

艾葉 抽出 藥鍼이 虛血性 損傷에 미치는 效果

최윤영¹ · 김재효¹ · 전문기¹ · 임정아¹ · 김경식¹ · 손인철¹

¹원광대학교 한의과대학 경혈학교실

Effects of FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI' Herbal Acupuncture on the Expression of nNOS protein Following Transient Forebrain Ischemic Injury in Rats

Yun-Young Choi¹, Jae-Hyo Kim¹, Moon-Ki Jeon¹, Jung-A Lim¹, Kyung-Sik Kim¹, In-Chul Sohn¹

¹Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Abstract

Objectives : Acupuncture has 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. Also, herbal acupuncture, namely aqua acupuncture has been applied and developed to various diseases including the cerebrovascular accident. FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI is the dry leaf of *Artemisia argyi* Levl. et Vant. collected in summer before the plant blooms and used to moxibustion and has been recommended for use as an analgesic and hemostatic. In this study, effects of FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI (艾葉) herbal acupuncture on the LR₃, namely Taechung on neuroprotection after the transient forebrain ischemia were investigated in Sprague-Dawely rats.

Methods : Expressions of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) protein in the hippocampus and cortex were observed at 2 hrs after transient forebrain ischemia by immunohistochemistry.

Results : Expression of nNOS protein was increased in the hippocampus and cortex at 2 hrs after transient forebrain ischemia. However, pretreatment with FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI' herbal acupuncture on LR₃ significantly decreased expression of nNOS protein compared to ischemia group. These features were observed in the motor cortex and the hippocampus.

Conclusions : These results suggest that pretreatment with FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI' herbal acupuncture on LR₃ inhibits the expression of nNOS protein induced by transient forebrain ischemia and may modulate excitatory toxicity of neuron related to neuronal cell death.

Key words : FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI, herbal acupuncture, cerebrovascular accident, nNOS

I. 緒 論

腦虛血 損傷 中 一過性 前腦 虛血 損傷

· 교신저자: 손인철, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학
경혈학교실, Tel. 063-850-6448, Fax. 063-857-6458,
E-mail: ichsohn@wonkwang.ad.kr

* 이 논문은 2003년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨
· 접수 : 2004/01/08 · 수정 : 2004/03/05 · 채택 : 2004/03/10

(transient forebrain ischemia)은 뇌에 공급되는 혈액을 일시적으로 완전히 차단하여 야기되는 뇌세포 손상¹⁾으로 腦虛血에 관한 病態生理를 연구하기 위하여 많이 활용되고 있다. 一過性前腦 虛血 損傷은 15분 정도의 일시적인 虛血 및 재관류로 3-4일 경과 후 뇌의 新皮質(neo-

cortex), 線條體(striatum), 海馬(hippocampal) CA1 부위와 小腦 (cerebellum)에 선택적으로 신경세포의 손실이 나타나는 遲延性 神經 細胞 死 (delayed neuronal death) 현상이 관찰되는 것으로 알려져 있다^{2,4)}.

Nitric oxide (NO)는 인체의 신경, 면역, 그리고 혈관계 등에 분포하여 생리 및 병리적 단계에서 혈관확장 및 신호전달물질로써 중요한 역할을 담당하며, nitric oxide synthase (NOS) 효소에 의하여 형성된다⁵⁾. 뇌에서는 신경세포에 존재하는 neuronal NOS (nNOS), 뇌혈관 내벽에 존재하는 endothelial NOS (eNOS)와 염증 상태에서 생성되는 inducible NOS (iNOS)로 구분되며, 뇌졸중이나 심장정지 등으로 야기되는 대뇌허혈 동안에 세포손상 기전에 작용하여^{6,7)} 허혈 손상시 nNOS를 포함한 NOS들의 작용에 의하여 NO의 합성이 증가하는 양상을 보이는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹⁰⁾.

藥鍼療法는 經絡學說의 原理에 의거하여 各種 藥物을 선택해서 有關한 穴位, 壓痛點, 反應點에 주입하여 鍼刺戟과 藥物刺戟을 동시에 가능케 하는 방법으로 虛血性 腦卒中的 急性期, 恢復期에 각각 적용하여 효과를 보고 있다¹¹⁾. 현재 다양한 종류의 藥材를 이용한 藥鍼 연구 및 臨床 治療 例를 中風治療와 관련하여 살펴 볼 수 있는데, 이중 艾葉은 전통적으로 灸法의 主要 재료로 이용될 뿐 藥鍼의 재료로는 아직까지 인정되지 않는 형편이다.

艾葉(FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI)은 菊 花科에 속한 다년생 초목인 황해쑥 (*Artemisia argyi*. Lev et Vant), 약쑥(*Artemisia asiatica* Nakai.)과 野艾 (*Artemisia vulgaris* L.) 등의 잎을 건조한 것으로, 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 등

에 사용되어 왔는데¹²⁻¹³⁾, 艾灸는 生體反應으로 營衛를 소통시키고, 經絡循環의 病變을 조화하여 氣血循環 장애로 야기된 諸般 疾患 및 疼痛을 치료하는데 사용되었다¹⁴⁾. 그러나 최근 艾葉 추출물에서 돌연변이 억제현상¹⁵⁾, 혈당조절 및 항균작용¹⁶⁾, 항위궤양효과¹⁷⁾, 혈소판 응집 억제작용¹⁸⁾ 및 항산화효과¹⁹⁻²⁰⁾ 등 뿐만 아니라 항암작용에 관련한 효과²¹⁾까지 보도됨으로써 藥鍼을 통한 연구가 요구되고 있는데, 이와 관련하여 張²²⁾과 李²³⁾는 전뇌 허혈 손상에서 艾葉 藥鍼이 cFos 단백질의 증가와 FosB 단백을 억제하는 효과를 확인함으로써 艾葉과 관련한 藥鍼 활용 및 中風 治療의 유용성을 제시하였고, 艾葉의 藥鍼 개발에 관하여 독성실험과 같은 기초적 연구²⁴⁻²⁵⁾도 진행되고 있는 상황이다. 그러나 中風 치료와 관련된 艾葉의 藥鍼 效能은 규명되지 않았으며, 그 안정성 여부 역시 지속적인 연구가 필요한 상황이다.

