼진염색질

(euchromatin)로 구성되어 나타났다 (Fig. 26).

6. Lectin 조직화학 소견

PNA의 lectin 조직화학 반응을 살펴보면 정상군(Fig. 28)에서는 해마형성체내의 일부 interneuron만이 양성반응을 나타내고 있었는데, 이 반응들은 세포체에 국한된 것으로 핵을 제외한 세포

질 전역에서 강하게 나타났다. 대조군(Fig. 29)에서는 CA1지역 피라미드층의 세포사이공간에서 약하게 양성반응이 나타나고 있었으며, 역시 interneuron에서도 양성반응이 나타났다. 실험군(Fig. 30)에서는 interneuron만이 양성반응을 나타내었으며, 대조군의 CA1 지역 피라미드층과 세포사이공간에서 나타났던 약한 양성반응은 없었다.

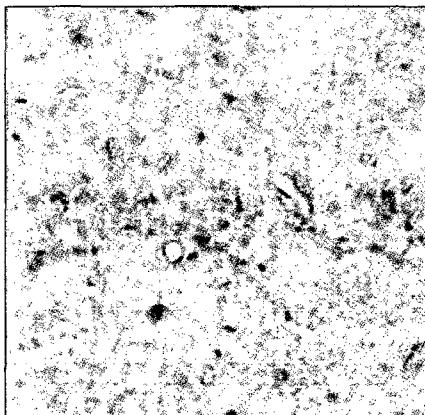


Fig. 32. Lectin binding pattern of control group. WGA positive reaction were decreased in hippocampus. Lectin histochemistry. $\times 100$

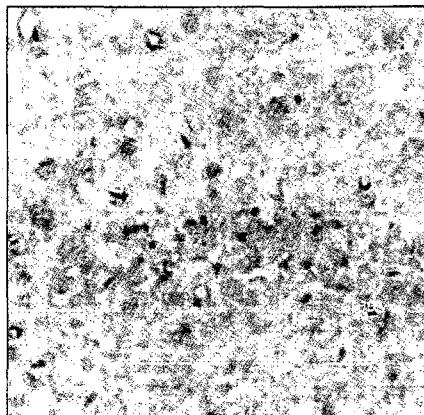


Fig. 33. Lectin binding pattern of sample group. WGA positive reaction were increased than control group in hippocampus. Lectin histochemistry. $\times 100$

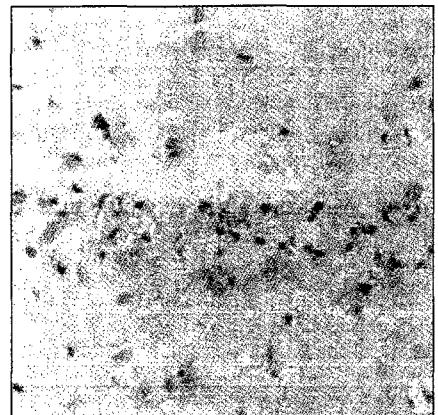


Fig. 34. Lectin binding pattern of normal group. UEA I are no reaction in hippocampus. Lectin histochemistry. $\times 100$

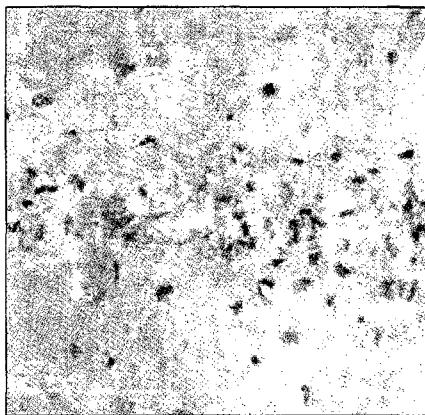


Fig. 35. Lectin binding pattern of control group. Con A are weak positive reaction in hippocampus. Lectin histochemistry. $\times 100$

