

艾葉 및灸津藥鍼이一過性前腦虛血損傷에 미치는效果

김재효¹ · 이관형¹ · 안영남¹ · 김용득¹ · 김경식¹ · 손인철¹

¹원광대학교 한의과대학 경혈학교실

Effects of Folium Artemisiae Argyi and Moxa Tar' Herbal Acupuncture on Transient Forebrain Ischemic Injury in Rats

Jae-Hyo Kim¹, Kwan-Hyung Lee¹, Young-Nam An¹, Yong-Deuk Kim¹,
Kyung-Sik Kim¹, In-Chul Sohn¹

¹Dept. of Meridian and Acupoint, College of Oriental Medicine, WonKwang University

Abstract

Objectives : Acupuncture and herbal medicine have been used to prevent and treat the cerebrovascular accident, such as a stroke, and many studies of acupuncture and moxibustion concerning to the stroke have been undertaken in the human and various animals. Recently, the new therapeutic tool, that is herbal acupuncture, has been developed since the 1950' and applied to various diseases including the cerebrovascular accident. The main characteristics of herbal acupuncture are a combination of acupuncture and herbal medicine. It was not well known the therapeutic effect and the mechanism of herbal acupuncture on transient forebrain ischemic injury, although it has been used frequently in clinics.

Methods : In this study, effects of folium Artemisiae Argyi and moxa tar' herbal acupuncture on the GV₂₀, named *Baek-Hue*, on neuroprotection after the transient forebrain ischemia were investigated in Sprague-Dawely rats. Expressions of cFos, FosB and BDNF protein in the hippocampus and cortex were observed at 2 hrs and 48 hrs after transient forebrain ischemia by immunohistochemistry and ELISA technique.

Results : Expression of cFos protein was increased slightly in the hippocampus and cortex at 2 hrs after transient forebrain ischemia, but FosB protein was increased highly comparing to cFos protein. However, pretreatment with folium Artemisiae Argyi or moxa tar' herbal acupuncture on GV₂₀ significantly increased expression of cFos protein and significantly decreased expression of FosB protein compared to control group, respectively. These features were observed in the motor cortex and retrosplenial granular cortex as well as the hippocampus. Also, pretreatment with folium Artemisiae Argyi and moxa tar' herbal acupuncture on GV₂₀ significantly increased the expression of BDNF protein in the hippocampus and the cortex compared to control group at 48 hrs after transient forebrain ischemia, respectively.

Conclusions : These results suggest that pretreatment with folium Artemisiae Argyi or moxa tar' herbal acupuncture on GV₂₀ has neuroprotective effect on transient forebrain ischemia and theherbal acupuncture on GV₂₀ may be related to antioxidative function.

Key words : folium Artemisiae Argyi, transient forebrain ischemia, GV₂₀, immediate early gene, BDNF

· 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 연구비는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2001-000-00452-0)지원
으로 수행되었음.

I. 緒 論

腦卒症과 관련하여 中風의 病因病理에 대한 諸家說은 風, 火, 氣虛, 濕痰 및 瘀血說로 요약되며, 이러한 原因은 平소의 攝生에서 養生失宜, 五志過極, 七情內傷, 房勞六慾過多, 色慾不節, 勞力內傷, 酒色過度, 內外勞傷, 膏粱厚味, 厚味醇酒, 肥盛 등의 要因으로 五臟의 機能失調를 초래하여 內生風, 火熱, 濕痰, 瘀血 및 虛로 나타나고⁴⁾, 中風의 四大症狀으로 偏枯, 風痺, 風懿, 風非 등과 그 주요증상으로 卒中暴仆, 暴痞, 口眼喎斜, 手足癱瘓, 人事不省, 言語蹇澁, 痰涎壅盛 등을 언급하며, 이에 관련한 病因病機, 藥物治療 및 鍼灸治療 연구들이 체계화되고 있다¹⁾.

腦卒中은 神經障礙 소견이 24 時間 以上 지속하는 腦血管에 기인한 急性 腦機能障礙를 말한다. 이는 크게 腦硬塞과 腦出血로 구분하며, 다시 腦硬塞은 腦血栓症과 腦硬塞症으로, 腦出血은 腦實質內 出血과 蜘蛛膜下 出血로 區分하고 있는 世界的으로 가장 흔한 사망 원인이자 또한 심각한 신체적 後遺症을 남기는 질환이며, 이중 虛血性 腦血管이 가장 큰 비율을 차지하고 있다²⁾. 이로 인해 국내외적으로 매우 다양한 연구가 진행되어 오고 있으며, 특히 실험동물을 이용하여 虛血性 腦 損傷을 유발시킨 모델로 前腦 虛血과 局所 腦虛血이 존재한다.

흰쥐에서 兩側 椎骨動脈 및 兩側 頸動脈을 閉鎖시켜 뇌에 혈액공급을 완전히 차단 (four vessel occlusion, 4-VO)한 다음 혈액공급을 재개하는 虛血 및 再貫流 損傷은 3-4일 이후 뇌의 新皮質, 線條體, 海馬 CA1 부위와 小腦에 선택적으로 神經세포의 손실이 나타나는 遲延性 神經細胞死 현상이 관찰되는 것으로 알려져 있다³⁾. 이와 같은 지연성 신경 세포사의 병

리현상은 前腦 神經細胞에서 glutamate의 과도 축적으로 NMDA, AMPA와 kainate 수용체의 활성화 및 세포내 칼슘이온 증가로 인한 흥분독성과 재관류 후 유리산소기 (free radical)에 의한 神經세포 損傷, 단백질합성의 장애 및 단백질 분해, 미토콘드리아의 기능장애, 염증세포의 활성화 그리고 細胞自滅死 기전의 활성화 등이 제시되고 있다⁴⁾.

藥鍼療法은 韓醫學에서 十二經脈, 奇經八脈의 經穴과 經外奇穴, 阿是穴 등의 특정 俞穴을 刺鍼하여 經脈의 기능을 조절함으로써 精神氣血, 五臟六腑의 질병을 치료하는 經絡理論과 韓藥의 氣味, 性象, 作用을 살피어 임상 치료 효과를 극대화시키고 약물을 인체의 기관이나 病所에 접근, 작용시키는 기전을 연구하는 本草學 理論을 결합시킨 新鍼療法이다. 특히, 藥鍼療法은 내복약이 갖는 소화흡수 과정에서의 장시간 소요, 유효성분의 소실 및 복용의 불편함 등의 단점을 經絡, 經穴을 통한 자극과 약물 흡수라는 점에 근거하여 극복함으로써 최소량의 약물로서 최대의 효과를 기대할 수 있다는 이점을 지니고 있다⁵⁾.

灸法의 主材料인 艾葉은 菊花科에 속하는 다년생 초목인 황해쑥 (*Artemisia argyi*. Lev et Vant), 약쑥 (*Artemisia asiatica* Nakai.)과 野艾 (*Artemisia vulgaris* L.)의 잎을 건조한 것으로서, 調理氣血, 逐寒濕, 溫經止血, 安胎하여 心腹冷痛, 泄瀉, 久痢, 下血, 月經不調, 帶下, 胎動不安, 癰瘍, 疥癬 등에 사용되었다⁶⁾. 최근의 연구 결과를 보면, 朴 等⁷⁾는 艾葉의 methanol 추출물에서 항염증작용 및 진통작용을 나타내며, 쑥의 당지질 성분들이 암세포에 대하여 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었고⁸⁾, caffeic acid, catechol, protocatechuic acid 등을 많이 함유하여 抗酸化 效果가 우수함을 밝

했다⁹⁾.

그러나, 아직까지 艾葉과 관련한 虛血性 前腦 損傷에 관한 연구가 진행되지 않았으며, 藥鍼의 개발 역시 미미한 수준에 머물러 있다. 이에 본 연구에서는 前腦 虛血性 損傷에 따른 神經細胞 損傷과 死滅에 대한 艾葉 藥鍼의 效果를 조사하고자 하였다. 이를 위하여, 腦虛血 損傷 後 神經세포 사멸과정과 생존과정에 역할을 하는 것으로 알려진 cFos, FosB 및 BDNF 단백질의 발현 변화를 관찰하였으며, 아울러 中風에 활용도가 높은 百會에 대한 艾葉 藥鍼이 一過性 前腦 虛血 損傷으로 인한 cFos, FosB 및 BDNF 단백질의 변화에 영향을 미치는지를 관찰하였다.

II. 實驗方法

1. 實驗 動物

실험동물은 체중 200~250 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만 가한 虛血 損傷群 (Con), 艾葉 藥鍼 시술 후 一過性 虛血 損傷을 유발한 藥鍼群 (Moxa-W or Moxa-Tar)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 Pulsinelli & Buchan¹⁰⁾이 제시한 양측 추골동맥 (vertebral a.)과 경동맥 (common carotid a.)의 4개의 혈관 폐색법에 의하여 유발시켰다. 실험동물은 2% halo-

thane (2-Bromo-2-chloro - 1,1,1 - trifluoroethane, Sigma-Aldrich Inc, U.S.A.)과 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 2경추 사이로 지나가는 양측 추골동맥 (vertebral artery)을 전기인두로 燒灼하여 영구적으로 폐색시켰다. 추골동맥 폐색을 유발 한 후 24시간 후, 경동맥 폐색을 위하여 흰쥐를 양와위 자세 (supine position)로 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 봉합사로 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. 藥鍼液 製造

약재 : 약재는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입하여 정선한 후에 사용하였다.