이 研究에서는 一過性 前腦 虛血 損傷 후 뇌 신경세포에서 발현되는 nNOS 단백질의 양상과 변화를 관찰하고, 艾葉 燃燒抽出物인 灸津을 太衝에 藥鍼하여 nNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 살펴봄으로써 大腦 虛血 損傷에 대한 艾葉 藥鍼의 效果를 확인하고자 하였으며, 이에 유의한 결과를 얻어 보고하고자 한다.

II. 材料 및 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. 一過性 前腦 虛血 損傷만 가한 虛血

損傷群 (ISCH)과 艾葉 (*folium artemisiae argyi*) 藥鍼 시술 후 一過性 虛血 損傷을 유발한 藥鍼群 (FAA)으로 분류하였다.

2. 一過性 前腦 虛血 損傷

一過性 前腦 虛血은 Pulsinelli & Buchan¹⁾이 제시한 방법에 따라 유발하였는데, 이를 요약하면 양측 추골동맥 (vertebral a.)과 경동맥 (common carotid a.)의 4개의 혈관 폐색법에 의하여 유발시켰다. 실험동물은 2% halothane (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 2 경추 사이로 지나가는 양측 추골동맥 (vertebral artery)을 전기인두를 사용하여 영구적으로 폐색시켰다. 추골동맥 폐색을 유발 한 후 24시간 후, 경동맥 폐색을 위하여 흰쥐를 양와위자세로 위치시킨 후 정중 경부부위의 피부를 절개하여 양측 경동맥을 분리하였으며, 분리된 경동맥 (common carotid artery)을 micro aneurysm clips (# 160-863, George Tiemann and Co., Plainview, NY)을 이용하여 폐색하고 아울러 봉합사로 경부 근육 내에 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

藥材 : 圓光大學校 韓醫科大學 益山韓方病院에서 황해쑥 (*Artemisia argyi*, Lev et Vant)을 건조한 艾葉 (FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI)을 구입하여 정선한 후에 사용하였다.

灸津 (Tar of FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI) 추출물 : 삼각 플라스크 입구에 깨묵링을 올려놓고, 1회마다 艾葉 5 g을 뜸 절구를 이용하여 원뿔 모양으로 만든다. 다음 넓은 면을 아래로 깨묵링위에 올려놓고, 불을 붙여서 삼각 플라스크 바닥으로 흐르는 뜸 tar를 모은다. 艾葉이 연소하면서 침강되는 tar성 연기가 더 이상 발생되지 않으면, 새 艾葉으로 대체하기를 반복한다. 플라스크 바닥에 모인 艾葉의 tar를 methanol 100%로 녹이고 column을 이용하여 불순물을 제거하고 40±2°C를 증탕증류기를 이용하여 methanol을 90% 증발시킨다. 남은 tar성분과 methanol 혼합물을 -70°C의 냉동동결건조기를 이용하여 72시간 건조시킨 후 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 藥鍼을 施術하였다. 실험동물의 藥鍼刺戟은 左右側 下肢에서 足厥陰肝經의 原穴인 太衝 (LR₄)을 인체와 상응하는 흰쥐의 제 1 趾와 제 2 趾間 本節 後에서 取穴하였으며, 26 gauge의 1 ml 注射器를 사용하여 經穴部位의 皮下에 삽입하여 각각 0.2 ml을 1 회 주입하였다.

5. nNOS 면역 조직 화학 검사

실험동물을 마취 후 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 심장을 관류하

여 혈액을 제거하였으며, 다시 4% paraformaldehyde로 관류시킨 후 뇌를 분리하였다. 분리된 뇌는 4% paraformaldehyde에서 12 시간 동안 4 °C에서 고정한 후 30% sucrose에서 2 일 이상 방치하였다. Cryostat (Leica, Germany)를 이용하여 35 μ m의 두께로 조직절편을 만들어서 0.1 M PBS로 3회 이상 세척하였다. 그 후 0.1M PB에 0.3% Triton-X 100을 넣고, NBT (N6876, Sigma)와 β NADPH (N1630, Sigma)를 섞은 이 용액을 조직절편과 37 °C에서 1 시간 동안 반응시킨 후 실온에서 0.1 M PB로 세척한 뒤 조직을 slide glass에 부착하여 건조하고 탈수과정을 거쳐 cover slide를 덮어 광학현미경하에서 푸른색의 nNOS 양성 세포를 관찰하였고 화상자동시스템 (Image-Pro Plus, U.S.A.)을 이용하여 nNOS 양성 세포의 수를 측정하였다.