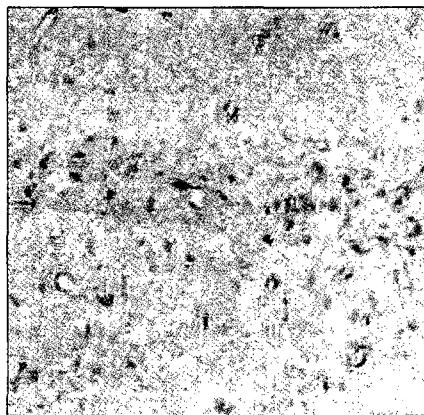


Fig. 36. Lectin binding pattern of normal group. LCA are weak positive reaction in hippocampus. Lectin histochemistry. $\times 100$

WGA의 lectin 조직화학 반응을 살펴보면 정상군(Fig. 31)에서는 CA1 지역의 pyramidal neuron들이 과립모양으로 약한 양성반응을 나타내었으며, 피라미드층의 세포사이공간에서도 과립모양의 약한 양성반응을 나타내었다. 피라미드층을 제외한 해마형성체의 세포사이공간에서도 약한 양성반응이 나타났으며, interneuron의 세포질에서도 약한 양성반응이 나타났었다. 대조군(Fig. 32)에서는 세포들이 줄어들면서 해마형

성체 전반에 걸쳐서 양성반응이 줄어들었는데, 실험군(Fig. 33)에서는 남아있는 세포들을 중심으로 양성반응이 증가하였다.

UEA I은 정상군, 대조군 및 실험군 모두에서 음성반응을 나타내었다(Fig. 34).

Con-A는 정상군의 pyramidal neuron과 세포사이공간 모두에서 약한 양성반응(Fig. 35)이 나타났으며, 대조군과 실험군의 반응양상은 변화가 없었다.

SBA는 정상군, 대조군 및 실험군의 일부 interneuron에서만 양성반응이 나타났으며, 그외의 지역에서는 모두 음성반응이 나타났다.

LCA는 정상군, 대조군 및 실험군의 pyramidal neuron과 그 주변의 사이신경세포에 약한 양성반응이 나타났다 (Fig. 36).

IV. 考 察

뇌졸중은 높은 사망률과 후유증을 일으키는 질환으로 중풍환자의 장애정도는 뇌손상의 범위와 부위에 가장 큰 영향을 받는다.¹⁷ 지난 10년간 뇌허혈 연구 목표중의 하나는 혈액순환과 에너지 공급이 차단된 후에 신경세포를 죽음으로 이끄는 병태생리학적 기전을 설명하는 것이었다. 대뇌허혈의 기전은 혈액동력학적(hemodynamic) · 신경생리학적(neuro physiologic) · 생화학적(biochemical) 변화에 의하여 발생하며, 그것은 기능적 장해(functional disturbances)와 연계되고, 뇌의 구조적 통합성의 손실(loss of the structural integrity of brain)과 연계되는 것으로

알려져 있다.¹⁸

실험에 사용한 MG는 후대뇌교통동맥(posterior communicating artery)의 결손으로 인하여 뇌에 혈액을 공급하는 대뇌동맥륜(willis circle)이 불완전하게 형성되어 있기 때문에,¹⁹ 양쪽 총경동맥에 일시적인 폐색을 일으키기 쉽고 좋은 재현성을 보여 허혈성 뇌손상(ischemic brain damage)의 기전 연구²⁰ 및 뇌허혈에 대한 약물의 신경세포보호작용(neuro protection)을 평가하는 동물모델로서 자주 사용되고 있다.²¹

