

Phospholipase A₂(PLA₂) 藥鍼이 中大腦動脈閉塞으로 誘發된 흰쥐의 神經損傷 保護 效果에 미치는 영향

김성민¹ · 정태영¹ · 임성철¹ · 서정철¹ · 김미려² · 양재하³ · 한상원¹

대구한의대학교 한의과대학 ¹침구학교실, ²생리학교실, ³생리학교실

The Protective Effect of Phospholipase A₂(PLA₂) Herbal-acupuncture against the Neuronal Damage Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion(MCAO) in Rats.

Sung-Min Kim¹, Tac-Young Jung¹, Seong-Cheol Leem¹, Jeong-Chul Seo¹, Mi-Ryeo Kim²,
Chae-Ha Yang³, Sang-Won Han¹

Dept. of ¹Acupuncture & Moxibustion, ²Physiology, ³Pharmacology,
College of Oriental Medicine, DaeguHanny University

Abstract

Objectives : In order to prove the effect of Phospholipase A₂(PLA₂) Herbal-acupuncture, this experimental studies were performed by using rats that had neuronal damage due to the Middle Cerebral Artery Occlusion(MCAO).

Methods : Microdialysis probes were implanted into the coordinate of striatum of anesthetized rats which consist of sham-operated 8 rats, MCAO-operated 8 rats and PLA₂ Herbal-acupuncture administrated 8 rats before MCAO operating. The PLA₂ Herbal-acupuncture(0.5mg/kg) was administrated to rats 30 minutes before having an operation causing the MCAO. The surgical excision lead the cross resected brain to the acute ischemic state. The brain was sliced in 2mm thickness and stained with cresyl violet buffer for the measurement of cerebral infarcted area and volume.

Results : Based on the result of the tissue inspection for the cerebral ischemic cell, PLA₂ Herbal-acupuncture significantly protect neurocytes.

Conclusions : We suggest PLA₂ Herbal-acupuncture produces protective effects against the neuronal damage induced by MCAO. Therefore, PLA₂ Herbal-acupuncture may prevent delayed neuronal death(DND) in selectively vulnerable focal areas of the brain effectively.

Key words : Phospholipase A₂(PLA₂), Herbal-acupuncture, Middle Cerebral Artery Occlusion(MCAO), Neuronal Damage

I. 서 론

腦血管疾患(cerebrovascular disease)은 腦血

•교신저자: 한상원, 대구광역시 수성구 상동 165 대구한의대학교 부속
대구한방병원 침구과, Tel. 053-770-2129,
E-mail : hansw@dhu.ac.kr

•접수 : 2004/08/13 · 수정 : 2004/09/12 · 채택 : 2004/09/17

管의 病理學的 異常에 依해 일어나는 意識障礙와 神經學的인 損傷으로 因한 運動 및 感覺障礙 등을 隨伴하는 症候群을 總稱하는 것으로¹⁾, 食生活의 西歐化, stress, 運動不足 그리고 高血壓의 積極的인 治療로 因해 出血性 腦血管疾患보다는 虛血性 腦血管疾患의 發生比率이 漸次 增

加하고 있는 趨勢이다^{2,3)}.

血行障 碍로 因해 腦虛血이 發生하는 部位의 細胞는 수 초내에 機能障 碍가 오고, 수 분이 經 過한 後에는 非可逆性 損傷을 입게 된다. 그러나 腦虛血 周邊部(ischemia region)의 細胞는 약 간의 代 謝障 碍가 있다가 일정시간이 經 過한 後 에는 遲 延性 神 經細胞死(delayed neuronal death, DND)가 發生하므로 빠른 시기에 治 療을 하 여야 한다^{4,7)}. 現在 全 世界의 虛 血性 腦組 織 細胞 損傷 機轉에 關하여 활발하게 研 究가 進 行 되고 있으며, 神 經傳 達物 質들에 對한 많은 部 分 이 糾 明되고 있다. 이러한 研 究結 果를 土 臺로 神 經細胞 損傷을 抑 制하는 새로운 藥 物 開 發을 爲해 多 角의 治 療方法을 摸 索하고 있다.

