

원저

## 흰쥐의 一過性 前腦 虛血 損傷에 대한 鈞鈞藤 藥鍼의 效果

고정수, 김재효, 최동옥, 김경식, 손인철

원광대학교 한의과대학 경혈학교실

### Effects of *Ramulus Uncariae Cum Uncis*' Herbal Acupuncture on Transient Forebrain Ischemic Injury in Rats

Jeong-Soo Ko, Jae-Hyo Kim, Dong-Ok Choi, Kyung-Sik Kim, In-Cheul Son

Department of Acupoint, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

**Objectives** : Recently, herbal acupuncture has been developed in the Korea since the earlier 1960' applied to various diseases including the cerebrovascular accident. The main characteristics of herbal acupuncture are a combination the merit 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. *Ramulus Uncariae Cum Uncis* (鈞鈞藤) has been claimed to possess sedative, anti-spasmodic actions, and treat childhood epilepsy in oriental medical preparation. Also, it has been stated that *Ramulus Uncariae Cum Uncis* was antioxidative effect and neuroprotection against glutamate-induced neuronal death.

**Methods** : In this study, effects of *Ramulus Uncariae Cum Uncis*' herbal acupuncture on the GV<sub>20</sub> or LR<sub>3</sub>, named *Baek-hue* or *Tae-chung*, on neuroprotection after the transient forebrain ischemia were investigated in Sprague-Dawley 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 *Ramulus Uncariae Cum Uncis*' herbal acupuncture on GV<sub>20</sub> or LR<sub>3</sub> 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. Especially, cFos expression was more increased at the herbal acupuncture on GV<sub>20</sub> than LR<sub>3</sub>, but FosB expression was more decreased in LR<sub>3</sub> group than GV<sub>20</sub> group. Also, pretreatment with *Ramulus Uncariae Cum Uncis*' herbal acupuncture on GV<sub>20</sub> or LR<sub>3</sub> significantly increased the expression of BDNF protein in the hippocampus (254.88 ± 12 pg/ml in GV<sub>20</sub> group, 245.93 ± 44.4 pg/ml in LR<sub>3</sub> group) and the cortex (85.81 ± 3.45 pg/ml in GV<sub>20</sub> group, 111.51 ± 15.79 pg/ml in LR<sub>3</sub> group) compared to the hippocampus (134.07 ± 2.96 pg/ml) and the cortex (61.16 ± 4.11 pg/ml) in control group at 48 hrs after transient forebrain ischemia.

**Conclusion** : These results suggest that pretreatment with *Ramulus Uncariae Cum Uncis*' herbal acupuncture on GV<sub>20</sub> or LR<sub>3</sub> has neuroprotective effect on transient forebrain ischemia and the herbal acupuncture on GV<sub>20</sub> or LR<sub>3</sub> may be related to antioxidative effect and calcium channel block of *Ramulus Uncariae Cum Uncis*. Also, it could be mentioned there is specificity of acupoints treating ischemic injury through the difference between the herbal acupuncture of GV<sub>20</sub> and LR<sub>3</sub>. (J Korean Oriental Med 2003;24(2):66-80)

**Key Words**: herbal acupuncture, transient forebrain ischemia, *Ramulus Uncariae Cum Uncis*, GV<sub>20</sub>, LR<sub>3</sub>

· 접수 : 2003년 2월 14일 · 논문심사 : 2003년 3월 19일 · 채택 : 2003년 4월 17일  
· 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)지원으로 수행되었음

## 서 론

鈎鈎藤 (*Ramulus Uncariae Cum Uncis*)은 꼭두서니과에 속한 常綠藤本인 조구등 (*Uncaria sinensis* (OLIV.)) 동속근연식물의 가시가 달린 어린가지로, <名醫別錄>에서 최초로 언급되었으며, 鈎鈎藤의 性味는 甘, 微寒하며, 淸熱平肝, 鎮痙熄風 등의 작용을 하기에 驚癇抽搐, 肝陽上亢, 肝熱頭痛 등을 치료하는데 응용되고 있다<sup>1)</sup>. 최근에는 鈎鈎藤의 성분이 분리되어 oxindole계와 heteroyohimbine alkaloids계 성분들이 주로 함유된 것으로 확인되었으며<sup>2)</sup>, Indole alkaloids 성분들은 심혈관계에서 혈관이완, 저혈압유발, 항부정맥 효과 등이 보고되었을 뿐만 아니라 약한 중추신경계 억제작용도 존재하는 것으로 보고되어 있다<sup>3)</sup>. 더욱이 鈎鈎藤의 흰쥐 복강내 투여가 전뇌허혈 손상에 유효한 신경세포 손상 방어효과가 있음이 보고되기도 하였다<sup>4)</sup>.

腦虛血 損傷의 병태생리를 연구하기 위하여 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 있다<sup>5)</sup>. 前腦 虛血 損傷은 5-10분 정도의 일시적인 虛血을 유지하고 즉시 재관류시키면 前腦 部位 신경세포에서 glutamate의 과도한 축적으로 NMDA, AMPA와 kainate 수용체의 활성화 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 등<sup>6)</sup>이 발생되어, 3-4일 경과 후 뇌의 新皮質, 線條體, 海馬와 小腦에 선택적으로 신경세포의 손실이 나타나는 遲延性 神經 細胞死 (delayed neuronal death) 현상이 관찰되는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>.

cFos 및 FosB 단백질은 일정한 자극에 의해 신경세포에서 발현되는 immediate early gene (IEG)으로, 세포들과 그들의 경로를 확인하기 위한 기능적 또는

해부학적 표식자로 널리 사용되어져 왔다<sup>8)</sup>. 더욱이 cFos 단백질은 세포형질에 장기적인 영향을 주는 다른 종류의 이차적인 유전인자를 조절하게 된다<sup>9)</sup>. 腦 虛血 損傷 後 발현되는 IEG의 기능에 대하여 정확히 알려져 있지 않으나 cJun 과 FosB 단백질의 발현이 apoptosis와 같은 세포고사의 세포내 신호전달에 관여한다는 실험적 증거들이 제시되었다<sup>10)</sup>. 반면, cFos의 발현은 6시간 이전의 초기에는 세포생존에 관여되고, 48시간 이후의 지연성 발현양상은 細胞死에 관여된다고 제시되었다<sup>11)</sup>.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)는 많은 종류의 neurotrophin들 중의 하나이며, 신경계의 발달과정에서 강력한 생존 및 분화작용을 수행하는 것으로 알려져 있다. BDNF를 포함한 많은 종류의 neurotrophin들은 성인들의 신경계에 매우 풍부하게 존재하며, 간질성 발작, 외상성 손상, 저혈당성 혼수와 대뇌 허혈손상과 같은 다양한 대뇌 손상은 다양한 前腦부위에서 BDNF의 합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다<sup>12)</sup>. 이러한 BDNF의 증가에 대한 기능이나 작용에 대하여서는 아직 명확한 단계는 아니지만, 기존의 많은 논문에 의하면 손상후 BDNF의 증가는 내재되어 있는 신경보호작용을 나타내며<sup>13)</sup>, 또한 시냅스간 전달을 조절한다는 것을 보여주고 있다<sup>14)</sup>.

본 연구에서는 淸熱平肝 및 鎮痙熄風하는 효능을 갖는 鈎鈎藤이 腦의 一過性 虛血 損傷으로 발생하는 神經細胞 損傷 및 死滅에 대한 防禦作用 또는 治療作用을 확인하고자, 中風에 활용도가 높은 百會와 太衝에 각각 鈎鈎藤 藥鍼을 가하여 비교 연구하였다. 이를 위하여, 흰쥐의 일과성 전뇌 허혈 손상을 유발한 후 2시간째에서 cFos 및 FosB 단백질의 발현을 관찰하였고, 48시간째에서는 BDNF 단백질의 발현을 정량화를 통해 관찰하였으며, 이에 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

## 실험방법

### 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), 鈞鈞藤 藥鍼 시술 후 一過性 虛血 損傷을 유발한 藥鍼群 (百會 刺戟群 or 太衝 刺戟群)의 3개 실험군으로 분류하였다.

