

加味柴胡湯이 뇌허혈시 Glutamate receptor, free radical 및 뇌손상 보호에 미치는 영향

오병열, 김민상, 유병찬, 최영, 설인찬
대전대학교 한의과대학 내과학교실

Study on the Effect of *Gamisihotang*(GSHT) on Glutamate Receptor, Free Radical and Brain Damage in Rats Subjected to Brain Ischemia

Byung-Yul Oh, Min-Sang Kim, Byeong-Chan Yu, Young Choi, In-Chan Seol

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, DaeJeon University, Daejeon, Korea

Objectives : This study was undertaken to prove the effect of GSHT on the glutamate receptor, free radical and brain damage in rats subjected to brain ischemia.

Methods : Levels of cultured cortical neuron death caused by toxic chemicals were measured by LDH release assay. Neuroprotective effects of GSHT on brain tissues were examined in vivo by ischemic model of middle cerebral artery (MCA) occlusion.

Results : GSHT showed significant inhibitory effect on LDH release induced by NMDA-kinate-Fe²⁺. GSHT remarkably decreased coma duration time in a nonfatal dose of KCN and showed higher survival rate in a fatal dose. GSHT remarkably decreased ischemic area and edema induced by the MCA blood flow block. GSHT showed high improvement of forelimb and hind limb test after MCA occlusion in neurological examination. GSHT showed no significant change after MCA occlusion in pathological observation of the normal group.

Conclusions : These results indicate that GSHT can be used to treat the brain damage caused by brain ischemia. Further study will be needed about the functional mechanism, etc.

Key Words: *Gamisihotang* (GSHT), glutamate receptor, free radical, brain damage

서론

허혈성 뇌혈관 질환은 뇌에 혈류를 공급하는 혈관에 여러 가지 형태의 병리학적 이상이 발생되어 국

소적으로 정상적인 뇌혈류 장애를 초래하게 되는 질환을 말하는 것이다¹⁾. 이러한 허혈성 뇌혈관질환으로 인한 사망률은 우리나라에서 매우 높은 편이며²⁾ 뇌졸중 후에 발생하는 후유증으로 인한 생산성저하 및 정신적인 장애 등은 사회적인 문제로까지 대두되고 있다³⁾.

허혈성 뇌혈관질환의 발생시 혈관계쇄로 인하여 산소와 혈당공급이 중단되고, 세포막의 붕괴와 에너지 생산과정의 왜해로 세포대사에 이상을 초래하게

· 접수 : 2004년 6월 1일 · 논문심사 : 2004년 7월 20일
· 채택 : 2004년 7월 28일
· 교신저자 : 오병열, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9 대전대
부속청주한방병원
(Tel: 043-229-3800, Fax: 043-253-8757, E-mail:
stn35@hanmail.net)

된다⁴⁾. 이러한 뇌허혈 발작시에 초래되는 생리적·임상적 결과는 혈류량 감소의 정도와 지속시간 등에 의하여 결정되는데¹⁵⁾, 어느 정도의 뇌혈류량 감소는 보상기전이 작용하여 신경조직 내에 공급되는 혈류 부족에 따른 영향을 조절할 수도 있으나 지속적이면서 뇌허혈 부위가 확대되는 경우에는 뇌조직의 대사 작용에 영향을 미치게 되는 것이다¹⁾.

뇌혈류 감소에 따른 일련의 세포대사 중에 산소 자유기가 형성되고 glutamate 등의 신경전달물질이 과다하게 방출되어 정상 신경조직에 독성 자극이 증가되어 뇌조직은 불가역적 손상을 입게 된다¹⁴⁾.

加味柴胡湯은 大柴胡湯에 山查肉을 가미한 처방으로 柴胡, 黃芩, 芍藥, 大黃, 枳實, 半夏, 山查肉으로 구성되어 解表祛風, 蕩滌熱結, 豁痰하는 효능을 가지고 있어 대전대학교 부속 한방병원에서 중풍초기의 치료에 사용되어온 처방이다.

이에 저자는 加味柴胡湯이 초기 중풍환자의 뇌신경세포를 보호하는 작용기전을 검증하여 신규 약물을 개발하고자 N-methyl-D-aspartate(NMDA), kainate, Fe²⁺로 유발된 뇌신경세포손상에 대한 방어작용, apoptosis에 대한 방어작용, potassium cyanide(KCN)을 이용한 전뇌허혈에 대한 효과 및 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 국소뇌허혈에 대한 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 180~250g의 Sprague-Dawley계(SD) 웅성 rat와 18~20g의 International Cancer Research계(ICR) mouse를 충북 음성에 있는 대한실험동물센터에서 구입하여 사용하였고, 실험 당일까지 고형 사료(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상 삼양사 배합 사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃, 상대 습도 50±10%, 조명 시간 12시간(07:00~19:00), 조도

Table 1. The Compositions of Gamisihotang(GSHT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	12
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	6
芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	6
大黃	<i>Rhei Radix et Rhizoma</i>	6
枳實	<i>Aurantii Immaturus Fructus</i>	4
半夏	<i>Ginseng Radix</i>	10
山查肉	<i>Crataegii Fructus</i>	4
Total amount		70

150~300Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약물

본 실험에 사용한 Gamisihotang 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 본초학 교실에서 검증한 후 사용하였다. 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 Sigma-Aldrich(St.Louis,MO)에서 구입한 ferrous chloride, cytosine arabinofuranoside, potassium cyanide (KCN), dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A), cresyl fast violet, paraformaldehyde, 3.8% sodium citrate, 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride와 중외제약(Korea)에서 구입한 gerorane(Enflurane 제제), normal saline과 Bayer Dental(Japan)에서 구입한 xantopren VL, optosil-xantopren activator 및 Sigma Co.(U.S.A.)에서 구입한 kainte, Fe²⁺(ferrous chloride), NMDA(N-methyl-D-aspartate) 등을 사용하였다.