저자는 MG의 양쪽 총경동맥을 5분 동안 결찰한 후 재관류시켜 전뇌허혈 모델을 유발한 후 7일째 해마형성체내 CA1 지역의 pyramidal neuron의 상해 정도를 관찰하였다. 수분이내의 일시적 허혈은 glutamate의 대량 방출을 가져 오고 이는 뇌세포 가운데 특정 취약 집단의 사망을 유도하게 된다.¹⁹ 이들 가운데 대표적인 것이 대뇌피질의 신경세포와 해마형성체의 pyramidal neuron으로, 특히 해마형성체내 CA1지역 신경세포의 선택적 감소는 심한 기억장애를 초래한다.²² 그러나 CA1지역의 pyramidal neuron들은 일시적 허혈 이후 바로 사망하지 않고, 며칠이 지난 후 자연성으로 사망하게 된다.¹⁹ 여러 동물실험에서 뇌의 기능 및 형태 관찰 결과, 짧은 전뇌허혈이 있은 후 24시간 까지는 CA1지역 pyramidal neuron은 energy crisis나 morphological change가 없이 정상인 것으로 알려져 있다.^{2~4} 일에는 해마형성체 CA1지역의 pyramidal neuron이 자연성신경세포사(delayed neuronal death)를 시작하여²³, 3주 뒤에는 약 5%의 신경세포만이 생존한다고 보고²⁴되고 있다. 이러한 현상을 설명하기 위하여 많은 가설들이 제시되었으나, 그 기전은 아직 명확하지

않다.

中風의 치료에 있어서 각 시대별 中風原因論의 變化에 따라 각기 다른 처방이 광범위하게 응용되어 왔다. 그 중 李²⁵는 口開, 手散, 眼合, 遺尿, 鼻鼾등의 五臟絕을 脫病이라 하고, 牙關緊急, 兩手握固한 것을 閉證이라 하여 中風 脱證과 閉證으로 분류하였다. 최근에는 精神은 正常이면서 輕病일때는 中經絡으로, 神志昏亂하면서 重病이면 中臟腑로 구분하면서 閉證과 脱證으로 세분하기도 한다.²⁶ 中風閉證의 原因과 治法으로 李²⁶는 “閉者는 邪氣閉塞于外하고 元氣猶然在內한 것이므로 開關利氣하면 邪는 自散한다.”라고 하여 祛邪를 위주로 한 清肝熄風開竅法을 多用하였다.

中風의 急症에 사용되는 祛風至寶丹은 防風通聖散에 熟地黃, 天麻, 人蔘, 荊活, 獨活, 黃連, 全蝎, 黃柏, 細辛 등 9가지 약물을 加味한 方劑이다.¹⁴ 그 기본방인 防風通聖散은 热·風·燥의 세 가지 원인을 치료하는 方劑로, 六一散·調胃承氣湯·三黃瀉心湯·黃連解毒湯·四物湯·涼膈散·回春涼膈散 등이 合方된 의미를 포함하고 있어 諸風熱과 中風不語·暴瘡·語聲不出 및 舌強·口噤·筋惕·肉瞤 등에 활용되며, “風中臟昏冒及風熱證”에 사용되는 代表的 方劑이다.⁴ 祛風至寶丹은 防風通聖散에 祛風作用, 清熱解毒作用이 補強되고, 天麻·全蝎·細辛·人蔘 등이 더해져 鎮靜·鎮痙作用이 첨가되므로써 中風昏冒와 風熱에 활용할 수 있는 방제가 된다.⁴

祛風至寶丹을 투여한 MG의 총경동맥을 5분동안 결찰한 후 재관류시킨 해마형성체의 CA1지역 중간부위를 광학현미경으로 즉시 관찰한 결과, 허혈에 의한 피해는 별로 나타나지 않았다. 그러나 재관류 후 7일이 지난 대조군에서는 CA1지역의 pyramidal neuron의 수가 평균

27개/1mm²로 정상군의 평균 104개/1mm²보다 많이 감소되어 전형적인 자연성신경세포사의 경향을 나타내고 있었다. 실험군에서는 평균 44개/1mm²로 대조군에 비하여 세포수의 감소가 현저 하지는 않았는데, 이는 대조군에서 많이 관찰된 자연성 세포사가 약제에 의하여 억제된 것으로 추정할 수 있다.

뇌허혈 후의 뇌조직내 수분함량 변화를 관찰한 결과, 뇌조직의 수분함량 변화는 정상군에서는 3일, 7일에 각각 평균 78.90%와 79.12%였으며, 대조군에서는 평균 82.25%와 85.13%로 각각 증가되었고, 실험군에서는 각각 81.72%와 83.66%로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였다. 이상의 결과로 보아 祛風至寶丹은 일시적 허혈에 의한 뇌부종에 효과가 있음을 알 수 있다.