6. 항산화효과 측정

추출물의 수소공여능 (hydrogen donating ability, HDA)을 DPPH (1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl)의 환원성을 이용하여 517 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer (Beckman DU-65, U.S.A.)로 측정하였다. 즉, 소정 농도의 시료 (2 mg/ml)에 0.15 mM의 DPPH용액 3ml를 가하고, vortex mixer로 10 초 동안 섞어준 후 37°C에서 30 분간 반응시킨 다음, 이 반응액의 흡광도를 측정하였다. 이로써, 재조구에 대한 흡광도의 감소 비율로서 수소공여능을 나타내었다. 항산화효과 실험용 기질 유지는 항산화제가 첨가되지 않은 정제 대두유를 사용하였다. 추출물의 항산화 효과를 측정하기 위하여 500 ml의 비이커에 유지를 120 g씩 담은 후 10 ml의 추출물을 첨가한 후 30 분간 혼합하였다. 한편, 비교군으로서 200 ppm 농도의 BHA (Sigma Chemical

Co., U.S.A.)와 TBHQ (Eastman Kodak Co., U.S.A.)를 사용하였으며, 대조군은 용매 (에탄올 or 메탄올 등) 10 ml만 가하여 조제하였다. 조제된 시료는 즉시 50 ml 비이커에 12 g씩 나누어 담았다. 모든 시료는 45°C로 조절된 항온기에서 산화를 진행시키면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 과산화물가 (peroxide value, POV)와 공액이중산가 (conjugated dienoic acid, CDA)를 측정함으로써 산화 정도를 측정하였으며, 그 변화폭으로부터 항산화효과를 비교하였다. 이들의 항산화 효과를 비교하기 위하여 기질 유지의 과산화물가가 100 meq/kg oil에 도달하는 시간 (day)을 유도기간 (induction period, IP)으로 임의 설정한 다음 control의 유도기간에 대한 추출물이 첨가된 대두유의 유도기간으로부터 다음식에 의하여 상대적 항산화효과 (relative antioxidant effect, RAE (%)) = (IP of antioxidant added substrate / IP of the control) \times 100)를 산출하였다.

7. 統 計

컴퓨터 통계프로그램인 SigmaStat 2.0 (SPSS Inc., U.S.A.)을 사용하였으며, 실험결과는 Mean \pm 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. 大 腦 皮 質 營 養 區 域 中 虛 血 損 傷 에 對 한 艾 葉 藥 鍼 的 效 果

정상흰쥐에서는 대뇌피질에서 nNOS 단백질이 거의 관찰되지 않았으며, 일과성 전뇌 허혈 유발 2시간이 경과한 허혈 손상군에서는 nNOS

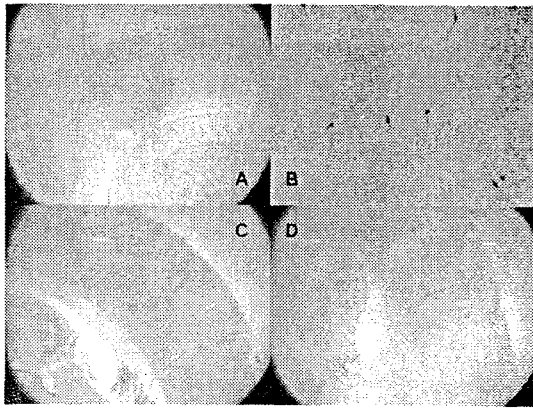


Fig. 1. Representative microphotographs showing effects of FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI' herbal acupuncture of acupoint LR₃ on nNOS protein expression in the motor cortex at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, normal group; B, represents magnified nNOS proteins positive neuronal cells; C, 2 hrs after ischemia injury in control group; D, pretreatment with herbal acupuncture on LR₃.

단백이 49±11.6 개가 확인되었다. 발현 양상을 보면 신경세포 (neuron)의 세포질 (cytoplasm)을 중심으로 가지돌기(dendrite)와 축삭(axon)에 고르게 존재하여 신경세포의 형태로 관찰되었는데, 이는 nNOS 단백질이 대뇌피질의 신경세포에만 선택적으로 발현되는 것을 보여주는 것이다. 반면, 허혈 손상을 유발하기 1시간에 兩側 太衝에 艾葉 藥鍼을 시술한 실험군은 허혈손상 후 2시간에 23±3.2 개 ($p<0.05$)의 nNOS 단백질이 관찰되어 허혈 손상군에 비하여 유의한 수준의 감소를 나타내었다(Fig. 1, 2).

2. 海馬 영역에서 虛血損傷에 대한 艾葉藥鍼의 效果

일과성 전뇌 허혈 손상 후 2시간이 경과하였을 때, 흰쥐의 해마 영역에서는 영역별로 nNOS 단백질의 발현이 증가하는 양상을 나타내었다.

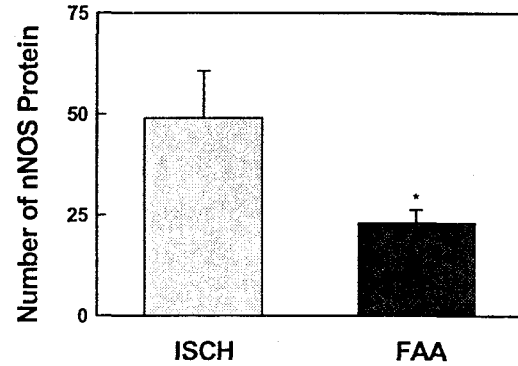


Fig. 2. Effects of FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI' herbal acupuncture of acupoint LR₃ on nNOS protein expression in the motor cortex at 2 hrs after transient forebrain ischemia. ISCH, transient forebrain ischemic injured rat; FAA, pretreatment with herbal acupuncture 1hr before (n=6). Values are mean±S.E. * significant difference from ischemic injured group (* $p<0.05$).

CA1 영역에서는 25.5±1.8 개, CA2 영역에서는 16.5±1.2 개, CA3 영역에서는 12±1.8 개, 그리고 치상회 (dentate gyrus, DG)에서는 33.5±4.2 개의 nNOS 단백질이 발현된 신경세포를 확인할 수 있다. 이는 해마 영역중 CA1과 DG에서 상대적으로 많은 nNOS 단백질이 발현되는 것이다 (Fig. 3, 4 & 5).

