

노령 흰쥐의 뇌허혈 손상시 凉膈散火湯이 뇌해마의 신경세포 및 HSP72 발현에 미치는 영향

박은경 · 신정원¹ · 손영주¹ · 정혁상 · 원란¹ · 손낙원^{1*}

경희대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 경희대학교 동서의학대학원 신경과학교실

Effect of Yanggyuksanhwa-tang on Pyramidal Neuron and HSP72 Expression in Ischemic Damaged Hippocampus of Aged BCAA Rats

Eun Kyung Park, Jung Won Shin¹, Young Joo Sohn¹, Hyuk Sang Jung, Ran Won¹, Nak Won Sohn^{1*}

Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Kyunghee University,

1: Department of Neuroscience, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University

This study investigated the effect of Yanggyuksanhwa-tang on cerebral ischemia of the rats. Considering age-related impact on cerebral ischemia, aged rats (18 months old) were used for this study. Ischemic damage was induced by the transient occlusion of bilateral common carotid arteries (BCAO) under the hypotension. Yanggyuksanhwa-tang was administered twice orally. Then changes of pyramidal neurons and heat shock protein 72 (HSP72) expressions in ischemic damaged hippocampus were observed. The BCAO in aged rats led significant decrease of pyramidal neurons in CA1 hippocampus. While the treatment of Yanggyuksanhwa-tang significantly attenuated the reduction of pyramidal neurons in CA1 hippocampus following BCAO ischemia. The BCAO in aged rats led significant increase of HSP72 expression in CA1 and mild in CA3 hippocampus. While the treatment of Yanggyuksanhwa-tang significantly attenuated the increase of HSP72 expression in CA1 hippocampus following BCAO ischemia. The extent of HSP72 expression in CA2 and DG of hippocampus was not different between the sham operated group, the BCAO ischemia control group, and the group of Yanggyuksanhwa-tang administration after BCAO ischemia. The treatment of Yanggyuksanhwa-tang significantly attenuated the increase of normalized optical density depending on HSP72 expression in CA1 hippocampus following BCAO ischemia.

Key words : Aging, Ischemia, Heat shock protein, Yanggyuksanhwa-tang, Rat

서 론

뇌졸중 발생의 중요한 원인 요소 중 하나가 노령이다.¹⁾ 건강한 사람에게 있어서도 연령 증가에 따라 기초뇌혈류(basal cerebral blood flow)가 감소됨이 보고 되어있고,²⁾ 뇌혈관에 경화가 있는 경우에는 이러한 연령 증가에 따른 변화가 더욱 현저하다고 하였다.³⁾ 또한 정상인과 치매의 경우는 물론 실험동물에서도 연령 증가에 따라 뇌의 모세혈관과 소동맥의 직경이 유의하게 변화하는 것으로 보고되어 있다. 뇌혈류의 변화는 뇌 대사활성의 변화와 매우 밀접한 관계에 있으므로 연령 증가에 따른 기초뇌혈류의 지속적인 감소는 뇌 에너지대사의 감소를 유발하게 된다.^{4,5)} 그러나

뇌졸중에 대한 약물의 효능을 검증하고자 하는 대부분의 실험연구에서 건강하고 젊은 실험동물을 사용하고 있으며, 원인 요소를 감안하여 노령의 실험동물을 사용한 연구는 매우 찾아보기 어렵다.⁶⁾ 이러한 점은 실험적 연구결과와 실제 임상에서 볼 수 있는 효능 사이의 장벽으로 존재하고 있다.⁹⁾ 그러므로 본 연구는 실제 중풍의 발병 연령이 노령인 점을 감안하여 실험동물을 출생 후 18개월된 노령 흰쥐를 사용함으로써 실험적 개선을 시도하였다.

凉膈散火湯은 東醫壽世保元⁷⁾에서 少陽人 胸膈熱症을 치료하는 처방으로 구성되었으며,⁸⁾ 윤 등⁹⁾과 배 등¹⁰⁾의 임상 통계 연구에 의하면 凉膈散火湯이 뇌졸중의 임상에서 가장 빈번히 사용되는 처방 중 하나로 보고 되어있다. 凉膈散火湯에 대한 실험적 연구로는 뇌혈관질환과 관련하여 이와 김¹¹⁾은 혈압 상승 및 국소 뇌혈류 증가 효능을, 이¹²⁾는 지주막하 출혈 이후의 제반 병리적 변화를 회복시키는 효과가 있다고 보고하였다.

* 교신저자 : 손낙원, 경기 용인시 기흥읍 서전리, 경희대학교 동서의학대학원
· E-mail: sohnw@khu.ac.kr · Tel : 031-201-2747
· 접수 : 2003/03/28 · 수정 : 2003/04/29 · 채택 : 2003/05/30

이러한 뇌졸중에 대한 涼膈散火湯의 효능을 노령 흰쥐에서 확인해보고자 뇌허혈 손상은 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법^{13,14)}으로 손상을 유발하고, 涼膈散火湯을 투여한 다음, 실험적으로 뇌세포의 손상억제 및 보호효과를 검증하는 지표로 이용되고 있는 腦海馬 CA1구역 추체신경세포의 손실정도를 조직학적으로 관찰하였으며, 뇌허혈 손상시 뇌세포의 과사 또는 자연사에 대하여 보호기전을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 뇌신경세포의 각종 스트레스에 대한 반응의 지표로 알려진 heat shock protein 72 (HSP72) 단백질^{15,16)}의 발현정도를 관찰한바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

실험방법

1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 18개월 (750~900g)의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 (21~23℃), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물의 조제 및 투여

본 실험에 사용한 涼膈散火湯은 東醫壽世保元⁷⁾에 기재된 것으로 그 처방 내용은 아래와 같다. 일반적인 물추출 엑기스 제조 방법에 의하여 1첩 당 17.3g의 엑기스를 얻었다. 약물은 뇌허혈 유발 2시간 및 6시간 후에, 총 2회 경구투여 하였으며, 1회 투여량은 5.8mg/100g으로 하였다.