해마형성체내 CA1지역 pyramidal neuron은 일시적인 뇌손상에 선택적으로 상처를 입는다. 실험에서 CA1지역 pyramidal neuron은 가역성 전뇌허혈 후 며칠동안 세포죽음(cell death)을 겪는데, 과거에는 이러한 자연성신경세포사 (delayed neuronal death)가 necrosis인지 apoptosis인지를 알 수 없었다.²⁷

해마형성체내 CA1지역 pyramidal neurons의 자연성신경세포사가 necrosis인지 apoptosis인지를 알아보기 위하여 TUNEL 방법을 이용하였다.

조직내의 apoptosis의 증거로 추정되는 apoptotic body는 특수염색을 통하여 광학현미경 검출이 가능하다. 광학현미경으로 apoptotic body를 검출하기 위해서는 apoptotic body의 임의적으로 잘려진 DNA조각의 3' 쪽 끝에 Tdt효소를 부착시켜 발색시키는 면역조직화학 염색이 이용된다. 이 연구에서 apoptosis 검출을 위하여 사용한 면역조직화학

염색은 1992년 Gavrieli 등에 의해 개발된 TUNEL 방법으로 형태학적으로 명확히 관찰할 수 있는 방법이다. 이에 저자는 Gavrieli가 고안한 TUNEL 방법 중 내재성 과산화분해효소 처리와 조직내의 단백질 처리 방법을 수정, 보완하여 조직을 염색하였다.

그 결과, 정상군은 TUNEL 염색에 양성반응을 보이지 않았으나, 대조군과 실험군에서는 해마형성체내 CA1지역에서 양성반응이 나타나, 일시적인 허혈 자극에 의하여 pyramidal neuron에 apoptosis가 일어났음을 알 수 있었다. 실험군에서는 대조군에 비하여 양성반응을 나타내는 세포수도 증가되었는데, 이는 祇風至寶丹이 일시적 허혈에 의한 지연성신경세포사의 기전 중의 하나인 apoptosis 소견을 증가시킨 것으로 생각된다.

허혈자극이 주어진 신경세포에서는 초기에 핵과 세포질에 있는 여러 소기관들의 세포부종으로 인한 핵막과 세포막의 부종 현상을 관찰할 수 있었다. 다음 단계로 핵과 세포질의 수축(shrinkage) 현상이 관찰되었다. 아울러 형질세포질 세망에서 수조사이 공간의 확장, 사립체의 파괴 및 세포질내 공포의 형성 증가 등 세포소기관의 퇴행을 관찰할 수 있었다. 뇌허혈에 민감한 부위인 가지돌기도 세포질과 사립체에서 부종소견이 나타났고, 미세공포가 생성되었으며 신경섬유의 특징적 구조물인 미세소관이 없어지고 있었다. 그리고 리보솜이 집단을 이루어 전자밀도가 높게 보이는 리보소체 무리(polyribosome)가 흩어지는 현상을 관찰할 수 있었다. 이러한 구조적인 변화는 지연성신경세포사의 초기에 일어나는 신경세포내의 미세구조적인 변화 즉 necrosis로 추정할 수 있었다.

Yamamoto 등²⁸에 의하면 재판류 후

시간이 지날수록 초기 가지돌기의 말단 부위에서 관찰되던 현상이 점차적으로 신경세포체 쪽으로 전이된다고 하였다. 본 연구에서도 크기가 작은 사멸된 가지돌기가 상대적으로 크기가 큰 정상적인 가지돌기사이에서 발견되는 현상을 관찰할 수 있었는데, 이는 뇌혈류가 회복된 후 말단의 가지돌기와 신경세포체가 상해를 입는 시간이 다름을 알 수 있었다.