虛血 損傷 1 시간 전에 艾葉 藥鍼을 太衝에 시술한 實驗群에서는 해마의 CA1 영역에서 6.2±1.9 개 ($p<0.001$), CA2 영역에서 5.7±1.7 개 ($p<0.001$), CA3 영역에서 5.8±1.2 개 ($p<0.05$)의 nNOS 단백질이 관찰되어 虛血 損傷群에 비하여 유의한 수준의 감소를 나타내었고, 특히 CA1 영역에서 두드러진 효과를 보여 주었다. 또한, 해마 영역중 DG에서는 13.3±2.2 개 ($p<0.01$)의 nNOS 단백질이 확인되어 마찬가지로 허혈 손상군에 비하여 유의한 감소를 보여 주었다 (Fig. 4, 5 & 6).

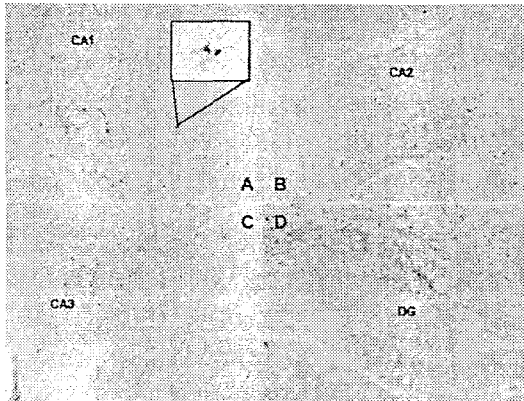


Fig. 3. Representative microphotographs showing increased expressions of nNOS protein in the hippocampal structures at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, represents CA1 region in hippocampus and magnified neurons containing nNOS protein in the square box; B, CA2 region in hippocampus; C, CA3 region; D, dentate gyrus in hippocampus.

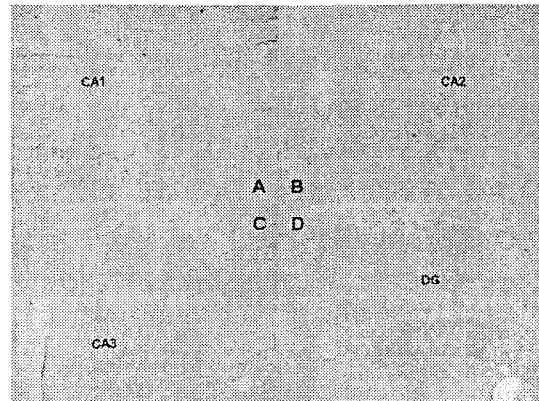


Fig. 5. Representative microphotographs showing effects of FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI' herbal acupuncture of acupoint LR₃ on nNOS protein expression in the hippocampal structures at 2 hrs after transient forebrain ischemia. A, represents CA1 region pretreated with herbal acupuncture on LR₃ 1 hrs before; B, CA2 region in hippocampus; C, CA3 region; D, dentate gyrus in hippocampus.

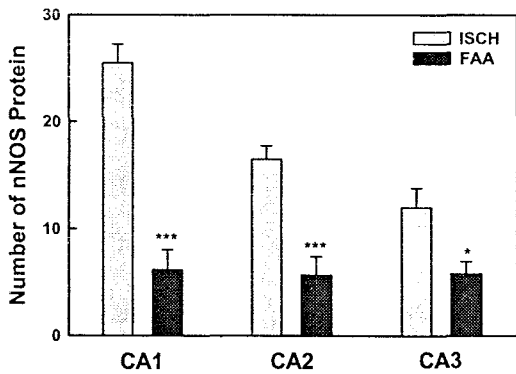


Fig. 4. Effects of FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI' herbal acupuncture of acupoint LR₃ on nNOS protein expression in the hippocampus at 2 hrs after transient forebrain ischemia. ISCH, transient fore brain ischemic injured rat; FAA, pretreatment with herbal acupuncture 1 hrs before (n=6). Values are mean±S.E. * significant difference from ischemic injured group (* p<0.05, *** p<0.001).

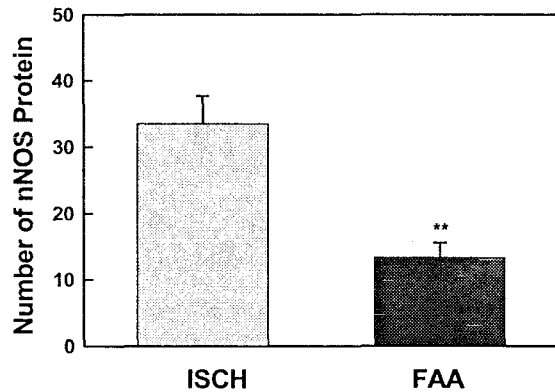


Fig. 6. Effects of FOLIUM ARTEMISIAE ARGYI' herbal acupuncture of acupoint LR₃ on nNOS protein expression in the dentate gyrus region of hippocampus at 2 hrs after transient forebrain ischemia. ISCH, transient forebrain ischemic injured rat; FAA, pretreatment with herbal acupuncture 1 hrs before (n=6). Values are mean±S.E. * significant difference from ischemic injured group (** p<0.01).

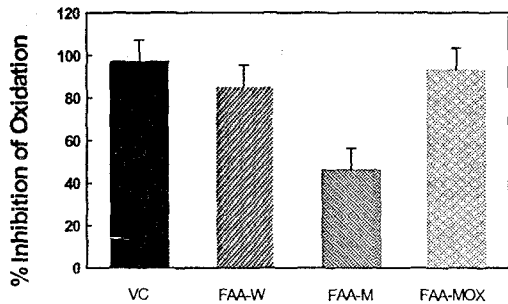


Fig. 7. Relative antioxidant effects of the extracted types of FOLIUM ARTEMISIAE ARGY' (FAA) containing 100 ug/ml extracts. VC, vitamin C that is positive control; FAA-W, water extracts of FAA; FAA-M, MeOH extracts of FAA; FAA-MOX, MeOH extracts of Moxi-tar (n=6). Values are mean±S.E.