Table 1. Prescription of Yanggyuksanhwa-tang

韓藥名	生藥名	重量
生地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	8.0 g
忍冬藤	<i>Lonicerae Caulis</i>	8.0 g
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	8.0 g
山梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	4.0 g
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	4.0 g
知母	<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	4.0 g
石膏	<i>Gypsum Fibrosum</i>	4.0 g
防風	<i>Ledebouriae Radix</i>	4.0 g
荊芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	4.0 g
總量		48.0 g

3. 실험군의 구분

실험군은 뇌허혈을 유발하기 위하여 시행된 수술과정 중 저혈압 유발과 총경동맥의 폐쇄만을 제외하고 모든 수술과정을 시행한 실험군을 sham군 (Sham) 으로 하고, 저혈압 상태에서 뇌허혈을 유발한 실험군을 대조군 (Control), 저혈압 상태에서 뇌허혈을 유발하고 涼膈散火湯을 경구투여한 실험군을 涼膈散火湯군 (Sample) 으로 구분하였으며, 각 실험군은 18개월령의 흰쥐 6마리씩으로 구성하였다.

4. 뇌허혈 손상 유발

뇌허혈은 Chan 등¹³⁾의 방법에 따라 저혈압 상태에서 양측

총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 transient global ischemia (TGI) 방법을 적용하였다. TGI 방법을 간단히 설명하면, 마취는 70% N₂O와 30% O₂의 혼합가스에 5% isoflurane으로 마취를 시작하여 수술 도중에는 1.5~2%의 농도로 마취를 유지하였다. 체온은 feedback-regulated heating pad로 수술 전과정 동안 37.0±0.5℃로 조절하였다. 양측 서혜부의 대퇴동맥을 노출시킨 후 PE-50 polyethylene catheter를 장착시키고, 한쪽에는 physiograph를 연결하여 동맥혈압을 수술 전과정 동안 지속적으로 기록하고, 다른 한쪽은 blood gas 측정 및 저혈압 유발을 위한 혈액채취에 사용하였다. 이후 전경부에서 양측 총경동맥을 노출시킨 후 PE-30 polyethylene tube로 만든 폐쇄용 고리를 장착하였다. 총경동맥 폐쇄를 위한 준비수술이 끝난 후 약 5분간의 안정기를 주었다. 저혈압의 유도는 Chan 등¹³⁾의 방법과 Sugawara 등¹⁴⁾의 연구결과에 근거하여 평균동맥혈압이 40mmHg가 유지되도록 한쪽 대퇴동맥으로부터 빠르게 혈액을 제거하였다. 저혈압이 유발된 즉시 전경부의 폐쇄고리를 당기고 metal clip으로 양측 총경동맥을 폐쇄하여 뇌허혈을 유발시켰다. 뇌허혈 유발 8분 후에 양측 총경동맥을 폐쇄한 metal clip을 제거하여 혈행을 재개통하고, 대퇴동맥을 통하여 혈액을 재주입하여 혈압을 정상으로 회복시켰다. 이후 상처부위를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다(Fig. 1 참조).

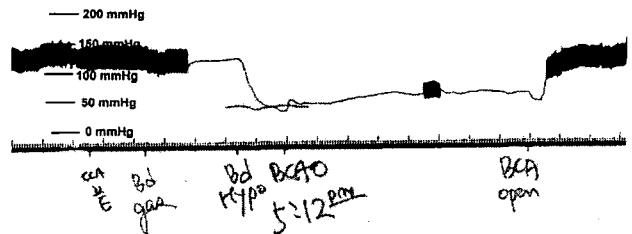


Fig. 1. A physiograph chart recorded the mean arterial blood pressure (MABP) from the femoral artery. The MABP was decreased to ~40 mmHg. Bilateral common carotid artery occlusion was maintained for 8 min. Then the blood flow was reperused, and the MABP was restored.

5. 뇌조직의 처리

TGI 유발 24시간 후 각각의 실험동물들을 sodium pentobarbital의 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 두개골로부터 제거한 다음 24시간 정도 post-fixation 하고, sucrose 용액에 넣어 침전시켰다. 다음 -40℃의 dry ice-isophentan에서 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50µm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

6. Cresyl violet 염색

선택한 뇌조직을 poly-L-lysine으로 코팅된 슬라이드에 붙여 건조시키고, 1% cresyl violet solution으로 2분간 염색한 다음 일반적인 조직표본제작법에 따라 탈수, 봉합하였다.

7. HSP72 면역조직화학염색

선택한 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10분~15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain)과 bovine serum albumin (Sigma)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. Hsp72/73 antibody (mouse monoclonal IgG, Oncogene Science)는 1:200의 희석배율로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후, 4°C에서 overnight으로 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl₂·H₂O (Sigma)를 섞은 diaminobenzidine-tetrachloride (Sigma)에서 5~10분간 발색 반응 시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2~3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

8. 뇌해마 CA1구역 추체신경세포 수의 측정

뇌해마 CA1구역 추체신경세포 수는 CCD 카메라와 영상분석시스템이 부착된 광학현미경으로 cresyl violet 염색된 조직에서 CA1의 일정길이 (1000µm) 내에 존재하는 추체신경의 수를 NIH Image software로 측정하였다.