水溶性 추출물 : 艾葉 200 g을 물 2000 ml와 함께 환저플라스크에 넣고 환류장치를 부착하여 1시간동안 전탕한 후 여과포로 여과하였다. 여과액을 3000 rpm에서 20분간

원심분리한 후 상층액을 취하여 52 °C에서 진공농축으로 감압농축시켜 -70 °C에서 24시간 동결시킨다. 그 후 동결건조기로 48시간 동결건조하여 15.5 g의 분말시료를 얻었으며, 이를 saline을 용매로 하여 50 mg/ml의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

灸津 추출물 : 삼각 플라스크 입구에 개목 링을 올려놓고, 1회마다 艾葉 (봉래구관, 서울) 5g을 뜸 절구를 이용하여 원뿔 모양으로 만든다. 다음 넓은 면을 아래로 개목 링위에 올려놓고, 불을 붙여서 삼각 플라스크 바닥으로 흐르는 뜸 tar를 모은다. 뜸속이 타면서 침강하는 tar 성분이 더 이상 나오지 않으면 버리고, 새로운 뜸으로 대체하기를 반복한다. 플라스크 바닥에 모인 뜸 tar를 methanol 100%로 녹이고 column을 이용하여 재 등의 불순물을 제거하고 40±2°C를 중탕 증류기를 이용하여 methanol을 90% 증발시킨다. 남은 tar 성분과 methanol 혼합물을 -70°C의 냉동동결건조기를 이용하여 72시간 건조시킨후, ethyl alcohol을 용매로 이용하여 20 mg/ml의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

4. 取穴 및 藥鍼 刺戟

一過性 前腦 虛血 損傷을 유발하기 1 시간 전에 약침자극을 실시하였다. 실험동물의 藥鍼 刺戟은 督脈의 百會 (GV 20)을 인체와 상응하게 頤窩의 頭頂部上 에서 取穴하였는데, 頤窩의 耳尖을 이은 선과 頤窩 두개골 정중선이 만나는 부위를 百會로 설정하였으며, 藥鍼 注入은 26 gauge 1ml 注射器를 사용하여 經穴部位의 皮下에 삽입하여 각각 0.4 ml을 1회 주입하였다.

5. cFos & FosB 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 고정된 후 30% sucrose에서 2일 이상 방치하였다. 냉동절편기 (Leica, Germany)를 이용하여 35 μm의 두께로 조직절편을 만들어서 slide glass에 부착 후, 세포내 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 10% H2O2용액에서 20분 동안 진탕하고, 그 후 pH 7.4의 PBS 용액으로 3회 이상 세척하고 0.5% Triton-X 100으로 20분간 진탕한 후 PBS로 2회 이상 세척하였다. 그후 blocking agent (normal goat serum)를 실온에서 60분간 처리한 다원일차항체 (cFos, Oncogene Sci, USA, 1:1000; FosB, SC-7203, Santa Cruz)를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 2시간 동안 실온에서 진탕시키고 PBS로 세척하였다. 그 후 이차항체인 biotinylated anti-rabbit & anti-mouse immunoglobulin (Dako, Denmark)을 실온에서 40분간 처리하여 PBS로 세척하고, streptavidin peroxidase (Vector ABC kit)를 90분간 처리하여 PB로 세척한 뒤 chromogen인 0.05% diaminobenzidine으로 발색하였다. 증류수로 1시간 동안 세척한 후 광학 현미경하에서 진갈색의 cFos 또는 FosB 양성 세포를 관찰하였고 화상자동분석시스템 (Image-Pro Plus, USA)을 이용하여 海馬부위 (hippocampus) 및 대뇌피질에서 cFos 또는 FosB 양성 세포의 수를 측정하였다.

6. BDNF 단백질 측정 및 정량

ELISA (Enzyme-linked immunoassay;

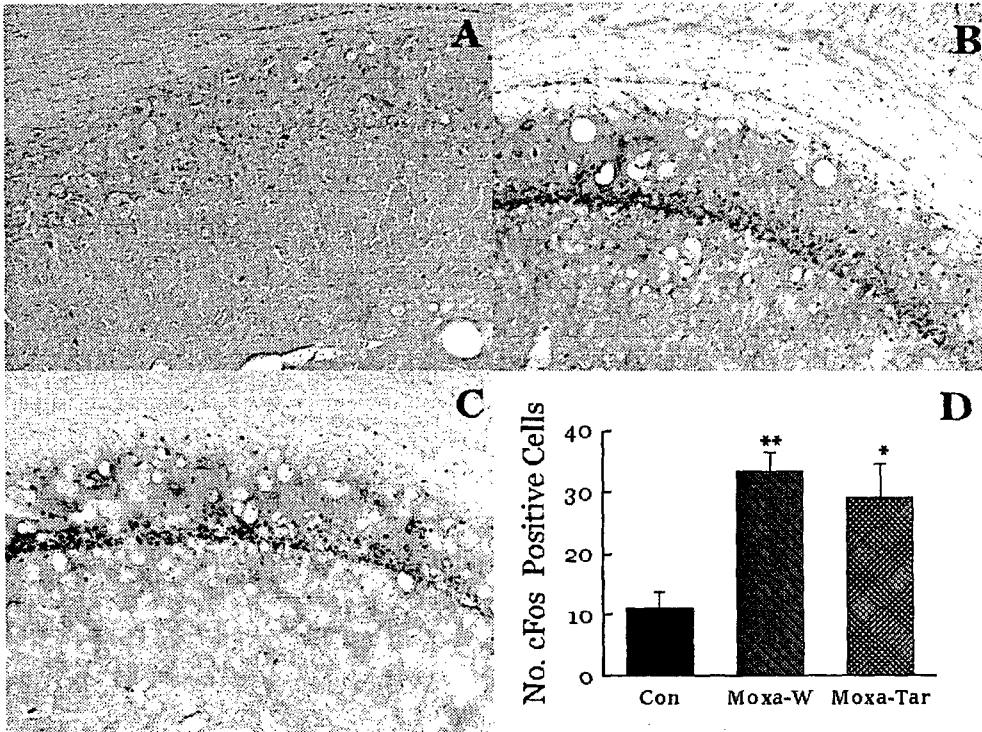


Fig. 1. Effects of folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture of GV₂₀ on cFos positive protein expression in the CA1 at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from the tar of folium Artemisiae Argyi in Moxa-Tar group. Values are Mean±SE. Number of each group is 10. * significant difference from control group (* p < 0.05 and ** p < 0.01).

promega, U.S.A.) 방법을 이용하여 신경친화성 물질의 하나인 BDNF 단백질을 측정하였다. 질소 탱크에 침수시킨 조직에서 단백질을 추출하기 위해 teflon grass homogenizer를 이용하여 충분히 분쇄하였으며 이때 lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 % NP40, 10 % glycerol, 1mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 0.5 mM sodium vanadate)는 100 mg 조직의 10 volume으로 사용하였다. 이어 13,000 g, 4°C에서 30분간 원심분리를 하여 상등액을 취한

후 DPBS buffer (per liter; 0.2 g KCl, 8.0 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 1.15 g Na₂HPO₄ pH 7.35, 133 mg CaCl₂·2H₂O, 100 mg MgCl₂·6H₂O)를 이용하여 1/3로 희석하고 희석액 100 µl를 ELISA에 사용하였다. 항 BDNF 단일항체로 ELISA plate well을 coating한 후 O/N동안 배양시킨 후 1번 세척하고 Block & Sample 1×Buffer를 이용하여 비특이적인 단백질 결합부를 제거하고 1번 세척하였다. 그 다음 BDNF 표준시약과 실험 조직을 plate well에 가한후 2시간~O/N으로 배양한 후 5번 세

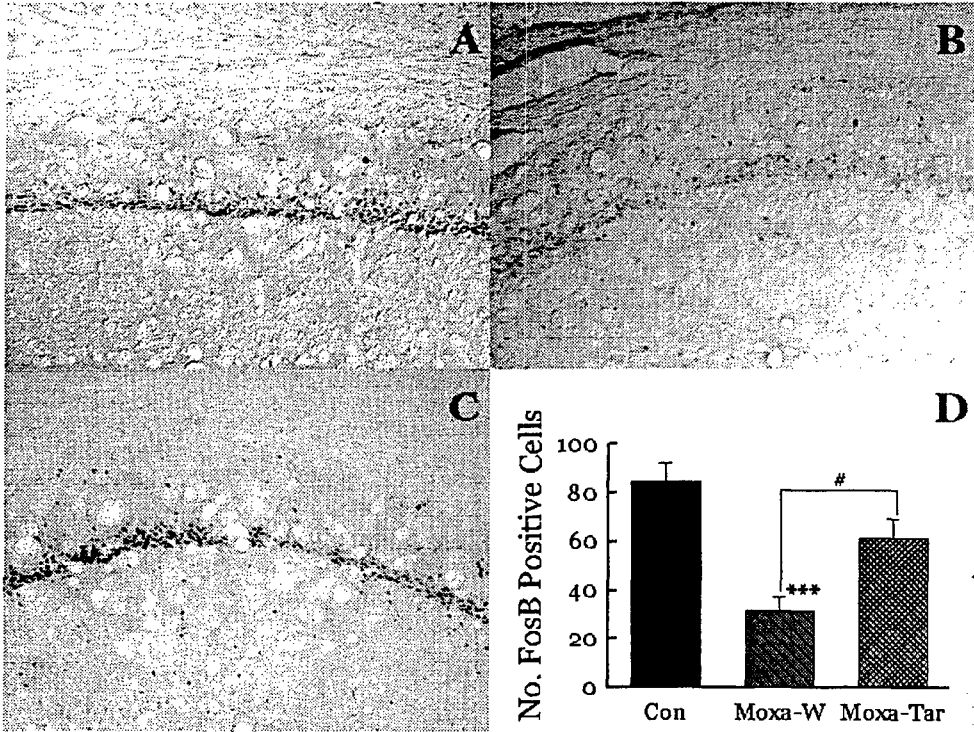


Fig. 2. Effects of folium *Artemisiae Argyi'* herbal acupuncture of GV₂₀ on FosB positive protein expression in the CA1 at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by folium *Artemisiae Argyi'* herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with folium *Artemisiae Argyi'* herbal acupuncture extracted from the tar of folium *Artemisiae Argyi'* in Moxa-Tar group. Notations are the same as the previous figures. * significant difference from control group (***p* < 0.001); # significant difference between the herbal acupuncture groups (# *p* < 0.05).

