

大黃이 뇌허혈 유발 老齡 흰쥐의 해마 c-fos 및 c-jun 발현에 미치는 영향

백진원, 김주원, 정승현, 신길조, 이원철

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Rhei Rhizoma* on c-fos and c-jun Expressions in the Hippocampus of Old BCAO Rats

Jin-Won Paik, Ju-Won Kim, Sung-Hyun Jeong, Gil-Cho Shin, Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objective : In this study old BCAO rats were observed for effects of 'Dea-Hwang' on brain ischemia injury, because risk of stroke increases with age.

Method : The brain ischemia injury was induced by temporarily closing carotids on both sides in a low blood pressuer state and Dea-Hwang was administered orally to 18 month-old BCAO rats.

Results and Conclusions : The ischemically damaged Hippocampus and c-fos and c-jun expression were analyzed by immunohistochemical staining and results are summarized as follows:

1. The c-fos expression after inducing a brain ischemia injury in the hippocampus was more inhibited in the dosed group than in the control group.
2. The normalized optical density of c-fos expression was more reduced in the CA1, CA2, and DG areas of the dosed group than in those of the control group.
3. The c-jun expression after inducing brain ischemia injury in the hippocampus was more inhibited in the dosed group than in the control group.
4. The normalized optical density of c-jun expression was more reduced in the CA1 area of the dosed group than in that of the control group.

Key Words: Dae-Hwang, c-fos, c-jun, the aged BCAO rats, hypoxia.

1. 緒 論

뇌졸중은 老齡에서 호발하는 질환으로 45~84세 인구 10만명당 250~400명의 발병빈도를 나타내며,

질환사망률이 약 30%로 전체 질병 사망원인의 세 번째로 대두되고 있다. 최근 우리나라의 경우 고혈압 치료와 식생활을 비롯한 생활방식의 변화로 인하여 출혈성 뇌졸중이 점차 감소되고 허혈성 뇌졸중이 증가되는 발병양태를 보이고 있다.

허혈성 뇌졸중은 한의학적으로 中風에 속하는데, 中風의 원인으로는 風, 熱, 濕, 痰, 瘀血 등이 있으며, 치료법으로는 祛風化痰, 清熱瀉火, 活血祛瘀, 理氣順氣, 通利大小便, 補虛 등이 있다.

大黃은 清熱攻下, 瀉火解毒, 活血祛瘀 등의 효능이

· 접수 : 2004년 7월 12일 채택 : 2004년 7월 28일
· 교신저자 : 백진원, 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2 동국대학교 분당 한방병원 6층 외과
(Tel : 031-710-3734, 3753 Fax : 031-710-3780, E-Mail : tetris37@hanmail.net)

있어 大便秘結, 神昏譫語, 食積痞滿, 裏急後重, 癥瘕積聚, 癰瘍腫毒, 時行熱疫 등을 치료하는데 이용되어 왔으며, 특히 三承氣湯, 大柴胡湯, 六一順氣散, 清肺瀉肝湯 등 중풍 급성기의 처방에 많이 활용되고 있다³.

大黃에 관한 실험적 연구로는 유효성분인 senno side의 사하작용⁴, 항혈전 및 어혈에 대한 효능^{5,6}, 혈중 지질 및 관련 효소활성⁷과 고지혈증에 대한 연구⁸, 혈압 및 angiotensin 변환효소에 미치는 영향⁹ 등의 보고가 있었고, 최근에는 nitric oxide의 제거¹⁰, superoxide dismutase(SOD) 활성 증가¹¹, 새로운 항산화 활성물질 piceatannol의 분리¹²에 대한 연구가 보고 되었다.

中風 급성기의 二便不利, 腑氣不通症에 通腑瀉下 治法과 관련하여¹³ 大黃의 뇌신경손상 보호 및 방어 효능을 관찰할 수 있을 것으로 생각되나, 이에 대해서는 in vitro 실험에서 大黃의 체온저하와 뇌허혈초기 신경손상방어에 의한 신경세포 보호효과^{14,15}에 대한 연구만이 보고되어 있다.