9. 뇌해마 각 구역의 HSP72 발현 표준광농도의 측정

뇌해마의 CA1, CA2, CA3 및 DG구역의 HSP72 발현에 따른 표준광농도 (normalized optical density, NOD)의 측정은 CCD 카메라와 영상분석시스템이 부착된 광학현미경과 NIH Image software를 사용하여 측정하였다. HSP72 발현이 면역조직화학적으로 염색된 뇌해마 조직의 각 부위를 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고, 뇌해마의 기준구역, CA1 하부의 뇌해마 실질조직과 측정하고자 하는 구역의 광농도 (optical density)를 256등급의 grey level에 따라 측정하고, 측정구역의 측정값을 기준구역의 측정값에 대하여 표준화하는 방법으로 NOD를 계산하였다.

실험성적

1. 뇌해마 CA1에서 신경세포의 변화

뇌허혈 손상 유발에 의하여 뇌해마 CA1 부위의 추체신경세포 수가 현저히 감소하였으며, 신경세포 사이의 간격이 넓어져 그 분포가 이완되게 관찰되었다. 涼膈散火湯 투여군에서는 추체신경세포 수의 감소가 현저하지 않았으며, 그 분포 역시 Sham군과 비슷한 양상을 보여주었다. (Fig. 2 참조)

뇌해마 CA1 부위에서 측정된 구체적인 추체신경세포의 수는 Sham군에서는 404±31개 이었으며 대조군에서는 234±18개로 감소하였고, 涼膈散火湯 투여군은 328±25개로 대조군에 비하여 유의하게 (P<0.001) 증가되어 있어, 뇌허혈 손상에 대한 신경세포보호효과가 있는 것으로 관찰되었다. (Table 2, Fig. 3 참조)

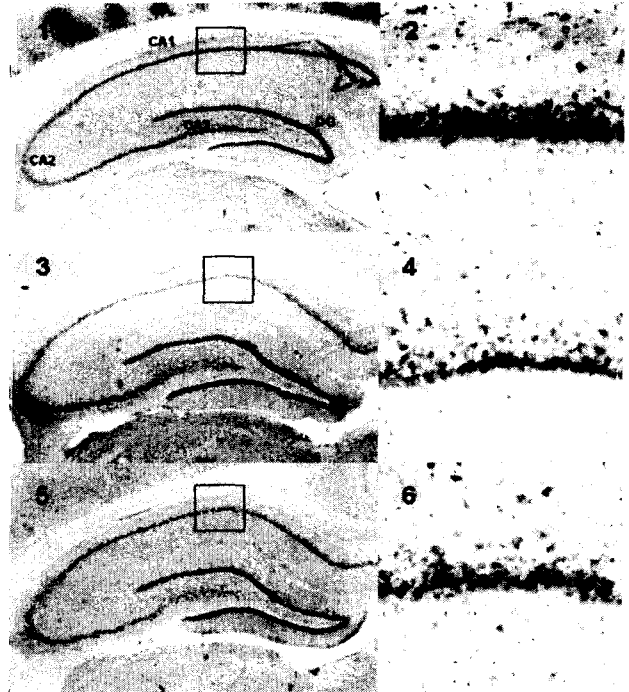


Fig. 2. Cresyl violet stained hippocampus and CA1 of aged BCAO rats. Section 1 and 2 are Sham operated group. Section 3 and 4 demonstrate the decrease of pyramidal neurons in CA1 of hippocampus of the BCAO aged rats (Control group). Section 5 and 6 demonstrate the increase of pyramidal neurons, compared to the control group, in CA1 of hippocampus following Yanggyuksanhwa-tang treatment to the BCAO aged rats.

Table 2. Changes of the Number of Pyramidal Neurons in CA1 of Hippocampus of Aged BCAO Rats

Groups	No. of Neuron	Decrease %
Sham	404±31	-
Control	234±18	42.1
Sample	328±25***	18.8

Data demonstrated Mean ± Standard Error. Sham: Sham operated group without hypotension and bilateral common carotid artery occlusion. Control: Group operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 8 minutes on aged rats. Sample: Group operated as same as control group and treated with Yanggyuksanhwa-tang. Decrease %: percentage with respect to Sham data. ***: statistical significance, P<0.001.

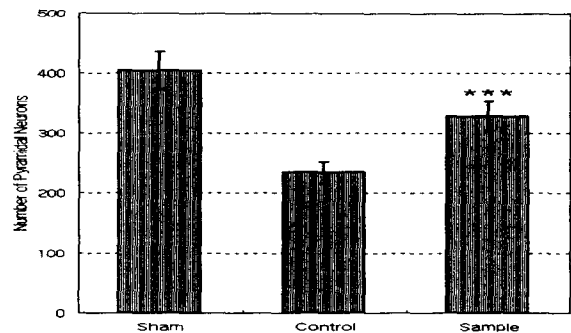


Fig. 3. Changes of the number of pyramidal neurons in CA1 of hippocampus of aged BCAO rats. Sham means the sham operated group without hypotension and bilateral common carotid artery occlusion. Control means the group operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 8 minutes on aged rats. Sample means the group operated as same as control group and treated with Yanggyuksanhwa-tang. Significant decrease of pyramidal neurons in CA1 hippocampus was reduced by treatment of Yanggyuksanhwa-tang in BCAO aged rats.