척하고, 1/500으로 희석한 항인체 BDNF (anti-Human BDNF) 복합항체를 가하고 2시간 동안 배양하였다. 배양된 표준시약 및 조직이 담겨진 plate well을 5번 세척 후 항 IgY HRP (Horse-Radish Peroxidase)를 가하고 1시간 가량 상온에서 배양하고 다시 plate well을 5번 세척 후 발색반응을 위해 TMB 용액을 가하여 상온에서 10분간 배양 후 발색반응을 관찰하였다. 적절한 발색반응이 나타나면 1N hydrochloric acid를 가하여 반응을 멈추고 ELISA Reader (Molecular Devices,

THERMO max, U.S.A.) 로 자외선 450 nm에서 흡광도를 측정한 다음 시약의 표준값을 정하기 위하여 각 농도별로 광학밀도 (OD; optical density) 값을 측정하여 표준곡선을 구하였고 실험시약의 광학밀도를 측정하였다. 이후 실험시약의 농도를 정량화하기 위하여 표준곡선을 이용하여 실험조직의 BDNF 농도를 구하였다.

7. 統計 (Statistics)

컴퓨터 통계프로그램인 SigmaStat 2.0

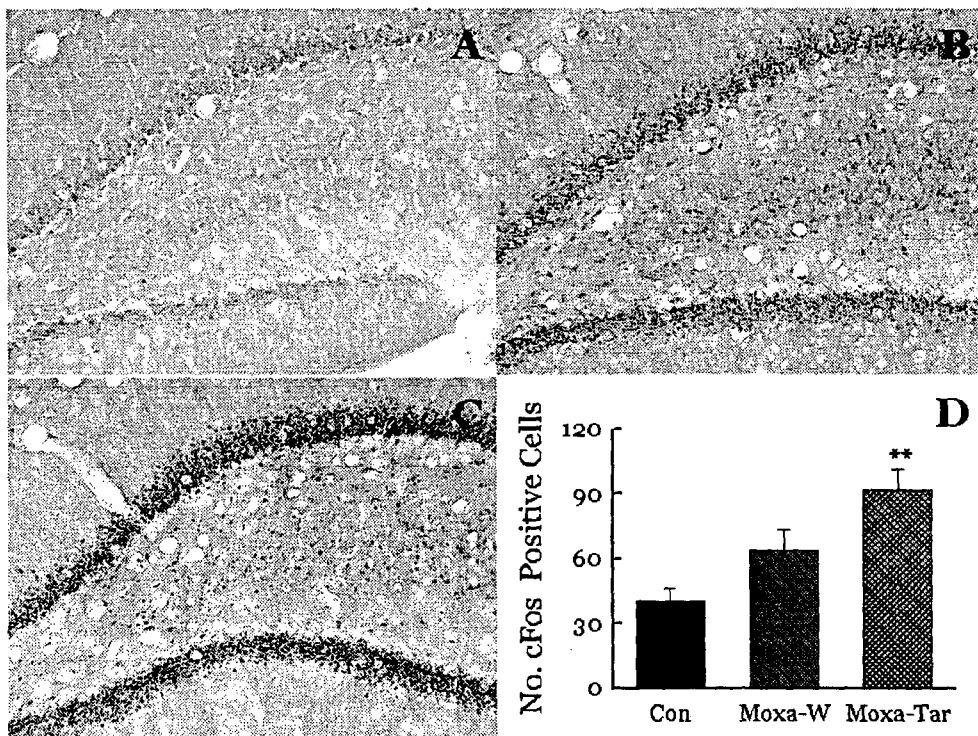


Fig. 3. Effects of folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture of GV₂₀ on cFos positive protein expression in the dentate gyrus at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from the tar of folium Artemisiae Argyi in Moxa-Tar group. Notations are the same as the previous figures. * significant difference from control group (** p < 0.01).

(SPSS Inc., U.S.A.)을 이용하였으며, 실험결과는 Mean±S.E.M.로 나타내었고, 통계검정은 unpaired student t-test와 일원분산분석법으로 실시하였다. P 값이 0.05 미만인 경우에만 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 實驗結果

1. 百會 艾葉 藥鍼 刺戟과 一過性 前腦 虛血 損傷 후 흰쥐의 海馬영역에서 cFos 및 Fos B 단백질 발현 樣相의 변화

본 연구에서는 一過性 前腦 虛血 損傷 정도와 艾葉 藥鍼의 效果를 관찰하고자 흰쥐의 대뇌를 영역별로 관찰하였다. 一過性 前腦 虛血 損傷을 유발한 대조군의 경우, 손상 후 2시간째에서 해마의 CA1 부위 cFos 단백질 발현은 11.3±2.6 개이며, FosB 단백질 발현은 84.9±7.2 개로 cFos 단백질 발현보다 FosB 단백질 발현이 현저하게 증가된 양상을 볼 수 있다. 반면, 百會에 대한 艾葉 藥鍼을 전치치한 실험군에서는 유의한 변화가 관찰되었는데, 水溶性 艾葉 藥鍼의 경우 海馬의 CA1에서는 33.6±3.0

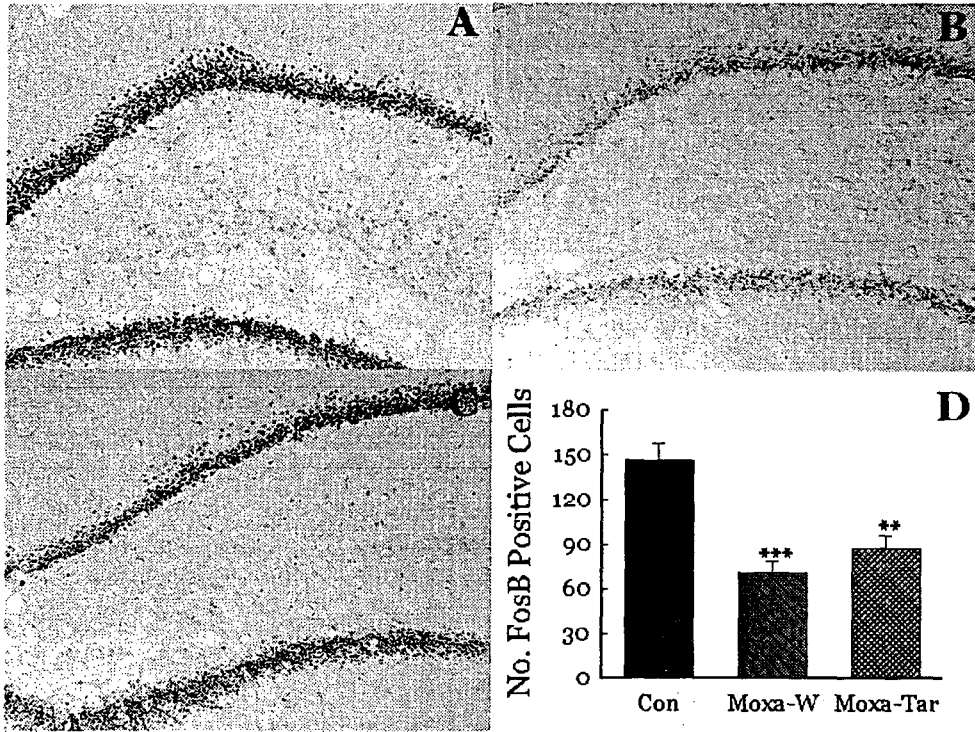


Fig. 4. Effects of folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture of GV₂₀ on FosB positive protein expression in the dentate gyrus at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from the tar of folium Artemisiae Argyi in Moxa-Tar group. Notations are the same as the previous figures. * significant difference from control group (** p<0.01, *** p <0.001).

개 ($p<0.01$)의 cFos 단백질과 31.8 ± 5.5 개 ($p<0.001$)의 FosB 단백질이 관찰되어 cFos 단백질 발현은 증가되었고, 반대로 FosB 단백질 발현은 감소되었다. 灸津 抽出 艾葉 藥鍼의 경우에서도 CA1에서 29.3 ± 5.4 개의 cFos 단백질이 관찰되었고 ($p<0.05$), 61.8 ± 7.7 개의 FosB 단백질이 관찰되어 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼 施術群과 유사한 경향을 나타내었지만 효과에 있어서는 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼이 우세하였다 (Fig. 1 & 2).