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

一過性 前腦 虛血은 Pulsinelli & Buchan<sup>9)</sup>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 복외위 위치에서 정중 항배부위의 피부를 절개한 후 제 1경추의 alar foramina를 노출시켜 제 1경추와 제 2경추 사이로 지나가는 양측 추골동맥 (vertebral artery)을 전기인두를 사용하여 영구적으로 폐색시켰다. 추골동맥 폐색을 유발 한 후 24시간 후, 경동맥 폐색을 위하여 흰쥐를 양외위자세로 위치시킨 후 정중 경부부위의 피부를 절개하여 양측 경동맥을 분리하였으며, 분리된 경동맥 (common carotid artery)을 microaneurysm 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 소실 및 대뇌피질 뇌전도 (electroencephalogram, EEG)중 DC성분의 억제현상을 기록하여 前腦 虛血 與否를 확인하였다. 虛血 유발 15분 후 결찰을 풀어줌으로써 혈류를 재개시켰으며, 회복시 발작을 보이는 흰쥐는 본 실험에서 제외하였다.

## 3. 藥鍼液 製造

약제는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입하여 정선한 후에 사용하였으며, 鈞鈞藤 (*Ramulus Uncariae Cum Uncis*) 200 g을 물 2000 ml와 함께 환저플라스크에 넣고 환류장치를 부착하여 1 시간 동안 전탕한 후 여과포로 여과하였다. 여과액을 3000 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 52 °C에서 진공농축으로 감압농축시켜 -70 °C에서 24 시간 동결시킨다. 그 후 동결건조기로 48 시간 동결 건조하여 분말시료를 얻었으며, 이를 saline을 용매로 하여 250 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 太衝 (LR<sub>3</sub>) 자극군의 경우, 左右側 下肢에서 足厥陰肝經의 原穴인 太衝 (LR<sub>3</sub>)을 인체와 상응하는 흰쥐의 제 1趾와 제 2趾 사이에서 취혈하였으며, 百會 (GV<sub>20</sub>) 자극군의 경우, 흰쥐의 耳尖을 이은 선과 흰쥐 두개골 정중선이 만나는 부위를 百會 부위로 정하였다. 穴位에 대한 약물주입은 26 gauge의 1 ml 注射器를 사용하여 經穴部位의 皮下에 삽입하여 太衝 刺戟群은 左右 各 0.2 ml을 1회 주입하였고, 百會 刺戟群의 경우 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 고정한 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액에서 20분 동안 진탕하고, 그 후 pH 7.4의 PBS 용액으로 3회 이상 세척 하고 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℃에서 8시간 반응시킨 후 2시간 동안 실온에서 진탕시키고 PBS로 세척하였다. 그 후 2 차항체인 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 세척 후 광학 현미경으로 진갈색의 cFos 또는 FosB 양성 세포를 관찰하였고 화상 자동분석 시스템 (Image-Pro Plus, U.S.A.)을 이용하여 海馬 (hippocampus) 및 대뇌피질 (cortex)에서 cFos 또는 FosB 양성 세포의 수를 측정하였다.

#### 6. Brain derived neurotropic factor (BDNF) 단백질 측정 및 정량

ELISA (Enzyme-linked immunoassay; promega, U.S.A.) 방법을 이용하여 신경친화성 물질의 하나인 BDNF 단백질을 측정하였다. 질소 탱크에 침수시킨 조직에서 단백질을 추출하기 위해 teflon grass homogenizer를 이용하여 분쇄하였으며 이때 lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 % NP40, 10 % glycerol, 1mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 0.5 mM sodium vanadate)는 100 mg 조직의 10 volume으로 사용하였다. 이어 13,000 g, 4℃에서 30분간 원심분리를 하여 상등액을 취한 후 DPBS buffer (per liter; 0.2 g KCl, 8.0 g NaCl, 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7.35, 133 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )를 이용하여 1/3로 희석하고, 희석액 100  $\mu\text{l}$ 를 ELISA에 사용하였다. 항 BDNF 단일항체로 ELISA plate well을 coating한 후 overnight 동안 배양시킨 후 1번 세척하고 Block&Sample 1×Buffer를 이용하여 비특이적인 단백질 결합부를 제거하고 1번 세척하였다. 그 다음 BDNF 표준시약과 실험 조직을 plate well에 가한 후

2시간 ~ overnight 으로 배양한 후 5번 세척하고, 1/500으로 희석한 항체인 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 One solution (Promega, U.S.A.)을 가하여 상온에서 10분간 배양 후 발색반응을 관찰하였다. 적정한 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 (SPSS Inc., U.S.A.)을 이용하였으며, 실험결과는 Mean±S.E.M.로 표현하였으며, 통계검정은 unpaired student *t*-test와 일원분산분석법으로 실시하였다. *P* 값이 0.05 미만인 경우에만 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

### 실험결과

#### 1. 一過性 前腦 虛血 損傷 後 海馬 및 大腦皮質 영역의 cFos 단백질 발현과 鈞鈞藤 藥鍼의 효과

일과성 전뇌 허혈 손상후 2시간제에서 cFos 단백질의 발현이 관찰되어졌는데, 海馬의 CA1 영역에서는  $11.3 \pm 2.06$ 개의 cFos 단백질 발현이 관찰되었다. 일과성 전뇌허혈을 유발하기 1시간 전에 鈞鈞藤 藥鍼을 전처치 한 경우, 이러한 cFos 단백질 발현에 유의한 변화가 관찰되었는데, 百會에 鈞鈞藤 藥鍼을 시술한 경우에는  $32.71 \pm 3.05$  개로 허혈 손상만을 유발한 실험군에 비하여 유의한 증가 ( $p < 0.001$ )를 나

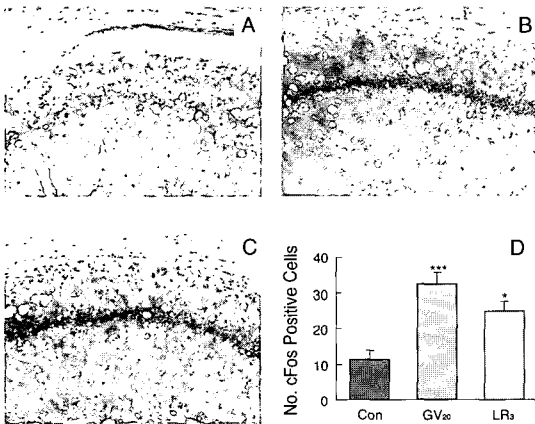
타내었다. 太衝에 대한 釣鉤藤 藥鍼 역시, 百會와 마찬가지로 일과성 허혈손상 후 2시간째에서  $25.33 \pm 2.4$  개로 cFos 단백질 발현이 대조군에 비하여 유의하게 증가 ( $p < 0.05$ )하였고, 百會와의 太衝 간의 발현량의 차이에서 百會가 보다 증가하는 경향을 보였으나, 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 1).

흰쥐 海馬의 齒狀回를 관찰한 결과에서는 일과성 전뇌 허혈 손상을 유발한 대조군에서는  $40.83 \pm 5.44$  개의 cFos 단백질 발현을 나타내었으며, 百會에 대한 釣鉤藤 藥鍼을 전처치 한 후 허혈 손상을 유발한 실험군에서  $106.38 \pm 8.03$  개로 대조군에 비하여 매우 유의한 증가 ( $p < 0.001$ )를 보였고, 太衝에 대한 釣鉤藤 藥鍼 경우에서도  $70.5 \pm 3.82$  개로 대조군에 비하여 유의한 증가 ( $p < 0.05$ )를 나타내었다. 더욱이, 百會에 가한 釣鉤藤 藥鍼의 효과가 太衝에 비하여 유의 ( $p < 0.01$ )하게 증가된 양상을 보였다 (Fig. 2).