이에 본 연구에서는 뇌허혈에서 大黃의 신경세포 보호효과와 작용기전을 老齡 흰쥐에서 확인하기 위하여, 18개월령의 흰쥐를 사용하여 뇌허혈 후 뇌조직에서 매우 빠른 반응을 나타내는 유전자들에 의한 c-fos 및 c-jun 단백질의 발현정도를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材 料 및 方 法

1. 재료

1) 약물의 조제 및 투여

실험에서 사용된 大黃(Rhei rhizoma)은 대한 약전 및 대한 약전 외 한약 규격주해¹⁶에 근거하여 동국대학교 강남한방병원에서 구입하였으며, 대황 200g을 일반적인 물추출액 제조방법에 의하여 약재 4g당 736.0mg의 물추출액을 얻었다. 약물은 뇌허혈 유발 2시간 및 6시간 후 총 2회 경구투여 하였으며, 1회 투여량은 12.3mg/100g으로 하였다.

2) 동물

본 연구는 바이오지노믹스(주)에서 구입한 18개월 (750~900g)된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하

였다. 흰쥐는 온도(21~23℃), 습도(40~60%) 및 조명(12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

3) 실험군의 구분

뇌허혈을 유발하기 위한 수술과정 중 저혈압 유발과 총경동맥의 폐쇄 이외의 모든 수술과정을 시행한 비교군을 sham군(Sham), 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 8분간 폐쇄하여 뇌허혈을 유발한 군을 대조군(Control), 저혈압 상태에서 대조군과 동일하게 뇌허혈을 유발하고 大黃추출물을 경구투여한 군을 실험군(Sample)으로 각각 구분하였다. 각 실험군은 18개월된 흰쥐 6마리씩으로 구성하였다.

2. 방법

1) 뇌허혈 손상 유발

뇌허혈은 Chan 등¹⁷의 방법에 따라 저혈압 상태에서 양측 총경동맥에 Transient global ischemia(이하 TGI) 방법을 적용하였다. 70% N₂O와 30% O₂의 혼합 가스에 5% isoflurane으로 마취를 시작하여, 수술시 1.5~2%의 농도로 마취를 유지하였으며, 체온은 feed back-regulated heating pad로 수술 전과정 동안 37.0±0.5℃로 조절하였다. 양측 서혜부의 대퇴동맥을 노출시킨 후 PE-50 polyethylene catheter를 장착시키고, 한 쪽에는 phygiograph를 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 5분동안 안정기를 두었다. 저혈압의 유도는 Chan 등¹⁷의 방법과 Sugawara 등¹⁸의 연구결과에 근거하여 평균동맥혈압이 40mmHg가 유지되도록 한쪽 대퇴동맥으로부터 빠르게 혈액을 제거하였다. 저혈압이 유발된 즉시 전경부의 폐쇄고리를 당기고 metal clip으로 양측 총경동맥을 폐쇄(bilateral common carotid artery occlusion, 이하 B CAO)하여 뇌허혈을 유발시켰다. 뇌허혈 유발 8분 후에 양측 총경동맥을 폐쇄한 metal

clip을 제거하여 혈행을 재개통하고, 대퇴동맥을 통하여 혈액을 재주입하여 혈압을 정상으로 회복시켰다. 상처부위를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다.

2) 뇌조직의 처리

TGI 유발 24시간 후 각각의 실험동물에 sodium pen tobarbital을 복강주사하여 깊이 마취시킨 다음 개흉하고, 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline(이하 PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류시켰다. 뇌를 두개골로부터 적출하고 약 24시간 정도 후고정한 후, sucrose 용액에 넣어 침전시켰다. -40℃의 dry ice-isopentane에서 동결시키고, 조직절편 제작시까지 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50 μ m 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

3) c-fos 및 c-jun 면역조직화학염색

선택한 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 세척하고, 1% H₂O₂에서 10~15분간 반응시킨 후 3회 세척하였다. 10% normal horse serum(Vectastain)과 bovine serum albumin(Sigma co.)이 포함된 PBS를 blocking solution으로 사용하여 1시간동안 반응시킨 후 3회 세척하였다. c-fos 및 c-jun antibody(mouse monoclonal IgG, Oncogene Science)를 PBS와 Triton X-100을 혼합한 용액에 1:200의 비율로 희석시켜 4℃에서 약 16시간동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법(ABC Vectastain Kit)에 따라 한 시간씩 반응시켰다. NiCl₂ · H₂O(Sigma co.)를 혼합한 diaminobenzidine-tetrachloride(Sigma co.)에서 5~10분간 발색시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2~3시간 건조시킨 후 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

4) c-fos 및 c-jun 발현에 따른 보정광밀도의 측정

해마의 CA1, CA2, CA3, DG구역의 c-fos 및 c-jun 발현에 따른 흑백 보정광밀도 (normalized optical density, 이하 NOD)의 측정은 CCD 카메라와 영상분석시스템이 부착된 광학현미경과 NIH Image software를 사용하여 측정하였다. c-fos 및 c-jun 발현을 면역조직화학적으로 염색한 해마 조직의 각 부위를 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고, 해마의

기준구역과 측정하고자 하는 구역의 광밀도(optical density)를 256등급의 흑백농도 (grey level)에 따라 측정하여, 측정구역의 측정값을 기준구역의 측정값에 대하여 표준화하는 방법으로 NOD를 계산하였다. 기준구역은 CA1 하부의 해마 실질조직 부위로 하였다.