흰쥐 海馬의 齒狀回 (dentate gyrus) 부위를 관찰한 결과에서는, 一過性 前腦 虛血 損傷을

유발한 대조군의 경우, 손상 후 2 시간째에서 40.8 ± 5.4 개의 cFos 단백질 발현이 관찰되었고, 146.4 ± 11.4 개의 FosB 단백질이 관찰되었다. 이는 CA1 영역에서 보다 많은 발현을 나타내었고, 아울러 cFos 단백질에 비하여 FosB 단백질의 발현이 매우 증가되어 있었다. 百會에 대한 艾葉 藥鍼을 시술한 실험군에서는, 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼은 齒狀回에서 64.2 ± 9.5 개의 cFos 단백질 발현과 71.3 ± 7.7 개 ($p<0.001$)의 FosB 단백질 발현이 관찰되었는데, 이는 대조군에 비하여 각각 증가와 감소하는 결과를 보여주고 있다. 또한 灸津 抽出 艾葉 藥鍼은 cFos 단백질

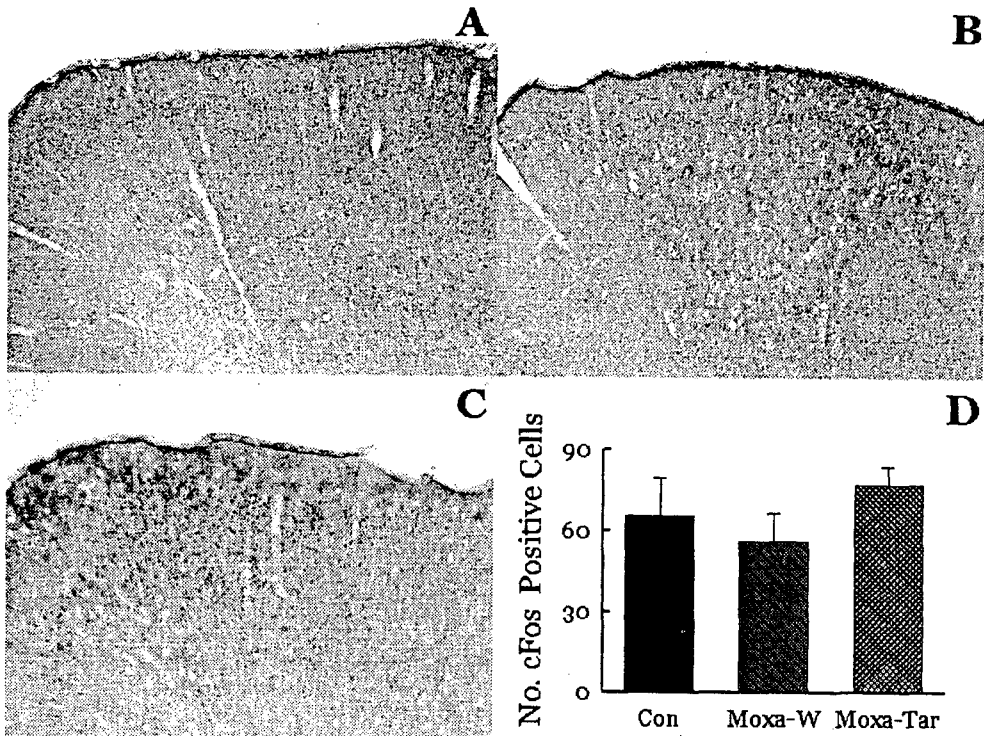


Fig. 5. Effects of folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture of GV₂₀ on cFos positive protein expression in the motor cortex at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from the tar of folium Artemisiae Argyi in Moxa-Tar group. Notations are the same as the previous figures.

이 92 ± 9.6 개 ($p < 0.01$)와 FosB 단백질이 87.2 ± 8.9 개 ($p < 0.01$)이 관찰되어 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼과 유사한 결과를 보였으며, 오히려 cFos 단백질 발현의 증가가 우세하게 나타났고, 반면 FosB 단백질 발현의 감소는 水溶性 抽出物에서 약간 우세하였다 (Fig. 3 & 4). 이러한 결과는 海馬의 CA1 영역에서 관찰된 것과 유사한 경향을 보여주고 있다.

2. 一過性 前腦 虛血 損傷 후 흰쥐의 大뇌 皮質에서 cFos 및 Fos B 단백질 발현과 百會 艾葉 藥鍼의 效果

또한 一過性 前腦 虛血 損傷이 大腦 皮質에 미치는 영향과 艾葉 藥鍼의 효과를 추구하고자, 大뇌 皮質의 運動 皮質과 retrosplenial granular b cortex에 대한 관찰을 수행하였다. 運動 皮質에서는 一過性 虛血 損傷 후 2시간째에서 66 ± 13.5 개의 cFos 단백질이 관찰되었으며, 222.5 ± 18.8 개의 FosB 단백질이 관찰되었다. 이는 海馬에서 관찰된 것에 비하여 크게 증가된 것을 볼 수 있었다. 이에 대하여, 虛血 損傷 1시간 전에 시술된 百會에 대한 艾葉 藥鍼의 효과를 살펴본 결과에서 cFos 단백질의 변화는 비교적 적었으며, 반대로 FosB 단백질의 변화는

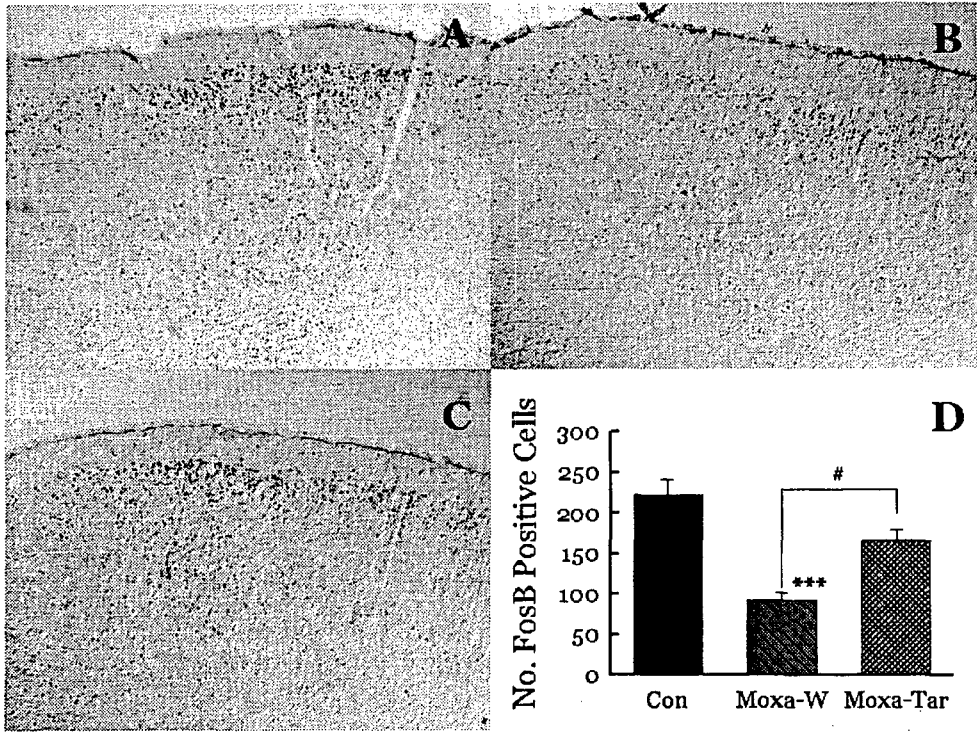


Fig. 6. Effects of folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture of GV₂₀ on FosB positive protein expression in the motor cortex at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from the tar of folium Artemisiae Argyi in Moxa-Tar group. Notations are the same as the previous figures. * significant difference from control group (***) p < 0.001; # significant difference between the herbal acupuncture groups (# p < 0.05).

유의하게 관찰되었다. 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼의 경우, 56.3 ± 10.5 개의 cFos 단백질 발현이 관찰되어 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으나, FosB 단백질은 93 ± 9.3 개로 대조군에 비하여 유의한 감소 ($p < 0.001$)를 나타내었다. 반면, 灸津 抽出 艾葉 藥鍼은 77.3 ± 6.4 개의 cFos 단백질과 166.5 ± 13.8 개의 FosB 단백질 발현이 관찰되었는데 이는 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 5 & 6). 이를 통해, 운동피질 영역에서도 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼이 灸津 抽出 艾葉 藥鍼에 비하여 유의하게 우세한 효

과를 나타내었다.