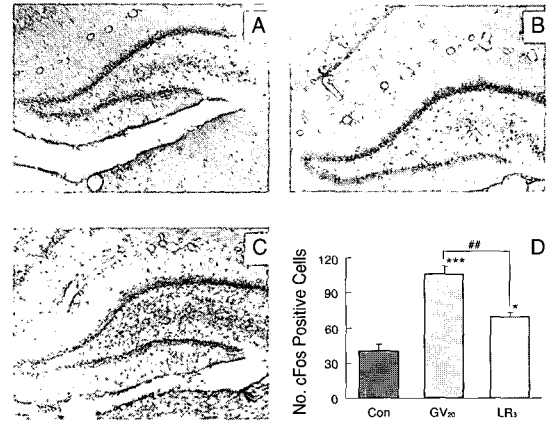
이러한 변화양상은 대뇌피질에서도 관찰되었는데,

운동피질 영역에서 일과성 전뇌 허혈 손상 이후 대조군의 경우  $66 \pm 13.45$  개의 cFos 단백질 발현이 관찰되었고, 百會에 釣鉤藤 藥鍼을 시술한 실험군의 경우  $126.75 \pm 1.25$  개의 유의하게 증가 ( $p < 0.001$ )된 cFos 단백질 발현이 관찰되었으며, 太衝 시술군에 비하여도 유의한 증가 ( $p < 0.01$ )가 관찰되었다. 반면, 太衝에 釣鉤藤 藥鍼을 시술한 실험군의 경우  $88.75 \pm 3.01$  개의 cFos 단백질 발현이 관찰되었는데 이는 대조군에 비하여 유의한 수준이 아니었으며, 해마부위에서 관찰되었던 cFos 단백질의 증가 양상이 운동피질 영역에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 3).

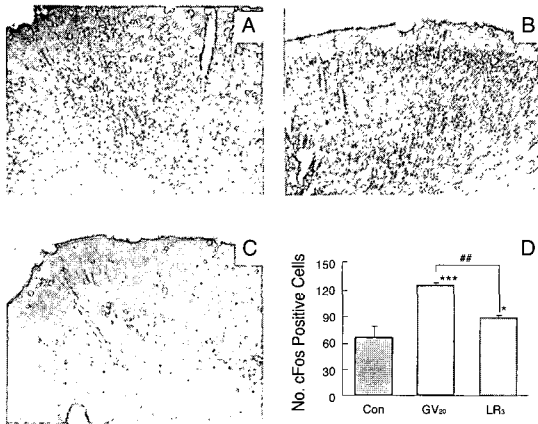
한편, 대뇌피질 중 RSGb 영역에서의 cFos 단백질의 변화는 다른 영역에 비하여 발현이 적게 나타났는데, 허혈 손상이 유발된 대조군에서는  $10 \pm 3.89$ 개의 발현이 관찰되었고, 釣鉤藤 藥鍼을 百會에 시술한 경우에는  $12.33 \pm 4.63$  개의 발현이 관찰되었으며, 太衝에 시술한 경우에는  $17 \pm 4.51$  개의 발현이 관찰되어 대



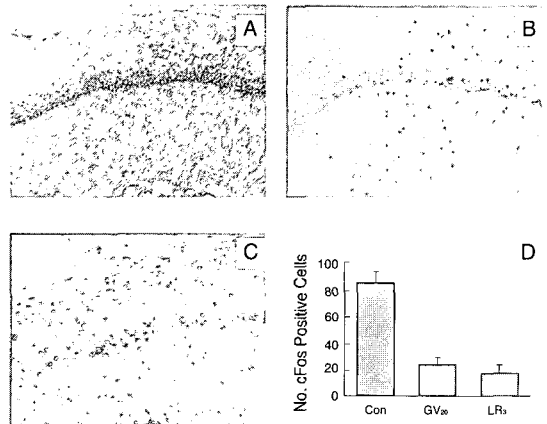
**Fig. 1.** Effects of *Ramulus Uncariae Cum Uncis* (RU) herbal acupuncture of GV<sub>20</sub> and LR<sub>3</sub> on cFos positive protein expression in the CA1 at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemia injury in control group; B, pretreatment with RU herbal acupuncture on GV<sub>20</sub>; C, pretreatment with RU herbal acupuncture on LR<sub>3</sub>. Values are Mean ± SE. Number of each group is 10. \* significant difference from control group (\*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).



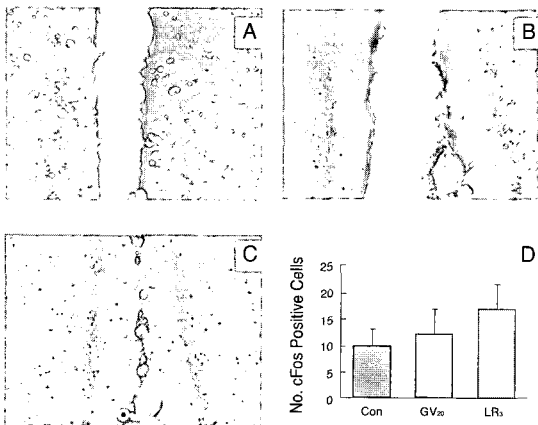
**Fig. 2.** Effects of *Ramulus Uncariae Cum Uncis* (RU) herbal acupuncture of GV<sub>20</sub> and LR<sub>3</sub> on cFos positive protein expression in the dentate gyrus (DG) at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemia injury in control group; B, pretreatment with RU herbal acupuncture on GV<sub>20</sub>; C, pretreatment with RU herbal acupuncture on LR<sub>3</sub>. Values are Mean ± SE. Number of each group is 10. \* significant difference from control group (\*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ); # significant difference between the herbal acupuncture group (##  $p < 0.01$ ).



**Fig. 3.** Effects of *Ramulus Uncariae Cum Uncis* (RU) herbal acupuncture of GV<sub>20</sub> and LR<sub>3</sub> on cFos positive protein expression in the motor cortex at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemia injury in control group; B, pretreatment with RU herbal acupuncture on GV<sub>20</sub>; C, pretreatment with RU herbal acupuncture on LR<sub>3</sub>. Notations are the same as the previous figures. \* significant difference from control group (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; # significant difference between the herbal acupuncture group (\*\*\*)  $p < 0.01$ ).



**Fig. 5.** Effects of *Ramulus Uncariae Cum Uncis* (RU) herbal acupuncture of GV<sub>20</sub> and LR<sub>3</sub> on FosB positive protein expression in the CA1 at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemia injury in control group; B, pretreatment with RU herbal acupuncture on GV<sub>20</sub>; C, pretreatment with RU herbal acupuncture on LR<sub>3</sub>. Values are Mean ± SE. Number of each group is 10. \* significant difference from control group (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).



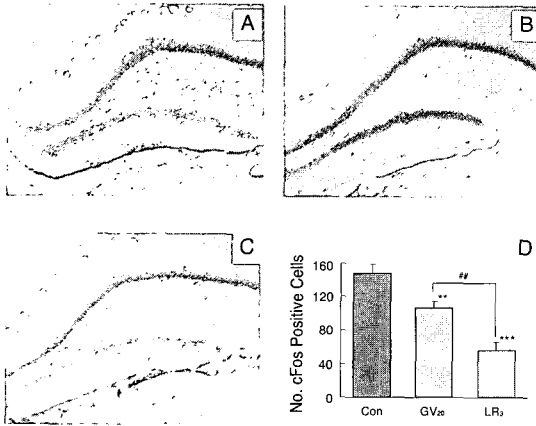
**Fig. 4.** Effects of *Ramulus Uncariae Cum Uncis* (RU) herbal acupuncture of GV<sub>20</sub> and LR<sub>3</sub> on cFos positive protein expression in the retrosplenial granular b cortex (RSGb) at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemia injury in control group; B, pretreatment with RU herbal acupuncture on GV<sub>20</sub>; C, pretreatment with RU herbal acupuncture on LR<sub>3</sub>. Notations are the same as the previous figures.

조군과 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4).

## 2. 一過性 前腦 虛血 損傷 後 海馬 및 大腦皮質 영역의 FosB 단백질 발현과 釣鉤藤 藥鍼의 효과

일과성 전뇌허혈 손상 유발 후에 관찰된 FosB 단백질 발현양상은 cFos 단백질 발현양상과는 다르게 나타났다. 흰쥐 해마부위 중 CA1 영역에서의 FosB 발현은 허혈손상 이후 2시간째에  $84.86 \pm 7.22$  개로 매우 큰 증가를 보였다. 釣鉤藤 藥鍼을 1시간 전에 전처치한 實驗群의 경우, 百會 刺戟群은  $24 \pm 5.05$  개 ( $p < 0.001$ )로 대조군에 비하여 매우 유의한 감소를 나타내었으며, 太衝 刺戟群은  $18.22 \pm 5.75$  개 ( $p < 0.001$ )로 대조군에 비하여 매우 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 5). 이는 허혈 손상 이후 cFos 단백질 발현 양상과 釣鉤藤 藥鍼 刺戟 後의 cFos 단백질 발현 변화와는 다른 결과를 보여주는 것이다.