2. 뇌해마에서 HSP72 발현의 변화

저혈압과 뇌허혈을 유발하지 않은 Sham군의 CA1과 CA3 구역에서는 HSP72가 발현되지 않았으나 CA2와 DG에서는 미약한 발현이 관찰되어 hippocampus의 각 구역이 HSP72 발현정도에 따라 잘 구별되는 양상을 보여주었다. 이에 비하여 저혈압과 뇌허혈을 유발한 대조군에서는 CA1 구역에서 HSP72의 발현이 현저히 증가하였으며, CA3 구역에서도 미약한 발현이 관찰되었다. 그러나 CA2와 DG 구역에서의 발현정도는 변화가 없었다. 涼膈散火湯을 투여한 군에서는 대조군에 비하여 CA1 구역에서의 HSP72 발현이 감소하였으며, CA3 구역에서는 감소하는 경향을 보였고, CA2와 DG 구역에서는 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 뇌허혈 손상에 의하여 HSP72는 hippocampus의 CA1 구역에서 발현이 현저히 증가하고, 이러한 HSP72의 발현이 涼膈散火湯의 투여에 의하여 감소한 것으로 관찰되었다. (Fig. 4 참조)

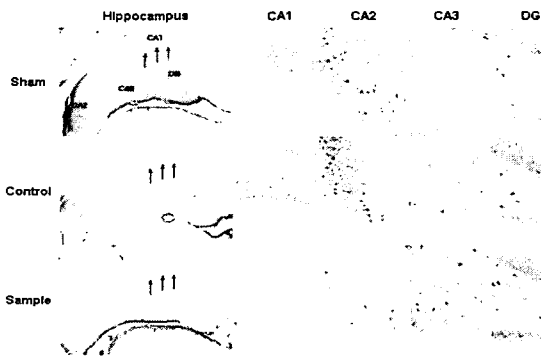


Fig. 4. HSP72 expressions in hippocampus of aged BCAA rats with immunohistochemical staining. Sham row shows hippocampus of sham operated animals without hypotension and bilateral common carotid artery occlusion. Control row shows hippocampus of aged rats operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 8 minutes. Sample row shows hippocampus of aged rats operated as same as control group and treated with Yanggyuksan-hwa-tang. HSP72 protein was expressed strongly in CA1 and weakly in CA3 of hippocampus of BCAA aged rats. Strong expression of HSP72 in CA1 hippocampus was reduced by treatment of Yanggyuksan-hwa-tang in BCAA aged rats.

3. 표준광농도를 이용한 뇌해마 각 구역의 HSP72 발현정도의 변화

뇌해마 각 구역에서의 표준광농도는 저혈압과 뇌허혈을 유발하지 않은 Sham군은 CA1 구역에서 58±1, CA2 구역에서 160±7, CA3 구역에서 102±3 및 DG 구역에서는 150±7로 나타났다. 이러한 표준광농도의 분포는 CA1 구역에서는 HSP72가 발현되지 않았고, CA3 구역에서는 HSP72가 미약하게 발현되었으며, CA2와 DG 구역에서는 HSP72가 현저하게 발현되었음을 나타내준다. 저혈압과 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 CA1 구역에서 104±4, CA2 구역에서 164±9, CA3 구역에서 128±4 및 DG 구역에서는 164±8로 측정되었다. 이는 HSP72 발현이 CA1 구역에서는 약 179% 증가하였으며, CA3 구역에서는 약 125% 증가하였고, CA2와 DG 구역에서는 변화가 없음을 나타내준다. 涼膈散火湯을 투여한 군은 CA1 구역에서 76±3, CA2 구역에서 166±6, CA3 구역에서 125±6 및 DG 구역에서는 159±8로 측정되었다. 이는 涼膈散火湯의 투여에 의하여 CA1 구역에서 HSP72의 발현이 약 131%만 증가함으로써 대조군에 비하여 유의성 (P<0.001)

있는 감소를 나타내었으며, 기타 다른 구역에서는 변화가 없었음을 보여준다. (Table 3, Fig. 5 참조)

Table 3. Changes of Normalized Optical Densities of Sub-regions of Hippocampus in Aged BCAA Rats

Groups	Sub-regions of Hippocampus			
	CA1	CA2	CA3	DG
Sham	58±1	160±7	102±3	150±7
Control	104±4 (179.3%)	164±9 (102.5%)	128±4 (125.5%)	164±8 (109.3%)
Sample	76±3*** (131.0%)	166±6	125±6 (122.5%)	159±8 (106.0%)

Data are demonstrated Mean±Standard Error. Percentages in parentheses are increase percentage with respect to Sham data. Sham: Sham operated group without hypotension and bilateral common carotid artery occlusion. Control: Group operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 8 minutes on aged rats. Sample: Group operated as same as control group and treated with Yanggyuksan-hwa-tang. ***, statistical significance, P<0.001.