虛 血性 腦 血 管 疾 患은 中 風의 範 疇에 屬하며³⁾, 中 風 急 性 期는 大 部 分 本 虛 標 實과 上 盛 下 虛證이 므로, 治 療은 本 虛證이 있어도 標 實證을 爲 主로 治 療한다. 急 卽 治 其 標의 原 則에 따라 平 肝 熄 風, 清 熱 滌 痰, 化 痰 通 腑, 活 血 通 絡 등의 治 法을 多 用 하는데, 이 때에 邪 氣가 盛하고 症 候가 實하기 때문에 淸 心 開 竅 蘇 醒 神 志 涼 解 熱 毒의 效 能 이 있는 藥 物을 많이 使 用하고 있다⁸⁾.

蜂 毒은 蜂 毒의 毒 囊에 들어있는 約 40여 가지의 有 效 成 分으로 構 成된 物 質로 蜂 毒의 性 味는 苦, 辛, 平, 有 毒하고, 臨 床에서는 鎮 痛, 解 熱, 消 炎, 鎮 痙, 免 疫 增 強 및 抗 癌 效 果 等의 效 能 이 있는 것으로 알려져 있다.^{9,10)} 蜂 毒의 成 分 中 phospholipase A₂(PLA₂)에 대하여 tumor를 억제하는데 相 關이 있다고 報 告하였으나^{11,12)} 아직 까지 中 大 腦 動 脈을 閉 塞시킨 動 物 模 型을 利 用하여 腦 虛 血 過 程에서 PLA₂가 神 經傳 達物 質에 미치는 影 響에 關한 研 究가 不 足한 실정이다.

이 에 著 者는 腦 虛 血 誘 發時 腦 組 織 細胞 保 護 效 果에 따른 腦 卒 中 治 療 機轉을 實 驗 的으로 研

究하기 爲해 人 爲 的으로 中 大 腦 動 脈 閉 塞 術로 腦 虛 血을 誘 發시킨 흰 쥐에 對해 PLA₂ 藥 液을 合 谷에 注 入한 後, 腦 梗 塞 部 位의 容 積을 測 定하여 有 意한 結 果를 얻었기에 報 告하는 바이다.

II. 재 료 및 방 법

1. 動 物 및 材 料

1) 動 物

動 物은 體 重 240-260g의 Sprague-Dawley系 雄 性 흰 쥐(大 韓 實 驗 動 物 中 心)를 使 用하였고, 물 과 펠릿 飼 料(제 일 사 료)를 자 由 롭게 먹도록 하였 으며, 飼 育 室 內의 溫 度는 21~24℃, 濕 度는 40~60%로 維 持하였고, 낮 과 밤의 週 期는 各 各 12 時 間으로 하였 으며, 實 驗 室 環 境에 2週 間 適 應 시킨 後 實 驗에 使 用하였다.

2) 材 料

藥 液은 Sigma社의 phospholipase A₂를 구 입하여 使 用하였다.

2. 方 法

1) 試 藥 的 調 製

本 實 驗에 使 用된 PLA₂는 주 사 用 食 염 수(normal saline)를 가하여 調 製하였다.

2) 藥 液 群

흰 쥐 8마리를 1個 群으로 하여 control group 은 腦 虛 血만 誘 發시켰고, sham group은 腦 虛 血 은 誘 發시키지 않고, 마취 狀 態에서 各 各 同 部 位에 同 樣한 處에 注 入하였으며, tail group은 주 사 用 食 염 수(normal saline) 0.2ml을 꼬 리에 注 入하였다. 그 리고 合 谷(LL₄)¹³⁾에 相 應하는 實 驗 動 物의 體 表 上의 兩 側 穴 位에 saline group은 주 사 用 食 염 수(normal saline)를, sample group은 PLA₂ 藥

鍼液을 各各 0.1ml(0.5mg/kg)씩 1回 注入하였다.

3) 中大腦動脈閉塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)에 의한 흰쥐의 腦虛血 誘發^{14,15)}

正常群을 除外한 흰쥐를 N₂O(70%)O₂(30%)와 混合된 3% isoflurane으로 吸入 痲醉시킨 後, 頸部를 切開하여 右側 總頸動脈과 外頸動脈을 結紮하였다. 15分동안 動物을 安定시킨 後, 外頸動脈을 조금 자르고 0.25mm直徑의 nylon monofilament를 內頸動脈쪽으로 約 17mm程度 밀어 넣어 中大腦動脈을 閉塞하였다. 切開된 部位를 縫合한 後 痲醉에서 恢復시켰는데, 手術 및 痲醉 恢復期間동안 溫度調節裝置를 利用하여 直腸內 溫度를 37℃로 維持시켰다.