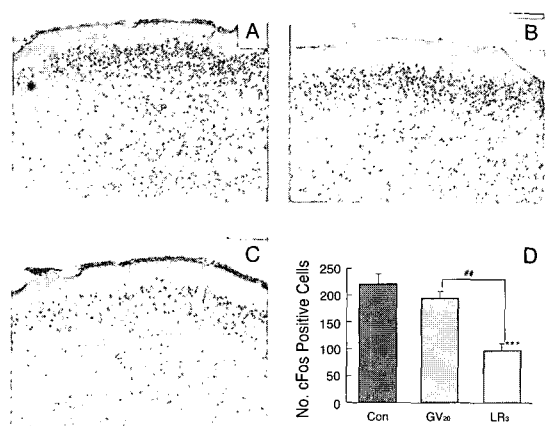
마찬가지로 흰쥐 海馬 中 齒狀回에서 FosB 단백질 발현은 일과성 허혈 손상 이후 대조군에서는 146.44



**Fig. 6.** Effects of *Ramulus Uncariae Cum Uncis* (RU) herbal acupuncture of GV<sub>20</sub> and LR<sub>3</sub> on FosB positive protein expression in the dentate gyrus (DG) at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemia injury in control group; B, pretreatment with RU herbal acupuncture on GV<sub>20</sub>; C, pretreatment with RU herbal acupuncture on LR<sub>3</sub>. Notations are the same as the previous figures. \* significant difference from control group (\*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ); # significant difference between the herbal acupuncture group (#  $p < 0.01$ ).

±11.36 개의 발현이 관찰되었으며, 百會에 鈞鉤藤 藥鍼을 전치치한 실험군에서는  $105.92 \pm 7.78$  개 ( $p < 0.01$ )로 대조군에 비하여 FosB 단백질 발현이 유의하게 감소되었다. 아울러, 太衝에 대한 鈞鉤藤 藥鍼 자극 역시 齒狀回の FosB 단백질 발현을  $57 \pm 8.1$  개 ( $p < 0.001$ )로 유의한 수준으로 감소시켰으며, 太衝이 百會에 비하여 유의한 수준으로 FosB 단백질 발현을 억제하였다 ( $p < 0.01$ )(Fig. 6).

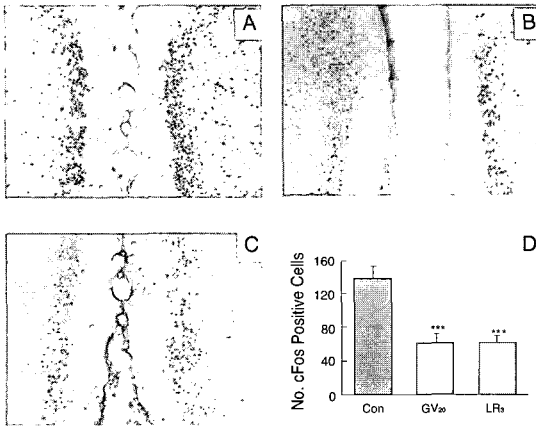
흰쥐 대뇌피질 중 運動皮質 영역에 대한 FosB 단백질 발현의 변화를 관찰한 결과, 일과성 전뇌 허혈 손상 유발 후 2시간째에서  $222.5 \pm 18.78$  개의 다량의 FosB 단백질 발현이 관찰되었고, 이러한 발현의 분포는 운동피질의 表層에서 보다 뚜렷하게 증가되어 있었다. 반면, 鈞鉤藤 藥鍼을 前處置로 주입한 실험군에서는 FosB 단백질 발현이 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었는데, 百會를 刺戟한 실험군에서는



**Fig. 7.** Effects of *Ramulus Uncariae Cum Uncis* (RU) herbal acupuncture of GV<sub>20</sub> and LR<sub>3</sub> on FosB positive protein expression in the motor cortex at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemia injury in control group; B, pretreatment with RU herbal acupuncture on GV<sub>20</sub>; C, pretreatment with RU herbal acupuncture on LR<sub>3</sub>. Notations are the same as the previous figures. \* significant difference from control group (\*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ); # significant difference between the herbal acupuncture group (#  $p < 0.01$ ).

$194.71 \pm 13.48$  개로 대조군에 비하여 감소하는 경향은 보였으나 유의한 수준의 감소는 아니었으며, 太衝에 刺戟한 실험군에서는  $98 \pm 10.54$  개 ( $p < 0.001$ )로 대조군과 百會 자극군에 비하여 유의한 FosB 단백질 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 7).

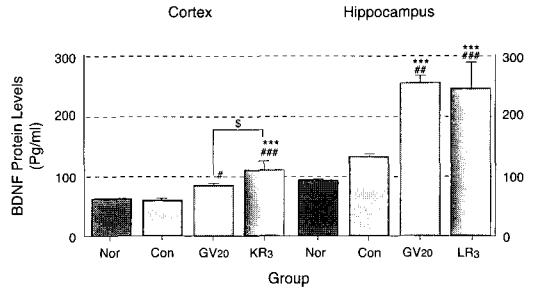
Retrosplenial granular cortex (RSGb)에서 관찰한 결과에서, 일과성 전뇌 허혈 손상을 유발한 대조군의 경우,  $139.29 \pm 12.16$  개로 FosB 단백질의 발현이 관찰되었으며, 이러한 발현양상은 鈞鉤藤 藥鍼을 시술한 실험군에서 모두 유의하게 감소되었는데, 百會에 자극한 경우에는  $61.5 \pm 10.89$  개 ( $p < 0.001$ ), 太衝에 자극한 경우에는  $62.2 \pm 9.09$  개 ( $p < 0.001$ )의 FosB 단백질 발현이 관찰되었다. 이 경우, 운동피질 영역에서와는 달리 百會 刺戟群과 太衝 刺戟群 모두 비슷한 수준의 FosB 단백질 발현 억제를 보여주었다(Fig. 8).



**Fig. 8.** Effects of *Ramulus Uncariae Cum Uncis* (RU) herbal acupuncture of GV<sub>20</sub> and LR<sub>3</sub> on FosB positive protein expression in the retrosplenial granular b cortex (RSGb) at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, 2 hrs after ischemia injury in control group; B, pretreatment with RU herbal acupuncture on GV<sub>20</sub>; C, pretreatment with RU herbal acupuncture on LR<sub>3</sub>. Notations are the same as the previous figures. \* significant difference from control group (\*\**p*<0.001).

### 3. 一過性 前腦 虛血 損傷 후 BDNF 단백질 발현과 鈞藤 藥鍼의 效果

정상 동물의 경우 대뇌피질 부위의 BDNF 단백질은 64.3±1.31 pg/ml 이었으며, 해마 부위에서는 94.65±0.82 pg/ml로 해마가 대뇌피질보다 BDNF 단백질이 높 이 분포하고 있었다. 일과성 전뇌 허혈 손상을 유발 한 대조군의 경우 대뇌피질에서는 61.16±4.11 pg/ml 이 관찰되었고, 해마에서는 134.07±2.96 pg/ml이 관 찰되어, 허혈손상의 해마부위에서의 BDNF 단백질 이 증가한다는 점을 확인할 수 있었다. 또한, 鈞藤 藥 鍼을 허혈 손상 1시간 전에 투입한 경우에 BDNF 단 백은 크게 증가하는 경향을 보였는데, 百會에 시술한 경우에서는 대뇌피질에서 85.81±3.45 pg/ml과 해마 에서 254.88±12 pg/ml로 정상동물과 대조군에 비하 여 유의하게 증가되었다. 아울러, 太衝에 시술한 경우 에서도 대뇌피질은 111.51±15.79 pg/ml와 해마에서 는 245.93±44.4 pg/ml의 BDNF 단백질이 정량되었는



**Fig. 9.** Effects of *Ramulus Uncariae Cum Uncis* (RU) herbal acupuncture of GV<sub>20</sub> and LR<sub>3</sub> on expression of BDNF protein following transient forebrain ischemia. Levels of BDNF are measured in the cortex and the hippocampus at 48 hrs after ischemia. Values are means±SD. Number of group is 3. \* significant difference from normal group (\*\**p*<0.001), # significant difference from control group (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01 and \*\*\**p*<0.001); § significant difference between the herbal acupuncture group (§*p*<0.05).