Retrosplenial granular b cortex (RSGb) 영역을 중심으로 관찰된 결과를 살펴보면, 虛血 損傷을 유발한 대조군에서는 10 ± 2.9 개의 cFos 단백질과 139.3 ± 12.2 개의 FosB 단백질이 나타났는데, 비교적 다른 부위에 비하여 cFos 단백질 발현이 적게 관찰되었다. 百會에 대한 艾葉 藥鍼을 시술한 결과에서는 水溶性 抽出 및 灸津 抽出 艾葉 藥鍼에서 각각 10.5 ± 2.5 개와 20 ± 5.1 개의 cFos 단백질이 관찰되었고, 81.3 ± 12.7 개와 97.3 ± 14.4 개의 FosB 단백질이 관찰

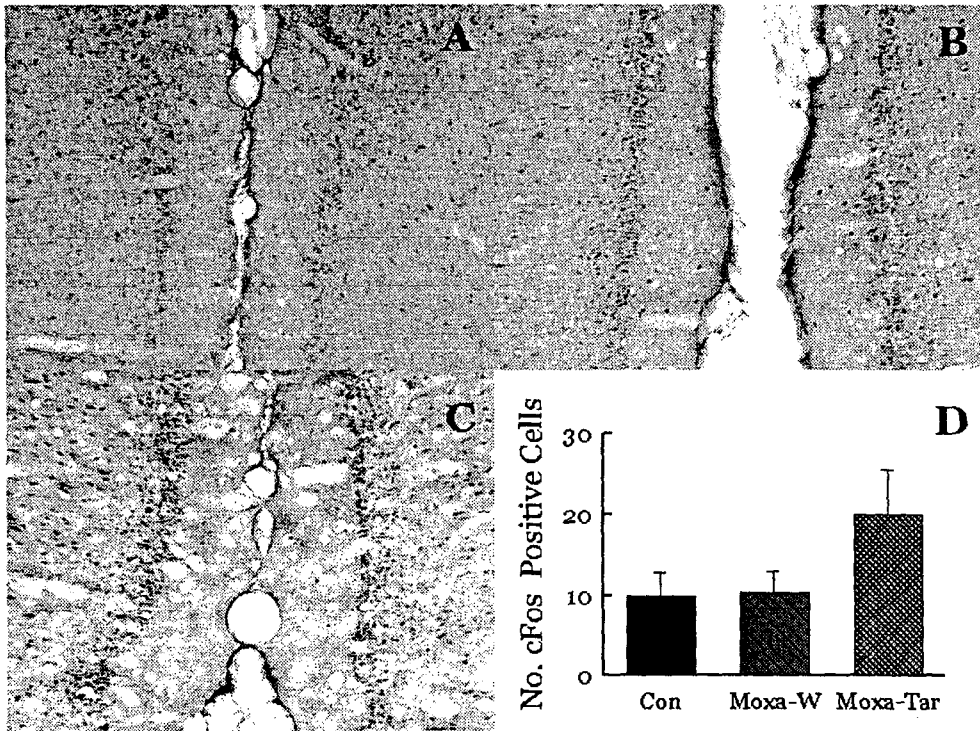


Fig. 7. Effects of folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture of GV₂₀ on cFos positive protein expression in the retrosplenial granular b cortex (RSGb) at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from the tar of folium Artemisiae Argyi in Moxa-Tar group. Notations are the same as the previous figures.

되었다. 이러한 발현 양상은 대조군에 비하여 cFos 단백질은 증가하는, FosB 단백질은 감소하는 경향을 나타내었지만 다른 부위에서 관찰된 것과 같은 유의한 변화는 아니었다 (Fig. 7 & 8).

이상의 cFos 단백질과 FosB 단백질 발현을 관찰한 결과, 비교적 해마부위에서의 艾葉 藥鍼 효과가 뚜렷한 반면, 대뇌피질에서는 효과가 뚜렷하지는 않았다. 그리하여, cFos 및 FosB 단백질의 발현이 신경세포의 손상에 대하여 어떠한 의미인지를 본 연구에서 찾고자 다음에서 BDNF 단백질의 발현을 관찰하였다.

3. 百會 艾葉 藥鍼이 一過性 前腦 虛血 損傷 후 BDNF 단백질 발현에 미치는 영향

이상에서는 一過性 前腦 虛血 損傷에 대한 艾葉 藥鍼의 효과를 살펴본 결과, 초기발현 유전 단백질인 cFos와 FosB 단백질의 발현에 艾葉 藥鍼이 直接的인 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 이러한 효과를 이해하기 위하여, 艾葉 藥鍼 전처치 후 유발된 一過性 前腦 虛血 損傷 흰쥐에서 손상후 48 시간째 BDNF (brain derived neurotrophic factor) 단백질의 발현을 관찰하고 정량화 하였다.

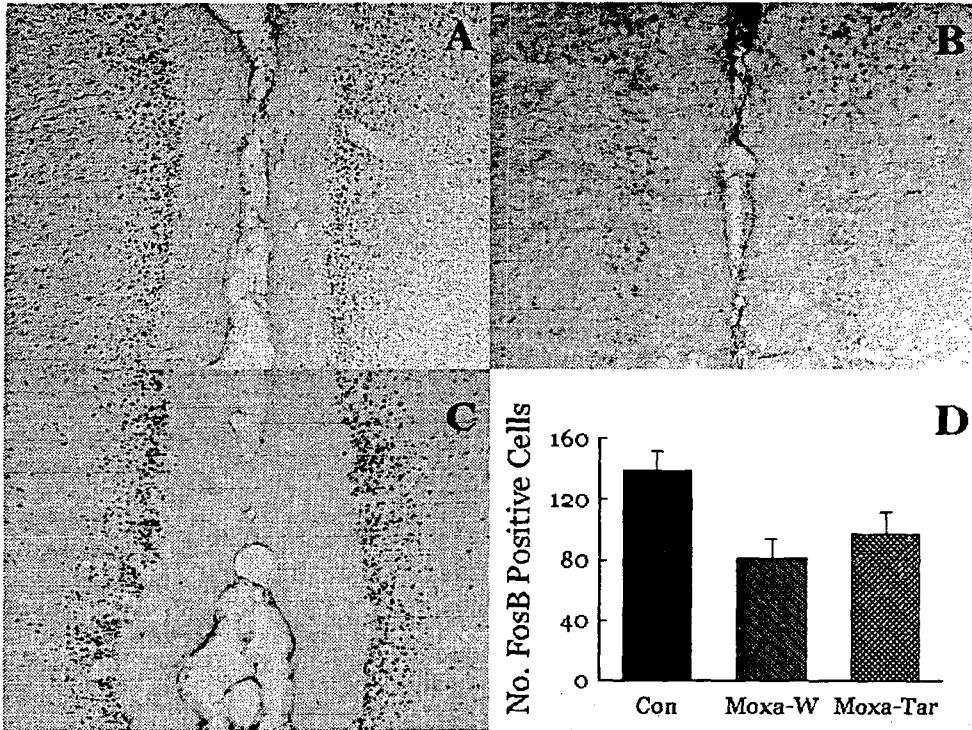


Fig. 8. Effects of folium *Artemisiae Argyi'* herbal acupuncture of GV₂₀ on FosB positive protein expression in the retrosplenial granular b cortex (RSGb) at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemic injury in control group; B, Moxa-W group pretreated by folium *Artemisiae Argyi'* herbal acupuncture extracted from water; C, pretreatment with folium *Artemisiae Argyi'* herbal acupuncture extracted from the tar of folium *Artemisiae Argyi'* in Moxa-Tar group. Notations are the same as the previous figures.

대뇌피질에서는 정상군 (64.3±1.3 pg/ml)에 비하여 일과성 전뇌虛血 損傷을 유발한 대조군 (61.2±4.1 pg/ml)에서 약한 BDNF 단백질 발현의 감소가 관찰되었으나 유의한 편은 아니었다. 그러나, 艾葉 藥鍼 전처치 실험군에서는 水溶性 抽出物을 통한 艾葉 藥鍼群에서 95.6±6.1 pg/ml로 BDNF 단백질의 유의한 증가 (p<0.001)를 나타내었으며, 灸津 抽出物에서도 96±4.4 pg/ml로 역시 유의한 증가 (p<0.001)를 나타내었다 (Fig. 9).

海馬에서는 정상군에서는 94.7±0.9 pg/ml의 BDNF가 정량화되었으며, 대조군에서는 134.1

±3 pg/ml로 정상군에 비하여 유의하게 증가된 BDNF 단백질을 관찰할 수 있었다. 艾葉 藥鍼 實驗群에서도 유의한 증가를 관찰하였는데, 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼群에서는 225.3±48.5 pg/ml (p<0.01)을 나타내었으며, 灸津 抽出物 藥鍼群에서는 214.9±38.8 pg/ml (p<0.01)을 나타내어 정상군과 대조군에 비하여 모두 유의한 증가를 나타내었다 (Fig. 9).

IV. 考 察

中風은 暴仆, 卒暴彊仆, 不知人, 不省人事,

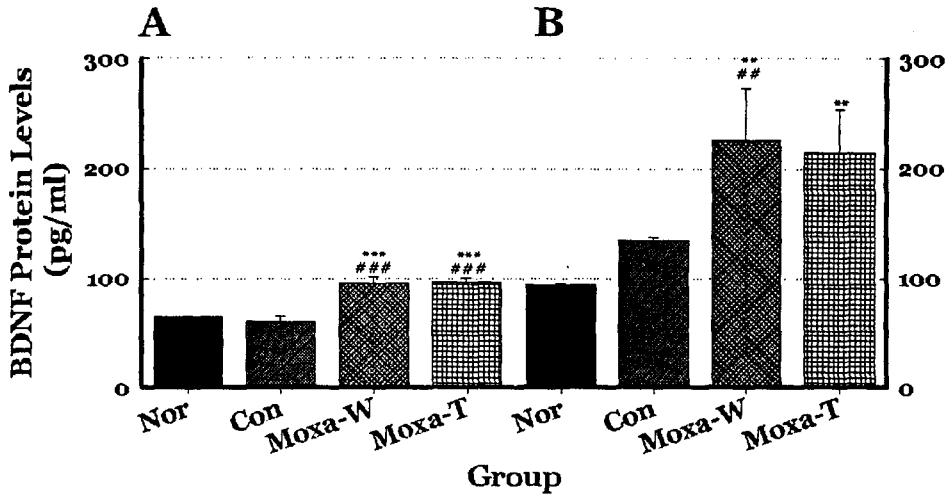


Fig. 9. Effects of folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture of GV₂₀ on expression of BDNF protein following transient forebrain ischemia. Levels of BDNF are measured in the cortex (A) and the hippocampus (B) at 48 hrs after ischemia. Nor, normal group; Con, 2hrs after ischemic injury; Moxa-W, pretreatment with folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted by the water; Moxa-T, pretreatment with folium Artemisiae Argyi' herbal acupuncture extracted from the tar. Values are means±SD. Number of group is 3. * significant difference from normal group (** p<0.01, *** p<0.001), # significant difference from control group (## p<0.01, ### p<0.001).