4) 腦梗塞 部位의 容積 測定

中風誘發 24시간 後 對照群과 實驗群의 大腦를 2mm간격으로 잘라 200ml의 saline에 TTC (2, 3, 5 - Triphenyltetrazolium chloride) 4g을 녹여 미리 제조해둔 2% TTC용액에 담귀 37℃ water bath에서 30분간 염색하였다. 염색된 절편은 4% formaline용액으로 조직을 고정시켰다. 고정된 조직의 腦梗塞 部位의 容積은 Image analyzer system (OPTIMAS, Edmonds, WA, USA)을 利用하여 測定하였다.

3. 統計處理

實驗結果의 統計的 有意性은 ANOVA(One-Way Analysis of Variance)와 post-hoc LSD (Least Significant Difference) test¹⁷⁾를 利用하여 檢證하였으며, P<0.05 水準인 것을 有意하다고 認定하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 腦梗塞 部位의 容積 測定

Control 群의 striatum과 cortex의 梗塞 容積은 각각 146.3±11.2, 286.4±29.9 mm³ 였고, saline 群의 striatum과 cortex의 梗塞 容積은 각각 103.3±10.9, 276.4±17.2 mm³ 였으며, tail 群의 striatum과 cortex의 梗塞 容積은 각각 151.1±15.2, 287.8±11.3 mm³ 로 이 중 saline 群의 striatum의 梗塞 容積만 control 群에 비하여 有意性(P<0.05)있게 감소하였다.

Sample 群의 striatum의 梗塞 容積은 49.4±6.3 mm³ 로 control 群과 saline 群에 비하여 모두 매우 有意性(P<0.001)있게 감소하였으며, cortex의 梗塞 容積은 146.5±24.4 mm³ 로 control 群과 saline 群에 비하여 모두 有意性(P<0.01)있게 감소하였다(Table 1, Figure 1).

Table 1. Effect of Herbal-acupuncture of PLA₂ on Infarction Dimension in the Rat Brain after MCAO

Group	No. of Animal	Infarction volume(mm ³)	
		Striatum	Cortex
Control	8	146.3±11.2 ^{a)}	286.4±29.9
Saline	8	103.3±10.9 [*]	276.4±17.2
Tail	8	151.1±15.2	287.8±11.3
PLA ₂	8	49.4±6.3 ^{****}	146.5±24.4 ^{**}

Infarction volume was measured after Herbal-acupuncture at bilateral Hapgok(LL₄) in rats subjected to permanent focal cerebral ischemia induced by 24 hours of middle cerebral artery occlusion (MCAO). Saline were given at bilateral Hapgok as control material and tail were used as non-specific control point

a) : Mean± S.E.

^{*}, P<0.05, ^{**}, P<0.01, ^{***}, P<0.001 as compared with the corresponding data of Control group ^{*}, P<0.05, ^{**}, P<0.01, ^{***}, P<0.001 as compared with the corresponding data of Saline group

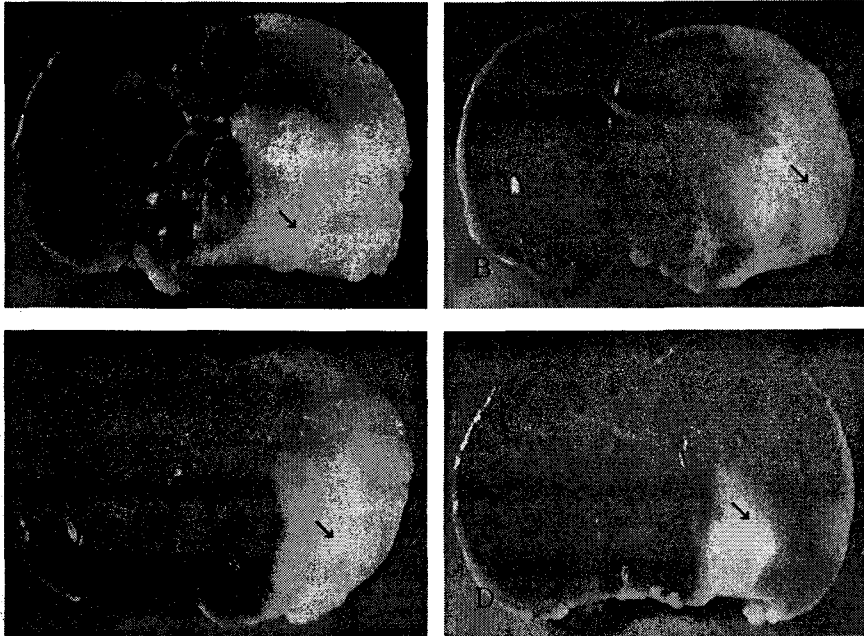


Figure 1. The infarction dimension of the rat brain after MCAO. The rats were pretreated with each method. A: control, B: saline, C: Tail, D: PLA₂