기기는 deep freezer(Sanyo Co., Japan), serum separator(녹십자, Korea), micro slide(Surgipath Co., U.S.A.), minos-ST(Cobas Co., France), centrifuge(Beckman Co., U.S.A.), rotary vaccum evaporator(Buchi 461, Swiss), freeze dryer(Eyela Co., Japan), autoclave(Hirayama, Japan), ultrasonic cleaner(Branson Ultrasonics Corp., U.S.A.), roller mixer(Gowon scientific technology Co., Korea), vortex (Vision Co., Korea), brain matrix(ASI Instrument, Warren, MI.,

U.S.A.), Royal Multi-Plus(Royal Medical Co., Korea), camera(Nikon, Japan), ACL-100 (Instrumentation Laboratory, U.S.A.), physiograph Model 7(GRASS Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A.), optical microscope(Olympus BH-2., Japan), transmission electron microscope(Hitachi H-600, Japan), scanning electron microscope(Hitachi S-2500, Japan), 대용약탕기, 3M filter paper, oral zonde(대종기기, Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 제조

약탕기에 증류수 1,200ml과 GSHT 2칩을 넣은 후, 2시간 가열 추출, 침전물을 3회 여과하고, 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 -70℃ deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조한 후 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 대뇌 피질 신경세포 배양

신경세포의 배양을 위해서 15일 된 mouse 태아의 neocortex를 분리하여 조직을 단일 세포로 나눈 후 1×10^5 /well의 세포를 5% horse serum, 5% fetal bovine serum, 2mM glutamine, 21mM glucose가 포함된 Eagle's minimal essential media(Eagle's salts, supplied glutamine-free)인 배양액을 이용하여 100 μ g/ml poly-D-lysine과 4 μ g/ml laminine로 precoating된 24 well plate에 분주하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 3-5 일째에 glia의 번식을 억제하기 위해 Ara-C로 처리한 후, DIV 7-10 이후에 실험을 하였다.

3) 세포독성의 유발실험

DIV 12에서 14 이후의 대뇌피질세포에 실험이 행하여졌으며, NMDA 수용체에 의해 매개된 세포독성 유발실험은 20mM NaCl, 5mM KCl, 1.6mM MgCl₂, 2.3mM CaCl₂, 15mM glucose, 20mM HEPES와 10mM NaOH가 포함된 HEPES controlled salt solution에서 NMDA에 10분 동안 노출시킨 후 배양되었다. non-NMDA 수용체 혹은 유리기에 의해 매개

된 세포독성 유발실험은 21mM glucose가 포함된 최소한의 배지에서 kainate와 Fe²⁺에 지속적으로 노출시키며 배양되었다. 신경 세포사는 24시간 후 죽은 세포로부터 배지로 유리된 LDH 활성을 측정하여 정량화하였다.

4) 전뇌허혈 유발 실험

전뇌허혈 모델은 Schubert⁶⁾의 방법에 준하였다. GSHT 투여군은 하루에 20g ICR mouse를 기준으로 검액 5.6mg/20g/day을 생리식염수 0.2ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 1회 경구 투여하였다. 대조군은 검액을 녹일 때 사용한 동량의 생리식염수를 경구투여 하였다. 경구 투여 30분 후에 비치사량인 1.87mg/kg KCN을 ICR mouse 미정맥에 주사한 후 정향 반사를 소실한 후, 정향 반사를 회복할 때까지의 시간을 측정하였다. KCN 유발 생존시간 측정은 경구 투여 30분 후에 치사량인 3.0mg/kg KCN을 미정맥 주사하여 치사율을 측정했다.

5) 국소 뇌허혈 유발 실험 (Middle Cerebral Artery Occlusion: MCA)

SD rat 8마리를 1군으로 하여 대조군과 GSHT 투여군으로 구분하였다. 중대뇌동맥 폐쇄 2시간 전에 실험 rat의 체중을 측정하고 GSHT 56.6mg/200g/day을 생리식염수 2ml에 용해시켜 oral zonde를 이용하여 경구 투여한 후 중대뇌동맥 폐쇄 실험을 하고 마취에서 깨면 신경학적 검사를 하였다. 국소 뇌허혈 유발 24시간 후 희생하고 뇌절편 8개를 만들어 부종율과 허혈 면적을 계산하였다.

(1) Silicon rubber cylinder 제작

Silicon rubber cylinder 제작은 Nagasawa⁷⁾ 등의 방법에 따라 4-0 규격의 나일론 봉합사(Deknatel Inc., Japan)를 적당한 길이로 잘라 열을 가해 한 쪽 끝에 매듭을 만들었다. 총 길이를 18mm로 만든 후 경화제를 섞은 silicon을 약 0.3mm 두께로 매듭 반대편에 얇게 8mm 두께로 덧씌워 silicon rubber cylinder를 만들었다.

(2) 국소 뇌허혈 유발

Rat을 수술대에 고정시키고 Royal Multi-Plus(Royal Medical Co, Korea)를 사용하여 N₂O(아산

Table 2. The Neurologic Grade

	Grade	Neurologic examination
	0	No deficit
Fore- limb	1	Forelimb flexation when suspended by the tail
	2	Reduced forepaw resistance to lateral push
	3	Circulating behaviour during suspension(body twisting)
Hind- limb	0	Immediate placement of the behind back on to the table(normal)
	1	No limb placement / movement

화질소)와 O₂(산소)의 비율을 7:3으로 조정하여 enflurane로 흡입 마취하였다. Nagasawa¹²⁾의 방법에 따라 목 중양을 절개하고 미주 신경에 손상을 주지 않도록 주의하면서 우측 총경동맥, 내경동맥 및 외경동맥을 분리한 뒤 총경동맥과 외경동맥을 결찰하고 곧바로 외경동맥과 내경동맥의 분지에 매듭을 제외한 프로브 전체를 삽입한 뒤 삽입부위 바로 위쪽을 결찰함으로써 동측 중대뇌동맥을 폐쇄하였다.