Apoptosis 과정은 여러 유도인자들에 의해 endogenous endonuclease의 활성이 증가되어 DNA 이중가닥을 규칙적으로 절단하고 이어서 핵 분절(nuclear fragmentation)과 세포 분절(cellular fragmentation)이 일어나 전자밀도가 높은 apoptotic body가 형성되고 apoptotic body들은 주변의 세포들이나 포식세포들에 의해 포식(phagocytosis)되는데²⁹, 인접세포가 apoptotic body만을 인식하여 포식되는 과정은 apoptotic body 표면의 변화에 의해 일어난다는 사실들이 일부 보고³⁰되고 있다.

본 연구에서도 실험군에서 대조군에 비하여 많은 핵질이 축합되어 전자밀도가 높은 덩어리를 이루는 apoptotic body를 전자현미경을 통해 관찰할 수 있었다. 이는 CA1지역 pyramidal neurons은 apoptosis를 통하여 일어나며, 치료하지 않은 전뇌손상(global ischemic injury)은 apoptosis를 포함하는 necrotic한 형태였다는 것으로 설명된다.³¹ 그러나 신경 괴사(neuronal necrosis) 이전에 일어나는 apoptotic pathway의 programmed biochemical events를 배제하지 못한다.³¹

최근의 연구에서 지연성 신경세포사가 apoptosis나 계획된 신경세포사는 아닌 허혈성 신경세포사의 최종결과라고도 하는데,³² TUNEL 염색의 양성반

응과 전자현미경상 apoptotic body 형성으로 보아 apoptosis가 지연성신경세포사에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

Lectin은 식물 뿐만 아니라 동물 혹은 미생물에서 추출된 단백질 혹은 당단백질로서, 여러 가지의 당잔기(sugar residue)에 특이적으로 결합하는 특성을 가지고 있다.³³ 또한 lectin들은 막성분의 분리 및 세포막 표면의 구조³⁴, 암세포의 동정³⁵과 암세포의 진행과정³⁶에 관한 연구에도 이용되고 있다. 세포 표면의 당잔기들은 세포에 안정성을 주고 세포가 어떤 물질을 인식하는데 중요한 작용을 한다.³⁷

본 연구에서 지연성신경세포사와 더불어 일어나는 신경세포 세포막의 변화를 lectin 조직화학을 이용하여 관찰하였다.

대조군에서 PNA의 양성반응이 증가하였는데, 이는 세포막의 galactosyl-1,3-N-acetylgalactosamine의 양이 증가된 것에 기인한다. WGA의 양성반응은 감소하는데, 이는 N-acetylglucosamine의 양이 감소되었기 때문이다. 인접세포가 apoptotic body만을 인식하여 포식하게 되는 과정에 대하여 Duval 등³⁸은 흰쥐의 큰 포식세포가 apoptosis된 림프구에 존재하는 mannose와 fucose를 인식한다고 보고하였고, Vlassara 등³⁹은 큰 포식세포의 monnosyl / fucosyl receptor가 apoptotic 적혈구를 인식한다고 보고하였다. Hall 등⁴⁰은 배지에서 배양중인 섬유모세포가 apoptotic 호중성백혈구를 인식할 때 mannose / fucose에 특이성을 가진 lectin이 섬유모세포의 인식작용을 저해하여 apoptotic 세포를 인식할 수 없게 하는 것으로 보아 mannose와 fucose 당잔기가 섬유모세포의 인식작용에 관여한다고 보고하였다. 그러나 신

경세포의 세포막에 존재하는 당단백질의 변화에 대한 보고는 거의 없었는데, 본 연구에서는 galactosyl-1,3-N-acetyl galactosamine, N-acetylglucosamine에서만 변화가 있어, 이에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과로 祛風至寶丹은 MG의 가역성 전뇌허혈로 인한 뇌세포손상을 감소시키는 것으로 생각되며, 향후 뇌조직 허혈지극에 대한 보다 구체적인 신경 세포손상의 기전에 대한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