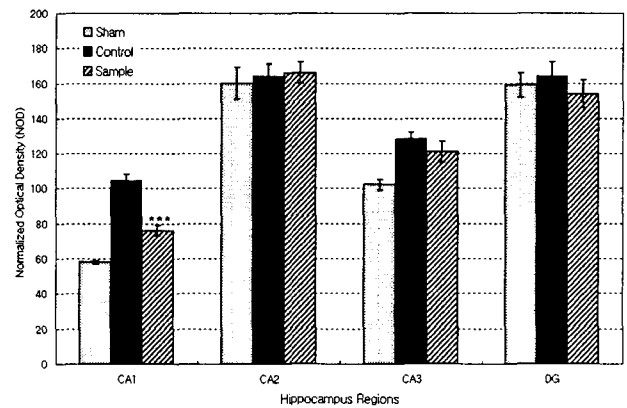


Fig. 5. Changes of normalized optical densities of sub-regions of hippocampus in aged BCAA rats. Sham means the sham operated group without hypotension and bilateral common carotid artery occlusion. Control means the group operated with 40 mmHg of hypotension and bilateral common carotid artery occlusion for 8 minutes on aged rats. Sample means the group operated as same as control group and treated with Yanggyuksan-hwa-tang. Strong expression of HSP72 in CA1 hippocampus was reduced by treatment of Yanggyuksan-hwa-tang in BCAA aged rats.

고찰

涼膈散火湯은 東醫壽世保元에서 少陽人 胸膈熱症을 치료하는 처방으로 구성되었으며,⁸⁾ 한방병원 외래 및 입원환자를 통한 임상 통계 연구에 의하면 涼膈散火湯이 뇌졸중의 임상에서 가장 빈번히 사용되는 처방 중 하나로 보고되어 있다.^{9,10,17)} 涼膈散火湯 중 生地黃은 瀉心火, 淸肺熱하고, 忍冬藤과 連翹 역시 心肺二經의 熱을 내리고 解毒하며, 梔子和 薄荷는 宣滯解鬱하고, 石膏는 肺와 胃 및 三焦의 熱을 제거하고, 知母와 함께 除濕止煩한다. 防風과 荊芥는 散風濕하며, 頭目滯氣한 것과 四肢攣急한 症을 치료하고, 生地黃과 知母는 補腎水 및 滋陰하는 효능이 있다. 그러므로 본 처방은 淸熱涼血, 瀉火解毒, 除煩解鬱, 祛風解表, 勝濕解痙하는 효능으로 淸熱, 解鬱, 祛風하는 中風의 치료 처방이다.^{8,11,12)} 涼膈散火湯에 대한 실험적 연구로는 뇌혈관질환과 관련하여 이와 김¹¹⁾은 혈압 상승 및 국소뇌혈류 증가 효능이 있으므로 뇌허혈에 대한 유의한 효능이 있을 것으로 보고하였고, 이¹²⁾는 지주막하 출혈 이후의 혈관경련에 대하여 혈관내피세포의 손상과 혈관내막의 비후를 회복시키고, 평활근의 수축을 감소시키

는 동시에 과사를 호전시키는 등 제반 병리적 변화를 회복시켜 연속을 감소시키는 효과가 있다고 보고하였다. 또한 그 기전과 관련하여 혈관확장에 관여하는 신경전달물질과 신경 peptide의 활성화에 기여하고, 특히 혈관확장에 관여하는 CGRP와 VIP 면역양성반응 신경섬유에 현저한 변화를 유발하는 것으로 보고하였다. 이외에도 김과 송⁵⁾은 전반적인 효능연구에서 간뇌성 경련에 대하여 유의한 효능이 있으며, 진통, 해열 및 수면시간 연장효능이 있는 것으로 보고하였고, 박 등¹⁸⁾은 비만증에 대하여, 홍과 홍¹⁹⁾ 및 최 등²⁰⁾은 고혈당 및 당뇨병에 대하여 유의한 효능이 있음도 보고한 바 있다.

뇌졸중은 45세~84세 사이에서 인구 10만명당 250~400명의 발병빈도를 나타내는 심각한 질환으로, 영구적인 불구를 유발시키며, 질환사망률이 약 30%로 전체 질병 사망원인의 세 번째 원인으로 대두되고 있다.^{5,21,22)} 허혈성 뇌경색에 대하여는 보조적인 처치 이외에 적절한 신경손상 보호효능의 치료법이 없는 실정이다. 현재는 섬유소용해 (fibrinolysis)에 유효한 약물의 사용이 유일한 치료법 중 하나이다. 그러나 이러한 섬유소 및 혈전용해제 사용에 의한 유효한 치료효능 역시, 발병의 약 97%의 경우에서 감안하기가 현실적으로 어려운, 발병 이후 약 3시간이라는 유효 치료시기의 제한을 받게 된다.²³⁾ 효과적인 신경손상 보호효능의 치료약물 개발의 어려운 점 중 하나가 뇌경색의 임상증상과 유사하고 약물효능을 정확히 예측할 수 있는 신뢰성 있는 실험동물모형이 없다는 것이다.²⁴⁾ 실제 뇌졸중 환자에 있어서는 뇌혈류 상태와 뇌경색 크기, 뇌의 구조적 상태와 뇌경색 발생의 위치 등에 따라 그 상관관계가 매우 가변적이며 임상증상이 다양하게 나타나는 것에 비하여 국소뇌허혈의 실험동물모형에서는 일정한 손상 유발을 나타낼 뿐이다.²⁵⁾ 뇌졸중 발생의 중요한 원인요소 중 하나가 노령이다. 뇌졸중 환자 216명에 대하여 CT scan으로 임상연구를 한 결과, 연령이 가장 영향이 큰 예후관점 지표라고 보고 되었다.¹⁾ 건강한 사람에게 있어서도 연령에 따라 기초뇌혈류(basal cerebral blood flow)가 감소됨이 보고 되어있고,²⁾ 뇌혈관에 경화가 있는 경우에는 이러한 연령에 따른 효과가 더욱 현저하다고 하였다.³⁾ 뇌졸중이라는 질병은 이렇게 노령의 질병이며 일반적으로 미만적 또는 국소적 혈관의 경화와 관련되어 있다. 또한 정상인과 치매의 경우는 물론 실험동물에서도 연령 증가에 따라 뇌의 모세혈관과 소동맥의 직경이 유의하게 증가하는 것으로 나타나 있다. 그러나 실험동물에서는 거의 대부분 건강하고 젊은 실험동물을 사용하고 있다.⁶⁾ 고혈압이 뇌졸중의 중요한 한 원인요소인 것과 관련하여 자발성 고혈압 흰쥐 (SHR)를 사용한 연구가 많이 이루어졌다. 그러나 국소 뇌허혈에 있어서 노령이 중요한 원인요소이지만 이러한 점이 감안된 실험동물모형 연구는 많이 이루어지지 않았다.⁴⁾ 젊은 흰쥐와 노령 흰쥐의 국소 뇌허혈에 대한 연구에 의하면, 국소 뇌허혈 모형에서 뇌경색의 크기가 연령 의존적으로 증가하였다.²⁶⁾ 신경검사지표에 따른 신경학적 결함을 관찰한바 젊은 흰쥐에서는 즉시적이고 심한 손상 후에 회복기전이 진행되는 것에 비하여 노령 흰쥐에서는 손상이 지속적이고 회복기전이 제대로 진행되지 못하는 특징이 관찰되었다.³⁾ 이러한 결과는 각기 다른 방식의 뇌허혈 유발모형에서도 동일한 경향이 나타