(3) 허혈면적 및 부종을 측정

수술 24시간 후에 rat에서 뇌를 꺼내어 brain matrix(ASI Instruments, Warren, MI., U.S.A.)를 이용하여 2mm두께의 coronal brain slice를 얻은 후 이 중 8 slice만을 선택하여 2% triphenyltetrazolium chloride(TTC) 용액을 가하고 37℃에서 20분간 배양하였다. 배양 종료 후 바로 사진을 찍어 현상하고, 염색된 조직을 10% formalin neutral buffer로 고정시켰다. Coronal slice에서 허혈면적을 측정하였고, 허혈면적 및 부종율은 아래의 식에 의해 산출하였다⁸⁾.

$$\text{虛血面積(\%)} = \frac{C}{A+B} \times 100$$

$$\text{浮腫率(\%)} = \frac{A-B}{2 \times B} \times 100$$

A : 각 Coronal slice에서의 허혈이 유발된 대뇌 반구 면적(mm²)

B : 각 Coronal slice에서의 대측 대뇌 반구 면적(mm²)

C : 각 Coronal slice에서의 허혈 면적(mm²)

(4) 신경학적 검사

중대뇌동맥 폐쇄 후, 저산소증 유발 후 및 재관류 후에 대한 각각의 신경학적 검사를 실행하여 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 신경학적 결손 정도를 측정하였다. 신경학적 결손 정도는 Bederson⁹⁾의 방법에 의하여 그 정도를 forelimb은 4등급으로, hindlimb은 2등급으로 나누어 점수화 하였으며 증상에 따른 등급 분류는 Table 2와 같다.

(5) 조직학적 관찰

각 실험군으로부터 적출한 뇌조직은 전두엽으로부터 2mm 간격으로 절개한 다음 허혈성 손상의 육안적 정도를 파악하기 위해 각 부분들은 TTC 염색 후 즉시 4% paraformaldehyde 고정액에 24시간 동안 고정하였다. 고정이 완료된 각 조직들은 흐르는 수돗물에서 12시간 수세 후 통상의 방법에 따라 알코올 농도 상승순으로 탈수 및 xylene에 투명 과정을 거친 다음 파라핀 블록을 제작하였다. 허혈성 손상에 의한 신경세포의 손상 정도는 Nissl 소체에 대한 특수 염색으로, 파라핀 블록을 이용하여 4µm 두께로 파라핀 절편을 만들어 탈파라핀 및 함수과정을 거친 다음 0.1% cresyl fast violet 염색액에 실온에서 30분간 염색 후 95% alcohol로 탈색하고 탈수 및 투명과정을 마친 다음 봉입하여 광학현미경하에서 검경 및 사진 촬영하였다.

7) 통계처리

실험 결과는 unpaired student's t-test를 사용하여 통계처리 하였으며 p<0.05 이하의 수준에서 유의성을 검정하였다.

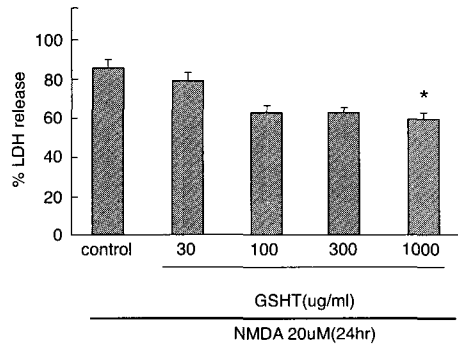


Fig. 1. The effect of GSHT on NMDA-induced excitotoxicity.

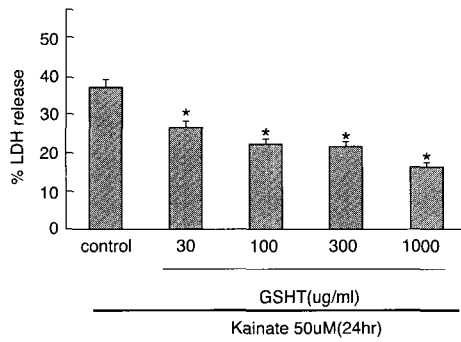


Fig. 2. The effect of GSHT on Kainate-induced excitotoxicity.

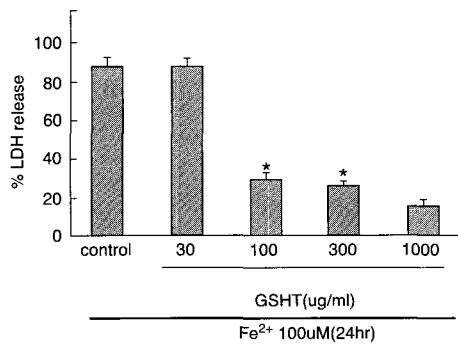


Fig. 3. Blockade of free radical neurotoxicity by GSHT.

Table 3. IC₅₀ of GSHT on Release of LDH Induced by MNDA, Kainate and Fe²⁺

	MNDA	Kainate	Fe ²⁺
IC ₅₀	> 1000 μg/ml	189.37 μg/ml	11.14 μg/ml

Table 4. The Duration of Coma in ICR Mice induced by KCN

Group	Sec
Control	289 ± 21.67
GSHT	180 ± 19.54

a): Mean ± Standard Error.

Control : 1.87mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of normal saline.

GSHT : 1.87mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of 5.6mg/20g of GSHT extracts.

Table 5. The Survival rate in ICR Mice induced by KCN

Group	%
Control	0
GSHT	40

a): Mean ± Standard Error.

Control : 3.0mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of normal saline.

GSHT : 3.0mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of 5.6mg/20g of GSHT extracts.