V. 結 論

祛風至寶丹이 가역성 전뇌허혈 모델에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 Mongolian Gerbil를 이용하여 뇌조직의 수분함량 변화, 광학현미경상 해마형성체 내 pyramidal neuron의 속적 변화, 지연성신경세포사(necrosis · apoptosis), neuronal membrane의 당단백질 변화 및 투과전자현미경상 지연성신경세포사로 인한 pyramidal neuron의 미세구조 변화를 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 뇌조직의 수분함량 변화는 정상군에서는 3일과 7일에 각각 78.90%와 79.12%였으며, 대조군은 각각 82.25%와 85.13%로 증가하였다. 실험군에서는 81.72%와 83.66%로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다.

- 광학현미경 소견은 정상군에서는 해마형성체의 피라미드 세포층에서 연속적이고 규칙적인 세포들이 대조군에서는 불연속적이고 불규칙한 형태로 나타났으나, 실험군에서는 대조군에 비하여 그 상해정도가 미약하였다.

- 해마형성체 CA1지역에 존재하는

pyramidal neuron의 개체수 변화는 정상군에서는 평균 104개였으며, 대조군에서는 평균 27개로 감소하였다. 실험군에서는 평균 44개로 대조군에 비하여 유의성이 인정되었다.

- TUNEL 염색에 의한 Apoptosis 소견은 정상군에서는 해마형성체 전반에 걸쳐 음성반응이 나타났으며, 대조군은 CA1지역의 pyramidal neuron에 국한하여 양성반응이 나타났다. 실험군에서는 대조군에 비하여 양성반응이 증가되었다.

- 전자현미경소견은 대조군에서는 괴사와 apoptosis가 나타났으며, 실험군에서는 대조군에 비하여 괴사는 감소되었고, apoptosis는 증가되었다.

- Lectin 조직화학 소견은 정상군에서는 PNA와 SBA는 interneuron에서 강한 양성반응이 나타났으며, WGA · Con-A · LCA는 피라미드층의 세포사이 공간에서 약한 양성반응을 나타내었다. 대조군에서는 PNA와 WGA의 반응성이 감소되었으며, 실험군에서는 PNA와 WGA의 반응성이 증가되는 경향을 나타내었다.

VI. 參考文獻

- 朱震亨. 丹溪心法. 台北:五洲出版社;1981,1,5.
- 方藥中, 鄭鐵濤, 李克光, 金壽山, 黃星垣, 董建華. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社;1986,414-23.
- 喻嘉言. 醫門法律(中國醫學大系). 서울:商務印書館;1995,395.
- 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:醫聖堂;1998,628.
- Walter J Koroshetz, Michael A Moskowitz. Emerging treatments for stroke in humans. *TiPS*. 1996;17:227-39.
- Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isia T, Hyman BT, Moskowitz MA. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18:238-47.
- 유종삼. 星香正氣散이 흰쥐의 腦損傷에 미치는 影響. 대전대학교 대학원. 1992.
- 최은정, 신길조, 이원철. 蘇合香元이 實驗的 腦梗塞 흰쥐의 局所腦血流量 및 梗塞 면적에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1997;18(1):462-5.
- 정승현, 신길조, 이원철. 六一順氣湯 抽出物이 생쥐의 全腦虛血에 미치는 影響. 東國韓醫學研究所論文集. 1999;7(2):149-54.
- 설인찬, 김병탁. 加味補陽還五湯이 高脂血症, 血栓, 高粘度血症, 高血壓 및 腦損傷에 미치는 영향. 韓方成人病學會誌. 1998;4(1):133-62.
- 조규선, 이원철, 윤상협. 흰쥐의 中大腦動脈閉鎖後 大造丸投與가 大腦半球 및 視床萎縮에 미치는 영향. 韓方成人病學會誌. 1998;4(1):163-75.
- 김선영, 윤상협, 이원철. 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄후 黃連解毒湯 투여가 대뇌반구 및 시상 위축에 미치는 영향. 東國論叢. 1998;37:229-46.
- 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;43:1369-74.
- Toru Matsui, Hiroshi Sinyama, Takao Asano. Beneficial effect of prolonged administration of albumin on ischemic cerebral edema and infarction after occlusion of middle cerebral artery in rats. *Neurosurgery*. 1993;33:293-300.
- Gavriei Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nucleus DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119:493-501.
- Bullock GR, Petrusz P. Techniques in Immunocytochemistry Vol 2. Academic Press. 1983:39-70.
- Per Wester, Johan Radberg, Bo Lundgren, Markku Peltonen. factors associated with delayed admission to hospital and in-hospital delays in acute stroke and TIA. *stroke*. 1999;30:40-8.