데 역시 정상동물과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. 더욱이, 대뇌피질에서의 BDNF 단백질 발현은 太衝 시술군에서 더욱 유의하게 증가된 것을 볼 수 있었다 (Fig. 9).

## 고 찰

中風은 暴仆, 卒暴疆付, 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 나타나 는 病證으로 정의되는 서양 의학적으로 중추신경계 질환들 다수에 포함되지만, 그 중 뇌혈관 질환의 범 주인 腦卒中이 가장 밀접하다고 볼 수 있다. 腦血管 疾患은 뇌의 급격한 순환장애로 인하여 발생하는데, 대개 虛血性 腦血管 疾患과 充血性 腦血管 疾患으로 兩分하며, 그 중 대부분은 虛血性 腦血管 疾患이다<sup>15)</sup>.

臨床上 中風은 中經絡과 中臟腑로 나뉘어 지며, 中 臟腑는 다시 閉證과 脫證으로 구분되어진다. 中經絡 은 口眼喎斜, 半身不遂, 手足麻木 등과 같은 증상이 지만, 病의 부위가 비교적 淺하고 病情 역시 비교적



가볍다. 반면 中臟腑는 突然昏仆, 人事不省하여 病의 부위가 깊고, 病情 역시 심하여, 閉證의 경우 神志昏沈, 牙關皮閉, 兩手緊握, 面赤氣粗, 喉中痰鳴 등의 증상이 나타나며, 脫證의 경우 神志昏糊, 目合口張, 手撤, 鼻鼾息微, 呼吸微弱 등의 증상이 출현한다. 이러한 증상에 대한 침구치료는 豫防에 足三里, 懸鍾(灸)하고, 前兆症에 風府, 大杼, 合谷, 太衝, 足三里, 肩髃, 曲池, 內關, 豐隆 등을 刺鍼하며, 中經絡중에서도 半身不遂의 경우 祛風化痰, 調和氣血하고자 百會, 風池, 肩髃, 曲池, 外關, 合谷, 環跳, 陽陵泉, 足三里, 懸鍾, 解谿, 太衝 등이 활용되었고, 口眼喎斜의 경우에는 疏通經絡, 調氣和血하고자 翳風, 地倉, 頰車, 合谷, 攢竹, 四白, 內庭, 顴膠, 挾承漿, 內庭, 太衝 등이 활용되었다. 中臟腑의 경우, 閉證에서는 人中, 十二井, 百會, 風池, 合谷, 勞宮, 豐隆, 涌泉, 太衝 등이 활용되었으며, 脫證에서는 人中 百會 涌泉 關元 神厥 足三里 腎俞 등이 활용되었다. 물론, 증상의 輕重과 合併症에 따라 合當한 治療 穴들이 가감된다<sup>6)</sup>. 또한 최근의 臨床 研究를 보면, 肝腎陰虛로 인하여 발생된 일과성뇌허혈 발작에 대하여 醒腦開竅 流通經絡 滋補肝腎하는 치료원칙을 세워, 內關, 人中, 三陰交, 極泉, 太衝, 絕骨의 穴을 선택 하였고, 肝腎已虛 肝陽偏亢으로 인한 腦梗塞에서 醒腦開竅, 滋補肝腎, 疏通經絡의 원칙을 세워 內關 人中 三陰交 極泉 尺澤 委中 風池 上星 透百會의 침구치료를 시술하였다<sup>7)</sup>.

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. 흰쥐에서 4-vessel occlusion (4-VO)은 해마부위 CA1의 방추형 세포들과 齒狀回의 hilus에 존재하는 somatostatin 함유 신경 세포들에서 선택적으로 세포사를 유발한다<sup>18)</sup>. 아울러, 일과성 전뇌 허혈이후 몇일내에 해마를 중심으로 지연성 신경세포사가 발생되며<sup>71,72)</sup>, 이러한 사멸증인 세포는 DNA의 파괴가 동반되는데, 특히 inter-nucleosomal DNA 분절화와 관련된 세포자멸 (apoptosis)과 관련된다<sup>19)</sup>.

大腦의 虛血 및 酸化의 損傷에 대한 한의학적 치

료법에 대한 연구는 임상 및 동물실험등이 활발히 진행되어 왔으며, 鈞鉤藤의 복강투여를 통한 前腦 虛血 損傷 治療에 대한 연구<sup>4)</sup>를 찾아 볼 수 있다. 반면 中風으로 유발된 후유증에 대한 치험사례나 연구가 대부분으로 鍼灸治療를 활용한 中風과 관련한 동물 실험이나 임상실험은 많지 않으며, 더욱이 藥鍼과 같은 시술을 통한 실험연구는 거의 全無한 형편이다.

鈞鉤藤 (Uncaria sinensis or rhynchophylla)은 한의학에서 고혈압과 이와 관련된 頭痛 및 眩暈을 치료하기 위하여 사용되어져 왔다. 鈞鉤藤은 性能에서 甘, 微寒하여 清熱平肝, 鎮痙熄風 등의 작용을 가지고 있으며, 驚癇抽搐, 肝陽上亢으로 인한 眩暈, 頭痛, 目赤, 肝熱頭痛 등을 치료하는데 응용되고 있다<sup>20)</sup>. 최근에는 鈞鉤藤의 성분이 분리되어 oxindole계와 heteroyohimbine alkaloids계 성분들이 주로 함유된 것으로 확인되었으며, Indole alkaloid계 성분으로는 hirsutine, hirsuteine, rhynchophylline, isorhynchophylline, dihydrocorynantheine 등이 보고되었다<sup>21)</sup>.

太衝 (LR<sub>3</sub>)은 足厥陰肝經의 俞土穴이자 原穴로 “治臟者, 治其原”와 “五臟有疾也, 當取十二原”이라는 점에 근거하여 질병치료에 응용하게 된다. 특히, 原穴에 대한 刺戟은 原氣를 通達시키고, 正氣를 維持시킴으로서 病邪를 억제할 수 있게 하며, 또한 臟腑經絡의 虛實을 조절할 수 있게 한다는 특징이 있다. 이러한 점에서 太衝은 肝臟과 肝經의 虛實을 조절할 수 있다. 足厥陰肝經의 流注를 보면, <<靈樞, 經脈篇>><sup>22)</sup>에서 “足厥陰之脈, 起於大趾叢毛之際 上循足跗上廉 去內踝一寸 上踝八寸交出太陰之後, 上躡內廉, 循股陰, 入毛中, 環陰器, 抵少腹, 挾胃, 屬肝, 絡膽, 上貫膈, 布脇肋, 循喉嚨之後, 上入頰頰, 連目系, 上出額, 與督脈會於巔, 其支者, 從目系下頰裏 環脣內. 其支者 復從肝別貫膈 上注肺”라고 언급하여, 足厥陰肝經의 流注가 頭頂部까지 도달하고 있음 알 수 있으며, 또한 이러한 流注의 특징과 肝藏血이라는 臟象學的 특징을 통해 中風治療에 활용됨을 다양한 문헌에서 살펴볼 수 있다.

百會 (GV<sub>20</sub>)은 甲乙經중에서 처음 언급되었으며, 異名으로 <<靈樞 熱病>>의 巔上, <<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 開竅醒腦 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이다<sup>23)</sup>. 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<sup>24)</sup>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%, 半身不隨에는 약 40% 등 中風의 각 증상에 대한 치료에서 百會는 활용범위가 넓은 것을 알 수 있다.