결 과

1. 세포 손상에 대한 방어효과

1) NMDA에 의한 세포 손상에 대한 방어효과

대조군은 86.10 ± 6.06(%), GSHT를 30, 100, 300, 1000 μg/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 79.19 ± 5.50(%), 63.92 ± 8.72(%), 63.01 ± 3.57(%), 60.40 ± 4.45(%로 나타나 1000 μg/ml 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 1).

2) Kainate에 의한 세포 손상에 대한 방어 효과

대조군은 37.04 ± 1.02(%), GSHT를 30, 100, 300, 1000 μg/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 26.65 ± 1.43(%), 22.57 ± 2.14(%), 22.03 ± 2.60(%), 16.45 ± 2.06(%로 나타나 농도 의존적으로 LDH 유리량을 억제하였고, 모든 농도에서 유의성 있는 결과가 나타났다(Fig. 2).

3) Fe²⁺에 의한 세포손상에 대한 방어 효과

대조군은 87.20 ± 13.33(%), GSHT를 30, 100, 300, 1000 μg/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 30.88 ± 2.15(%), 27.01 ± 7.07(%), 17.60 ± 1.59(%), 21.44 ± 1.08 (%)로 나타나 대조군에 비하여 모든 실험군에서 LDH 유리량을 억제하였고, 모든 농도에서 유의성 있는 결과가 나타났다(Fig. 3).

2. LDH 유리량 inhibitory concentration 50(IC₅₀)

MNDA에 의한 LDH 유리량 억제 IC₅₀은 1000 μg/ml 이상으로 나타났고, Kainate에서는 189.37 μg/ml로 나타났으며, Fe²⁺에 의한 유리량 IC₅₀은 11.14 μg/ml 농도로 나타났다(Tab:e 3).

3. 전뇌허혈에 대한 효과

1) KCN 유발 혼수 시간에 미치는 효과

비치사량의 KCN(1.87mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발된 ICR mouse의 혼수시간은 대조군이 289 ± 21.67sec, GSHT 투여군은 180 ± 19.54sec로 나타났다 (Table 4).

2) KCN 유발 생존율에 미치는 효과

치사량의 KCN(3.0mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발된 대조군의 생존율은 0%인데 비하여 GSHT 투여군은 40%의 생존율을 보였다(Table 5).

4. 국소뇌허혈에 대한 효과

1) 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적 및 부종율에 미치는 효과

중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적(Table 6)과 부종율(Table 7, Fig. 5)은 대조군에 비하여 GSHT 투여군에서 현저하게 감소 효과를 나타냈다.

Table 6. Ischemic Ratio in MCA Occluded SD Rats

No. of slices (n=4)	The mean extent of edema(%) control	The mean area of infarction (%) sample GSHT
1	31.57 ± 2.24	46.91 ± 3.39
2	35.94 ± 4.53	28.73 ± 6.32
3	38.87 ± 6.47	23.40 ± 5.18
4	45.61 ± 4.40	18.65 ± 3.41
5	40.21 ± 6.47	17.44 ± 1.19
6	25.71 ± 5.91	12.82 ± 6.45
7	3.09 ± 3.36	7.52 ± 2.24
8	ND	ND

a) : Mean ± Standard Error.

Control : Group after oral administration of normal saline.

ND : Not detectable.

GSHT : Oral administration of 56.6mg/200g of GSHT.

Table 7. Edema ratio in MCA occluded SD rats

No. of slices (n=4)	The mean extent of edema(%) control	The mean extent of edema(%) sample GSHT
1	15.67 ± 2.29	12.34 ± 1.34
2	18.95 ± 6.41	9.40 ± 3.32
3	20.11 ± 3.62	12.47 ± 5.08
4	25.10 ± 2.19	5.45 ± 6.08
5	11.08 ± 4.45	8.89 ± 5.11
6	7.80 ± 5.21	3.41 ± 1.08
7	ND	0.91 ± 4.34
8	ND	ND

a) : Mean ± Standard Error.

Control : Oral administration of normal saline.

ND : Not detectable.

GSHT : Oral administration of 56.6mg/200g of GSHT.

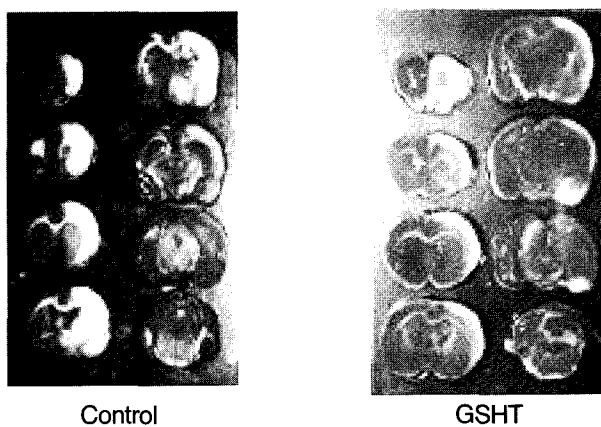


Fig. 5. Ischemic and edema in MCA occluded SD rats.

Table 8. The Neurologic Grade of Forlimb Test of Rat Treated with GSHT

Sample	Operation	Neurologic grade	
		Hypoxia	Recirculation
Control	3.00±0.00	2.66±0.33	2.66±0.33
GSHT	2.05±0.28	1.75±0.25	1.75±0.25

a) : Mean ± Standard Error.

Control : Oral administration of normal saline.

GSHT : Oral administration of 56.6mg/200g of GSHT.

Table 8. The Neurologic Grade of Hindlimb Test of Rat Treated with GSHT

Sample	Operation	Neurologic grade	
		Hypoxia	Recirculation
Control	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
GSHT	0.75±0.5	0.5±0.57	1.00±0.00

a) : Mean ± Standard Error.

Control : Oral administration of normal saline.

GSHT : Oral administration of 56.6mg/200g of GSHT.