3. 통계처리

실험결과 분석은 약물을 투여한 실험군을 허혈 유발 대조군과 각각 비교하는 Student's t-test를 사용하였다.

III. 實驗成績

1. 해마 CA1, CA2, CA3, DG 구역에서 c-fos 및 c-jun 발현의 변화

c-fos 발현은 sham군에서는 관찰되지 않거나 일부 실험동물에서 해마 CA1 부위와 DG 부위에서 미약하게 관찰되었다. 대조군에서는 해마 전 영역에서 현저히 증가되었으며, 특히 CA1 부위와 DG 부위에서 명확한 증가가 관찰되었다. 실험군에서는 전반적 감소가 관찰되었다. c-jun 발현은 sham군에서는 관찰되지 않았다. 대조군에서는 해마 전영역에서 현저하게 증가하였으나, 전체적으로 c-fos 발현 정도에는 미치지 못하였다. 실험군에서는 전반적으로 감소가 관찰되었다.

2. 해마 CA1, CA2, CA3, DG 구역에서 c-fos 발현에 따른 보정광밀도의 변화

Sham군에서는 CA1 구역에서 13.8 ± 1.3 , CA2 구역에서 18.1 ± 1.5 , CA3 구역에서 5.6 ± 1.4 , DG 구역에서 19.2 ± 1.5 로 나타났다. 대조군에서는 CA1 구역에서 103.9 ± 5.4 , CA2 구역에서 69.0 ± 3.4 , CA3 구역에서 55.8 ± 3.0 , DG 구역에서 94.5 ± 3.2 로 나타났다. 실험군에서는 CA1 구역에서 58.3 ± 9.6 로 대조군에 비하여 $P < 0.01$, CA2 구역에서 44.0 ± 7.9 로 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 감소를 나타내었다. CA3 구역에서는 36.2 ± 9.4 로 대조군에 비하여 감소는 하였으나, 유의성은 없었다. DG 구역에서는 52.2 ± 9.8 로 대조군에 비하여 $P < 0.01$

Table 1. Changes of the Normalized Optical Densities depending on c-fos Expression in Hippocampus of the Aged bilateral common carotid artery occlusion(BCAO) Rats

Groups	Sub-Regions of Hippocampus			
	CA1	CA2	CA3	DG
Sham	13.8 ± 1.3	18.1 ± 1.5	5.6 ± 1.4	19.2 ± 1.5
Control	103.9 ± 5.4	69.0 ± 3.4	55.8 ± 3.0	94.5 ± 3.2
Sample	58.3 ± 9.6**	44.0 ± 7.9*	36.2 ± 9.4	52.2 ± 9.8**

Sham; Sham operated group without Hypotension and BCAO on the aged Rats

Control; Group operated with 40 mmHg of Hypotension and BCAO for 8 Minutes on the aged Rats

Sample; Group treated with Rhei rhizoma Extract after 40 mmHg of Hypotension and BCAO for 8 Minutes on the aged Rats

Data demonstrated Mean ± Standard Error.

* : statistical significance

(* : P<0.05, ** : P<0.01 was compared with control group)

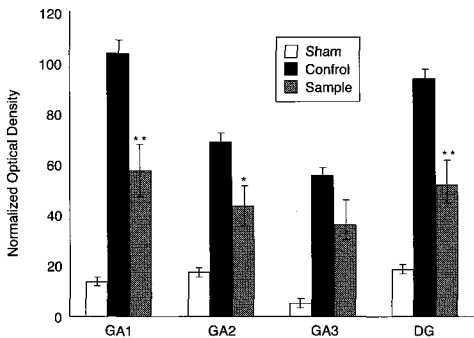


Fig. 1. The normalized optical Densities Depending on c-fos Expression in Hippocampus of the aged BCAO Rats with immunohistochemical Staining.