IV. 고 찰

蜂毒이란 꿀벌의 毒囊에 들어있는 約 40여 가지의 有效成分으로 構成된 物質로 國內에서는 蜂毒을 이용한 藥鍼에 관하여 研究가 활발히 進行되고 있어 鎮痛¹⁸⁾, 消炎¹⁹⁾, 鎮痙²⁰⁾ 등이 報告되었다.

봉독의 여러 성분 중 PLA₂는 봉독 enzymes의 主要成分으로 세포막 구성물질인 phospholipid의 2nd B부위에 결합하는 지방산을 가수분해하는 촉매효소로서 間接的 分解酵素로 作用하여 Phospholipid의 細胞膜을 分解하고, 다른 細胞膜 融解酵素의 作用을 誘導함으로 脂肪酸의 分解에 最初의 連鎖反應을 誘導하는 物質이 된다. PLA₂의 반응에 의해 형성된 산물은 강력한 세포막 활성물질로서 모든 세포를 둘러싸고 있는 지질의 이중구조에 영향을 미치고 또한 세포 상호간의 작용을 가능케 한다. 이러한 생화학적

세포막구조의 파괴는 PLA₂와 같은 효소에 의해 광범위하게 이루어지며 PLA₂에 의해 형성된 phosphoglycerides는 계속 파괴되어 새로운 합성분자로 대체되어진다. PLA₂는 세포막의 투과성을 증가시키고, 혈소판의 응집을 억제하고 백혈구 및 내피세포의 작용을 변화시킨다.²¹⁾ 또한 PLA₂는 용혈작용에서 Melittin과 상승적으로 작용하여 서로의 활성성을 증가시켜 준다.²²⁾ 그 외에 Deregnaucourt C²³⁾에 의하면 PLA₂는 인간혈청의 구성을 조절하는 적혈구의 plasmodium falciparum의 특정단계의 성장을 정지시킨다고 하였으며, Nethery D²⁴⁾에 의하면 횡격막의 mitochondria의 ROS(reactive oxygen species)의 형성은 PLA₂에 의지한다고 하였고, Wu YL²⁵⁾에 의하면 TNF(종양괴사인자)에 의한 세포살의 PLA₂의 활성화는 세포를 사망에 이르게 하는 경로에 신호를 보내는 중요한 요소라고 하였다.

中風은 本虛標實과 上盛下虛의 症이라 할 수 있으므로, 大部分 急性期에는 비록 本虛證이 있어도 標實證을 爲主로 治療한다. 急卽治其標의 原則에 따라 平肝熄風, 清熱滌痰, 化痰通腑, 活血通絡 등의 治法을 多用한다²⁶⁻²⁹. 이때에는 邪氣가 盛하고 症候가 實하기 때문에 빨리 病邪를 除去하기 爲해서 藥物療法 以外에도 捏法, 鍼法, 開喉法, 取嚏法, 吐法, 薰法² 등의 多様な 治法을 使用할 수 있다.

中風은 卒中昏倒 半身不遂 口舌歪斜 神志昏迷 舌強言蹇 或不語 遍體麻木 등의 症候를 일컫으며³⁰, 이것은 腦血管의 循環障로 因하여 卒然히 일어나는 意識障과 腦의 神經學的인 損傷에 의한 諸般運動 및 感覺障等을 隨伴하는 症候群을 總稱한다³¹.

中風의 主要 原因을 살펴보면 內經을 비롯한 隨, 唐 및 宋代 醫家들은 주로 風과 虛를 原因으로 하였고³², 金元時代의 劉³³는 主火說을, 朱³⁴는 濕痰을, 李³⁵는 正氣自虛로 因한다고 主張하였고, 清代以後 葉³⁶은 肝風內動을, 王³⁷은 氣虛瘀血이 原因이 된다고 主張하였다. 이를 通해 살펴보면 風, 火, 濕痰, 虛, 瘀血 등이 主要 原因이 됨을 알 수 있다.