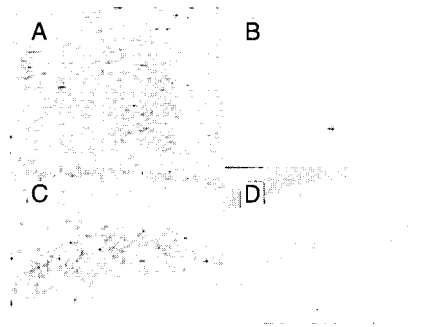


Fig. 6. Light micrographic appearance of the cerebral cortex and hippocampus, Cresyl fast violet stain, ×100.

A : Normal cerebral cortex portion B : Ischemic cerebral cortex portion

C : Normal hippocampal formation portion D : Ischemic hippocampal formation portion

2) 신경학적 검사

(1) Forlimb test

Forlimb test 결과, control은 3.00±0.00, 2.66±0.33, 2.66±0.33으로 결과가 나온대 비하여 GSHT 투여군은 2.5±0.28, 1.75±0.25, 1.75±0.25로 나타나 큰 호전현상을 나타내었다.(Table 8).

(2) Hindlimb test

Hindlimb test에서는 control은 1.00±0.00, 1.00±0.00, 1.00±0.00으로 결과가 나오는데 비하여 GSHT

투여군은 0.75±0.5, 0.5±0.57, 1.00±0.00로 큰 호전현상을 보였다(Table 9).

3) 조직학적 관찰 결과

(1) 대조군

대조군에서는 정상 대뇌반구 쪽에서 관찰되는 대뇌피질의 형태학적 소견으로는 6층의 대뇌 피질층(cortex layer)의 구분이 잘되고, 특히 제3층과 5층에 걸쳐 나타나는 큰 피라미드 세포(large pyramidal neuron)들이 cresyl fast violet 염색에 강한 염색성을

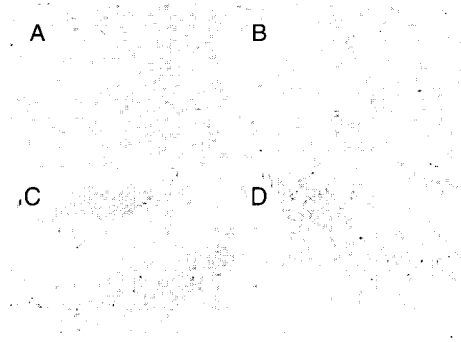


Fig. 7. Light micrographic appearance of the cerebral cortex and hippocampus. Cresyl fast violet stain, ×100.

A : Normal cerebral cortex portion B : Ischemic cerebral cortex portion
C : Normal hippocampal formation portion D : Ischemic hippocampal formation portion

보였다. 반면 허혈성 손상을 받은 대뇌반구의 피질영역에서는 대뇌 피질층의 구분이 어렵고 대부분의 세포핵들은 위축되고 세포간 경계는 불분명하고, 주변에는 크고 작은 공포(vacuole)들이 관찰되었다.

정상 대뇌 반구쪽의 해마형성체를 이루는 CA1~4 영역 부분과 치아이랑(dentate gyrus) 부근에서 관찰되는 신경세포들은 cresyl fast violet 염색에 강한 염색을 보이는 피라미드 세포들과 비교적 둥근 핵을 가진 과립세포들이 주로 관찰되었다. 반면 허혈성 손상을 받은 대뇌반구의 해마형성체 주변에서는 피라미드세포들은 거의 보이지 않고 주로 과립세포들과 작은 공포성 소포들이 관찰되었다(Fig. 6).

(2) GSHT 투여군

정상부위나 손상받은 쪽의 대뇌피질의 모두에서 조직학적 소견은 유사하였다. 해마형성체 주변에서는 손상 받지 않은 쪽에 손상받은 부위쪽의 CA1~CA4 영역 부분과 치아이랑 주변부의 피라미드 세포들이 약간 수적 감소가 의심되나 과립세포들은 변화를 보이지 않아 전체적인 조직학적 소견은 정상 부위와 같이 양호하였다(Fig. 7).

고 찰

뇌혈관 질환은 우리나라 성인의 제일 흔한 사망원인이다. 일반적으로 뇌혈관질환의 연간 발생비율은 지역마다 다소 차이가 있지만 인구 10만 명당 150-200으로 추정되고 있으며¹⁾, 이중 허혈성 뇌질환은 우리나라의 총 인구수를 약 4천만 명으로 가정할 때 매년 72,000명 정도의 환자가 전국적으로 발생된다고 추정할 수 있다¹⁰⁾.

뇌손상의 대표적 질환인 허혈성 뇌질환은 혈류량 감소가 초래되어 발생하는 질환으로¹¹⁾ 한의학에서 중풍의 범주에 속한다¹²⁾. 그 원인은 風, 火, 濕, 痰, 瘀血 및 虛 등이 있으며¹²⁾, 혈전에 대한 실험적 연구로 설¹³⁾의 補陽還五湯, 안¹⁴⁾의 加味通桂化瘀湯, 홍¹⁵⁾의 加味天麻鉤藤飲, 강¹⁶⁾의 清泡逐瘀湯이 있었으며, 瘀血을 血栓의 범주로 본 최¹⁷⁾는 中風의 瘀血論의 고찰과 活血化瘀法의 치료 근황이 있었다.

최근 뇌허혈로 인한 뇌세포괴사를 억제하는 연구는 NMDA channel과 관련된 glutamate 수용체의 차단과 free radical의 차단을 통한 뇌신경 보호에 그 중점을 두고 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

뇌허혈이 발생할 경우 비정상적으로 흥분성 아미노산 수용체가 과도하게 활성화되고 세포막의

phospholipid 대사를 활성화하며, 세포내로 과도한 칼슘이 유입되고 비정상적인 인지질 대사와 단백질 분해와 같은 일련의 반응들이 야기되어 세포 및 조직의 괴사에 관여하게 된다. 특히 glutamate의 역할은 흥분성 신경독성발현의 기전에서 중요한 자리를 차지하고 있다¹⁸⁾.