Strong c-fos expressions induced by the BCAO in CA1, CA2 and DG were reduced significantly by the Treatment of *Rhei rhizoma* Extract. Sham group operated Group without Hypotension and BCAO on the aged Rats. Control Group operated with 40 mmHg of Hypotension and BCAO for 8 Minutes on the aged Rats. Sample Group treated with Rhei rhizoma Extract after 40 mmHg of Hypotension and BCAO for 8 Minutes on the aged Rats.

; statistical significance (; P<0.05, **; P<0.01 was compared with control group)

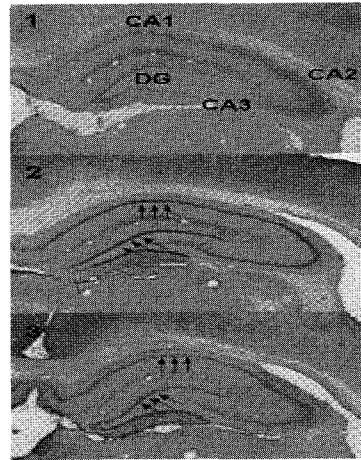


Fig. 2. Immunohistochemical Expressions of c-fos in Hippocampus of the aged BCAO Rats.

Section 1 shows the Sham operated Group. Section 2 shows the strong Expression of c-fos on CA1 and DG in Hippocampus of the aged BCAO Rats(Control group). Section 3 demonstrates the significant Decrease of c-fos Expression, compared to the control Group, Following the Treatment of *Rhei rhizoma* Extract(Sample group).

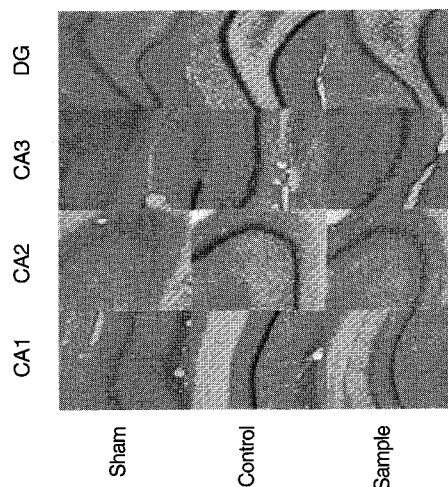


Fig. 3. Immunohistochemical Expressions of c-fos in Hippocampal sub-regions of the aged BCAO Rats.

Strong c-fos Expressions induced by the BCAO in CA1, CA2 and DG were reduced significantly by the Treatment of *Rhei rhizoma* Extract.

Table 2. Changes of the Normalized Optical Densities depending on c-jun Expression in Hippocampus of the Aged BCAA Rats

Groups	Sub-Regions of Hippocampus			
	CA1	CA2	CA3	DG
Sham	4.5±1.1	6.7±1.8	4.1±0.6	3.8±0.8
Control	36.8±2.6	25.7±3.2	21.8±1.9	27.2±3.7
Sample	24.6±3.5*	20.4±1.4	19.1±1.2	21.5±3.8

Sham; Sham operated group without Hypotension and BCAA on the aged Rats

Control; Group operated with 40 mmHg of Hypotension and BCAA for 8 Minutes on the aged Rats

Sample; Group treated with Rhei rhizoma Extract after 40 mmHg of Hypotension and BCAA for 8 Minutes on the aged Rats

Data demonstrated Mean ± Standard Error.

*: statistical significance

(*: P<0.05, **: P<0.01 was compared with control group)

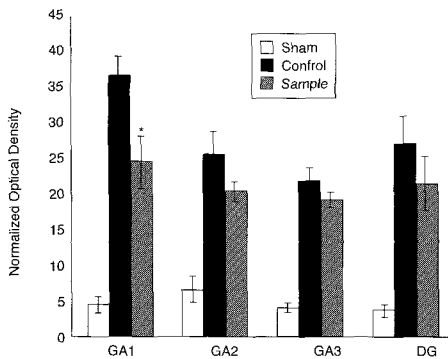


Fig. 4. The normalized optical Densities Depending on c-jun Expression in Hippocampus of the aged BCAA Rats with immunohistochemical Staining.

Strong c-jun expressions induced by the BCAA in CA1 was reduced significantly by the Treatment of *Rhei rhizoma* Extract. Sham group operated Group without Hypotension and BCAA on the aged Rats. Control Group operated with 40 mmHg of Hypotension and BCAA for 8 Minutes on the aged Rats. Sample Group treated with Rhei rhizoma Extract after 40 mmHg of Hypotension and BCAA for 8 Minutes on the aged Rats.