3. 艾葉의 抗酸化 效果

이상의 실험결과에서 太衝에 대한 艾葉 藥鍼이 虛血 損傷으로 야기되는 nNOS 단백질의 발현을 억제하는 것이 관찰되었다. 이러한 결과가 艾葉의 항산화효과와 연관이 있는지를 확인하기 위하여, 항산화 효과의 정도를 추출방법에 따라 비교하여 보았다. 아울러 대표적인 항산화물질로 알려진 비타민 C를 기준으로 비교하였는데, 비타민 C에서 항산화작용은 97.2%으로 관찰되었고, 艾葉의 水溶性 抽出物에서는 85.3%의 항산화작용이 나타났다. 이와는 반대로 艾葉의 메틸알콜을 용매로 사용하여 추출한 경우에는 46.3%으로 낮은 항산화작용이 나타났으며, 艾葉의 연소화합물인 灸津 추출물의 경우에는 93.2%의 높은 항산화작용이 관찰되었다 (Fig. 7).

IV. 考 察

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 의식장애

와 偏枯, 四肢不舉, 半身不遂, 口眼喎斜 등의 운동장애 및 舌強不語, 暴痞, 言語蹇澁 등의 언어장애 증상이 나타나는 병증으로 정의되는 서양의학적으로 중추신경계질환들 다수에 포함되지만, 그 중 뇌혈관질환의 범주인 腦卒中이 가장 밀접하다고 볼 수 있다. 뇌혈관 질환은 뇌의 급격한 순환장애로 인하여 발생하는데, 대개 虛血性 뇌혈관 질환과 充血性 뇌혈관 질환으로 양분하며, 그 중 대부분은 虛血性 뇌혈관 질환이다²⁶⁾. 宋代 이전에는 口眼喎斜, 皮膚病, 癰癩風, 精神疾患 등이 다수 風의 증상에 포함되어 中風에 대한 인식이 腦血管疾患과 직접적인 연관을 맺지 못하였으나, 宋代 이후에 들어서면서 中風은 腦血管疾患의 범주로 축소되기 시작하였다. 中風의 4大症狀으로 偏枯, 風痺, 風懿, 風痲 등과 그 주요 증상으로 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 체계화되었다²⁷⁻²⁸⁾.

흰쥐에서 前腦 虛血 損傷은 뇌의 新皮質, 線條體, 海馬 등에 선택적으로 신경세포의 손실을 가져오며, 이 중에서 해마 CA 영역의 방추형(pyramidal) 신경세포들이 가장 쉽게 損傷을 받게 된다. 이들 CA1 부위의 신경세포들은 재판류후 3-4일이 지나면 죽기 시작하는 遲延性 細胞死 (delayed neuronal death)가 나타난다²⁹⁻³¹⁾. 一過性 前腦 虛血 後 발생하는 신경세포의 損傷에는 free radicals³²⁾, glutamate³³⁻³⁴⁾, calcium 過負荷³⁵⁾, NO³⁶⁾ 및 cytokines³⁷⁻³⁸⁾ 등 많은 요인들이 관여하는 것으로 알려져 있는데, 이중 glutamate는 Ca⁺⁺의 신경세포 축적을 유도하고 이는 지속적으로 nNOS의 활성을 유도하게 되어 NO의 과도한 생성을 통한 신경독성을 야기하는 것으로 알려져 있다⁸⁾.

大腦의 虛血 및 酸化의 損傷에 대한 한의학적

치료법에 대한 연구는 임상 및 동물실험등이 활발히 진행되어 왔으며, 최근에 鍼刺戟 및 電鍼刺戟이 虛血 損傷으로부터 신경손상을 보호할 수 있다는 연구들이 제시되고 있는데, 百會와 人中 사이에 가한 電鍼刺戟이 대뇌의 국소적 虛血 損傷 동물에서 basic fibroblast growth factor (bFGF)의 발현을 증가시킨다고 보고되었고³⁹⁾, 金等⁴⁰⁾은 足三里에 가한 電鍼刺戟을 통해 흰쥐의 前腦 虛血 誘發에 의한 齒狀回 (dentate gyrus)의 신경세포 손상으로부터 세포재생이 증가됨을 관찰하였으며, 金等⁴¹⁾은 環跳 電鍼刺戟에 의한 뇌세포사의 억제를 관찰하였다. 본 연구와도 관련하여 電鍼刺戟으로 大腦 虛血로 인하여 증가된 iNOS나 NO가 억제된 결과를 찾아볼 수 있는데⁴²⁻⁴³⁾, 이러한 鍼刺戟은 大腦 局所 虛血 모델에서 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)⁴⁴⁾나 basic fibroblast growth factor (bFGF)⁴⁵⁾와 같은 neurotrophin을 증가시키었다. 또한 艾葉을 통한 腦 虛血性 질환에 대한 효과와 관련하여, 張²²⁾과 李²³⁾ 전뇌 허혈 손상에서 太衝과 百會의 艾葉 藥鍼이 cFos 단백질의 증가와 FosB 단백을 억제하는 효과를 통해 brain derived neurotrophic factor (BDNF)의 증가를 나타내었는데 이는 艾葉을 이용한 藥鍼의 효과가 신경친화물질의 증가와 관련되고 있음을 보여주는 예이다.