Glutamate나 aspartate 등은 아미노산계 신경전달물질로 허혈이 일어나는 과정에서 신경독성을 띠어 excitotoxins라고 불리우며¹⁸⁾, 이들은 적어도 3가지 종류의 수용체, 즉 NMDA receptor, quisqualate receptor, kainate receptor이며, 이들을 통하여 시냅스 후 세포막에 영향을 미친다. 이들 excitotoxin들에 의하여 일어나는 손상의 과정은 먼저 뇌신경세포에 산소의 공급이 중단되어 세포내 ATP생산이 감소되어 Na⁺-K⁺ pump가 올바르게 작용을 하지 못하게 한다. 이로 인해 세포의 K⁺ 농도가 증가하게 되어 시냅스 전 말단에서 탈분극이 일어나고 또한 glutamate에 의해서 작용되는 통로에 작용하여 Ca²⁺, Na⁺, Cl⁻와 물이 들어가게 된다. 정상적으로는 이 과정이 glial cell이나 시냅스 전 말단에 의해 glutamate가 재흡수되므로 제한이 되나 허혈상태나 ATP사용이 제한 될 경우 glutamate가 synaptic cleft에 남아 통로가 계속 열려있게 된다. 초기 세포사는 과도한 부종과 삼투압의 변화에 따른 세포막의 용해에 의해 일어나며, 지연성 세포사는 Ca²⁺ 농도가 증가하여 유리기의 형성, 세포막 손상, arachidonic acid 대사물질 형성 및 작용부전 등이 일어난다²¹⁾.

이러한 이론들을 바탕으로 채¹⁸⁾와 최²⁰⁾ 등의 실험적 연구에서는 뇌허혈 발생시에 glutamate와 같은 흥분성 신경전달물질이 유리되어 수용체 작용을 통해 과량의 칼슘이온이 세포 내로 유입되어 excitotoxicity를 일으킴으로서 궁극적으로 뇌신경세포의 괴사가 오는 것을 막기 위한 NMDA와 non-NMDA 수용체에 대한 길항제의 중요성과 가능성을 제시하고 있고, 임¹⁹⁾의 연구에서는 free radical들에 의한 뇌신경세포 손상을 방지하기 위하여 항산화제를 뇌졸중 치료를 위한 신경보호제로 개발 하려는 노력이 기울여지고 있다.

加味柴胡湯의 柴胡, 黃芩, 芍藥, 大黃, 枳實, 半夏, 山查肉으로 구성되어 있다. 柴胡는 辛涼解表, 疎肝理氣하고 大黃 枳實은 內瀉熱結하고 白芍藥은 清瀉肝膽하고 黃芩은 退熱解渴하고 半夏는 豁痰止嘔하고 山查肉은 化瘀散結하는 효능²²⁾을 가지고 있어 임상적으로 고혈압과 중풍 등의 질환에 활용할 수 있는 처방으로 대전대학교 부속한방병원에서는 초기 뇌허혈 환자 치료에 응용하고 있다.

이에 저자는 加味柴胡湯의 뇌손상 방어기전을 연구하고 그 효능을 입증하여 뇌세포손상 억제약물을 개발하기 위해 뇌허혈시 야기되는 glutamate receptor와 free radical 및 apoptosis 그리고 전뇌허혈과 중대 뇌동맥의 혈류를 차단한 국소뇌허혈에 대한 보호효과 등의 연구를 통한 뇌손상 억제효과 실험을 하였다.

먼저, 세포손상에 대한 방어효과를 알아보기 위하여 배양된 대뇌피질 세포에 NMDA, kainate 및 Fe²⁺을 처리하여 LDH 유리량을 측정하였다.

Lactic Dehydrogenase(LDH)는 생체 또는 장기에 널리 분포하여 장기손상시 다량 배출된다는 점에서 LDH 활성 증가는 생체내 어느 장기에 세포파괴가 이루어지고 있다는 것을 의미한다²³⁾. 그러므로 본 실험에서는 glutamate receptor와 free radical에 대한 반응을 억제하게 되면 뇌허혈로 인한 뇌세포괴사를 억제하게 되므로 LDH의 유리량을 측정함으로써 그 세포괴사 정도를 평가하였다.

NMDA에 의한 세포손상에 대한 방어효과에서는 GSHT 1000 μ g/ml 농도로 투여한 실험군에서 60.40 \pm 4.45(%)로 나타나 1000 μ g/ml 농도의 실험군에서 유의성있게 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 1).

Kainate에 의한 세포손상에 대한 방어효과에서는 GSHT 30, 100, 300, 1000 μ g/ml 농도로 투여한 실험군에서 각각 26.65 \pm 1.43(%), 22.57 \pm 2.14(%), 22.03 \pm 2.60(%), 16.45 \pm 2.06(%)로 나타나 모든 실험군에서 유의성있게 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 2).

Fe²⁺에 의한 세포손상에 대한 방어효과에서는 GSHT 30, 100, 300, 1000 μ g/ml 농도로 투여한 실험군에서 각각 30.88 \pm 2.15(%), 27.01 \pm 7.07(%), 17.60 \pm 1.59(%), 21.44 \pm 1.08(%)로 나타나 모든 실험군에서

유의성있게 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 3).

IC₅₀은 inhibitory concentration 50(fifty)를 말하는 것으로 어떠한 반응 A의 크기를 100%로 가정하였을 때, B라는 약물을 이용하여 반응 A의 크기를 50%로 감소시킬 수 있으면, 그때의 B의 농도를 반응 A에 대한 B의 IC₅₀이라고 한다²⁴⁾. MNDA에 의한 LDH 유리량 IC₅₀은 1000 µg/ml 이상으로 나타났고, Kainate에서는 189.37 µg/ml로 나타났으며, Fe²⁺에 의한 유리량 억제 IC₅₀은 11.14 µg/ml 농도로 나타났다(Table 3).