; statistical significance (; P<0.05 was compared with control group)

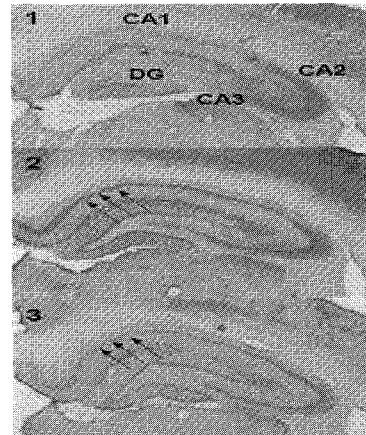


Fig. 5. Immunohistochemical Expressions of c-jun in Hippocampus of the aged BCAA Rats.

Section 1 shows the Sham operated Group. Section 2 shows the significant increase of c-jun Expressions in Hippocampus of the aged BCAA Rats(Control group). Section 3 demonstrates the significant Decrease of c-jun Expression in CA1, compared to the control Group, Following the Treatment of *Rhei rhizoma* Extract(Sample group).

의 유의한 감소를 나타내었다(Table 1, Fig. 1, 2, 3).

3. 해마 CA1, CA2, CA3, DG 구역에서 c-jun 발현에 따른 보정광밀도의 변화

Sham군에서는 CA1 구역에서 4.5±1.1, CA2 구역에서 6.7±1.8, CA3 구역에서 4.1±0.6, DG 구역에서 3.8±0.8로 나타났다. 대조군에서는 CA1 구역에서 36.8±2.6, CA2 구역에서 25.7±3.2, CA3 구역에서 21.8±1.9 및 DG 구역에서 27.2±3.2로 나타났다. 실험군에서는 CA1 구역에서 24.6±3.5으로 대조군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 감소를 나타내었으며, CA2 구역에서는 20.4±1.4, CA3 구역에서는 19.1±1.2, DG 구역에서는 21.5±3.8로 모두 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 2, Fig. 4, 5).

IV. 考 察

허혈성 뇌졸중은 中風의 범주에 속하는데, 中風은 病情의 변화가 多變하고 暴急한 특징을 가지고 있다.

의식, 운동, 언어장애들과 특히 인체의 濕痰, 瘀血 또는 氣血의 불균형 등 병리적 素因들로 인하여 心煩易怒, 胸悶, 煩躁不寧, 大便秘結, 小便短赤, 面紅, 目赤, 口乾, 口渴, 冷飲, 舌紅, 苔厚膩 등과 같은 火熱의 증후를 나타내기 쉽다. 따라서 임상에서 中風 급성기의 경우 清熱瀉火 및 通腑法을 이용한 치료법들이 많이 활용되고 있다^{13,19}.

大黃은 마디풀과에 속한 다년생 초목의 뿌리 줄기로⁵, 神農本草經에 “味苦寒, 下瘀血, 血閉, 寒熱, 破癥瘕積聚, 留飲宿食, 蕩滌腸胃, 推陳致新, 通利水穀, 調中化食, 安和五臟”라 하였으며²⁰, 清熱攻下, 瀉火解毒, 活血祛瘀, 清熱燥濕 등의 效能이 있어, 中風 급성기의 卒然仆倒, 不省人事, 半身不遂와 동반되어 나타나는 二便不利, 精神不安, 頭痛, 頭暈 등의 증상에 사용되어 왔다⁹. 중풍 급성기에 주로 활용되는 三化湯²¹, 六一順氣散²², 清肺瀉肝湯²³ 등의 주요구성약재로 실험적 연구로는 瀉下劑의 신경보호효과에 대한 보고는 있었으나, 이러한 瀉下劑의 주된 약물인 大黃이 신경세포에 미치는 영향에 관해서는 안⁴ 등의 연구 보고 이외에는 찾아보기 어려웠다.

中風은 老齡에 호발하는 질환으로, 실험적으로도 老齡의 실험동물에서 韓藥物의 효능을 관찰하는 것이 효과적이지만, 老齡의 실험동물을 사용한 연구보고는 거의 찾아보기 어렵고, 실험동물모형에서는 거의 대부분 건강하고 젊은 실험동물을 사용하고 있다²⁴. 고혈압이 뇌졸중의 중요한 한 원인요소인 것과 관련하여 자발성 고혈압 흰쥐(SHR)를 사용한 연구는 많이 이루어졌으나, 노령이 중요한 원인요소인 뇌허혈에서는 나이가 감안된 실험동물모형 연구는 거의 없었다. 젊은 흰쥐와 노령 흰쥐에서 국소 뇌허혈을 유발하고 그 결과를 비교 연구한 보고에 의하면, 뇌경색의 크기가 연령 의존적으로 증가하였으며²⁵, 신경검사지표에 따른 신경학적 결함을 관찰한 결과 젊은 흰쥐에서는 즉시적이고 심한 손상 후에 회복기전이 진행되는 것에 비하여 노령 흰쥐에서는 손상이 지속적이고 회복기전이 제대로 진행되지 못하는 특징이 관찰되었다²⁶.