났다. 기억능력은 노령 흰쥐에 비하여 젊은 흰쥐가 우수하였으며, 이러한 결과는 사람이나 흰쥐 모두에서 동일한 인지능력의 연령 의존적 악화 현상과 일치하는 것이다.²⁸⁾ 한편으로 젊은 흰쥐에 비하여 노령 흰쥐에서 NMDA-receptor 결합이 광범위하게 감소하는 것이 관찰되었으며, GABA성이나 콜린성 활성의 변화없이 NMDA-receptor에 의한 반응들이 연령과 매우 밀접하게 관련되는 것으로 보고되어 있다. 이는 노령 흰쥐에서 신경학적 손상을 증폭시키는 기전과 관련된 excitotoxicity가 감소되는 것을 나타낸다.²⁹⁾ 아마도 노령의 뇌는 기능적으로 연관된 더 넓고 많은 뇌 영역들을 작용시켜 연령 의존적 손상에 대하여 적응하는 능력이 있을 수도 있다고 하였다.²⁷⁾ 본실험의 결과, 뇌허혈에 의하여 뇌해마 CA1 부위의 추체신경세포의 수가 감소하였으며, 신경세포 사이의 간격이 넓어져 그 분포가 이완되었으며, 涼膈散火湯의 투여에 의하여 신경세포 수의 증가는 물론 그 분포가 정상에 가깝게 회복되었다. 뇌허혈에 의한 뇌해마 CA1 부위 추체신경세포 수의 변화를 관찰한 결과에서도 涼膈散火湯의 투여는 노령의 실험동물 뇌허혈 손상에 대해서 신경세포보호효과가 있는 것으로 관찰되었다. 그러나 이러한 涼膈散火湯의 효능이 실험동물의 연령 증가에 밀접한 관련이 있는가 하는 점에 대하여는 더 많은 연구가 있어야 할 것이다. Heat-shock protein (HSP)은 스트레스유발 단백질 (stress-induced proteins)의 일종으로, heat-shock gene은 열충격이나 허혈 또는 각종 스트레스 등 변성단백질을 생산하는 모든 스트레스에 대한 반응으로 그 발현이 증가되며, 식물이나 이스트, 박테리아 및 모든 포유류 세포에서 발견된다.¹⁶⁾ HSP family에는 그 분자량에 의하여 명칭이 붙여진 HSP10, HSP27, HSP60, HSP70 (or HSP72) HSP90 등과 ubiquitin 등이 존재한다. HSP70은 HSP72로도 불리며, 모든 살아 있는 세포에서 발견되는 가장 대표적인 inducible HSP이다. HSP70은 열, 중금속, 독소, 허혈 등 여러 스트레스에 대한 반응으로 합성된다.^{30,31)} HSP의 작용기전은 변성단백질에 의하여 결합-HSP90이 heat-shock-factor proteins (HSFs)으로부터 분리되는 것으로부터 시작되며, HSP90은 정상상태에서는 HSFs에 결합하여 HSFs를 억제하고 있다.³²⁾ HSFs로부터 HSP90의 분리는 HSFs의 phosphorylation을 유도하며, 또한 protein kinase C (PKC)에 의하여 HSF가 활성화 된다. 활성화된 HSFs는 3중합체를 형성하고, HSP70 gene의 promotor에 결합하여 transcription을 자극한다.^{33,34)} 그 결과 스트레스를 받은 세포내에는 HSP70 단백질과 mRNA 수준이 급격히 증가하게 된다. 생산된 HSP70 단백질은 변성단백질과 결합한 다음, HSP70은 ATP hydrolysis에 의하여 유도되는 대사과정내에서 변성단백질의 효소적 역할과 3차구조의 복원을 시도한다. 즉 변성단백질이 HSP70의 발현을 자극하며, HSP70은 변성단백질의 구조와 기능을 복원하는 것으로 알려져 있다.³⁵⁾ 국소뇌허혈 후 뇌혈류량이 매우 낮은 부위를 제외한 모든 허혈세포에서 HSP70 mRNA가 발현되었다고 보고되어 있다. HSP70 단백질은 뇌경색 중심부에서 허혈에 내성이 강한 내피세포에서 주로 생산되었으며, 뇌경색 바깥영역의 신경세포와 뇌경색 가장자리의 신경교세포에서도 발현된다 하였다.¹⁵⁾ 이러한 뇌경색 바깥영역에서의 HSP70 발현은 뇌허혈의 penumbra를 규정하

