

원 저

環跳 (GB30) 電鍼刺戟이 一過性 前腦 虛血로 유발된 c-Fos 단백질 발현에 미치는 影響

김재효, 김풍식, 김경식, 김민선¹⁾, 박병림¹⁾, 손인철

원광대학교 한의과대학 경혈학교실, 원광대학교 의과대학 생리학교실¹⁾

Effect of Electroacupuncture of GB30 on the Expression of c-Fos following Transient Forebrain Ischemia in Rats

Jae-Hyo Kim, Poong-Sik Kim, Kyung-Sik Kim, Min-Sun Kim¹⁾, Byung-Rim Park¹⁾, In-Cheul Son

Department of Acupoint, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,
Department of Physiology, School of Medicine, Wonkwang University¹⁾

Objective : Acupuncture and herbal medicine have been used to prevent and treat cerebrovascular accident, such as stroke, and many studies of acupuncture and moxibustion concerning stroke have been undertaken in humans and various animals. However, the protective effect of the electroacupuncture (EA) of Huan-do (GB30) on the transient forebrain ischemia injury has not been published.

Methods : The neuroprotective effects of EA (2 ms, 10 Hz, and 1 - 2 mA) of GB30 on the transient forebrain ischemia injury were investigated by immunohistochemistry of c-Fos-like protein in Sprague-Dawley rats.

Results : The transient forebrain ischemia injury resulted in increased expression of c-Fos-like protein (cFL) in the dentate gyrus (DG) and CA1 for 6 hrs after ischemia, and EA increased significantly expression of cFL in the CA1 and DG. For 48 hrs after, there was delayed expression of cFL at the CA1 and DG, representing the sign of neuronal cell death, but EA decreased the delayed expression of cFL, significantly.

Conclusion : These results suggest that the neuroprotective effects of EA on transient forebrain ischemia injury may be related to excitatory regulation of cFL at the early stage and inhibitory regulation in the long term. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(2):108-118)

Key Words: transient forebrain ischemia, electroacupuncture, GB30, immediate early gene, c-Fos, hippocampus.

서 론

- 접수 : 2001년 12월 24일 · 채택 : 2002년 4월 8일
· 교신저자 : 손인철, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 경혈학교실
(Tel. 063-850-6448, Fax. 063-857-6458, E-mail: ichsohn@wonkwang.ac.kr)
· 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R02-2001-00452) 지원으로 수행되었음.

腦卒中 (stroke)은 韓醫學의 名稱으로 中風으로 불리우며, 뇌혈관 질환으로 뇌혈관의 경색 또는 파열에 의해서 발생되며, 암이나 심혈관질환 등과 함께 현대인에게 중요한 사망원인 중의 하나이다. 국제보건

기구 (WHO)에서는 腦卒症을 “血管異常外에는 뚜렷한 원인이 없이 24시간이상 지속하거나 사망으로 급속히 진행하는 국소적인 뇌기능 장애로 인한 임상증상”으로 정의하고 있다¹⁾.

中風은 暴仆, 卒暴彊付, 不知人, 不省人事, 昏倒, 昏不知人, 精神夢寐 등의 갑작스런 의식장애와 偏枯, 四肢不舉, 半身不遂, 口眼喎斜 등의 운동장애 및 舌強不語, 暴瘡, 言語蹇澁 등의 언어장애 증상이 나타나는 병증으로 정의된다²⁾. 中風의 四大症狀으로 偏枯, 風痺, 風懿, 風瘡 등과 그 주요증상으로 卒中暴仆, 暴, 口眼喎斜, 手足癱瘓, 人事不省, 言語蹇澁, 痰涎壅盛 등이 있다. 中風은 鍼灸, 藥物 및 物理治療 등을 종합적으로 활용하여 임상적으로 우수한 효과를 얻어왔는데, 그 중에서도 刺鍼 및 施灸 치료는 수많은 경험의 축적을 바탕으로 꼭넓게 연구되고 있다. 中風에 관련한 鍼灸치료에 대하여,豫防에는 足三里, 懸鍾(灸)하고, 前兆症에는 風府, 大杼, 合谷, 太衝, 足三里, 肩髃, 曲池, 內關, 豐隆 등을 刺鍼하고, 半身不遂에는 百會, 曲池, 合谷, 肩髃, 崑崙, 懸鍾, 手三里, 足三里, 陽關陵泉, 風市, 環跳, 風池 등을 刺鍼하는 등의 많은 치료방법 등이 제시되고 있다³⁻⁴⁾.

腦虛血 損傷의 병태생리를 연구하기 위하여 여러 가지 방법의 동물 모델이 개발되어 왔으며, 이중 흰쥐에서 양측 경추동맥을 영구적으로 폐쇄시킨 후 양측 경동맥을 일시적으로 폐쇄 (four vessel occlusion, 4-VO)시켜 뇌에 혈액공급을 완전히 차단한 다음 혈액공급을 재개하는 虛血 및 再貫流 損傷 (ischemia-reperfusion)이 많이 이용되고 있다⁵⁾. 前腦 虛血 損傷은 지속적으로 뇌혈류를 차단할 경우 측부순환이 없으므로 前腦가 급성 뇌경색에 빠지게 되고 높은 치사율을 보이게 되나, 5-10분 정도의 일시적인 虛血을 가하고 즉시 재관류시키면 급성 뇌경색에 빠지지는 않지만 3-4일 경과 후 뇌의 新皮質 (neocortex), 線條體 (striatum), 海馬 (hippocampal) CA1 부위 와 小腦 (cerebellum)에 선택적으로 신경세포의 손실이 나타나는 遲延性 神經細胞死 (delayed neuronal death) 현상이 관찰되는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 이와 같은 지연성 신경 세포사에 대한 정확한 원인은 밝혀져 있지

않으나 前腦部位 신경세포에서 glutamate의 과도한 축적으로 NMDA, AMPA와 kainate 수용체의 활성 및 세포내 칼슘의 증가로 인한 흥분독성 (excitotoxicity)과 재관류 후 유리산소기 (free radical)에 의한 신경세포 損傷, 단백질합성의 장애 및 단백질 분해, 미토콘드리아의 기능장애, 염증세포의 활성화 그리고 apoptosis 기전의 활성화 등이 관여한다는 많은 실험적 증거들이 제시되었다⁷⁾.