이는 임²⁵⁾의 실험결과와 유사한 것으로 加味柴胡湯이 NMDA, kainate 등의 세포독성 물질 및 Fe²⁺ 등의 유리기에 의한 뇌세포손상 실험에서 LDH 유리량을 유의성 있게 억제하여 세포괴사과정 중에서 glutamate에 의한 세포독성과 유리기에 의한 세포손상을 억제하는 효과가 있으며 이 중 유리기에 의한 세포손상에 더욱 효과적인 것으로 사료된다.

뇌허혈유발 실험에서는 KCN법⁶⁾으로 전뇌허혈을 유발하고 중대뇌동맥을 폐쇄 하여 국소뇌허혈을 유발시킨 후에 전뇌허혈에서는 혼수시간과 생존율을 측정하고 국소뇌허혈에서는 뇌허혈면적, 부종율을 살피고 조직학적 검사와 신경학적 검사를 시행하였다.

전뇌허혈 유발에 사용한 KCN법은 세포내 mitochondria의 cytochrome oxidase의 활성을 억제하고 전자전달계에서의 효소이용을 제한하여 고에너지 인산화합물을 고갈시킴으로써 세포독성을 발현한다. 또한 KCN에 의해 유발된 저산소시의 뇌기능 장애를 촉진하는 요인으로는 혐기적 해당계의 항진에 기인된 유산 등의 산성대사물의 축적, 순환 shock에 의한 중독성의 뇌허혈을 들 수 있다²⁶⁾.

비치사량의 KCN(1.87mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발시킨 혼수 시간을 측정한 결과, 加味柴胡湯 투여군에서 혼수시간이 단축은 보였으나 유의성 있는 단축효과를 나타내지는 않았다(Table 4).

치사량의 KCN(3.0mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발시킨 생존율 측정 결과, 대조군의 생존율은 0%인데 비하여 加味柴胡湯 투여군은 40%의 생존율을 나타내었다(Table 5). 이는 加味柴胡湯이 급성 뇌조직 손상에 대하여 우수한 보호효과가 있음을 시사하는 것이라

사료된다.

국소뇌허혈에 사용된 silicon rubber cylinder 제작은 Nagasawa 등의 방법⁷⁾에 의거하였는데, 허혈 후 재관류를 연구할 수 있는 장점을 가지고 있다²⁵⁾. 또한 조직 손상을 검증하기 위한 TTC 용액은 처음에는 씨앗의 활성도를 알아 보기 위하여 사용되었고 이후 포유류의 조직에서 허혈성 경색부위를 찾기 위해 사용된 것으로 H&E 염색 방법에 비해 값싸며 시간 소모가 적다²⁷⁾.

허혈성 뇌질환과 동반되어 발생하는 뇌부종은 세포독성부종의 기전과 혈관인성 뇌부종의 기전이 모두 관여된다고 알려져 있다²⁸⁾. 즉, 허혈성 뇌병변의 발생 초기에는 세포독성 부종이 주된 부종 발생기전이나 시간이 경과하면서(48시간 이상 허혈이 지속되면) 세포독성 부종의 기전과 혈관인성 부종의 기전이 함께 작용하여 발생한다. 뇌허혈이 지속되어 뇌혈류량이 특정 역치 이하로 감소하게 되면 결국 세포가 죽어가면서 세포성분이 세포외 수분량이 증가한다. 또한 세포괴사의 결과로 생긴 세포성분의 이화물질과 뇌혈관장벽을 구성하는 세포들이 파괴되어 혈장 단백질에 대한 혈관 투과성이 증가하는 혈관인성 부종의 발생으로 세포외 공간의 삼투압이 더욱 높아져 뇌부종이 더욱 악화되고⁹⁾, 결국 두개내압의 증가를 유발하거나 악화시킴으로 뇌질환의 중요한 합병증이 된다⁹⁾.

중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적 및 부종율에 미치는 효과에서는 허혈 면적율과 부종율을 측정하여 허혈 면적에서는 대조군에 비하여 GSHT 투여군은 현저한 감소 효과를 나타내었고(Table 6), 부종율에서도 대조군에 비하여 GSHT 투여군에서 현저한 감소 효과를 나타내었다.(Table 7, Fig. 5).

이는 임²⁵⁾, 유²⁶⁾ 등과 유사한 실험결과로 이는 加味柴胡湯이 두개내혈관 폐쇄로 인한 급성기 뇌허혈 및 뇌경색과 뇌부종을 억제하고 뇌손상을 보호하는 효과가 있음을 시사하고 있는 것이다.

본 실험에서 중대뇌동맥 폐쇄 후, 저산소증 유발 후 및 재관류 후에 대한 각각의 신경학적 검사를 시행하여 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 신경학적 결손정도

를 측정하였는데, Forlimb test의 결과는 대조군에 비하여 GSHT 투여군은 2.5 ± 0.28 , 1.75 ± 0.25 , 1.75 ± 0.25 로 큰 호전현상을 보였고(Table 8), Hindlimb test의 결과도 대조군에 비하여 GSHT 투여군 0.75 ± 0.5 , 0.5 ± 0.57 , 1.00 ± 0.00 로 큰 호전현상을 보였다(Table 9).

조직학적 관찰에서 정상 대뇌피질과 해마형성체 주변 관찰 소견은 정상군과 동일하였으며, 허혈 손상된 대뇌피질과 해마형성체 주변 관찰 소견은 약간의 조직 괴사 소견이 보였으나 전체적인 조직학적 소견은 정상부위와 같이 양호하였다(Fig. 6, 7).