뇌졸중의 실험연구에 타당성 있는 원인요소를 감

안한 실험동물모형을 사용하는 것이 약물의 효능을 확인하는 방법으로 생각되어, 본 연구에서는 18개월 된 老齡 흰쥐에 일시적인 뇌허혈 손상을 유발한 후 뇌세포의 손상억제 및 보호효과를 면역조직화학적 염색을 통해 해마 부위에서 c-fos와 c-jun 단백질이 발현정도를 조사하였다.

c-fos와 c-jun은 immediate early genes(이하 IEGs)에 의하여 발현되는 단백질들이다. IEGs는 중추신경계에서 다양한 요소들에 의해 발현이 유도된다. 그 예로 kindling, long-term potentiation, nociception 시 발현이 유도되고, 병적인 상태로 간질, 허혈 시에도 이러한 유전자의 발현을 볼 수 있다. IEGs는 세포의 성장과 분열, 분화와 발달에 관여하며, 신경세포사, 축삭 발아 시 중요한 역할을 하며 다른 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다^{27,28}.

뇌허혈은 즉시적으로 뇌조직에서 생화학적인 변화를 야기시키며, 뇌허혈이 유발된 후 수분 이내에 신경세포 유전자들의 발현 증가가 나타나는데, 이러한 매우 빠른 반응을 나타내는 유전자들이 IEGs이다²⁷. 뇌허혈은 IEGs 발현의 강력한 자극요소이다. mRNA 발현의 해부학적 위치를 알 수 있는 in situ hybridization 방법을 사용한 실험연구에 의하면 IEGs 발현 증가가 뇌허혈에 가장 민감한 것으로 알려진 해마의 DG, CA1, CA3의 추체신경세포, neocortex, 소뇌의 Purkinje cells 등에서 c-fos 및 c-jun mRNA 발현을 크게 증가시킨다고 하였다²⁹. 또한 미약한 국소 뇌허혈에서는 IEGs 발현이 허혈영역에만 제한되어 나타나지만 심한 국소 뇌허혈에서는 IEGs 발현이 허혈영역 밖에서도 광범위하게 관찰되었다³⁰. 뇌허혈 시간이 30분에서 90분으로 증가되면 IEGs의 발현이 허혈영역의 외부에서는 물론 반대측 해마에서도 관찰되며³¹, 흰쥐에서 영구적으로 중대뇌동맥을 폐쇄한 경우에는 중대뇌동맥이 혈액공급을 하는 부위는 물론 반대측의 대뇌피질 구조들에서도 c-fos와 c-jun 및 zif/268의 발현이 관찰되었다³². 또다른 국소 뇌경색 모형에서는 thalamus, lateral and medial geniculate nuclei 및 substantia nigra 등 심부구조에서도 c-fos와 jun-B의 발현이 관찰되었다^{30,33}. 이에 따라 뇌허혈 후에 IEGs 발현으로 나타나는

c-fos, fos-B, c-jun, jun-B 및 jun-D 단백질의 면역화학적 반응이 뇌허혈 손상의 지표로 사용된다.

뇌허혈을 유발한 후 6, 12, 24, 48, 72시간에 해마에서 c-fos 및 c-jun 발현을 관찰한 실험에 의하면 c-fos와 c-jun 모두 6시간에 나타나기 시작하여 24시간에 최고점에 이르고 48시간부터는 발현을 관찰할 수 없었다고 하였다²⁴. 본 연구에서는 실험에 사용될 수 있는 노령 흰쥐의 수적 제한 등에 의하여 다양한 시간대에 걸쳐 관찰할 수 없어 위와 같은 연구결과에 근거하여 c-fos와 c-jun의 발현이 가장 현저한 뇌허혈 유발 후 24시간에 大黃의 효능을 관찰하였다.