c-Fos 단백질은 일정한 자극에 의해 신경세포에서 발현되는 immediate early gene (IEG)으로, 세포들과 그들의 경로를 확인하기 위한 기능적 또는 해부학적 표식자로 널리 사용되어져 왔다⁸⁾. 더욱이 c-Fos 단백질은 세포형질에 장기적인 영향을 주는 다른 종류의 이차적인 유전인자를 조절하게 된다⁹⁾. 이와 함께 여러 형태의 腦 損傷에 관한 실험모델들에서 損傷 24시간이내와 24~48시간 이후에 각각 c-Fos와 cJun을 포함하여 몇몇 IEG의 강한 발현이 관찰된다는 사실은 많은 연구자들 사이에서 인정되고 있다¹⁰⁻¹¹⁾. 한편 腦虛血 損傷 後 발현되는 IEG의 기능에 대하여 정확히 알려져 있지 않으나 c-Fos의 발현은 6시간 이전의 초기에는 세포생존에 관여되고, 48시간 이후의 지연성 발현양상은 細胞死 (cell death)에 관여된다고 제시되었다¹²⁾.

環跳 (GB 30)는 足少陽膽經의 經穴로 下肢風濕痺痛, 癱瘓, 半身不遂, 麻木, 神經衰弱, 舜麻疹, 風疹등에 활용되며, 아울러 足少陽膽經과 足太陽膀胱經이 모두 流注하는 곳에 대한 치료 가능성을 가지고 있다. 현대 해부학적 관점에서 보면, 大臀筋 (gluteus maximus muscle)과 坐骨神經 (sciatic nerve) 등이 분포하고 있는 특징이 있으며, 기존의 동물실험에서 電鍼刺戟은 통증역치 상승을 통해 진통효과와 延髓 및 中腦내의 5-HT를 증가시키는 효과를 나타내었다. 또한, 環跳의 電鍼刺戟이 甲狀腺機能을 조절하고, 胃液 分泌를 조절하는 작용을 나타내는 것이 확인되었으며, 家兔의 環跳에 가한 電鍼이 炎症反應을 억제하였다¹³⁻¹⁴⁾. 이러한 실험결과들은 環跳에 대한 刺鍼이 中樞神經系에 영향을 줄 수 있는 가능성과 環跳의 刺鍼이 中風과 관련한 腦虛血 損傷에 치료효과를 기대

하여 볼 수 있다

이에 본 연구에서는 環跳에 가한 電鍼刺戟이 흰쥐에서 一過性 前腦 虛血 (transient forebrain ischemia)에 의하여 유발되는 뇌세포고사에 신경방어 작용여부를 확인하고자 c-Fos 면역 단백 발현의 변화를 관찰하였다.

실험 방법

1. 實驗動物

실험동물은 체중 250~300 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷 (Samtako's Sam : TacN (SD) BR, Korea)을 사용하였으며, 실험 1주일 전부터 실온의 실험실 환경에 적응할 수 있도록 하여 stress 및 환경의 변화에 따른 영향을 최소화하였다. 正常群 (NOR), 一過性 前腦 虛血 損傷群 (ISCH), 一過性 虛血 損傷 後 電鍼刺戟을 시술한 電鍼刺戟群 (ISCH+EA)의 3개 실험군으로 분류하였다.

2. 一過性 前腦 虛血 損傷 (Transient forebrain ischemia injury)

一過性 前腦 虛血은 Pulsinelli와 Buchan⁵⁾이 제시한 양측 추골동맥 (vertebral a.)과 경동맥 (common carotid a.)의 4개의 혈관 폐색법에 의하여 유발시켰다. 실험동물은 2% halothane과 100% 산소의 혼합가스를 2 L/min로 마취를 시작하였으며, 마취가 이루어진 뒤 0.5% halothane과 100% 산소의 혼합가스로 마취를 유지하였다. 먼저 추골동맥 폐색은 복와위 위치에서 정중 항배부위의 피부를 절개한 후 제 1 경추의 alar foraminae를 노출시켜 제 1경추와 제 2 경추 사이로 지나가는 양측 추골동맥 (vertebral artery)을 전기인두를 사용하여 영구적으로 폐색시켰다. 추골동맥 폐색을 유발 한 후 24시간 후, 경동맥 폐색을 위하여 흰쥐를 양와위자세로 위치시킨 후 정중 경부부위의 피부를 절개하여 양측 경동맥을 분리하였으며, 분리된 경동맥 (common carotid artery)을 micro aneurysm clips (# 160-863, George Tiemann and Co., Plainview, NY)을 이용하여 폐색하고 아울러 봉합사

로 경부 근육내에 존재하는 측지분지의 흐름을 폐쇄하였다. 대뇌로 흐르는 혈류를 15분 동안 차단하는 동안에는 흰쥐의 체온을 heating bed를 이용하여 36-37°C를 유지하였으며, 혈관폐쇄 동안 동공산대와 righting reflex 소실을 확인하였다. 虛血 유발 15분 후 결찰을 풀어줌으로써 혈류를 재개시켰으며, 회복시 발작을 보이는 흰쥐는 본 실험에서 제외하였다.

3. 取穴 및 電鍼 刺戟 (Electro-acupuncture)

실험동물의 電鍼刺戟은 左右側 下肢에서 環跳 (GB30)를 取穴하였으며, stainless steel needle (0.25mm diameter)가 각각의 經穴部位의 皮下에 5 mm 깊이로 삽입되었다. 電鍼刺戟은 虛血 損傷 직후부터 30분간 가하였고, 電氣刺戟은 pulsemaster (A300, WPI, U.S.A.)를 통해 주파수와 자극시간을 조절하였으며, stimulus isolator (A385, WPI, U.S.A.)를 통해 2 ms, 1~2 mA의 강도와 10 Hz의 빈도로 자극이 이루어졌다. 아울러, 一過性 前腦 虛血 損傷 後 6시간 째 관찰 대상이 된 電鍼刺戟群 (ISCH+EA)은 1회의 電鍼刺戟이 시술되어졌으며, 48시간째 관찰 대상이 된 電鍼刺戟群 (ISCH+EA)에서는 虛血 損傷 直後와 24시간째에 電鍼刺戟을 30분간 施術하여 總 2회의 電鍼刺戟을 加하였다.