18. Krause GS, Whithe BC, Aust SD, Nayindi NR, Kumar K. Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. Crit Care Med. 1988;16: 714-26.
19. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res. 1982;239:57-69.
20. Deshpande JK, Siesjo BK, Wieloch T. Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1987;7:89-95.
21. Hara H, Kato H, Kogure K. Protective effect of α -tocopherol on ischemia neuronal damage in the gerbil hippocampus. Brain Res. 1990;510:335-8.
22. Zola Morgan S, Squire LR, Amaral G. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. J Neurosci. 1986;6: 2950-67.
23. Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed hippocampal damage in human following cardiorespiratory arrest. Neurology. 1987;37: 1281-6.
24. Bonnekoh P, Barbier A, Oschlies U, Hossmann KA. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus: morphological change after 5-min ischemia and long survival times. Acta Neuropathol(Berl). 1990;80:18-25.
25. 李中梓. 醫宗必讀. 臺北:文光圖書公司;1991,205-7.
26. 李用粹. 證治彙報. 臺北:旋風出版
- 社;1976,1-7.
27. Frederick Colbourne, Hui Li, Alastair M Buchan. Continuing postischemic Neuronal death in CA1 influence of ischemia duration and cytoprotective doses of NBQX and SNX-111 in rats. Stroke. 1999;30:662-8.
28. M Yamamoto, AM Boyer, JE Crandall, M Edwards, H Tanaka. Distribution of stage-specific neurite-associated proteins in the developing murine nervous system recognized by a monoclonal antibody. J Neurosci. 1986;6:3576-94.
29. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis : An overview of cell death. Am J Pathol. 1995;146:3-15.
30. Savill JS, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. Nature. 1990;343:170-3.
31. Colbourne F, Sutherland GR, Auer RN. Electron Microscopic Evidence against Apoptosis as the Mechanism of Neuronal Death in Global Ischemia. J Neuroscience. 1999;19(11):4200-10.
32. Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia : a role for apoptosis? J Cereb Blood Flow Metab. 1996 Mar;16(2):195-201.
33. Scott T, Eagleson M. Concise encyclopedia biochemistry. 2nd Ed. Berlin & New York. Walter de Gruyter. 1988:333-4.
34. Aoki D, Nozawa S, Iizuka R, Kawakami H, Hirano H. Differences in lectin binding patterns of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma, with special reference to staining with Ulex europaeus agglutinin I and Peanut agglutinin. Gynecologic Oncol. 1990;37:338-45.
35. Kawakami H, Ito M, Miura Y, Hirano H. Lectin-histochemical studies on the process of liver metastasis of mouse colon carcinoma(colon26) cell. Acta Histochem Cytochem. 1992;25:577-82.
36. Chang S, Chung LWK. Interaction between prostatic fibroblast and epithelial cells in culture ; Role of androgen, Endocrinology. 1989;125: 2719-27.
37. Bohinski RC. Modern concepts in biochemistry. 4th Ed. Boston. Allyn and Bacon. 1983:217-36.
38. Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). Immunology. 1985;56(2): 351-8.
39. Vlassara H, Valinsky J, Brownlee M, Cerami C, Nishimoto S, Cerami A. Advanced glycosylation end-products on erythrocyte cell surface induce receptor-mediated phagocytosis by macrophages. J Exp Med. 1987;166: 539-48.
40. Hall SE, Savill JS, Henson PM, Haslett C. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. J Immunol. 1994;153: 3218-27.