艾葉은 菊花科에 속한 다년생 초목인 황혜쑥 (*Artemisia argyi*, Lev et Vant), 약쑥 (*Artemisia asiatica* Nakai.)와 野艾 (*Artemisia vulgaris* L.) 등의 잎을 건조한 것으로, 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 왔는데^{12, 46)}, 艾灸療法을 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 사용되었다¹⁴⁾. 최근의 연구 결과에서는 艾葉의 化學的 側面에 대한 研究와 같은 다양한 방향으로 進行되어 왔으며, 艾葉 自體의 化學成分의 定性, 定量과 艾葉의 成分이 生體에 미치는 影響에 대한 側面으로 進行되고 있다. 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 臨床의 效能 糾明을 가능케 하였다. 최근 艾葉에서 다양한 성분과 효능에 대하여 연구되어 phellandrene, couprol, cadinene, cineol, repinen-4-ol, β -caryophyllene, linalool, artemisia alcohol, camphor, bornol 등과 艾葉의 燃燒成分物에서 tricosanol, hentriacontane, arachnalkol, thujone, n-nonacosanne, n-hentriacontane, C37H76, tanine 및 그 이성체, catechol, 포화지방족탄화수소 등의 성분이 확인되었다⁴⁷⁻⁴⁸⁾.

太衝 (LR₄)은 足厥陰肝經의 俞土穴이자 原穴로 足趾 本節後 2寸에 위치하고 있으며, 해부학적으로는 短拇趾伸筋 (tendon of extensor hallucis brevis muscle)과 背側骨間筋 (dorsal interosseus muscle)가 존재하며, 주위로는 深腓骨神經 (deep peroneal nerve), 足背動脈 (dorsal artery of foot) 등이 지나가고 있다⁴⁹⁾. 특히, 太衝은 原穴이자 五俞穴중 俞穴이라는 특징을 지니고 있어, 치료상 “治臟者, 治其俞”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》⁵⁰⁾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, 上膈內廉, 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.

본 연구에서는 艾葉의 항산화효과의 측면과 太衝의 中風 治療 가능성을 토대로 前腦 虛血 損傷에 대한 豫防 및 治療效果를 확인하고자, 허혈 손상 이후 대뇌 신경세포에서의 nNOS 단백질 발현을 토대로 연구하였다. 일반적으로 정상 흰쥐의 대뇌피질 및 해마에서는 nNOS 단백질이 거의 관찰되지 않음으로써 nNOS 단백질이 병리적 상태에서 증가함을 추정해 볼 수 있는데, 본 실험에서 처럼 일과성 전뇌 허혈을 유발후 2시간이 경과한 허혈 손상군에서 nNOS 단백질이 신경세포 (neuron)의 세포질 (cytoplasm)을 중심으로 가지돌기 (dendrite)와 축삭 (axon)에서 관찰되었고, 이러한 nNOS 단백질을 함유한 신경세포가 크게 증가됨을 확인하였다. 이는 대뇌피질 뿐만 아니라 해마 영역에서도 유의하게 증가되었는데, 해마부위에서는 특히 CA1과 DG에서 보다 많은 수의 nNOS 단백질 함유 신경세포가 관찰되었다. 이는 기존 연구에서 一過性 前腦 虛血 損傷은 해마의 CA1 방추형 신경세포들에서 선택적으로 세포사를 야기하는 반면 CA2-3와 DG 신경세포는 부분적 損傷에 머무른다는 점에서 이해할 수 있다⁵¹⁻⁵²⁾. 허혈 손상을 유발하기 1시간에 兩側 太衝에 艾葉 藥鍼을 시술한 실험군에서는 허혈손상 후 2시간에

nNOS 단백질이 허혈 손상군에 비하여 유의한 수준의 감소를 나타내었고, 이러한 효과는 특히 해마의 CA1에서 두드러지게 나타났다.

nNOS 단백질 발현의 감소가 허혈 손상에 대한 신경보호 작용과 연관이 있음은 다양한 연구 결과를 통해 알 수 있는데, Coert 등⁵³⁾은 nNOS의 inhibitor인 7-nitroindazole (7-NI)의 전처치가 국소 뇌허혈로 야기된 뇌경색을 억제하는 효과가 있음을 확인하였고, Jiang 등⁸⁾ 역시 7-NI를 통해 전뇌허혈 손상에서 해마부위의 신경활동성을 부분적으로 정상화를 촉진하였음을 보고하였다. 한편 nNOS 생성이 결여된 변이생쥐 (mutant mice)에서 허혈손상 후 세포사의 과정이 늦어지는 것이 확인된 사실은⁵⁴⁾ 본 연구결과에서 艾葉 藥鍼의 허혈 손상에 대한 신경보호 작용을 직간접적으로 증명하는 것이라 보여진다.

nNOS 억제를 통한 신경보호작용의 기전에 대하여 생각하여 보면, NO의 신경독성 작용이 NO와 superoxide의 반응물인 peroxynitrite에 의하여 증계되어 나타나는데⁵⁵⁾, 이와 관련하여 non-specific nitric oxide synthase 억제제인 N omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)가 허혈 손상후 감소된 superoxide dismutase (SOD)의 활성을 정상화하는 것이 관찰되었다⁵⁶⁾. 이는 본 연구결과에서 확인된 艾葉의 水溶性 抽出物에서 85.3%의 항산화작용과 艾葉의 연소화합물인 灸津 추출물의 경우에서 93.2%의 높은 항산화작용을 통해 艾葉 藥鍼이 艾葉의 藥物的 作用을 통해 一過性 前腦 虛血에 따른 신경세포 손상을 억제할 수 있음을 보여주는 것이다.