흥분독성 (Excitotoxicity)은 glutamate 또는 기타 흥분성 아미노산이 신경세포의 죽음을 몰고오는 것으로, 중추신경계에서 다양한 급성 손상 또는 만성 퇴행성변화로 야기되는 신경세포 손실은 이러한 흥분 독성에 기인하는 생각되어진다. 이러한 흥분 독성이 야기될 때, 초기발현 유전자 (IEG, immediate early gene)인 *cfos*가 다량 생성되어 전사인자 (transcription factor)를 암호화하게 한다. *cFos* 단백질은 Jun 계열 단백질과 함께 이성 이중체 (heterodimer)를 형성하여, AP-1 복합체를 형성하고 이는 많은 세포질내 유전자들에서 발견되어지는 AP-1 배열에 결합함으로써 전사과정을 조절하게 된다<sup>25)</sup>. *cfos*에 대한 여러 증거들이 모여짐에 따라 *cfos*가 신경세포의 생존 또는 사멸을 조절하는데 필수적이라고 추정되고 있다. 그리하여, 해마부위에서 *cfos* 발현 매우 크게 나타나는 변형 생쥐를 개발한 실험에서, *cFos*가 BDNF의 발현을 조절한다는 것을 확인하였으며, 또한 세포흥분성과 생존을 중계하는 세포기전에 중요한 유전 조절인자라는 사실을 주장하였다<sup>26)</sup>. 또한, *cfos*와 *cJun*의 결합에 의하여 형성된 AP-1 복합체가 NGF<sup>27)</sup>을 조절할 수 있다는 연구결과를 통해 *cfos* 단백질의 발현이 다양한 손상으로부터 신경세포를 보호할 수 있다고 추정된다.

*fosB* 유전자와 단백질은 1989년에 설치류의 3T3 cDNA library로부터 Fos 계열의 3번째로 분리되었다. 설치류의 *FosB* 단백질은 334개의 아미노산으로 구

성되어 있으며, Fra-1과 일정부분이 일치하지만, 72% 수준에서 *cfos*의 DNA-binding domain에서 동일한 부분이 있다<sup>28)</sup>. *FosB*와 *cFos*는 그들의 promoter내에 유사한 조절 부위가 존재하는 것으로 추정되며, 이로 인하여 서로의 발현을 억제할 수 있다. 또한, *FosB*의 SRE는 *cFos*의 SRE에 비하여 자극에 대한 반응이 약하여, 비교적 신경계에서 *cFos*의 발현이 더 많은 것으로 알려져 있다. 정상 상태에서 *FosB*는 주로 cortex의 layer II, IV, V 와 VI에 산재되어 있으며, 아울러 치상회의 背側에도 존재하는 것으로 보고되고 있으며, 유해성 자극을 가할 경우, 자극 후 2시간부터 발현되어 4~8시간까지 지속되는 것으로 보고되고 있다<sup>29)</sup>. 또한 허혈성 손상에 노출될 경우에도 *FosB*의 발현이 증가되며, 이러한 발현은 주로 해마의 CA1과 치상회에 제한되어 발현된다고 보고하였다<sup>30)</sup>. 이를 바탕으로 *FosB*의 발현은 허혈성 손상으로 유발되는 신경세포 사멸과정의 정도를 이해하는 지표가 되고 있다. 물론, 같은 Fos 계열인 *cfos* 역시 *FosB*와 마찬가지로, 세포사멸의 정도를 측정하는 관찰대상이기도 하나 최근의 연구에서 *cfos*의 발현이 신경세포 생존 과정과 관련이 있음이 보고되고 있어, *FosB*와는 다른 각도에서 접근하여야 할 것으로 사료된다.

본 연구결과에서 이러한 *cFos* 단백질 및 *FosB* 단백질의 발현 양상이 관찰되었는데, 흰쥐의 해마에서는 정상 상태의 경우는 *cFos* 단백질이 거의 관찰되지 않았으며, 일과성 전뇌 허혈 손상후 2시간째에서 *cFos* 단백질의 발현이 관찰되어졌다 (CA1,  $11.3 \pm 2.06$ 개; 齒狀回,  $40.83 \pm 5.44$ 개). 일과성 전뇌 허혈을 유발하기 1시간 전에 鈞鈞藤 藥鍼을 전처치 한 경우, *cFos* 단백질 발현에 유의한 변화가 관찰되었는데, 百會에 鈞鈞藤 藥鍼을 시술한 경우에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다 ( $32.71 \pm 3.05$ 개). 太衝에 대한 鈞鈞藤 藥鍼 역시, 일과성 허혈손상 후 2시간째에서 *cFos* 단백질의 발현이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고 ( $25.33 \pm 2.4$ 개), 百會와의 太衝 간의 발현량의 차이에서 百會가 보다 증가하는 경향을 보였으나, 유의한 차이를 나타내지 않았다. 또한 海馬의 齒狀回는 百會에 대한 鈞鈞藤 藥鍼을 전처치 한 후 허혈 손상

을 유발한 실험군에서도 유의한 증가 ( $106.38 \pm 8.03$  개)를 보였고, 太衝에 대한 鈞鈎藤 藥鍼 경우에서도 유의한 증가 ( $70.5 \pm 3.82$ 개)를 나타내었다. 이러한 변화양상은 대뇌피질에서도 관찰되었는데, 운동피질 영역에서 대조군 ( $66 \pm 13.45$ 개)에 비하여 百會에 鈞鈎藤 藥鍼을 시술한 실험군 ( $126.75 \pm 1.25$ 개)의 경우 유의하게 증가하였고, 太衝 시술군에 비하여서도 유의한 증가가 관찰되었다. 반면, 太衝에 鈞鈎藤 藥鍼을 시술한 실험군 ( $88.75 \pm 3.01$ 개)은 대조군에 비하여 유의한 수준이 아니었다. 한편, 대뇌피질 중 RSGb 영역에서의 cFos 단백질의 변화는 다른 영역에 비하여 발현이 적게 나타났는데, 대조군 ( $10 \pm 3.89$ 개)의 발현이 鈞鈎藤 藥鍼을 百會에 시술한 경우 ( $12.33 \pm 4.63$ 개)와 太衝에 시술한 경우 ( $17 \pm 4.51$ 개)와 비교하여 차이를 보이지 않았다. 이는 해마 영역과 대뇌피질의 운동피질 영역과 비교하여 볼 때, 鈞鈎藤 藥鍼 자극이 RSGb 영역의 cFos 단백질 발현에 대한 효과가 적거나 없음을 반영하는 것으로 보인다.

또한 일과성 전뇌 허혈 손상 유발 후에 관찰된 FosB 단백질의 발현양상은 cFos 단백질 발현양상과는 다르게 나타났다. 흰쥐 해마부위 중 CA1 영역에서의 FosB 발현은 허혈손상 이후 2시간째에  $84.86 \pm 7.22$  개로 매우 큰 증가를 보였다. 鈞鈎藤 藥鍼을 1시간 전에 전치치한 百會 藥鍼群 ( $24 \pm 5.05$ 개)과 太衝 藥鍼群 ( $18.22 \pm 5.75$ 개)은 대조군에 비하여 매우 유의한 감소를 나타내었다. 이는 허혈 손상 이후 cFos 단백질 발현 양상과 鈞鈎藤 藥鍼 刺戟 後의 cFos 단백질 발현 변화와는 다른 결과를 보여주었다. 마찬가지로 齒狀回에서 FosB 단백질 발현은 대조군에서는  $146.44 \pm 11.36$  개의 발현이 관찰되었으며, 百會 藥鍼群 ( $105.92 \pm 7.78$ 개)과 太衝 藥鍼群 ( $57 \pm 8.1$ 개)에서 매우 유의한 수준으로 감소되었는데, 太衝이 百會에 비하여 보다 유의한 수준으로 FosB 단백질 발현을 억제하였다. 또한 흰쥐 대뇌피질 중 運動皮質 영역은 대조군에서  $222.5 \pm 18.78$  개의 다량의 FosB 단백질 발현이 관찰되었고, 이러한 발현의 분포는 운동피질의 표층에서 보다 뚜렷하게 증가되어 있었다. 반면, 鈞鈎藤 藥鍼을 前處置로 주입한 실험군에서는 FosB 단백질 발

현이 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었는데, 百會 藥鍼群 ( $194.71 \pm 13.48$ 개)은 대조군에 비하여 감소하는 경향은 보였으나 유의한 수준의 감소는 아니었으며, 太衝 藥鍼群 ( $98 \pm 10.54$ 개)은 대조군과 百會 藥鍼群에 비하여 유의한 FosB 단백질 발현 감소가 관찰되었다. Retrosplenial granular cortex (RSGb)에서도 대조군의 경우  $139.29 \pm 12.16$ 개로 FosB 단백질 발현이 관찰되었으며, 이는 鈞鈎藤 藥鍼群 (百會,  $61.5 \pm 10.89$ 개; 太衝,  $62.2 \pm 9.09$ 개)에서 모두 유의하게 감소되었는데, 운동피질 영역에서와는 달리 百會와 太衝 모두 비슷한 수준의 FosB 단백질 발현 억제를 보여주었다.