4. c-Fos 면역 조직 화학 검사

실험동물을 chloral hydrate (400 mg/kg)로 마취 후 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 심장을 관류하여 혈액을 제거하였으며, 다시 4% paraformaldehyde로 관류시킨 후 뇌를 분리하였다. 분리된 뇌는 4% paraformaldehyde에서 3시간 동안 실온에서 고정한 후 30% sucrose에서 2일 이상 방치하였다. 냉동절편기 (Leica, Germany)를 이용하여 40 μm의 두께로 조직절편을 만들어서 slide glass에 부착 후 6% H₂O₂용액에서 30분 동안 진탕하고, 그 후 pH 7.4의 PBS 용액으로 3회 이상 세척하고 0.3% Triton-X 100으로 30분간 진탕한 후 PBS로 3회 이상 세척하였다. 그후 blocking agent (normal goat serum)를 실온에서 30분간 처리한 일차항체 (c-Fos, Oncogene

Sci, USA, 1:1000)를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 2시간 동안 실온에서 진탕시키고 PBS로 세척하였다. 그후 이차항체인 biotinylated anti-rabbit & anti-mouse immunoglobulin (Dako, Denmark)을 실온에서 40분간 처리하여 PBS로 세척하고, streptavidin peroxidase (Vector ABC kit)를 20분간 처리하여 PBS로 세척한 뒤 chromogen인 0.05% diaminobenzidine으로 발색하였다. 증류수로 1시간 동안 세척한 후 광학 현미경하에서 진갈색의 c-Fos 양성 세포를 관찰하였고 화상자동분석시스템 (Image-Pro Plus, USA)을 이용하여 海馬 (hippocampus)에서 c-Fos 양성 세포의 수를 측정하였다.

5. 統計 (Statistics)

컴퓨터 통계프로그램인 Statview 4.0 (Abacus Concepts Inc., U.S.A.)을 이용하였으며, 실험결과는 Mean \pm S.E.M.로 나타내었고, 통계검정은 unpaired student t-test와 one-way ANOVAs로 실시하였다. P 값이 0.05 미만인 경우에만 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

실험 결과

1. 一過性 前腦 虛血 損傷과 해마부위의 c-Fos 면역 단백 발현양상

정상동물 (NOR)에서는 c-Fos 면역 단백의 발현을 거의 찾아볼 수 없다. 반면, 一過性 前腦 虛血 損傷 후 6시간이 되는 損傷群 (ISCH-6hrs)에서는 해마 (hippocampus) 부위의 영역에 따라 발현이 관찰되었는데, CA1 영역에서 15.75 ± 3.84 개, CA2 영역에서는 12 ± 1.53 개, CA3 영역에서는 7.67 ± 1.76 개, 그리고 齒狀回 (DG, dentate gyrus)에서 163.2 ± 7.68 개로 가장 많은 발현량을 나타내었다. 損傷 후 24시간째 (ISCH-24hrs)에는 CA1 영역에서 14 ± 3.5 개, CA2 영역에서 10 ± 2.5 개, CA3 영역에서 5 ± 3 개, DG에서 6 ± 4 개의 c-Fos 단백 발현을 나타내었는데, 6시간째에 비하여 치상회 (DG)에서 발현이 거의 나타나지 않는 것을 관찰하였다. 虛血 損傷 48시간째 (ISCH-48hrs)

에서는 CA1 영역에서 51.88 ± 5.02 개, CA2 영역에서 1 ± 0.58 개, CA3 영역에서 0.33 ± 0.33 개, 그리고 DG에서 4.67 ± 1.76 개의 발현을 관찰하였으며, 6시간째와 24시간째에 비하여 CA1 영역에서 c-Fos 발현이 가장 유의하게 증가함을 확인하였다 (Fig. 1 and Fig. 2). 이상의 관찰에서 損傷 後 6시간째와 損傷 後 48시간째에서 c-Fos 단백질 발현이 영역에 따라 차이가

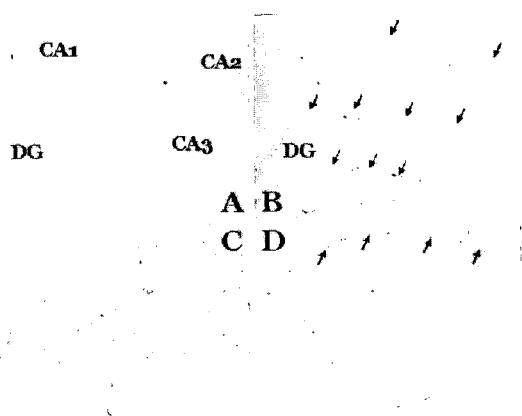


Fig. 1 Microphotographs showing immunohistochemical staining for c-Fos like protein in the hippocampus after transient forebrain ischemia injury. (A), normal; (B), 6hrs after; (C), 24 hrs after; (D), 48 hrs after. The majority of c-Fos labeled neurons displayed a strong intensity in immunostaining. Arrows indicate cFos labeled neurons.

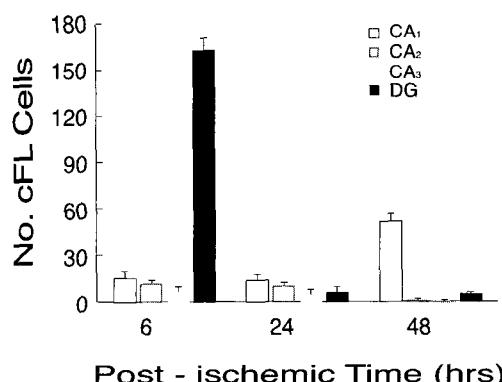


Fig. 2 Temporal changes of number of c-Fos like protein in hippocampus and dentate gyrus (DG) after transient forebrain ischemia injury. Values are mean \pm S.E.M. Number of each group was 6.

있으나 가장 잘 관찰되는 것을 알 수 있다. 이러한 결과를 근거로 腦虛血 損傷에 대한 電鍼刺戟의 영향을 관찰하고자 하였다.