昏倒, 昏不知人, 精神夢寐 등의 갑작스런 의식 장애와 偏枯, 四肢不舉, 半身不遂, 口眼喎斜 등의 운동장애 및 舌強不語, 暴瘧, 言語蹇澁 등의 언어장애 증상이 나타나는 病症으로 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성과 充血성으로 양분하며, 그 중 대부분은 虛血性 腦血管 疾患이다²⁾.

百會 (GV20)은 甲乙經중에서 처음 언급되었으며, 異名으로 《靈樞熱病》의 顛上, 《甲乙經》의 三陽五會, 泥丸宮 《資生經》의 天滿, 《醫宗金鑑》의 維會로 나타나고 있다. 百會는 開發醒腦 및 回陽固脫의 작용을 통해 頭痛, 目

眩, 鼻塞, 耳鳴, 中風, 失語, 脫肛, 陰挺, 久泄久痢 등을 다스리는 主要 經穴이다¹¹⁾. 또한, 百會는 《千金要方》, 《太平聖惠方》 및 《針灸資生經》에서 각각 언급하고 있는 中風七穴, 中風七處穴, 治風七穴에 모두 포함된 經穴로써, 中風治療의 重要穴로 인식되고 있다. 이는 孫等¹²⁾이 조사한 바에 따르면, 전체 中風治療에서 百會의 활용도는 80%에 이르며, 中臟腑證에서는 약 45%, 中經絡證은 약 25%, 中臟證에는 약 80%, 中腑證은 약 100%, 半身不遂에는 약 40% 등 中風의 각 증상에 대한 치료에서 百會는 활용범위가 넓은 것을 알 수 있다. 최근에 중풍과 관련하여 百會를 활용한 침구치료 연구를 살펴보면, 東等¹³⁾은 急性 腦出血 환자에 대하여 鍼治療로 百會, 太陽穴을 捻轉補瀉

하는 방법을 통해 치료효과를 검토하였으며, 王¹⁴⁾은 百會, 風池, 曲池 등의 穴과 華佗夾脊 5, 7, 9, 11 등의 穴을 교대로 鍼治療하여 血壓 및 心臟機能의 개선 효과를 연구하였다. 또한, 百會와 관련된 국내 연구를 살펴보면, 흰쥐와 本態性 高血壓 흰쥐에 transganglionic tracer 인 WGA-HRP와 CTB를 주입하여 척수와 신경절에 표지된 하위 신경핵들의 영역과 心血管系의 調節과 관련이 있다고 알려진 serotonin, VIP (vasoactive intestinal peptide) 그리고, substance P를 이용하여 脊髓와 神經節에서의 면역반응을 관찰하여 관련성을 해부학적으로 증명하였다¹⁵⁾. 林 等¹⁶⁾은 百會 艾灸에 의하여 혈청지질의 변화가 유의하게 변화한다는 점을 관찰하였고, 百會 刺鍼이 대뇌 및 소뇌 등에서 rCBF의 증가를 유발한다고 하였다¹⁷⁾. 이러한 연구에도 불구하고 아직까지 百會와 관련하여 뇌졸중이나 중풍과 같은 실험 동물모델에 대한 연구결과는 아직 보고되지 않고 있는 형편이다. 다만, 中國에서 보고된 연구결과로는, 실험동물의 失血性 저혈압 shock에서 百會 刺鍼이 혈압을 상승시켰고, 혈관내 염증성 발열시 熱을 떨어뜨렸다고 보고하고 있다. 또한 뇌혈관성 偏麻痺에서 百會와 曲鬚을 이용한 치료를 수행하였다는 임상 예를 찾아 볼 수 있다¹⁸⁾.

본 研究에서 藥鍼으로 활용된 艾葉은 調理 氣血, 逐寒濕, 溫經止血, 安胎하여 心腹冷痛, 泄瀉, 久痢, 下血, 月經不調, 帶下, 胎動不安, 癰瘍, 疥癬 등에 사용되어 왔는데⁶⁾, 대개의 경우에는 艾灸療法를 통해 營血 및 衛氣의 장애로 기인된 제반 질환 및 疼痛을 艾灸의 生體反應으로 營衛를 소통시키고, 經絡循環의 病變을 조화하는데 사용되었다. 艾葉을 燃燒시킴으로써 生成되는 二次物質, 즉 燃燒生成物에 대한

研究는 加熱에 따른 艾葉의 成分 및 活性變化, 燃燒生成物에 대한 臨牀的 效能 糾明을 가능케 하였다. 다만 최근 艾葉에서 다양한 성분과 효능에 대하여 연구되어지고 있으며, 성분은 phellandrene, couprol, cadinene, cineol, repinen-4-ol, β -caryophyllene, linalool, artemisia alcohol, camphor, bornol 등과 艾葉의 燃燒成分物으로써 밝혀진 成分에는 tricosanol, hentriacontane, arachinalkol, thujone, n-nonacosanne, n-hentriacontane, C37H76, tannin 및 그 이성체, catechol, 포화지방족탄화수소 등이 확인되었다¹⁹⁾. 아울러, 최근 돌연변이 억제현상, 혈당조절 및 항균작용, 항위계양효과, 혈소판 응집 억제작용 및 항산화효과²⁰⁾ 및 항암작용에 관련한 효과가 있음이 대두되었다.

一過性 前腦 虛血 損傷은 특히 해마부위에 많은 피해를 유발하는데, 해마부위 細胞死는 CA1의 pyramidal 세포들과 dentate gyrus의 hilus에 존재하는 somatostatin-immunoreactive 신경세포들에서 선택적으로 발생되며, 허혈 이후 몇일이내에 해마를 중심으로 지연성 신경세포사가 발생되며²¹⁾, 이러한 사멸중인 세포는 DNA의 파괴가 동반되는데, 특히 internucleosomal DNA 분절화와 관련된 세포사멸(apoptosis)과 관련된다²²⁾.

cFos 단백질은 일정한 자극에 의해 신경 세포에서 발견되며, cfos proto-oncogene은 다양한 자극에 반응하여 흥분되는 세포들과 그들의 경로를 확인하기 위한 기능적 또는 해부학적 표식자로 널리 사용되어져 왔다. 더욱이 cFos 단백질은 cJun 단백질과 결합으로 이량체(dimer)를 형성하여, activator protein-1 (AP-1)으로써 알려진 전사인자를 형성하여, 세포형질에 장기적인 영향을 주는 다른 종류의 이차적인 유전인자를 조절하게

된다²³⁾. 아울러, fosB 유전자와 단백질은 1989년에 설치류의 3T3 cDNA library로부터 Fos 계열의 3번째로 분리되었고, 정상 상태에서 FosB는 주로 cortex에 산재되어 있으며, 아울러 齒狀回의 背側에도 존재하는 것으로 보고되고 있으며, 유해성 자극을 가할 경우, 자극 후 2 시간부터 발현되어 4~8 시간까지 지속되는 것으로 보고되고 있다²⁴⁾. 또한 虛血性 손상에 노출될 경우에도 FosB의 발현이 증가되어 주로 해마의 CA1과 치상회에 주로 발현되며^{25,26)}, FosB의 발현이 虛血性 손상으로 유발되는 신경세포 사멸과정의 정도를 이해하는 지표가 될 수 있음을 보여주었다.

cFos 발현 역시 대개의 경우 cFos와 그에 관련된 유전물질들이 신경손상에 관련하거나 신경세포의 죽음의 과정에서 유도된다고 주장하였으나²⁷⁾, 최근 들어 cFos와 그와 관련된 gene들이 虛血 損傷으로부터 회복하는 필수적인 것이라는 연구가 제시되었다²⁸⁾. 아울러, 虛血 損傷 後 cfos antisense oligonucleotide를 사용하여 cFos의 발현을 억제한 실험에서 오히려 세포손상이 증가하고²⁹⁾, 損傷을 억제시키는 인자로 알려진 nerve growth factor (NGF)의 발현이 억제되었다. 그외에도, 15분 동안의 虛血 과 재관류 후에 cFos는 CA3-4 영역의 방추형 신경세포에서 1-6시간동안 발현되었고, CA1에서는 거의 발현되지 않았으며, cJun은 4-48시간에 발현되었는데, 이러한 결과를 통하여 cFos와 cJun의 초기 발현되는 시공간적 특성을 고려할 때, 一過性 虛血에 의한 신경세포손상으로부터 방어하고 있는 상태를 보여주는 것이라 추정하였다³⁰⁾. 또한 cfos null mutant mice에서 신경독소가 더욱 악화된다고 하며, Cho 등²⁸⁾은 신경손상 방어제제로 알려진

NAMDA (N-acetyl-O-methyl dopamine)을 전처치하고 虛血 損傷을 유발하였을 때, cFos 단백질의 발현이 상향조정되는 것을 관찰함으로써 cFos의 신경세포방어작용에 대한 가능성을 넓히고 있다. 이러한 손상모델에서 cFos 발현은 초기에는 損傷에 대하여 저항적인 영역에서 전반적으로 확인되다가, 지연성 이차 발현에서는 오히려 손상이 심한 부위에서 발현되는 양상을 나타낸다. 더욱이, cFos 단백질은 損傷에 대하여 저항적인 영역에서 대개 발현되기에 損傷에 취약한 CA1 영역에서는 발현이 거의 되지 않는 점을 고려할 때 cFos 단백질의 발현은 虛血 損傷후 초기의 경우에는 세포 생존을 위한 요소가 될 수 있다고 추정할 수 있다.