본 연구 결과, c-fos 및 c-jun 발현은 sham군에서는 발현이 관찰되지 않거나 일부 실험동물에서 해마 CA1 부위와 DG 부위에서 미약하게 발현된 것이 관찰되었다. c-fos는 정상상태에서는 발현되지 않는 것이 일반적인데 미약하게 발현된 결과는 사육 환경의 변화 및 수술 등의 스트레스에 의한 것으로 추정된다. 대조군에서는 해마 전 영역에서 c-fos의 발현이 현저하게 증가되었는데, 특히 CA1 부위와 DG 부위에서 증가가 확실하게 관찰되었다. c-jun의 발현이 역시 현저하게 증가되었으나 발현 강도는 전체적으로 c-fos 발현 정도에는 미치지 못하였다.

c-fos와 c-jun 발현을 정량적으로 관찰한 결과, 실험군은 CA1 구역에서 c-fos와 c-jun 발현 모두가 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. CA2 및 DG 구역에서도 c-fos 발현은 大黃 투여에 의하여 유의하게 감소되었으나, c-jun의 발현에는 큰 영향이 없었다.

해마 중 CA1 구역의 추체신경세포들은 뇌허혈에 가장 민감하게 반응하는 신경세포로 CA1 추체신경세포가 나타내는 세포수의 변화, 각종 유전자 및 단백질 발현의 변화 등은 뇌허혈에 대한 신경세포 손상 기전에 대한 연구와 약물의 신경손상에 대한 보호효능을 연구하는데 가장 흔히 사용되는 지표이다. 따라서 뇌허혈에 의하여 증가된 CA1 구역의 c-fos 및 c-jun 발현이 大黃 투여에 의하여 유의하게 감소되었다는 결과는 大黃이 IEGs 조절작용을 통하여 뇌허혈 신경세포손상에 대하여 보호효능을 가지고 있다는 것을 직접적으로 보여주는 결과이다.

이러한 大黃의 효능이 老齡의 흰쥐에서만 나타나는 특징적인 것인지 본 연구만으로는 명확히 알 수 없으므로, 향후 젊은 흰쥐에서의 효능과 老齡 흰쥐에서의 효능 등 비교연구 및 기전에 대한 지속적인 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

이상의 결과로 볼 때 大黃이 뇌허혈 손상 초기에 신경세포 보호작용이 있어 신경세포 손상을 감소시키는 효능이 있을 것으로 생각된다.

V. 結 論

18개월된 노령 흰쥐를 사용하여 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법으로 뇌허혈을 유발한 다음 大黃을 경구투여하고, 해마 각 부위에서 c-fos와 c-jun 발현을 면역조직화학염색을 통하여 大黃의 신경세포 손상 보호작용을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 뇌허혈 유발 후 해마 전 영역에서 c-fos 발현을 관찰한 결과, 大黃 추출물을 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 해마 전영역에서 발현이 감소하였다.
2. 해마 각 구역에서 c-fos 발현에 따른 보정광밀도를 측정된 결과, 실험군의 CA1, CA2 및 DG 구역에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.
3. 뇌허혈 유발 후 해마 전 영역에서 c-jun 발현을 관찰한 결과, 大黃 추출물을 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 해마 전 영역에서 발현이 감소하였다.
4. 해마 각 구역에서 c-jun 발현에 따른 보정광밀도를 측정된 결과, 실험군의 CA1 구역에서만 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.

參 考 文 獻

1. 강성돈, 정진원, 문병순, 김중돈. 뇌졸중의 역학적 동향에 대한 연구. 대한신경외과학회지. 1999;28:509-13.
2. 전국한의과대학 심계내과학교실. 심계내과학. 서울:

- 서원당; 1999, 420-32.
3. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울:행림사; 1995, 242-3.
 4. 김호철, 안덕균. 대황과의 배합전당이 대황 증 senno side b의 추출량에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1996;11(1):75-8.
 5. 김도완, 박창국. 전탕시간에 따른 생대황(生大黃) 및 주대황(酒大黃)이 어혈병태모형에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1998;19(1):114-33.
 6. Park EK, Choo MK, Yoon HK, and Kim DH. Antithrombotic and antiallergic activities of rhaponticin from *Rheum rhizoma* are activated by human intestinal bacteria. Arch Pharm Res. 2002;25(4):528-33.
 7. 손영중, 김운상, 이영중. 대황이 고지혈증 흰쥐의 혈중지질 및 효소활성에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1999;14(1):61-8.
 8. 이영중. 대황 전탕액 분획이 고지사료 투여 흰쥐의 혈중 지질 함량에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2000;15(2):87-93.
 9. Sanae F, Komatsu Y, Chisaki K, Kido T, Ishige A, Hayashi H. Effects of San' o-shashin-to and the constituent herbal medicines on theophylline-induced increase in arterial blood pressure of rats. Biol Pharm Bull. 2001;24(10):1137-41.
 10. Yokozawa T, Chen CP, Tanaka T. Direct scavenging of nitric oxide by traditional crude drugs. Phytomedicine. 2000;6(6):453-63.
 11. Tian J, Du H, Yang H, Liu X, Li Z. A clinical study on compound da huang (radix et rhizoma rhei) preparations for improvement of senile persons' memory ability. J Tradit Chin Med. 1997;17(3):168-73.
 12. 오성준, 백남인, 김해영. 대황 (*Rheum undulatum* L.) 뿌리의 항산화 활성물질, Piceatannol. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol. 2001;44(3):208-10.
 13. 박중양, 변일. 중풍치료에 있어서 淸熱瀉火法에 대한 문헌적 고찰. 대한한방내과학회지. 1991;12(1):155-65.
 14. 안덕균, 원도희, 김중호. 4-vessel occlusion으로 유발한 흰쥐 전뇌허혈의 신경세포 손상에 대한 대황의 방어 효과. 대한본초학회지. 1999;14(1):111-20.
 15. 오경환. 大黃이 뇌허혈 유발 老齡 흰쥐의 해마 손상 및 HSP70 발현에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2002.
 16. 지형준. 대한약전 및 대한약전외 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인덱스사; 1998, 577-8.
 17. 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. 1998;18(20):8292-9.
 18. 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. 2000;877:281-7.
 19. 이원철. 腦卒中 急性期에 응용되는 下法에 대한 연구. 대한한의학회지. 1998;19(1):385-91.
 20. 孫星衍 輯. 神農本草經. 臺北:文光圖書有限公司; 1979, 67.
 21. 김동은, 정승현, 박인식, 신길조, 이원철. 三化湯이 중대뇌동맥 결찰로 유발된 뇌허혈에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(2):127-34.
 22. 정승현, 신길조, 이원철. 六一順氣散 抽出物이 생쥐의 全腦虛血에 미치는 영향. 동국한의학회연구논문집. 1997;7(2):149-54.
 23. 오연환, 정승현, 박인식, 신길조, 이원철. 淸肺瀉肝湯이 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(2):161-74.
 24. Millikan C. Animal stroke model. Stroke. 1992;23:795-7.
 25. Kharlamov A, Kharlamov E, Armstrong DM. Age-dependent increase in infarct volume following photochemically induced cerebral infarction: putative role of astroglia. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2000; 55(3):B135-41.
 26. Shapira S, Spir M, Wengier A, Grauer E, Kadar T. Aging has a complex effect of a rat model of ischemic stroke. Brain Res. 2002;925:148-58.
 27. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate Early Gene Expression in Response to Cerebral Ischemia; Friend or Foe Stroke. 1996;27:1682-7.
 28. 김신국, 이용만, 방선웅, 이애영, 김재문, 유택근, 이영호. 벤자틴 페니실린에 의해 유도된 국소 발작간 질양 파형이 백서 대뇌에서 c-jun 단백질 발현 양상에 미치는 영향. 대한신경과학회지. 2000;18(5):617-23.
 29. Neumann-Haefelin T, Wiessner C, Vogel P, Back T, Hossmann KA. 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;14:206-16.
30. Kinouchi H, Sharp FR, Chan PH, Koistinaho J, Sagar SM, Yoshimoto T. Induction of c-fos, junB, c-jun, and hsp70 mRNA in cortex, thalamus, basal ganglia, and hippocampus following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:808-17.
31. An G, Lin T-N, Liu J-S, Xue J-J, He Y-Y, Hsu CY. Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. *Ann Neurol.* 1993;33:457-64.
32. Collaco-Moraes Y, Aspey BS, de Belleruche JS, Harrison MJ. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to MK-801. *Stroke.* 1994;25:1855-60.
33. Kinouchi H, Sharp FR, Chan PH, Mikawa S, Kamii H, Arai S, Yoshimoto T. MK-801 inhibits the induction of immediate early genes in cerebral cortex, thalamus, and hippocampus, but not in substantia nigra following middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett.* 1994;179:111-4.
34. Gilby KL, Armstrong JN, Currie RW, Robertson HA. The effects of hypoxia-ischemia on expression of c-fos, c-jun and Hsp70 in the young rat hippocampus. *Mol Brain Res.* 1997;48:87-96.