2. 環跳의 電鍼刺戟이 一過性 前腦 虛血 損傷 초기에 유발된 c-Fos 면역단백 발현에 미치는 효과

一過性 前腦 虚血 損傷 유발후 環跳에 대하여 전침 자극군의 경우, 一過性 前腦 虚血 損傷 후 6시간 째에서 CA1 영역에서 25 ± 3.35 개 ($P < 0.05$), CA2 영역에서 15.67 ± 3.48 개, CA3 영역에서 8 ± 2.31 개, 齒狀回 (DG) 영역에서 205 ± 13.64 개 ($P < 0.05$)의 c-Fos 면역 단백질의 발현이 관찰되었다(Fig. 3 and Fig. 4). 이는 같은 시간의 前腦 虚血 損傷群과 비교할 때, CA1 영역과 齒狀回 (DG) 영역에서 유의한 증가를 나타내어 電鍼刺戟 자체가 前腦 虚血 損傷의 초기단계에서 해마부위의 c-Fos 면역 단백질의 발현을 촉진하는 것으로 추정된다.

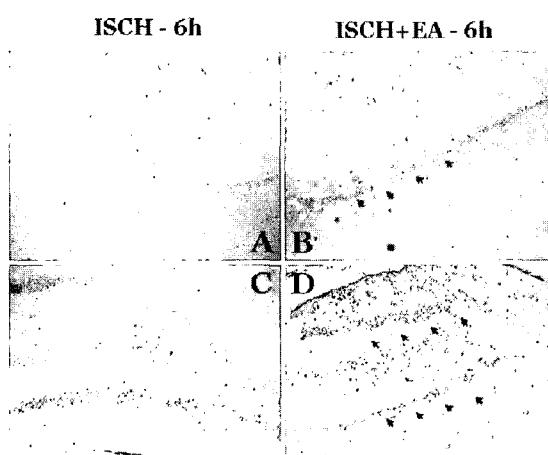


Fig. 3 Microphotographs showing the effect of electroacupuncture on c-Fos like protein expression in the hippocampus at 6hrs after transient forebrain ischemia injury. (A) and (B), magnification of CA1 area; (C) and (D), magnification of dentate gyrus area. ISCH - 6h, 6hrs after; ISCH+EA - 6h, electroacupuncture treatment. The majority of c-Fos labeled neurons displayed a strong intensity in immunostaining. Arrows indicate c-Fos labeled neurons.

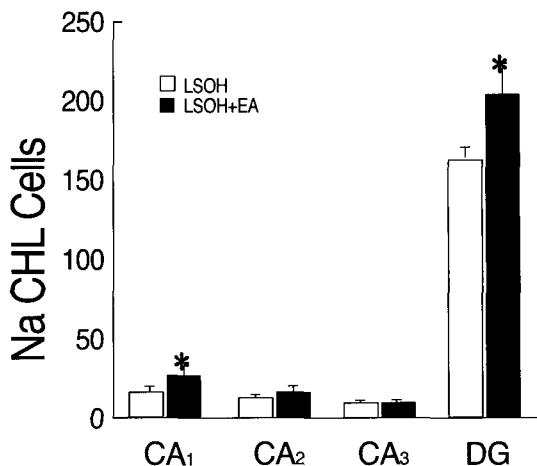


Fig. 4 Effects of electroacupuncture on c-Fos like protein expression in the hippocampus at 6hrs after transient forebrain ischemia injury. ISCH, ischemia injury; ISCH+EA, electroacupuncture treatment after the insult. Values are mean \pm S.E.M. Number of each group was 6. * $P < 0.05$ compared with the ischemia group.

3. 環跳의 電鍼刺戟이 一過性 前腦 虚血 損傷에 의한遲延性 c-Fos 면역단백 발현에 미치는 효과

一過性 前腦 虚血 損傷 후 48시간이 경과한 실험군 (ISCH-48hrs)에서는 CA1 영역에서 51.88 ± 5.02 개, CA2 영역에서 1 ± 0.58 개, CA3 영역에서 0.33 ± 0.33 개, 그리고 DG에서 4.67 ± 1.76 개의 발현이 관찰되었다. 이 기간의 발현양상은 損傷 초기단계와는 반대로 CA1 영역을 중심으로 c-Fos 면역 단백질의 발현이 증가되었다는 것이다 (Fig. 5 - A & C, and Fig. 6). 전침 자극군에서는 CA1 영역에서 32 ± 7.2 개 ($P < 0.05$), CA2 영역에서 1.67 ± 0.88 개, CA3 영역에서 0.67 ± 0.67 개, DG 영역에서 0.67 ± 0.58 개 ($P < 0.05$)의 발현이 관찰되었다 (Fig. 5 - B & D, and Fig. 6). 특히, CA1 영역과 DG 영역에서 虚血 損傷群과 비교하여 유의한 발현감소가 나타났으며, 電鍼刺戟이 損傷 초기 6시간째와 비교하여 반대 양상의 발현 억제결과를 보여주고 있다.

이를 종합하여 보면, 環跳에 가한 電鍼刺戟이 一過性 前腦 虚血 損傷에 따른 해마조직부위에서의 c-

Fos 면역 단백질의 발현양상에서 초기 6시간째 발현이 촉진되었고, 48시간째 발현이 억제되는 결과를 보여주었다.

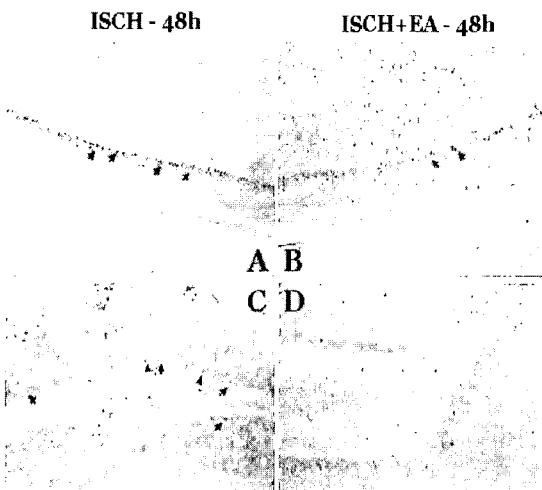


Fig. 5 Microphotographs showing the effect of electroacupuncture on c-Fos like protein expression in the hippocampus at 48 hrs after transient forebrain ischemia injury. (A) and (B), magnification of CA1 area. (C) and (D), magnification of dentate gyrus area. Notations are the same as previous figures.