이상의 연구 결과를 종합하여 볼 때, 흰쥐에서 유발된 一過性 前腦 虛血 損傷이 艾葉 抽出物을 이용한 太衝 부위 藥鍼 刺戟에 의하여 손

상 정도가 완화되었다는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 효과에 대하여, 보다 다양한 접근방법을 통한 규명이 필요하며, 현재로서는 艾葉 抽出物이 가지는 抗酸化 효과가 가장 큰 영향을 미쳤을 것이라는 추측을 하게 된다. 그러한 이유로는 본 연구 결과에서 항산화 효과가 水溶性 抽出物과 灸津 抽出物에서 강한 작용이 나타났기 때문이다. 그러나, 허혈 손상의 病理 機轉 및 신경세포 사멸과정의 복잡성을 고려할 때 단순히 항산화 효과로만 설명되기에는 여러 측면의 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 結 論

이 연구에서는 一過性 前腦 虛血 損傷 후 흰 쥐의 해마 및 대뇌피질 영역에서 nNOS 단백질 발현 양상을 관찰함으로써, 太衝에 가한 艾葉 藥鍼의 前處置가 虛血 損傷을 억제하는데 效果的인지를 규명하고자 하였다.

1. 일과성 전뇌 허혈을 유발후 2시간이 경과한 허혈 손상군에서는 대뇌피질의 nNOS 단백질이 49 ± 11.6 개와 太衝에 艾葉 藥鍼을 前處置한 실험군에서는 허혈손상 후 2시간에 23 ± 3.2 개 ($p < 0.05$)의 nNOS 단백질 관찰되어 허혈 손상군에 비하여 유의한 수준의 감소를 나타내었다.
2. 일과성 전뇌 허혈 손상 후 해마의 CA1 영역과 치상회에서 nNOS 단백질 발현이 크게 증가하였고, CA2 영역과 CA3 영역은 상대적으로 적은 nNOS 단백질이 발현되었다.
3. 艾葉 藥鍼을 太衝에 前處置한 實驗群에서 해마의 CA1, CA2, CA3 및 치상회 영역에서 nNOS 단백질이 虛血 損傷群에 비하여 유의하게 감소하였고, 특히 CA1 영역에서 두드러진 효과를 보여 주었다.
4. 본 연구의 藥鍼 주재료인 艾葉의 연소화합

물인 灸津 추출물의 경우에서 가장 높은 항산화효과가 관찰되었고, 아울러 水溶性 抽出物에서 높은 항산화작용이 나타났으나, 메틸알콜을 용매로 사용하여 추출한 경우 낮은 항산화작용이 관찰되었다.

이상의 연구 결과를 종합하여 볼 때, 흰쥐에서 유발된 一過性 前腦 虛血 損傷이 艾葉 抽出物을 이용한 太衝 부위 藥鍼 刺戟에 의하여 손상 정도가 완화되었다는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 효과에 대하여, 보다 다양한 접근방법을 통한 규명이 필요하며, 현재로서는 艾葉 抽出物의 抗酸化 효과가 가장 큰 영향을 미쳤을 것이라는 추측을 하게 된다.

參考文獻

1. 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.
2. 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.
3. Kirino T, Sano K. Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol*. 1984 ; 62 : 209-18.
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. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol Rev.* 1991 ; 43 : 109-42.
6. Gulyaeva NV, Stepanichev MYu, Onufriev MV, Lazareva NA, Zarzhetsky YV, Gurvitch AM, Volkov AV. Cardiac arrest induces decrease of nitric oxide synthase activity and increase of free radical generation in rat brain regions. *Neurosci Lett.* 1996 ; 220(3) : 147-50.
7. Beasley TC, Bari F, Thore C, Thrikawala N, Louis T, Busija D. Cerebral ischemia/reperfusion increases endothelial nitric oxide synthase levels by an indomethacin-sensitive mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998 ; 18(1) : 88-96.
8. Jiang MH, Kaku T, Hada J, Hayashi Y. Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 2002 ; 946(1) : 139-47.
9. Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993 ; 13(3) : 355-8.
10. Tominaga T, Sato S, Ohnishi T, Ohnishi ST. Electron paramagnetic resonance (EPR) detection of nitric oxide produced during forebrain ischemia of the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994 ; 14(5) : 715-22.
11. 김수범. 中風의 藥鍼療法. *藥鍼學會誌.* 1997 ; 1(1) : 126-37.
12. 全國韓醫科大學本草學教授共編著. 本草學. 서울 : 永林社. 1995 : 405-6.
13. 楊思澍, 張樹生 傅景華. 中醫臨床大全. 北京 : 北京科學技術出版社. 1988 ; 1196-8.
14. 林鍾國. 鍼灸治療學. 서울 : 集文堂. 2001 : 233-5.
15. 박건영, 하정옥, 유영법, 이종호, 박종철. artemisia속 식물들의 향돌연변이효과. *생약학회지.* 1996 ; 27(2) : 96-100.
16. Marrif HI, Ali BH, Hassan KM. Some pharmacological studies on *Artemisia herba-alba* (Asso.) in rabbits and mice. *J Ethnopharmacol.* 1995 ; 49(1) : 51-5.
17. Lee EB. The effect of *Artemisia Herba* on gastric lesion and ulser in rats with isolation of Eupatilin, Taejeon, Korea, In Unesco Regional Seminar on the Chemistry, Pharmacology and Clinical Use of Flavonoid Compound. 1995 ; 11-15.
18. Tsutomu U, Hiroshi K, Zenichi O. Antiinflammatory effect of extract from *Phellodendri cortex*. *J Med Pharma Society for WAKAN-YAKU.* 1989 ; 6 : 158-64.
19. 大西基代, 戶田靜男, 管田良仁, 東家一雄, 黒巖共一, 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.
20. Chiba A, Nakanishi H, Chichibu S. Thermal and antiradical properties of indirect moxibustion. *Am J Chin Med.* 1997 ; 25(3-4) : 281-7.
21. 황윤경, 김동청, 황우익, 한용봉. 쑥(*artemisia princeps Pampan.*) 추출 성분의 암세포 증식 억제효과. *한국영양학회지.* 1998 ; 31(4) : 799-808.
22. 張進堯. 太衝 艾葉 藥鍼이 一過性 前腦 虛血