거나 뇌허혈영역 중에서 단백질변성구역 (zone of protein denaturation)을 결정하는 지표로 사용된다.^{36,37)} 또한 최근 연구에 의하면 HSP70의 과도한 발현은 *in vitro* 실험에서 세포괴사 및 세포자연사를 유발하는 손상으로부터 뇌세포 보호효과가 있으며, *in vivo* 실험에서도 HSP70의 과도한 발현이 뇌허혈이나 경련에 의하여 유발된 뇌손상에 대하여 손상억제효과가 있는 것으로 발표되었다.³⁸⁾ 본실험의 결과는 저혈압과 뇌허혈을 유발하지 않은 Sham군의 CA1과 CA3 구역에서는 HSP72가 발현되지 않았으나 CA2와 DG에서는 미약한 발현이 관찰되어 hippocampus의 각 구역이 HSP72 발현정도에 따라 잘 구별되는 양상을 보여주었다. 이에 비하여 저혈압과 뇌허혈을 유발한 대조군에서는 CA1 구역에서 HSP72의 발현이 현저하였으며, CA3 구역에서도 미약한 발현이 관찰되었다. 그러나 CA2와 DG 구역에서의 발현정도는 변화가 없었다. 涼膈散火湯을 투여한 군에서는 대조군에 비하여 CA1 구역에서의 HSP72 발현이 감소하였으며, CA3 구역에서는 감소하는 경향을 보였고, CA2와 DG 구역에서는 변화가 관찰되지 않았다. 또한 HSP72의 발현을 계량적으로 검증하기 위하여 표준광농도를 계산한 자료도 동일한 결과를 보여주었다.

위와 같은 결과에 의하여 涼膈散火湯이 노령 흰쥐의 뇌허혈 손상에 대하여도 유의한 효능이 있음을 알 수 있었다. 그러나 젊은 흰쥐에서의 효능과 노령 흰쥐에서의 효능 등 비교연구 및 기전 연구에 대하여는 지속적인 많은 연구가 진행되어야 할 것이다. 본 연구에서는 최소한 한방 처방의 효능 연구에 있어서 보다 임상실제에 가까운 실험모형의 도입 자체에 의미가 있다고 생각한다.

결 론

저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법을 사용하여 18개월된 노령 흰쥐에게 뇌허혈을 유발한 다음 涼膈散火湯을 투여하고 뇌해마 추체신경세포의 변화와 HSP72의 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

BCAO 뇌허혈에 의하여 뇌해마 CA1 부위 추체신경세포는 현저하게 감소하였고, 涼膈散火湯 투여에 의하여 유의성 ($P<0.001$) 있게 그 감소가 억제되었다. BCAA 뇌허혈에 의하여 HSP72의 발현은 CA1 구역에서 가장 현저하였고, CA3 구역에서도 미약한 발현이 관찰되었으며, CA1 구역에서 현저한 HSP72의 발현 증가가 涼膈散火湯 투여에 의하여 억제되었다. 뇌해마의 CA2 및 DG 구역에서의 HSP72 발현은 Sham군과 대조군 및 涼膈散火湯 투여군 모두에서 변화를 나타내지 않았다. 표준광농도를 이용한 HSP72 발현정도의 측정에 의하여도 CA1 구역에서 현저한 HSP72 발현 증가가 涼膈散火湯 투여에 의하여 유의성 ($P<0.001$) 있게 억제되었음이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(01-PJ9-PG1-01CO03-0003)과 BK 21 사업에 의해 지원되었음.