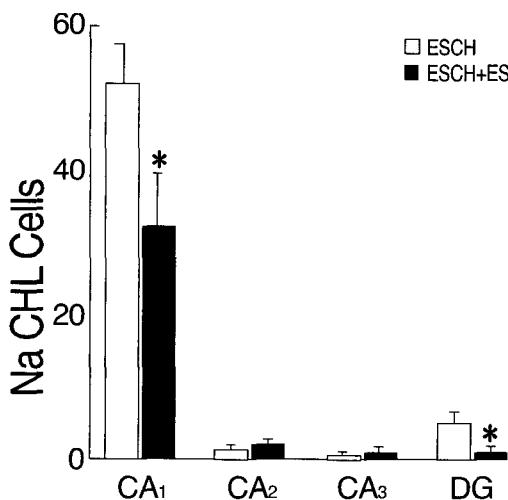


Fig. 6 Effect of electroacupuncture on c-Fos like protein expression in the hippocampus at 48 hrs after transient forebrain ischemia injury. Notations are the same as previous figures.

또한, 전침자극의 효과가 다른 대뇌 영역에서도 관찰되는지를 확인하기 위하여, 대뇌피질의 일부인 restrosplenial granular b cortex (RSGb)에서 c-Fos 면역 단백질 발현을 관찰하였다. 一過性 前腦 虛血 損傷 후 6 시간째에서는 虛血 損傷群에서는 거의 발현이 나타나지 않았으나, 電鍼刺戟群에서는 약간의 발현이 관찰되었다. 또한 48시간째에서는 虛血 損傷群에서 다량의 c-Fos 면역 단백질의 발현이 관찰되었고, 電鍼刺戟群에서도 c-Fos 면역 단백질의 발현이 비교적 감소된 추세를 보여 주고 있으나, 이러한 변화는 해마조직 부위와 비교할 때 유의한 정도는 아니었다 (Fig. 7).

고 찰

中風은 暴仆, 卒暴彊付, 不知人, 不省人事, 昏倒, 昏不知人, 精神夢寐 등의 갑작스런 의식장애와 偏枯, 四肢不舉, 半身不遂, 口眼喎斜 등의 운동장애 및 舌強

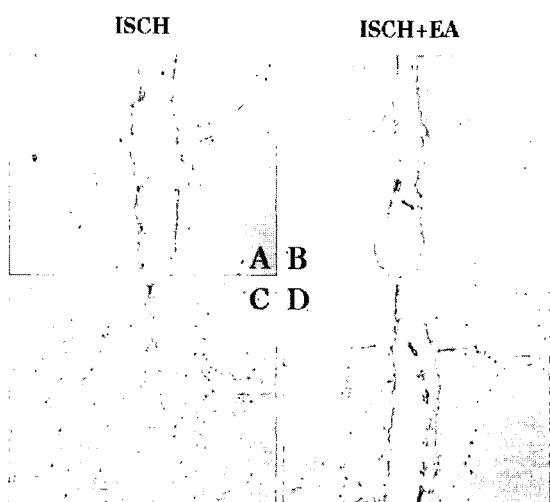


Fig. 7 Microphotographs showing the effect of electroacupuncture on the c-Fos like protein expression in the restrosplenial granular b cortex (RSGb) at 6 and 48 hrs after transient forebrain ischemia injury. (A) and (B) represent 6 hrs; (C) and (D) represent 48 hrs. Notations are the same as previous figures. There is little expression of cFos comparing with the hippocampus.

不語, 暴瘡, 言語蹇澁 등의 언어장애 증상이 나타나는 병증으로 정의되는 서양 의학적으로 중추신경계 질환들 다수에 포함되지만, 그 중 뇌혈관질환의 범주인 腦卒中이 가장 밀접하다고 볼 수 있다. 뇌혈관 질환은 뇌의 급격한 순환장애로 인하여 발생하는데, 대개 虛血성 뇌혈관 질환과 충혈성 뇌혈관 질환으로 양분하며, 그 중 대부분은 허혈성 뇌혈관 질환이다²⁾.

이러한 中風에 대한 연구를 위해서는 유발방법이 간단하고도 치사율이 낮으면서 재현 가능한 동물모델이 요구되어지는데, 특히 훈취를 이용한 虛血성 뇌손상을 일으키는 실험 모델로 前腦 虛血 (global cerebral ischemia)과 국소뇌虛血 (focal cerebral ischemia)이 존재한다. 前腦 虛血 모델은 일시적으로 대뇌의 넓은 부위에 영향을 주어 특정 취약 부분에 신경학적 損傷을 유발시키는 것으로, 주로 腦虛血 발생시 뇌의 변화 기전을 연구하는데 사용되고 있다. 이에는 양측 총경동맥을 결찰하는 2 - vessel occlusion 방법 (2-VO)과 양측 추골동맥 및 총경동맥을 결찰하는 4 - vessel occlusion 방법 (4-VO)이 있다¹⁵⁾. 훈취에서 4-VO는 뇌의 新皮質 (neocortex), 線條體 (striatum), 海馬 (hippocampus) CA1와 小腦 (cerebellum)에 선택적으로 신경세포의 손실을 가져 오며, 이중에서 hippocampus CA 영역의 방추형 신경세포들이 가장 쉽게 損傷을 받게 된다. 이들 CA1 부위의 신경세포들은 재판류후 3-4일이 지나면 죽기 시작하는 것으로 보고되었다¹⁶⁾. 특히 虛血손상 시점과 細胞死사이에 시간적 차이가 대부분의 경우 12시간에서 수일까지 차이가 나타나는 특징을 遲延性 細胞死 (delayed neuronal death)라고 칭한다¹⁶⁾. 이러한 연구는 주로 해마 (hippocampus)의 CA1 영역에서 연구되어져 왔으며, 일부에서는 線條體 (striatum), CA4 영역, 대뇌피질 (cerebral cortex)의 layer 2와 5에서 부분적으로 수행되었다.