腦虛血은 두 가지 病態生理學的 過程으로 發生하는데, 첫째는 血管閉鎖로 因하여 酸素와 血糖 供給이 消失된다는 점이고, 둘째는 細胞膜 崩壞와 에너지 生産過程의 瓦解로 細胞代謝의 變化를 招來한다는 것이다. 最近 觀察에 따르면 神經細胞에 죽음을 招來하는 細胞內 過程은 治療할 수 없는 것이 아니고, 血流을 恢復시키거나 細胞內로의 Ca²⁺ 流入을 遮斷하거나 아니면 興奮性 神經傳達物質을 妨害함으로써 神經細胞를 죽음으로부터 피하게 할 수 있고, 治療的 可能性^{1,38}도 있다는 報告가 많아 本 實驗을 하게 되었다.

虛血性 腦損傷을 誘發하는 動物實驗 model은 두 種類가 있는데, global ischemic model과 focal ischemic model 方法이 있다. 全體的인 腦虛血 誘發은 兩側 總頸動脈을 結紮하는 方法과 兩側 總頸動脈 및 椎骨基底動脈 모두를 結紮하는 方法이 있는데, 이 方法은 腦幹의 虛血로 因한 急性 死亡 등으로 實驗 成功率이 낮다는 報告³⁹가 있어, 本 實驗은 局所的인 虛血을 誘發시키는 方法을 施行하였다. 可逆性 腦虛血模型의 實驗보다는 實際 臨床的인 治療方面에 接近하기 爲해 非可逆性 腦虛血模型으로 하였다.

腦虛血로 因해 梗塞에 빠지면 腦組織에 廣範圍한 壞死가 일어나는데, 이는 生體가 生存하고 있는 한 一定한 過程을 거쳐 膠質性(gelatinous) 및 膠癥痕(glial scar) 現狀으로 된다. 虛血性 神經細胞 變化(ischemic neuronal change)의 肉眼的 所見은 48時間이 經過하여야 되며, 顯微鏡의 所見은 12時間이 經過하여야 虛血性 神經細胞 變化和 浮腫 現狀을 볼 수 있는데⁴⁰, 本 實驗은 MCAO手術과 약침 시술 후 腦를 切開하여 cresyl violet buffer로 染色하여 組織檢査를 施行하였다. PLA₂ 藥鉞을 MCAO手術 30分前에 處置하여 腦虛血時 神經組織細胞 損傷을 保護하고 抑制하는 藥理作用이 있는지를 알아보는데 그 目的을 두었다. Image analyzer system을 利用하여 흰쥐의 腦梗塞 部位의 容積을 測定한 結果, 對照群에 비해 藥鉞處置群에서 매우 有意性인 腦組織 損傷 減少가 觀察되었다.

以上에서 살펴본 바와 같이 PLA₂ 藥鉞은 腦梗塞 部位의 容積에서 有意性이 認定되어 急性期 中風治療 및 遲延性 神經細胞壞死 防止에 利用할 수 있을 것으로 思慮된다.