이상의 결과를 종합하면 加味柴胡湯은 뇌허혈로 인한 세포괴사에 이르는 과정에서 신경독성 물질로 작용하는 glutamate 등과 같은 신경계 전달물질을 차단하여 세포손상을 방어하고 free radical에 의한 세포막손상을 억제하여 뇌손상을 보호하는 효과가 있는 것으로 사료된다. 또한 허혈면적 및 뇌부종의 감소효과와 신경결손 정도를 호전시켜 허혈성 뇌손상에 활용할 가치가 높을 것으로 생각되며, 향후 그 기전에 대하여는 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

加味柴胡湯이 뇌손상 방어기전을 검증하고자 NMDA, kainate, Fe^{2+} 로 유발된 뇌신경세포손상에 대한 방어작용, apoptosis에 대한 방어작용, KCN을 이용한 전뇌허혈에 대한 효과 및 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 국소뇌허혈에 대한 효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味柴胡湯은 뇌손상억제 효과실험에서 NMDA를 투여한 대조군보다 LDH 유리량을 유의성 있게 억제하였다.
2. 加味柴胡湯은 뇌손상억제 효과실험에서 Kainate를 투여한 대조군보다 LDH 유리량을 유의성 있게 억제하였다.
3. 加味柴胡湯은 뇌손상억제 효과실험에서 Fe^{2+} 를 투여한 대조군보다 LDH 유리량을 유의성 있게 억제하였다.

4. 加味柴胡湯은 비치사량의 KCN에서는 혼수시간 단축을 보였고, 치사량의 KCN에서는 40%로 생존율을 보이게 하였다.
5. 加味柴胡湯은 중대뇌동맥 혈류차단에 의한 허혈면적 및 부종을 현저히 감소시켰다.
6. 加味柴胡湯은 국소뇌허혈 유발 후 forelimb 및 hindlimb의 신경학적 검사에서 큰 호전양상을 보이게 하였다.
7. 加味柴胡湯은 국소뇌허혈 유발 후 조직학적 관찰에서 정상부위와 같은 조직학적 소견을 보이게 하였다.

참고문헌

1. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울:중앙문화진수출판사. 2002:264-276.
2. 統計廳. 死亡原因統計年譜. 대전:통계청. 2001:18-19.
3. 이정아. 뇌졸중후 우울증과 일상생활 수행능력과의 상관관계. 동의신경정신과학회지. 2000;11:149-154.
4. 아담스 신경과학 편찬위원회 역. 아담스 신경과학. 서울:도서출판 정담. 1998:720-722.
5. 이종달 역. 그림으로 설명한 병리학. 서울:고려의학. 1991:127-134,231,736,741-746.
6. Schubert J, Brill WA. Antagonism of experimental cyanide toxicity in relation to the in vivo activity of cytochrome oxidase. J Pharmacol Exp Ther. 1986;162(2):352-359.
7. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. Stroke. 1989;20:1037-1043.
8. 정혜주. 뇌허혈 동물모델을 이용한 뇌기능개선제의 효능에 관한 연구 (I). 국립보건안전연구원보. 1994;7(1):178-185.
9. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion. Evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke. 1986;17:472-476.
10. 김종성 · 최수미. 뇌졸중의 모든 것. 서울:도서출판 정담. 1998:5.

11. 의학교육연수원. 가정의학. 서울:서울대학교출판부. 1996:249-319.
12. 全國韓醫科大學 心系內科學教室. 心系內科學. 서울:書苑堂. 1999:73-74,77,110-112, 277-279,420-422,427,430,505.
13. 설인찬. 補陽還五湯이 高脂血症, 血栓, 高粘度血症, 高血壓 및 腦損傷에 미치는 影響. 韓方成人病學會誌. 1998;4(1):133-162.
14. 안택원. 加味通竅化痰湯이 血栓, 腦虛血 및 腦損傷에 미치는 影響. 大田:大田大學校 大學院. 1999:35-37.
15. 홍석. 加味天麻鉤藤飲의 血栓症, 腦虛血症, 및 腦損傷에 對한 實驗的 研究, 大田:大田大學校 大學院. 1999:45,50.
16. 강순희 외. 清泡逐瘀湯 및 蜂毒이 瘀血病態模型에 미치는 影響. 대한한의학회지. 1995;16(1):351-366.
17. 최현 외. 中風의 瘀血論의 考察 및 活血化痰法에 의한 治療 近況. 대한한의학회지. 1991;11(1):145-150.
18. 채창희. 흰쥐에서 일시적 국소 뇌허혈에 미치는 Glutamate의 역할. 대한마취과학회지. 2000;38:1062-1067.
19. 임소영. Nitric Oxide Synthase의 억제가 전뇌허혈/재관류시 Hydroxyl Radical 생성에 미치는 영향. 대한마취과학회지. 1999;36:710-722.
20. 최규택. 뇌허혈 발생전 K⁺ 통로 조작이 해마의 [K⁺] 및 Glutamate 농도에 미치는 영향. 대한마취과학회지. 1999;36:510-517.
21. Cheung JY, Bonve JV, Malis CD. Calcium and ischemic injury. N Engl J Med. 1986;314:1670-1676.
22. 全國韓醫科大學 本草學教授共著. 本草學. 서울:永林社. 1885;149-150,179,242-244,350-351, 369-370, 448-449, 581-583.
23. 이귀녕, 권오현. 임상병리과일(3th/Edition). 서울:의학문화사. 2000:374-376.
24. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1994:112-122,125-129,591-593,1218-1220.
25. 임승민. 三氣飲과 通痺飲이 腦損傷 및 血栓에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2002;23(4):617-626.
26. 유종삼. 加味掃蕪散이 高血壓 및 腦損傷에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2003;24(3):72-83.
27. von Pechman H, Runge P. Oxydation der formazy-luerbindungen. Ber Deutsch Chem Ges. 1984;27:2920-2930.
28. Black K. Blood-Brain Barrier in Youmans. Neurological Surgery, 4th ed. 1996;1:482-489.