Neurotrophic factors는 말초신경계 및 중추신경계에서 발생과 유지에 중요하게 관여되고 있으며, 이중 매우 잘 알려진 신경친화성 물질로는 nerve growth factor (NGF)가 있다. 최근, 같은 유전자 계열로서, brain derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4/5 (NT-4/5)가 또한 밝혀졌다<sup>31)</sup>. 중추신경계에서, BDNF는 대개 해마부위에서 가장 많이 분포되어 있는 것으로 알려져 있으며, amygdaloid, piriform, cingulate, entorhinal cortex와 neocortex에서 낮은 수준으로 분포되고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 BDNF에 대하여 지금까지의 연구들을 보면, 다양한 대뇌손상에 따른 BDNF의 변화를 관찰하였는데, kainic acid를 통해 유발된 간질에서 BDNF mRNA가 해마와 피질영역에서 크게 증가되는 것이 관찰되었다<sup>32)</sup>. 역시 일과성 전뇌허혈 손상에서 해마의 치상회에서 BDNF mRNA가 크게 증가한다는 것이 밝혀졌다<sup>33)</sup>. 현재까지는 이러한 손상 이후 증가하는 BDNF가 신경손상을 개선하는 방어적 작용 또는 신경연접을 재구성하는 신경가소성에 역할을 하는 것으로 추정하고 있다. 더욱이, 외인적으로 주입한 BDNF가 허혈손상으로 인한 신경세포 사멸을 억제하는 사실이 다양한 실험과 연구에서 밝혀졌으며, 이러한 BDNF의 주입은 허혈손상 전이나 후에 시행하여도 모두 유의하게 효과적인 것으로 드러났다<sup>34)</sup>. 대뇌의 허혈성 손상이후 손상에 대하여 저항성을 지닌 신경세포 영역에서 BDNF, pCREB

(phosphorylated CREB)과 PGHS-2의 수치가 크게 증가한다는 사실을 보고하면서, 이들이 신경보호작용을 하는데 중요한 역할을 함을 주장하였다<sup>35)</sup>. 또한 BDNF나 pCREB은 허혈성 손상 후 48-72 시간에서 가장 크게 증가하며, 특히 해마 부위중 허혈 손상에 대하여 저항성이 높은 신경세포로 구성되어진 치상회에서 증가하는 것으로 보고되었다. 반면, 허혈 손상에 취약한 CA1 영역에서는 BDNF나 pCREB이 감소하는 것을 보였고, 아울러 48 시간 이후에서 cFos 발현이 증가된다고 보고하였다<sup>36)</sup>.

이를 근거로 하여, 본 연구에서는 BDNF 단백질의 정량화를 허혈 손상이후 48시간째에 시행하였다. 또한, 앞에서 언급한 cFos 단백질과 FosB 단백질의 발현 양상과 鈞鈎藤 藥鍼의 치료효과를 이해하기 위하여, BDNF 단백질 발현 여부와 변화를 관찰 할 필요가 있었다. 정상 동물의 경우 대뇌피질 부위의 BDNF 단백질은  $64.3 \pm 1.31$  pg/ml 이었으며, 해마 부위에서는  $94.65 \pm 0.82$  pg/ml로 해마가 대뇌피질보다 BDNF 단백질이 높고 분포하고 있었다. 일과성 전뇌 허혈 손상을 유발한 대조군의 경우 대뇌피질에서는  $61.16 \pm 4.11$  pg/ml이 관찰되었고, 해마에서는  $134.07 \pm 2.96$  pg/ml이 관찰되어, 허혈손상의 해마부위에서의 BDNF 단백질이 증가한다는 점을 확인할 수 있었다. 또한, 鈞鈎藤 藥鍼을 허혈 손상 1시간 전에 투입한 경우에 BDNF 단백질은 크게 증가하는 경향을 보였는데, 百會에 시술한 경우에는 대뇌피질에서  $85.81 \pm 3.45$  pg/ml과 해마에서  $254.88 \pm 12$  pg/ml로 정상동물과 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다. 아울러, 太衝에 시술한 경우에서도 대뇌피질은  $111.51 \pm 15.79$  pg/ml과 해마에서는  $245.93 \pm 44.4$  pg/ml의 BDNF 단백질이 정량되었는데 역시 정상동물과 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. 더욱이, 대뇌피질에서의 BDNF 단백질의 발현은 太衝 시술군에서 더욱 유의하게 증가된 것을 볼 수 있었다.

이상의 결과에서 鈞鈎藤 藥鍼이 일과성 전뇌 허혈 손상으로 야기되는 신경세포의 손상과 사멸을 억제할 있다는 사실을 확인할 수 있다. 이는 허혈 손상 이후 초기에 발현되는 cFos 단백질의 발현을 藥鍼 刺戟群

에서 더욱 증가되었다는 점과 BDNF 단백질 역시 藥鍼 刺戟으로 증가되었다는 점에서 더욱 확신할 수 있다. 이러한 효과는 크게 두가지 방향에서 이해할 수 있는데, 첫 번째는 鈞鈎藤의 성분중 최근 밝혀진 바에 의하면, 특히 Indole alkaloids 성분들은 심혈관계에서 혈관이완, 저혈압유발, 항부정맥 효과등이 보고되었을 뿐만 아니라 약한 중추신경계 억제작용도 존재하는 것으로 보고되어 있다<sup>340)</sup>. Indole alkaloid계 성분중 hirsutine, 3 $\alpha$ -dihydrocadmbine, rhynchophille 등은 평활근 이완작용에 의한 혈압강하를 초래하는데, 이때 이들 약물들이 Ca<sup>2+</sup> channel의 차단효과에 기인한다고 한다고 하여, 흰쥐의 대동맥 평활근에서 hirsutine이 Ca<sup>2+</sup> channel을 차단하여 voltage dependent Ca<sup>2+</sup> 유입을 억제시키고 세포내 Ca<sup>2+</sup> 저장고로부터의 Ca<sup>2+</sup> 유리를 감소시켜 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 감소시킨다고 하였다<sup>3)</sup>. 그리고 흰쥐의 pheochromocytoma 세포에서도 hirsutine의 Ca<sup>2+</sup> channel 차단 효과가 존재한다고 한다<sup>37)</sup>. 아울러 鈞鈎藤의 ethanol 추출 성분이 흰쥐의 뇌에서  $\alpha$ -2 adrenoreceptor, serotonin (5-HT)수용체-1, 5-HT-1A 수용체, opiate 수용체, dopamine 1 수용체, 및 GABA-A, GABA-B 수용체에 강한 결합력이 있다는 연구결과가 보고되었다<sup>38)</sup>. 이는 허혈 손상 과정에 Ca<sup>2+</sup>의 세포내 influx의 증가가 세포 사멸을 촉진한다는 기존의 연구를 고려할 때, 본 연구에서 나타난 鈞鈎藤의 효과를 관련지을 수 있을 것이다. 다음으로 이해할 수 있는 두 번째는 鈞鈎藤의 항산화효과를 나타내는 활성산소분출작용을 ESR (electron spin resonance)로 분석한 연구<sup>39)</sup>와 鈞鈎藤의 흰쥐 복강내 투여가 전뇌허혈 손상에 유효한 신경세포 손상 방어효과가 있다는 보고<sup>4)</sup>를 통해 鈞鈎藤의 항산화작용을 통한 신경세포 손상의 보호 작용으로, 鈞鈎藤의 복강내 투여가 일정농도에서 신경방어효과가 있으며 PC12 cell에서 세포에 대한 항산화작용과 뇌조직내 apoptosis 유발효소 중 하나인 cyp32 단백질의 발현을 억제함을 관찰하였다<sup>4)</sup>. 이는, 첫 번째에서 언급한 Ca<sup>2+</sup> 수용체 작용과 함께 중요한 신경방어작용을 나타내는 인자라고 볼 수 있는 것이다.