V. 결 론

PLA₂ 藥鉞은 臨床에서 虛血性 腦血管疾患의

急性期 治療 및 遲延性 腦神經細胞壞死 防止에 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

참고문헌

1. Raymond D Adams 외. 아담스 신경과학. 서울 : 정담. 1998 : 715-28.
2. 金永錫. 臨床中風學. 서울 : 書苑堂. 1997 : 303-4, 437.
3. 全國韓醫科大學 心系內科學教室. 서울 : 書苑堂. 1999 : 502, 505-6.
4. Arai H, Passonneau JV, Lust WD. Energy metabolism in delayed neuronal death of CA1 neurons of hippocampal following transient ischemia in the gerbil. Brain Dis. 1986 ; 1 : 263-78.
5. Blomqvist P, Lindvall O, Wielloch T. Lesions of the local coeruleus system aggregate ischemic damage in the rat brain. Neurosci. Lett. 1985 ; 58 : 353-8.
6. Iijima K, Kogure K. Prevention of delayed neuronal death in gerbil hippocampus by iron channel blockers. Stroke. 1988 ; 19 : 1003-7.
7. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res. 1982 ; 239 : 57-69.
8. 沈全魚 外. 中風證治. 北京 : 中醫古籍出版社. 1988 : 1, 6, 8-10, 13-4.
9. 叢法滋. 腦病的中醫論治. 北京 : 人民衛生出版社. 1993 : 78-86.
10. 陳輝. 實用中醫腦病學. 北京 : 學苑出版社. 1993 : 62-74.
11. 廓賀齡. 內科急症治療學. 5. 上海 : 上海科學技術出版社. 1988 : 270-73.
12. 김지영 외. 봉독요법의 최신연구동향에 대한 고찰. 大韓鍼灸學會誌. 1997 ; 14(2) ; 47-71.
13. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學(上). 서울 : 집문당. 2000 : 323-5
14. Warner DS, Martin H, Ludwig P, McAllister A, Keana JFW and Weber E. In vivo models of cerebral ischemia: Effects of parenterally administered NMDA receptor glycine site antagonists. J. Cereb. Blood flow Metab. 1995 ; 15 : 188-96.
15. Hillered L, Hallstrom A, Segersvard S, Persson L, Ungerstedt U. Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intercerebral microdialysis. J Cereb Blood Flow Metab. 1989 ; 9 : 607-16.
16. Tossman U, Ungerstedt U. Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. Acta Phys Scand. 1986 ; 128 : 9-14.
17. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. Stroke. 1989 ; 20 : 1037-43.
18. 윤형석, 김용석, 이재동. 통증 관련 봉독연구에 대한 고찰. 대한약침학회지. 2000 ; 3(1) : 157-75,
19. 都垣錫, 張竣赫, 金慶鎬, 尹鍾和, 金甲成. 蜂毒療法이 흰쥐의 膝關節 炎症性 浮腫에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1995 ; 12(1) ; 211-20.
20. 金利和, 李栽東, 盧植, 閔炳一. 흰쥐에서 合谷穴 蜂毒藥針刺戟에 依한 開口反射의 反應. 大韓韓醫學會誌. 1999 ; 16(1) ; 106-12.
21. Yuan Y et al. An essential role for

- lysophosphatidylcholine in the inhibition of platelet aggregation by secretory hospholipase A₂. *Blood*. 1995 ; 86(11) : 4166-74.
22. Assen E et al. A peptide from the venom of the Honey Bee. *Brit Pharmscol*. 1973 ; 337-8.
23. Deregnaucourt C, Schrevel J. Bee venom phospholipase A₂ induces stage-specific growth arrest of theintraerythrocytic Plasmodium falciparum via modifications of human serumcomponents. *J Biol Chem*. 2000 ; 275(51) : 39973-80.
24. Nethery D, Callahan LA, Stofan D, Mattera R, DiMarco A, Supinski G. PLA₂ dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygenspecies. *J Appl Physiol*. 2000 ; 89(1) : 72-80.
25. Wu YL, Jiang XR, Newland AC, Kelsey SM. Failure to activate cytosolic phospholipase A₂ causes TNF resistance in humanleukemic cells. *J Immunol*. 1998 ; 160(12) : 5929-35.
26. 沈全魚 外. 中風證治. 北京 : 中醫古籍出版社. 1988 : 1, 6, 8-10, 13-4.
27. 叢法滋. 腦病的中醫論治. 北京 : 人民衛生出版社. 1993 : 78-86.
28. 陳輝. 實用中醫腦病學. 北京 : 學苑出版社. 1993 : 62-74.
29. 廓賀齡. 內科急症治療學. 5. 上海 : 上海科學技術出版社. 1988 : 270-3.
30. 張笑平. 中醫急症救治. 湖南 : 湖南科學技術出版社. 1991 : 145-6.
31. 李文鎬. 內科學(上). 서울 : 學林社. 1986 : 179-210.
32. 黃文東. 實用中醫內科學. 上海 : 上海科學技術出版社. 1988 : 414.
33. 劉完素. 河間三六書. 서울 : 成輔社. 1976 : 37-8.
34. 朱震亨. 丹溪心法附與. 서울 : 大星文化社. 1982 : 67-8.
35. 李 杲. 東垣十種醫書. 서울 : 大星文化社. 1983 : 64-5.
36. 葉 桂. 臨證指南醫案. 上海 : 上海科學技術出版社. 1993 : 17-8.
37. 王清任. 中國意學大成(醫林改錯). 2. 上海 : 上海科學技術出版社. 1992 : 15-6.
38. Sinom RP, Swan JH, Griffith T. Blockade of NMDA receptors may protect against ischemic brain damage in the brain. *Science*. 1984 ; 226 : 850-2.
39. Hickey RW, Akino M, Strausbaugh S, De Courtmn-Myers GM. Use of the Morris water maze and acoustic startle chamber to evaluate neurologic injury after asphxial arrest in rats. *Pediatr Res*. 1996 ; 39(1) : 77-84.
40. 지계근. 신경병리학. 서울 : 서울대학교출판부. 1990 : 61-3.