본 연구에서는 이러한 관점 하에 cFos 단백질과 FosB 단백질의 발현을 각각 조사함으로써, 虛血 損傷의 여부와 艾葉 藥鍼의 효과를 확인하고자 하였다. 그 결과, 虛血 損傷 대조군의 경우, 손상 후 2시간째 해마의 CA1 부위에서 cFos 단백질 발현보다 FosB 단백질의 발현이 현저하게 증가된 양상을 볼 수 있다. 반면, 百會에 대한 艾葉 藥鍼을 전처치한 실험군에서는 유의한 변화가 관찰되었는데, 水溶性 艾葉 藥鍼의 경우 海馬의 CA1에서 cFos 단백질의 유의한 증가와 FosB 단백질의 유의한 감소가 관찰되었다. 灸津 抽出 艾葉 藥鍼의 경우에서도 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼 施術群과 유사한 경향을 나타내었지만 효과에 있어서는 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼이 우세하였다. 또한, 흰쥐 海馬의 齒狀回 부위를 관찰한 결과에서는 虛血 損傷으로 CA1 영역에서 보다 많은 발현을 나타내었고, 아울러 cFos 단백질에 비하여 FosB 단백질의 발현이 매우 증가되어 있었다. 百會에 대한 艾葉 藥鍼을 시술한 실험군에서는 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼과 灸津 抽出 艾葉 藥鍼 모두 齒狀回에

서 cFos 단백질 발현 증가와 FosB 단백질 발현의 감소 결과를 보여주고 있다. 대뇌피질의 運動皮質과 retrosplenial granular b cortex에 대한 관찰에서는 百會에 대한 艾葉 藥鍼의 효과를 살펴본 결과에서 cFos 단백질의 변화는 비교적 적었으며, 반대로 FosB 단백질의 변화는 유의하게 관찰되었고 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼이 灸津 抽出 艾葉 藥鍼에 비하여 유의하게 우세한 효과를 나타내었다. cFos 단백질과 FosB 단백질 발현을 관찰한 결과를 요약하면, 비교적 해마부위에서의 艾葉 藥鍼 효과가 뚜렷한 반면, 대뇌피질에서는 효과가 뚜렷하지는 않았다. 결과적으로 앞선 연구 결과들이 언급하듯, cFos 단백질의 발현 증가가 신경세포의 생존에 관여되는 것이라면, 본 연구의 결과는 百會에 가한 艾葉 藥鍼이 神經保護作用을 나타내고 있는 것이라 사료된다.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)는 많은 종류의 neurotrophin들 중의 하나이며, 신경계의 발달과정에서 강력한 생존 및 분화작용을 수행하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 간질성 발작, 외상성 손상, 저혈당성 혼수와 大腦 虛血 損傷과 같은 다양한 대뇌 손상은 다양한 前腦부위에서 BDNF의 합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다³¹⁾. 이러한 BDNF의 증가에 대한 기능이나 작용에 대하여서는 아직 명확한 단계는 아니지만, 손상후 BDNF의 증가는 내재되어 있는 신경보호작용을 나타내는 것이며, 시냅스간 전달을 조절한다는 것을 보여주고 있다. 또한, 대뇌의 虛血性 손상 이후 손상에 대하여 저항성을 지닌 신경세포 영역에서 BDNF, phosphorylated CREB과 PGHS-2의 수치가 크게 증가한다는 사실을 보고하면서, 이들이 신경보호작용을 하는데 중요한 역할을 함을 주장하였다³²⁾. 이러한 BDNF의 증

가는 pCREB와 더불어 虛血性 손상 후 48-72 시간에서 가장 크게 증가하며, 특히 해마 부위 중 虛血 損傷에 대하여 저항성이 높은 신경세포로 구성되어진 齒狀回에서 증가하는 것으로 보고되었다. 반면, 虛血 損傷에 취약한 CA1 영역에서는 BDNF나 pCREB이 감소하는 것을 보였고, 아울러 48 시간이후에서 cFos 발현이 증가된다고 보고하였다³³⁾.

본 연구에서 BDNF 단백질을 ELISA를 이용하여 정량화하여, 虛血 損傷으로 인한 BDNF 단백질 발현 변화와 百會에 대한 艾葉 藥鍼의 효과를 확인하여 보았다. 이러한 효과를 위하여, 艾葉 藥鍼 전처치 후 유발된 一過性 前腦 虛血 損傷 흰쥐에서 損傷 後 48 시간째 BDNF 단백질 발현을 관찰하였다. 대뇌피질에서는 정상군 (64.3 ± 1.3 pg/ml)에 비하여 一過性 前腦 虛血 損傷을 유발한 대조군 (61.2 ± 4.1 pg/ml)에서 약한 BDNF 단백질 발현의 감소가 관찰되었으나 유의한 편은 아니었다. 그러나, 艾葉 藥鍼 전처치 실험군에서는 水溶性 抽出物을 통한 艾葉 藥鍼群에서 95.6 ± 6.1 pg/ml로 BDNF 단백질의 유의한 증가 ($p < 0.001$)를 나타내었으며, 灸津 抽出物에서도 96 ± 4.4 pg/ml로 역시 유의한 증가 ($p < 0.001$)를 나타내었다. 海馬에서는 정상군에서는 94.7 ± 0.9 pg/ml의 BDNF가 정량화되었으며, 대조군에서는 134.1 ± 3 pg/ml로 정상군에 비하여 유의하게 증가된 BDNF 단백질을 관찰할 수 있었다. 艾葉 藥鍼 實驗群에서도 유의한 증가를 관찰하였는데, 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼群에서는 225.3 ± 48.5 pg/ml ($p < 0.01$)을 나타내었으며, 灸津 抽出物 藥鍼群에서는 214.9 ± 38.8 pg/ml ($p < 0.01$)을 나타내어 정상군과 대조군에 비하여 모두 유의한 증가를 나타내었다.

이상의 결과는 艾葉 藥鍼이 BDNF 단백질을

증가시킨다는 점을 확인시키는 것으로, 이러한 BDNF 단백질의 증가에 관해 최근의 한 연구에서는 calcineurin의 길항제인 cyclosporin의 투여가 前腦 虛血 損傷 후 해마의 CA1 영역에서 나타나는 신경세포사를 개선시킨다는 사실을 BDNF의 발현량을 토대로 관찰하기도 하였는데³⁴⁾, BDNF가 cCREB에 의하여 조절되어 생존이나 발생단계에 강력한 역할을 한다는 사실에 기인하는 것이다. 이를 바탕으로 cyclosporin A가 calcineurin을 억제하여 pCREB를 유도하고, 결국은 BDNF의 유도를 초래한다는 가설을 세우게 된다. 이상의 결과로 우리는 다음과 같은 몇 가지 사실을 이해할 수 있는데, 즉 대뇌의 一過性 虛血 損傷은 해마부위에서 특히 취약성을 지닌 CA1 영역에서 세포사가 쉽게 발생되어지며, 이러한 세포사 억제에 관하여 내재적으로 존재하는 BDNF의 활성이 중요하다는 것을 확인할 수 있다. 더욱이, 외인적으로 주입한 BDNF가 虛血 損傷으로 인한 신경세포 사멸을 억제하는 사실이 다양한 실험과 연구에서 밝혀졌으며, 이러한 BDNF의 주입은 虛血 損傷 전이나 후에 시행하여도 모두 유의하게 효과적인 것으로 드러났다^{35,36,37)}.

以上の 研究 結果를 綜合하여 볼 때, 百會에 대한 艾葉 藥鍼 刺戟은 흰쥐에서 유발된 一過性 前腦 虛血 損傷에 의한 神經細胞 損傷을 완화하며, 아울러 神經保護作用을 나타내고 있음을 확인하였다. 다만, 이러한 효과에 대한 다양한 접근방법을 통한 규명이 필요하며, 현재로서는 艾葉 抽出物이 가지는 抗酸化 效果가 가장 큰 영향을 미쳤을 것이라는 추측을 하게 된다. 그러나, 一回性 藥鍼 刺戟에 의한 虛血 損傷 豫防 및 治療가 단순히 抗酸化 效果로만 설명되기에는 神經세포 사멸과정 및 차단이 복

잡성을 고려할 때 다양한 추가 연구가 요구된다.