大腦의 虛血 및 酸化的 損傷에 대한 한의학적 치료법에 대한 연구는 임상 및 동물실험등이 활발히 진행되어 왔으며, 이러한 연구들은 대부분 韓藥處方이나 黃芩¹⁷⁾, 鈞鈎藤¹⁸⁾, 綠茶¹⁹⁾ 등과 같은 韓藥材에 의한 예방 및 치료에 주로 집중되고 있다. 반면 鍼灸治

療에서의 中風과 관련한 동물실험이나 임상실험은 많지 않으며, 대개의 실험이 中風으로 유발된 후유증에 대한 치험사례나 연구가 대부분을 이루고 있다. 그러나, 최근에 鍼刺戟 및 電鍼刺戟이 虛血 損傷으로부터 신경손상을 보호할 수 있다는 연구들이 제시되고 있는데, Ou 등²⁰⁾은 百會와 人中 사이에 가한 電鍼刺戟이 대뇌의 국소적 虛血 損傷 동물에서 basic fibroblast growth factor (bFGF)의 발현을 증가시킨다고 보고하였고, 金 等²¹⁾은 足三里에 加한 電鍼刺戟이 들쥐에서의 前腦 虛血 誘發로 나타난 齒狀回 (dentate gyrus)의 세포재생을 증가시킨다고 보고하였다. 또한, 電鍼刺戟으로 大腦虛血로 인하여 증가된 NO가 억제되었다는 보고²²⁾와 大腦 局所 虛血 모델에서 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)²³⁾나 basic fibroblast growth factor (bFGF)²⁴⁾와 같은 neurotrophin의 증가가 관찰되었다는 보고는 앞에서 언급하였던 신경방어 치료제의 범주에 포함되는 결과라고 이해할 수 있다.

大腦虛血에 대한 반응으로 중추신경계내 신경세포는 immediate early gene의 일종인 c-Fos를 발현되는 것이 많은 관련연구에서 제시되었다. 虛血 損傷 後 c-Fos 발현의 기능적 의의에 대하여 많은 논란이 지속되는 가운데, 대개의 경우 c-Fos와 그에 관련한 유전물질들이 신경손상에 관련하거나 신경세포의 죽음의 과정에서 유도된다고 주장하였다²⁵⁾. 그러나 최근들이 c-Fos와 그와 관련된 gene들이 세포사에 관련되어 있다고 하더라도, 그 발현이 虛血 損傷으로부터 회복하는 필수적인 것이라는 연구가 제시되었다²⁶⁾. 아울러, 虛血 損傷 後 c-Fos antisense oligonucleotide를 사용하여 c-Fos의 발현을 억제한 실험에서 오히려 세포손상이 증가하고²⁷⁾, 損傷을 억제시키는 인자로 알려진 nerve growth factor (NGF)의 발현이 억제되는 것으로 밝혀졌다²⁸⁾. 또한 Cho 등²⁶⁾은 신경손상 방어제로 알려진 NAMDA (N-acetyl-O-methyldopamie)을 전처치하고 虛血 損傷을 유발하였을 때, c-Fos 단백질의 발현이 상향조정되는 것을 관찰함으로써 c-Fos의 신경세포방어작용에 대한 가능성을 넓히고 있다.

環跳 (GB 30)는 體骨, 體樞, 分中, 體壓, 樞中, 環谷이라고도 칭하는 足少陽膽經의 經穴로 足太陽膀胱經과도 交會하기 때문에 通經活絡, 消散經絡風濕과 宜利腰髀氣滯의 特性을 지니고 있으며, 下肢風濕痺痛, 癪瘍, 腰痛, 膝痛, 脚氣, 半身不遂, 麻木, 神經衰弱, 莽麻疹, 風疹등에 활용되며, 아울러 足少陽膽經과 足太陽膀胱經이 모두 유주하는 곳에 대한 다양한 치료가 능성이 예상되어진다. 기존의 실험동물실험에서 環跳의 電針刺戟은 통증역치를 상승시키며, 延髓와 中腦 內의 5-HT를 증가시키는 효과를 나타내었다. 또한, 흰쥐에서 環跳의 電鍼刺戟이 甲狀腺機能과 胃液分泌를 조절하는 작용을 나타내는 것이 확인되었으며, 家兔의 環跳에 가한 電針이 炎症反應을 억제하였다.^[3,4] 이를 통하여, 環跳에 대한 刺鍼이 中樞神經系에 영향을 줄 수 있는 가능성과 環跳의 刺鍼이 中風과 관련한 腦虛血 損傷에 치료효과를 기대하여 볼 수 있다.

본 연구에서는 一過性 前腦 虛血 損傷 後 6시간이 되는 損傷群에서는 해마부위의 영역에 따라 발현이 관찰되었는데, CA1 영역에서 15.75 ± 3.84 개, CA2 영역에서는 12 ± 1.53 개, CA3 영역에서는 7.67 ± 1.76 개, 그리고 齒狀回에서 163.2 ± 7.68 개로 가장 많은 발현량을 나타내었다. 虛血 損傷 48시간째에서는 CA1 영역에서 51.88 ± 5.02 개, CA2 영역에서 1 ± 0.58 개, CA3 영역에서 0.33 ± 0.33 개, 그리고 DG에서 4.67 ± 1.76 개의 발현을 관찰하였으며, 6시간째와 24시간째에 비하여 CA1 영역에서 c-Fos 발현이 가장 유의하게 증가함을 확인하였다. 이상의 관찰에서 損傷 後 초기 6시간째와 損傷이 진행중인 48시간째에서 c-Fos 단백질 발현이 영역에 따라 차이가 있으나 가장 잘 관찰되는 것을 알 수 있다. 이를 근거로 一過性 前腦 虛血 損傷 동물에서 環跳에 대한 電鍼刺戟의 효과를 연구하고자 하였다. 腦虛血 損傷에 대한 電鍼刺戟의 영향을 관찰한 결과, 一過性 前腦 虛血 損傷 유발후 環跳에 대하여진 電鍼刺戟은 CA1 영역에서 25 ± 3.35 개 ($P < 0.05$)와 齒狀回 (DG)영역에서 205 ± 13.64 개 ($P < 0.05$)의 c-Fos 면역 단백질의 발현이 관찰되었다. 이는 같은 시간의 前腦 虛血 損傷群과 비교

할 때 유의한 증가를 나타내어 電鍼刺戟 자체가 前腦 虛血 損傷의 초기단계에서 해마부위의 c-Fos 면역 단백질의 발현을 촉진하는 것으로 추정된다. 반면, 一過性 前腦 虛血 損傷 後 48시간이 경과한 실험에서는 전침 자극이 CA1 영역에서 32 ± 7.2 개 ($P < 0.05$)와 DG 영역에서 0.67 ± 0.58 개 ($P < 0.05$)로 虛血 損傷群과 비교하여 유의한 발현감소가 나타났으며, 이는 電鍼刺戟이 損傷초기 6시간째와 비교하여 반대 양상의 발현 억제결과를 보여주고 있다. 이러한 현상이 다른 대뇌조직에서도 관찰되는지를 확인하기 위하여, 대뇌피질의 일부인 restrosplenial granular b cortex (RSGb)에서 c-Fos 면역 단백질 발현을 관찰하였으나, 변화는 해마조직 부위와 비교할 때 유의한 정도는 아니었다.