그러나, 본 연구 결과에서 나타난 것처럼 百會에

대한 藥鍼刺戟과 太衝에 대한 藥鍼刺戟이 동일한 효과를 나타내고 있으면서도 정도에서 차이가 나타남을 확인할 수 있다. 이는 단순히 鈞鈞藤 자체만의 허혈 손상을 억제하고 신경세포를 보호하는 작용으로 이해하여 서는 안될 것으로 사료된다. 즉, cFos 단백질 발현은 百會에 가한 鈞鈞藤 藥鍼에서 보다 우월하였으며, FosB 단백질 및 BDNF 단백질의 발현은 太衝에 가한 鈞鈞藤 藥鍼에서 보다 우월하였다. 즉, 鈞鈞藤 藥鍼은 鈞鈞藤이라는 자체의 藥物的 효과와 병행하여 穴位에 대한 특이적 효과를 가지고 있음으로 해석해야 할 것이다.

따라서 이상의 실험 결과들과 문헌적 고찰을 근거할 때, 본 실험에서 일과성 전뇌허혈 손상에 대한 鈞鈞藤 藥鍼 효과는 鈞鈞藤 추출물에 의한 Ca<sup>2+</sup> 수용체 차단효과 및 항산화 효과에 의하여 나타난 것으로 추정되며, 아울러 藥鍼 자극을 위한 穴位的 차이를 나타내는 特異性を 보이고 있음을 확인할 수 있었다. 다만, 이러한 特異성을 이해하기 위해 추가적이고 다양한 연구가 필요하리라 사료된다.

## 결 론

本 研究는 一過性 前腦 虛血 損傷에 따른 초기 발현 유전 단백질 (immediate early gene protein)인 cFos 및 FosB 단백질의 변화와 BDNF 단백질의 변화를 관찰함으로써, 百會와 太衝에 시술한 鈞鈞藤 藥鍼이 각각 虛血 損傷으로부터 神經保護 效果 여부를 확인하고자 하였다.

1. 일과성 전뇌 허혈 손상후 2시간째에서 海馬의 CA1와 齒狀回 영역에서 鈞鈞藤 藥鍼을 百會와 太衝에 전치치로 시술한 경우, cFos 단백질의 발현이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다.
2. 대뇌피질에서 百會와 太衝에 대한 鈞鈞藤 藥鍼은 cFos 단백질의 증가 양상을 나타내었으며, 유의하지 않았다.
3. 일과성 전뇌허혈 손상 유발 후에 海馬에서의 FosB 발현은 허혈손상 이후 2시간째에 큰 증가를 보였고, 鈞鈞藤 藥鍼을 百會 藥鍼群과 太衝

藥鍼群은 각각 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.

4. 大腦皮質중 運動皮質은 鈞鈞藤 百會 藥鍼群에서 FosB 단백질 발현이 대조군에 비하여 감소하였는데, 太衝 藥鍼群은 대조군과 百會 자극군에 비하여 유의한 FosB 단백질 발현 감소가 관찰되었고, Retrosplenial granular cortex (RSGb)은 대조군에 비하여 百會와 太衝에 자극한 경우에서 모두 FosB 단백질 발현이 감소되었다.
5. 와 太衝에 대한 鈞鈞藤 藥鍼은 대뇌피질과 해마에서 BDNF 단백질의 발현이 유의하게 증가되었다.

본 실험에서 일과성 전뇌허혈 손상에 대한 鈞鈞藤 藥鍼 效果는 鈞鈞藤 추출물에 의한 Ca<sup>2+</sup> 수용체 차단효과 및 항산화 효과에 의하여 나타난 것으로 추정되었다. 다만, 이러한 효과에 대한 기전을 이해하기 위해 추가적이고 다양한 연구가 필요하리라 사료된다.

## 참고문헌

1. 高學敏 主編. 中藥學. 1판. 北京:人民衛生出版社. 2000:1415-1422
2. Tang W, Eisenbran G. Chinese drugs of plant origin ; Chemistry, pharmacology and use in traditional and modern medicine. Berlin Heidelberg:Springer-Verlag. 1992:997-1002.
3. Yano S, Horiuchi H, Horie S, Aimi N, Sakai S and Watanabe K. Ca<sup>2+</sup> channel blocking effects of hirsutine, an indole alkaloid from Uncaria genus, in the isolated rat aorta. Planta Med. 1991;57(5): 403-405.
4. 李仁煥. 흰쥐의 前腦虛血모델에 대한 鈞鈞藤의 神經防禦效果. 경희대학교 대학원 한의학 박사학위. 2000: 1-59.
5. 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. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. Prog Neurobiol. 2000;62:215-249.
7. 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.
8. Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, Hokfelt T. Expression of c-fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(23):9569-73.
  9. Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 1990 Apr;4(4):477-85.
  10. Colotta F, Polentarutti N, Sironi M, Mantovani A : Expression of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *Biol Chem.* 1992;267:18278-18283.
  11. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe? *Stroke.* 1996;27(9):1682-7.
  12. Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults, *Trends Neurosci.* 1994;17:490-496.
  13. Schabitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2000 Sep;31(9):2212-7.
  14. Tanaka T, Saito H, Matsuki N. Inhibition of GABAA synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J. Neurosci.,* 1997;17:2959-2966.
  15. 김영석. 임상중풍학. 서울:서원당. 1997:303-8, 317-29.
  16. 常青. 實用中風防治手冊. 北京:中國中醫藥出版社: 1993:24-25, 46.
  17. 石學敏. 石學敏針灸學. 天津:天津科學技術出版社. 1996:359-360
  18. Araki T, Kato H, Kogure K. Selective neuronal vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: Distribution and time course. *Acta Neurol. Scand.* 1989;80:558-553.
  19. 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.
  20. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울:남산당. 1986:658-659.
  21. Bensky D and Gramble A. *Chines Herbal Medicine-Materia Medica.* Eastland Press, Seattle, 1986:603-604.
  22. 郭靄春 編著. 黃帝內經 靈樞校注語譯. 서울:醫聖堂. 1993:102-136.
  23. 劉冠軍. 中醫針灸經穴集成. 江西科學技術出版社. 1997:468-470,544-546.
  24. 손인철, 안성훈. 中風七穴의 중풍치료에 대한 문헌적 고찰. *大韓針灸學會誌.* 1995;15(2):255-274.
  25. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1988;1:623-634.
  26. Zhang JH, Zhang DS, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M. c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nature Genetics.* 2002;30:416-420.
  27. Hengerer B, Lindholm D, Heumann R, Ruther U, Wagner EF, Thoenen H. Lesion-induced increase in nerve growth factor mRNA is mediated by c-fos. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(10):3899-3903.
  28. Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system:control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB / ATF proteins. *Brain Research Reviews.* 1998;28:370-490.
  29. Herdegen T, Tolle T, Bravo R, Zieglgansberger 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;129:221-224.
  30. Neumann-Haefelin T, Wiessner C, Vogel P, Back T, Hossmann K. Differential expression of the immediate early genes c-fos, c-jun, junB, and NGFI-B in the rat brain following transient forebrain ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994;14:206-216.
  31. Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature,* 1990;344: 339-341.
  32. Dugich-Djordjevich MM, Tocco G, Lapchak PA, Pasinetti GM, Najm I, Baudry M, Hefi F. Regionally specific and rapid increases in brain-derived

- neurotrophic factor messenger RNA in the adult rat brain following seizures induced by systemic administration of kainic acid. *Neuroscience*. 1992;47:303-315.
33. Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjö BK, Persson H. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:648-652.
  34. 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.
  35. 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.
  36. Walton MR, Dragunow M. Is CREB a key to neuronal survival? *Trend in Neuroscience*. 2000;23-2:48-53.
  37. Nakazawa K, Watano T, Ohara-Imaizumi M, Inoue K, Fujimori K, Ozaki Y, Harad M and Takanaka A. Inhibition of ion channels by hirsutine in rat pheochromocytoma cells. *Jpn J Pharmacol*. 1991;57:507-515.
  38. Zhu M, Bowery NG, Greengrass PM and Phillipson JD: Application of radioligand receptor binding assays in the search for CNS active principles from Chinese medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 1996;54:153-164.
  39. Lin JM, Lin CC, Chen MF, Ujjiie T and Takada A. Studies on Taiwan folk medicine, thang-kau-tin (II): Measurement of active oxygen scavenging activity using an ESR technique. *Am J Chin Med*. 1995; 23(1):43-51.
  40. Aisaka K, Hattori Y, Kihara T, Ishihara T, Endo K, Hikino H. Hypotensive action of 3 alpha-dihydrocadambine, an indole alkaloid glycoside of *Uncaria hooks*. *Planta Med*. 1985;5: 424-427.