V. 結 論

本 研究에서는 一過性 前腦 虛血 損傷 후 흰쥐의 海馬 및 大腦皮質 영역에서 cFos, Fos B 및 BDNF 蛋白 發顯 樣相을 관찰함으로써, 百會에 가한 艾葉 藥鍼의 前處置가 虛血 損傷을 억제하는데 효과적인지를 규명하고자 하였다.

1. 虛血 損傷을 유발 2시간제 대조군 해마의 CA1 부위 cFos 및 FosB 단백질 발현에 비하여 百會 艾葉 藥鍼群의 cFos 단백질은 유의한 증가를 FosB 단백질은 감소를 나타내었고, 이러한 효과는 水溶性 艾葉 藥鍼群에서 더욱 분명하게 나타났다.
2. 海馬의 齒狀回에서 百會 艾葉 藥鍼은 cFos 단백질 발현을 증가시키고, FosB 단백질 발현을 억제하였으며, 灸津 抽出 藥鍼에서 분명한 반응을 나타내었다.
3. 運動皮質에서 水溶性 抽出 藥鍼은 cFos 단백질 발현은 대조군과 차이가 없었으나, FosB 단백질은 대조군에 비하여 감소하였고, 灸津 抽出 藥鍼에서 cFos 단백질과 FosB 단백질 발현은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.
4. Retrosplenial granular b cortex (RSGb)에서는 百會 艾葉 藥鍼을 시술한 결과, 水溶性 抽出 및 灸津 抽出 艾葉 藥鍼에서 다른 부위에서 관찰된 것과 같은 유의한 변화는 나타나지 않았다.
5. 一過性 前腦 虛血 損傷 흰쥐에서 손상후 48 시간제 BDNF (brain derived neurotrophic factor) 단백질의 발현은 대뇌피질에서는 정상군에 비하여 一過性 前腦 虛血 損

傷을 유발한 대조군에서 약한 BDNF 단백질 발현의 감소가 관찰되었고, 艾葉 水溶性 抽出物을 통한 艾葉 藥鍼群에서 BDNF 단백질의 유의한 증가를 나타내었으며, 灸津 抽出物에서도 유의한 증가를 나타내었다.

6. 海馬에서 艾葉 藥鍼 實驗群은 水溶性 抽出 艾葉 藥鍼群과 灸津 抽出物 藥鍼群에서 정상군과 대조군에 비하여 모두 BDNF 단백질의 유의한 증가를 나타내었다.

以上の 研究 結果를 綜合하여 보면, 艾葉의 水溶性 抽出物과 灸津 抽出物을 이용한 百會의 藥鍼 刺戟이 一過性 前腦 虛血 損傷을 豫防하고 治療하는데 效果의이며, 比較적 水溶性 抽出 艾葉이 FosB 단백질 발현의 억제에 우세한 효과를 나타내었다. 다만, 大腦 部位에 따라 cFos, FosB 및 BDNF 단백질 발현에 차이를 나타냄을 확인 할 수 있는데, 이에 대한 다양하고 추가적인 연구와 검토가 필요하다고 사료된다.

參考文獻

1. 常青. 實用中風防治手冊. 北京 : 中國中醫藥出版社. 1993 ; 24-25, 46.
2. 김영석. 임상중풍학. 서울 : 서원당. 1997 ; 303-8, 317-29.
3. Hergruido MJ, Carceller F, Roda JM, and Avendano C. Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rat : A critical assessment. *Neuroscience*. 1999 ; 93 : 71-80.
4. 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.
5. 이해정. 약침학 개론 및 임상. 서울 : 일증사. 1999 ; 13-8.
6. 全國韓醫科大學 本草學教室 共編著. 本草學. 서울 : 영림사. 1995 ; 405-6.
7. 박종철, 유영법, 이종호, 김남재. 한국산 식용식물의 화학성분 및 생리활성(VI)-참죽나무 잎, 미나리, 쪽의 항염증 및 진통효과. *J Korean Soc Food Nutr*. 1994 ; 23(1) : 116-9.
8. 황윤경, 김동청, 황우익, 한용봉. 쪽(*Artemisia princeps Pampan.*) 추출 성분의 암세포 증식 억제 효과. *한국영양학회지*. 1998 ; 31(4) : 799-808.
9. Lee GD, Kim JS, Bae JO, Yoon HS. Antioxidative effectiveness of water extract and ether extract in wormwood (*Artemisia montana Pampan.*). *J Korean Soc Food Nutr*. 1992 ; 21(1) : 17-22.
10. 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 : 913-4.
11. 劉冠軍. 中醫針灸經穴集成. 江西科學技術出版社. 1997 ; 468-70, 544-6.
12. 손인철, 안성훈. 中風七穴의 중풍치료에 대한 문헌적 고찰. *대한침구학회지*. 1995 ; 15(2) : 255-74.
13. 東貴榮 等. 頭穴 治療 急性 腦出血 即刻效應의 機理探討(鍼刺對體感誘發電位의 影響). *中國針灸*. 1994 ; 14(2) : 82-5.
14. 王岫. 鍼刺對中風病人血壓及心功能的影響. *中國針灸*. 1994 ; 14(6) : 295-7.
15. 이창현, 이상룡, 번덕시. 고혈압 치료에 상용되는 채간부 경혈에 대한 형태학적 연구. *大韓鍼灸學會誌*. 1999 ; 16(2) : 181-98.
16. 임종국, 김민규. 百會 足三里穴 艾灸가 白鼠의 혈청 지질에 미치는 영향. *大韓鍼灸學會誌*. 1993 ; 10(1) : 219-33.

17. 김성민 송호천 범희승 강화정 안수기 정환정 김지열. Tc-99m ECD 뇌혈류 SPECT를 이용한 百會, 人中, 合谷, 足三里, 三陰交에서 體鍼의 뇌혈류에 대한 효과. 大韓核醫學會誌. 2000 ; 34(6) : 456-64.
18. 康鎖彬. 經脈腧穴學. 河北科學技術出版社. 1995 ; 203-4.
19. 지형준, 이상인. 대한약전의 한약(생약)규격집 주해서. 서울 : 한국메디칼인덱스사. 1989 ; 242-3.
20. 大西基代, 戶田靜男, 管田良仁, 東家一雄, 黑巖共一, 木村通郎. 艾葉의 燃燒 生成物이 過酸化脂質에 미치는 작용. 全日本鍼灸學會誌. 1990 ; 40(2) : 228-31.
21. Ito U, Yamaguchi T, Tomita H, Tone O, Shishido T, Hayashi H, and Yoshida M. Maturation of ischemic injuries observed in mongolian gerbils: introductory remarks. In Ito U, Kirino T, Kuroiwa T, and Klatzo I (eds): Maturation Phenomenon in Cerebral Ischemia. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest : Springer-Verlag. 1992 ; 1-39.
22. Ferrer I, Alcantara S, Ballabriga J, Olive M, Blanco R, Rivera R, Carmona M, Berrueto M, Pitarch S, Planas AM. Transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) and epidermal growth factor receptor (EGF-R) in normal and pathologic brain. Progr Neurobiol. 1996 ; 49 : 99-123.
23. 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.
24. Herdegen T, Tolle T, Bravo R, Zieglansberger W, Zimmermann M. Sequential expression of JUN B, JUN D and FOS B proteins in rat spinal neurons: cascade of transcriptional operations during nociception. Neurosci Lett. 1991 ; 129 : 221-4.
25. Kiessling M, Stumm G, Xie Y, Herdegen T, Aguzzi A, Bravo R, Gass P. Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1993 ; 13(6) : 914-24.
26. Dragunow M, Beilharz E, Sirimanne E, Lawlor P, Williams C, Bravo R, Gluckman P. Immediate-early gene protein expression in neurons undergoing delayed death, but not necrosis, following hypoxic ischemic injury to the young rat brain. Mol Brain Res. 1994 ; 25 : 19-33.
27. Hafezi F, Steinbach JP, Marti A, Munz K, Wang ZQ, Wagner EF, Aguzzi A, Reme CE. The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. Nat Med. 1997 ; 3(3) : 346-9.
28. 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.
29. 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.
30. Takemoto O, Tomimoto H, Yanagihara T. Induction of c-fos and c-jun gene products and heat shock protein after brief and prolonged cerebral ischemia in gerbils. Stroke. 1995 ; 26(9) : 1639-48.

31. Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci.* 1994 ; 17 : 490-6.
32. Walton M, Connor B, Lawlor P, Young D, Sirimanne E, Gluckman P, Cole G, Dragunow M. Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999 ; 29(2-3) : 137-68.
33. Marshall R. Walton and Mike Dragunow. Is CREB a key to neuronal survival? *Trend in Neuroscience.* 2000 ; 23-2 : 48-53.
34. Miyata K, Omori N, Uchino H, Yamaguchi T, Isshiki A, Shibasaki F. Involvement of the brain-derived neurotrophic factor/TrkB pathway in neuroprotective effect of cyclosporin A in forebrain ischemia. *Neuroscience.* 2001 ; 105(3) : 571-8.
35. Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A. Brain derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994 ; 14 : 689-92.
36. Kiprianova I, Freiman TM, Desiderato S, Schwab S, Galmbacher R, Gillardon F, Spranger M. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. *J Neurosci Res.* 1999 ; 56(1) : 21-7.
37. Schabitz WR, Schwab S, Spranger M, Hacke W. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997 ; 17 : 500-6.