- 損傷에 미치는 效果. 원광대학교 대학원 박사학위논문. 2003 : 1-52.
23. 李寬炯. 百會 艾葉 藥鍼이 一過性 前腦 虛血 損傷에 미치는 效果. 원광대학교 대학원 박사학위논문. 2003 : 1-47.
24. 윤성목, 임종국. 애엽 약침액의 급성, 아급성 독성에 관한 연구. 大韓鍼灸學會誌, 2000 ; 17(1) : 143-51.
25. 조경희, 손윤희, 임종국 外. 마우스에서 애엽 약침액의 급성 독성 시험. J. Life Resource & Industry. 1999 ; 4 : 7-12.
26. 김영석. 임상중풍학. 서울 : 서원당. 1997 : 303-8, 317-29.
27. 常青. 實用中風防治手冊. 北京 : 中國中醫藥出版社. 1993 : 24-5, 46.
28. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1989 : 362-3.
29. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res. 1982 ; 239 : 57-69.
30. Pulsinelli WA, Brieryly JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. Ann Neurol. 1982 ; 11 : 491-8.
31. Schmidt-Kastner Rk, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. Neuroscience. 1991 ; 40 : 599-636.
32. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann N Y Acad Sci. 2000 ; 899 : 136-47.
33. Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. Trends Neurosci. 1988 ; 11(10) : 465-9.
34. Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. Annu Rev Neurosci. 1990 ; 13 : 171-82.
35. Simon RP, Griffiths T, Evans MC, Swan JH, Meldrum BS. Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1984 ; 4(3) : 350-61
36. Holtz ML, Craddock SD, Pettigrew LC. Rapid expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases during post-ischemic reperfusion in rat brain. Brain Res. 2001 ; 898(1) : 49-60.
37. Beamer NB, Coull BM, Clark WM, Hazel JS, Silberger JR. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. Ann Neurol. 1995 ; 37(6) : 800-5.
38. Schielke GP, Yang GY, Shivers BD, Betz AL. Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. J Cereb Blood Flow Metab. 1998 ; 18(2) : 180-5.
39. Ou YW, Han L, Da CD, Huang YL, Cheng JS. Influence of acupuncture upon expressing levels of basic fibroblast growth factor in rat brain following focal cerebral ischemia-evaluated by time-resolved fluorescence immunoassay. Neurological Res. 2001 ; 23 : 47-50.
40. Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, Huh Y, Chung JH, Seo JC, Kang JE, Lee HJ, Yim SV,

- Kim CJ. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.* 2001 ; 297(1) : 21-4.
41. 김풍식, 김재효, 최동욱, 김경식, 손인철. 一過性 前腦 虛血 損傷에 대한 環跳 (GB30) 電鍼刺戟의 效果. 大韓經絡經穴學會誌. 2002 ; 19(1) : 35-46.
42. Shi J. A study on the effect and mechanism of acupuncture suppression of neuronal apoptosis following cerebral ischemia. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 1999 ; 30(4) : 326-9.
43. Zhao P, Huang ZN, Chen G, Cheng JS. Electro-acupuncture attenuates nitric oxide release from rat striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *Acupunct Electrother Res.* 2000 ; 25(2) : 101-7.
44. Wei G, Huang Y, Wu G, Cao X. Regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor expression by electroacupuncture after transient focal cerebral ischemia. *Acupunct Electrother Res.* 2000 ; 25(2) : 81-90.
45. Yang WO, Huang YL, Da CD, Cheng JS. Electroacupuncture reduces rat's neuronal ischemic injury and enhances the expression of basic fibroblast growth factor. *Acupunct Electrother Res.* 1999; 24(1) : 1-10.
46. 新編中藥大辭典. 新文豐出版公司. 1970 : 843-7.
47. 지형준, 이상인. 韓藥規格集注解. 서울 : 한국메디칼인렛스사. 1989 : 242-3.
48. 千永實, 金昌煥, 姜成吉, 高炯均, 朴英培, 金容奭. 艾鍼의 標準化 作業에 대한 研究動向. 大韓針灸學會誌. 1997 ; 14(1) : 55-69.
49. 全國韓醫科大學 鍼灸-經穴學教室 編著. 鍼灸學, 서울 : 集文堂. 1994 : 667-8
50. 郭靄春 編著. 黃帝內經 靈樞校注語譯. 醫聖堂. 1993 : 102-36.
51. Kirino T, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 1984 ; 62(3) : 201-8.
52. Pulsinelli WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res.* 1985 ; 63 : 29-37.
53. Coert BA, Anderson RE, Meyer FB. Is neuroprotective efficacy of nNOS inhibitor 7-NI dependent on ischemic intracellular pH? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 ; 284(1) : H151-9.
54. Elibol B, Soylemezoglu F, Unal I, Fujii M, Hirt L, Huang PL, Moskowitz MA, Dalkara T. Nitric oxide is involved in ischemia-induced apoptosis in brain: a study in neuronal nitric oxide synthase null mice. *Neuroscience.* 2001 ; 105(1) :79-86.
55. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat.* 1996 ; 10 : 179-90.
56. Seif-el-Nasr M, Fahim AT. Antioxidant effect of N omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on global cerebral ischemia in a rat model. *Arzneimittelforschung* 2001 ; 51(8) : 628-32.