참고문헌

1. Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. Stroke incidence, prevalence, and survival: secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989. *Stroke* 27, 373-380, 1996.
2. Ewing JR, Brown GC, Gdowski JW, Simkins R, Levine SR, Welch KMA. Stroke risk and age do not predict behavioral activation of brain blood flow. *Ann Neurol* 25, 571-576, 1989.
3. Shaw TG, Mortel KF, Meyer JS, Rogers RL, Hardenberg J, Cutaia MM. Cerebral blood flow changes in benign aging and cerebrovascular disease. *Neurology* 34, 855-862, 1984.
4. Davis M, Mendelow D, Perry RH, Chambers IR, James OFW. Experimental stroke and neuroprotection in the aging rat brain. *Stroke* 26, 1072-1078, 1995.
5. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathophysiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391-397, 1999.
6. Millikan C. Animal stroke model. *Stroke* 23, 795-797, 1992.
7. 이제마. 東醫壽世保元, p70, 신일문화사, 서울, 1964.
8. 김진성, 송일병. 양격산화당의 효능에 관한 실험적 연구, 경희한의대논문집 7, 273-285, 1984.
9. 윤진구, 조기호, 김영석, 이경섭. 뇌졸중에 관한 임상통계적 연구, 대한한방내과학회지 10(1), 25-38, 1989.
10. 배철환, 조기호, 이원철, 김영석, 배형섭, 이경섭, 구본홍. 폐쇄성 뇌졸중에 대한 임상적 연구, 경희한의대논문집 10, 665-687, 1987.
11. 이기주, 김경요. 십이미관중탕, 양격산화탕, 형방사백산이 백서의 혈압 및 국소 뇌혈류량에 미치는 영향. *한국전통의학지* 9(2), 259-268, 1999.
12. 이동원, 이원철. 지주막하출혈 후 뇌기저동맥벽에 존재하는 면역양성 신경섬유의 변화에 미치는 양격산화당의 효과. *한의학연구소논문집* 8(1), 117-131, 1999.
13. Chan PH, Kawase M, Murakami K, Chen SF, Li Y, Calagui B, Reola L, Carlson E, Epstein CJ. Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci* 18(20), 8292-8299, 1998.
14. Sugawara T, Kawase M, Lewen A, Noshita N, Gasche Y, Fujimura M, Chan PH. Effect of hypotension severity on hippocampal CA1 neurons in a rat global ischemia model. *Brain Res* 877, 281-287, 2000.
15. Kinouchi H, Sharp FR, Hill MP, Koistinaho J, Sagar SM, Chan PH. Induction of 70-kDa heat shock protein and hsp70 mRNA following transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 13, 105-115, 1993.
16. Lindquist S. Heat-shock proteins and stress tolerance in

- microorganisms. *Curr Opin Genet Dev* 2(5), 748-755, 1992.
17. 권도익, 고창남, 조기호, 기영석, 배형섭, 이경섭. 한방병원 심계내과 입원 환자에 대한 임상연구, *경희의학* 12(2):200-213, 1996.
 18. 박재형, 김경요, 전병훈. 양격산화당이 gold thioglucose로 유발된 백서의 비만증에 미치는 효과. *대한한의학회지* 17(2), 145-160, 1996.
 19. 홍성범, 홍순용. 소양인에 응용되는 양격산화당이 백서의 당뇨병에 미치는 영향. *사상의학회지* 3(1), 201-217, 1991.
 20. 최병일, 고병희, 송일병. 소양인 양격산화당과 인동등지골피탕 및 숙지황고삼탕이 alloxan 투여 고혈당 백서에 미치는 영향. *경희한의대논문집* 15, 113-133, 1992.
 21. 박재인, 윤태영, 최중명, 박순영, 유동순. 최근 우리나라 뇌졸중의 역학적 양상에 관한 연구, *경희대의대논문집* 18:157:168, 1993.
 22. 송일한, 오동환, 감흥선, 조정휘, 김천삼, 김명식, 송정상, 배종화. 우리나라 뇌졸중의 최근 10년간 변화양상에 대한 연구, *대한내과학회지* 43, 637-644, 1992.
 23. Adams RJ, Fisher M, Furlan AJ, del Zoppo G. Acute Stroke Treatment Trials in the United States : Rethinking Strategies for Success. *Stroke* 26, 2216-2218, 1995.
 24. DeGraba TJ, Pettigrew LC. Why do neuroprotective drugs work in animals but not in humans?. *Neurol Clin* 18, 475-493, 2000.
 25. Liu Y, Karonen JO, Vanninen RL, Otergaard L, Roivainen R, Nuutinen J, Perkio J, Kronon M, Hamalainen A, Vanninen EJ, Soimakallio S, Kuikka JT, Aronen HJ. Cerebral hemodynamics in human acute ischemic stroke: a study with diffusion- and perfusion-weighted magnetic resonance imaging and SPECT, *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 910-920, 2000.
 26. Kharlamov A, Kharlamov E, and Armstrong DM. Age-dependent increase in infarct volume following photochemically induced cerebral infarction: putative role of astroglia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55(3):B135-141, 2000.
 27. Shapira S, Spir M, Wengier A, Grauer E, Kadar T. Aging has a complex effect of a rat model of ischemic stroke. *Brain Res* 925, 148-158, 2002.
 28. Andersen MB, Zimmer J, Sams-Dodd F. Specific behavioral effects related to age and cerebral ischemia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 62(4), 673-682, 1999.
 29. Gonzales RA, Brown LM, Jones TW, Trent RD, Westbrook SL, Leslie SW. N-Methyl-D-aspartate mediated responses decrease with age in Fischer 344 rat brain. *Neurobiol Aging* 12, 219-225, 1991.
 30. Abe K, Lee TH, Aoki M, Nitta Y, Isoyama S. Preferential expression of HSC70 heat shock mRNA in gerbil heart after transient brain ischemia, *J Mol Cell Cardiol* 25, 1131-1135, 1993.
 31. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248, 850-854, 1990.
 32. Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471-480, 1998.
 33. Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem* 32, 17-29, 1997.
 34. Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 441-469, 1995.
 35. Bruce BD, Churchich J. Characterization of the molecular-chaperone function of the heat-shock-cognate-70-interacting protein. *Eur J Biochem* 245, 738-744, 1997.
 36. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36, 557-565, 1994.
 37. Kinouchi H, Sharp FR, Koistinaho J, Hicks K, Kamii H, Chan PH. Induction of heat shock hsp70 mRNA and HSP70 kDa protein in neurons in the 'penumbra' following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 619:334-338, 1993.
 38. Lowenstein DH, Chan PH, Miles MF. The stress protein response in cultured neurons: characterization and evidence for a protective role in excitotoxicity. *Neuron* 7, 1053-1060, 1991.