이러한 결과에 관련하여, 環跳와 大腦虛血 損傷모델에 대한 실험은 아직까지 보고된 예가 없다. 다만, 본 연구에서 環跳의 電鍼刺戟이 一過性 前腦 虛血 損傷을 억제한 결과를 이해하기 위하여 해부학적으로 근접되어 있는 좌골신경에 관련된 다른 연구를 제시하고자 한다. Damien 등^[29]은 좌골신경 (sciatic nerve)에 가한 유해성 전기자극이 海馬 (hippocampus)에서 c-Fos, Jun, Krox 등 의 전사인자 (transcription factor)를 발현시키는 것이 확인되었으나, 아직 그 작용이나 발현되는 결과에 대하여 정확한 이해는 아직 없는 실정이다. 그러나, 이러한 유해성 자극에 대한 해마조직의 반응이 전기생리학적 또는 분자생물학적으로 다양하게 연구되었는데, CA 1 중간신경세포 (interneuron)의 흥분과 방추형 신경세포 활동성의 억제를 유도하며^[30], 해마의 뇌파를 증강시키고^[31], 국부적 혈행을 증가시킨다^[32]는 것이 보고되었다. 물론, 環跳의 電鍼刺戟이 坐骨神經에 가한 電鍼刺戟과 같다고 인정하기는 아직 어렵지만, 이러한 자극에 의한 해마 (hippocampus)에서의 전사인자의 발현이 촉진된다는 것은 외부자극에 대한 대뇌 자체의 방어능력을 향상시킬 수 있는 가능성을 타진 할 수 있으며, 또한 병리적 환경에 노출되어 損傷되는 대뇌를 보호할 수 있는 방법을 개발 할 수 있으리라 사료된다. 더욱이, Cho 등^[33]은 足太陽膀胱經의 至陰 刺鍼

이 후두엽의 시각영역을 자극할 수 있음을 확인하였다. 또한, 최근에 많은 鍼刺戟 및 電鍼刺戟이 大腦虛血과 관련한 실험이 진행되어 신경손상을 억제하거나 보호하는데 작용함을 제시하고 있다. Uchida 등³⁴⁾은 鍼刺戟이 대뇌피질의 혈액 흐름 및 세포의 아세틸콜린 유리를 증가시키며, 風府와 人中の 電鍼刺戟 (7Hz, 6mA)이 前腦虛血동물에서 해마부위의 c-Fos 단백질 발현을 증가시키고, CA1 영역의 세포사를 억제한다는 결과를 보고³⁵⁾하고 있다. Zhao 등³⁶⁾은 마찬가지로 風府와 人中の 電鍼刺戟 (15 HZ, 6 mA)이 일과성 국소虛血 損傷동물의 損傷을 억제할 수 있다고 보고하였다. 또한, 大椎와 百會의 電鍼刺戟이 大腦虛血로 유발된 NO의 증가를 정상으로 낮추어 大腦虛血 損傷을 억제한다는 보고³⁷⁾를 살펴볼 수 있다.

이러한 연구결과들은 비록 環跳의 효과를 직접적으로 뒷받침하지 않으나, 鍼刺戟 자체가 중추신경계에 다양한 영향을 미치며, 아울러 大腦虛血과 같은 중추신경계의 병변에 치료효과를 나타낼 수 있음을 보여준다. 앞으로 다양한 經穴이나 經絡의選擇을 통한 중추신경계에 대한 작용과 一過性 前腦虛血 損傷과 같은 病理的 모델에서의 鍼刺戟 효과를 확인하여야 하며, 본 연구에서 확인된 環跳의 前腦虛血 損傷에 대한 보호효과에 대한 다양한 실험이 진행되어 그 효과를 구체화하여야 할 것이라 사료된다.

결 론

본 연구에서는 環跳 (GB30)에 가한 電鍼刺戟이 Sprague-Dawley계 흰쥐의 一過性 前腦虛血에 의하여 유발되는 神經細胞死 (neuronal cell death)에 신경보호 효과를 확인하여 중추신경계에 대한 영향을 줄 수 있는지를 규명하고, 環跳의 電鍼刺戟을 통한 中風과 관련된 치료효과 가능성을 개발하고자 하였다.

1. 一過性 前腦虛血 損傷과 海馬部位의 c-Fos 면역 단백 발현양상을 관찰한 결과, 一過性 前腦虛血 損傷 後 6시간에서는 해마 (hippocampus) 부위의 齒狀回 (dentate gyrus)에서 163.2 ± 7.68 개로 가장 많은 발

현량을 나타내었고, 48시간째에서 CA1 영역에서 51.88 ± 5.02 개로 발현의 증가를 관찰하였다.

2. 環跳의 電鍼刺戟이 一過性 前腦虛血 損傷에 미치는 효과를 관찰한 결과, 一過性 前腦虛血 損傷 後 6시간째에서 CA1 영역에서 25 ± 3.35 개 ($P < 0.05$)와 齒狀回 (DG) 영역에서 205 ± 13.64 개 ($P < 0.05$)의 c-Fos 면역 단백질의 증가된 발현이 관찰되었다. 반면, 一過性 前腦虛血 損傷 後 48시간에서는 CA1 영역에서 32 ± 7.2 개 ($P < 0.05$)와 DG 영역에서 0.67 ± 0.58 개 ($P < 0.05$)의 발현이 관찰되어, 虛血 損傷群에 비하여 유의한 감소를 보였고, 이는 電鍼刺戟이 損傷 後 6시간째와 비교하여 반대 양상의 발현 억제결과를 보여주고 있다.

이상의 결과를 정리하여보면, 해마조직부위에서의 c-Fos 면역 단백질의 발현은 損傷초기 6시간에서는 電鍼刺戟으로 발현이 촉진되었고, 48시간째에는 발현이 억제되었다. 이러한 결과는 損傷초기의 c-Fos 면역 단백질의 발현이 뇌세포를 보호하는 기전에 관여되는 것으로 추정되며, 아울러 電鍼刺戟이 腦虛血 損傷을 방어할 수 있는 효과를 나타내는 것으로 이해되어 진다.

Acknowledgments : 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R02-2001-00452)지원으로 수행되었음.

참고문헌

- Waltimo O, Kaste M, Aho K, Kotila M. Outcome of stroke in the Espoo-Kauniainen area, Finland. Ann Clin Res. 1980;12(6):326-30.
- 김영석. 임상중풍학. 서울:서원당. 1997:303-8,317-29.
- 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1989:362-363.
- 常青. 實用中風防治手冊. 北京:中國中醫藥出版社. 1993:24-25,46.
- Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. Stroke.

- 1988;19: 913-914.
6. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O' Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* 2000;179:1-33.
 7. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol.* 2000;62:215-249.
 8. Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature.* 1984;311(5985):433-8.
 9. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci.* 1991;14:421-51.
 10. Nowak TS, Ikeda J, Nakajima T. 70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Stroke.* 1990;21:107-111.
 11. Kamme F, Campbell K, Wieloch T. Biphasic expression of the Fos and Jun families of transcription factors following transient forebrain ischaemia in the rat. Effect of hypothermia. *Eur J Neurosci.* 1995;77:2007-2016.
 12. Paul T, Akins, Philip K, Liu, Chung Y, Hsu. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia; Friend or Foe?. *Stroke.* 1996; 27:1682-1687.
 13. 王富春 洪杰. 經穴治病明理. 北京:科學技術文獻出版社. 2000:289-290.
 14. 羅永芬 主編. 脈穴學(供鍼灸學專業用). 上海科學技術出版社. 1998:186-187.
 15. Ginsberg MD, Busto R. Rodent Model of Cerebral Ischemia. *Stroke.* 1989;20:1627-1642.
 16. Pulsinelli WA, Brierly JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982;11:491-498.
 17. 이병철. 흰쥐의 前腦 虛血 모델에 對한 黃芩의 神經
防禦效果. 경희대학원 박사학위. 2000:1-46.
 18. 이인환. 흰쥐의 前腦 虛血 모델에 對한 鈎鉤藤의 神經防禦效果. 경희대학원 박사학위논문. 2000:1-59.
 19. Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee JK et al. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res. Bull.* 2000;53:743-749.
 20. Ou YW, Han L, Da CD, Huang YL, Cheng JS. Influence of acupuncture upon expressing levels of basic fibroblast growth factor in rat brain following focal cerebral ischemia-evaluated by time-resolved fluorescence immunoassay. *Neurological Res.* 2001; 23:47-50.
 21. Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, Huh Y, Chung JH, Seo JC, Kang JE, Lee HJ, Yim SV, Kim CJ. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.* 2001;297(1):21-4.
 22. Zhao P, Huang ZN, Chen G, Cheng JS. Electro-acupuncture attenuates nitric oxide release from rat striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *Acupunct Electrother Res.* 2000;25(2):101-7.
 23. Wei G, Huang Y, Wu G, Cao X. Regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor expression by electroacupuncture after transient focal cerebral ischemia. *Acupunct Electrother Res.* 2000;25(2):81-90.
 24. Yang WO, Huang YL, Da CD, Cheng JS. Electroacupuncture reduces rat's neuronal ischemic injury and enhances the expression of basic fibroblast growth factor. *Acupunct Electrother Res.* 1999;24(1):1-10.
 25. Preston GA, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, Srinivasan DG, Alcorta DA, Barrett JC. Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Mol Cell Biol.* 1996;16(1):211-8.
 26. Cho S, Park EM, Kim Y, Liu N, Gal J, Volpe BT, Joh TH. Early c-Fos induction after cerebral ischemia: a possible neuroprotective role. *J Cereb Blood Flow*

- Metab. 2001;21(5):550-6.
- 27. Zhang Y, Widmayer MA, Zhang B, Cui JK, Baskin DS. Suppression of post-ischemic-induced fos protein expression by an antisense oligonucleotide to c-fos mRNA leads to increased tissue damage. *Brain Res.* 1999;832(1-2):112-7.
 - 28. Cui JK, Hsu CY, Liu PK. Suppression of postischemic hippocampal nerve growth factor expression by a c-fos antisense oligodeoxynucleotide. *J Neurosci.* 1999;19(4):1335-44.
 - 29. Damien Pearse, Asim Mirza, John Leah, Jun, Fos and Krox in the hippocampus after noxious stimulation: simultaneous-input-dependent expression and nuclear speckling. *Brain Res.* 2001;894:193-208.
 - 30. Zheng F, Khanna S. Hippocampal field CA1 interneuronal nociceptive responses: modulation by medial septal region and morphine. *Neuroscience.* 1999;93:45-55.
 - 31. Archer DP, Roth SH. Pharmacodynamics of thiopentone: nocifensive reflex threshold changes correlate with hippocampal electroencephalography. *Br J Anaesth.* 1997;79(6): 744-9.
 - 32. Sakiyama Y, Sato A, Senda M, Ishiwata K, Toyama H, Schimidt RF. Positron emission tomography reveals changes in global and regional cerebral blood flow during noxious stimulation of normal and inflamed elbow joints in anaesthetized cats. *Exp Brain Res.* 1998;118:439-446.
 - 33. Cho ZH, Chung SC, Jones JP, Park JB, Park HJ, Lee HJ, Wong EK, Min BI. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95:2670-2673.
 - 34. Uchida, S., Kagitani, F., Suzuki, A., Aikawa, Y., Effect of acupuncture-like stimulation on cortical cerebral blood flow in anesthetized rats. *Jpn. J. Physiol.* 2000;50: 495-507.
 - 35. Ying SX, Cheng JS. Effects of electro-acupuncture on C-FOS expression in gerbil hippocampus during transient global ischemia. *Acupunct Electrother Res.* 1994;19(4):207-13.
 - 36. Zhao P, Cheng J. Effects of electroacupuncture on extracellular contents of amino acid neurotransmitters in rat striatum following transient focal cerebral ischemia. *Acupunct Electrother Res.* 1997;22(2):119-26.
 - 37. Xu N, Xu G, Zhong P, Wang L, Zhu S, Chen Q. Effects of electroacupuncture at du meridian on contents of nitric oxide and endothelin in rats with acute cerebral ischemia. *Zhen Ci Yan Jiu.* 1996;21(3):18-21.