

柴胡가 뇌허혈유발 老齡 흰쥐의 해마 c-Fos 및 c-Jun 발현에 미치는 영향

박순일, 오경환, 황주원, 유도균, 한창호, 정승현, 신길조, 이원철
동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effect of Bupleuri Radix on c-Fos and c-Jun Expression in Ischemic Damaged Hippocampus of the Aged BCAA Rats

Soon-Il, Park, Kyung-Hwan Oh, Joo-Won Hwang, Do-Kyun Ryu, Chang-Ho Han, Sung-Hyun Chung, Gil-Cho Shin, Won-Chul Lee

Dept. of Oriental Medicine The Graduate School, Dongguk University

Objectives : In this study, aged BCAA rats were used to observe the effect of Bupleuri Radix on brain ischemic injury, because aging is an important factor in stroke.

Methods : The brain ischemic injury was induced by temporary closing carotids on both sides in a low blood pressure state, and Bupleuri Radix was orally administered to 18 month-old BCAA rats. The ischemic damaged hippocampus and c-Fos and c-Jun expression were analyzed by the immunohistochemical staining.

Results and Conclusions : Results are summarized as follows;

1. The c-Fos expression after inducing a brain ischemic injury in the hippocampus was more inhibited in the experimental group than in the control group.
2. The normalized optical density of c-Fos expression was more reduced in cornu ammonis(CA)1, dentate gyrus(DG) areas in the experimental group than in the control group.
3. The c-Jun expression after inducing a brain ischemic injury in the hippocampus was more inhibited in the experimental group than in the control group.
4. The normalized optical density of c-Jun expression was more reduced in CA1 and DG areas in the experimental group than in the control group.

Key Words: c-Fos, c-Jun, ischemic damage, Bupleuri Radix, the Aged BCAA Rats.

1. 緒 論

뇌졸중은 노령 인구에서 질병으로 인한 사망원인 중 3번째로 호발하는 질환으로, 최근 고혈압 치료와 식생활을 비롯한 생활방식의 변화로 인하여 우리나라의 경우 허혈성 뇌졸중이 증가하는 발병양태를 보이고 있다¹.

저산소증이 유발되면 각종 세포는 허혈성 손상을 입게 되는데, 특히 뇌는 수분간의 허혈상태 만으로도 중추신경계를 구성하고 있는 신경세포와 신경교 세포 등이 손상을 입어 뇌와 신경계에 심각한 질환이 유발될 수 있다².

柴胡는 산형과에 속한 다년생 초본인 柴胡의 뿌리를 건조한 약재로 性味가 苦, 微寒하고 和解退熱, 疏肝解鬱, 升舉陽氣하는 효능이 있어, 半表半裏의 邪氣를 치료하기에 적합하므로 傷寒의 寒熱往來, 胸脇苦滿, 肝氣鬱結 등에 활용된다³⁻⁵. 특히 中風急性期の 肝熱暴亢, 痰熱腑實로 인한 大小便閉 등의 熱

· 접수: 2005. 5. 18. · 채택: 2005. 6. 8.
· 교신저자: 황주원, 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2
동국대학교 분당한방병원 6층 외과
(Tel. 031-710-3734, 3735, Fax. 031-710-3780
E-mail : zilia@dreamwiz.com)

實證에 활용되는 大柴胡湯의 주된 약제이다⁶.

약리작용으로는 해열, 진통, 소염, 항괴양 및 간기능 보호, 이담작용 등이 있으며^{5,7}, 종양부위에 tumor infiltrating lymphocyte를 증가시키고 자연살해세포를 활성화시키는 항암효과⁸, 각종 질환의 원인이 되는 유해 nitric oxide의 발생 감소 효과⁹, 유효성분 중에서 saikosaponin의 다양한 효능에 대하여 많은 연구가 보고되어 있다¹⁰.

柴胡가 중추신경계에 미치는 영향에 대해서는 柴胡로부터 추출된 linoleic acid의 항경련 효능¹¹, dopamine, serotonin 및 GABA receptor에 작용한다는 보고¹², PC12 손상 세포 및 전뇌허혈 유발 Gerbil에 있어서 세포보호효과¹³, 유해 nitric oxide에 대한 신경세포 보호효능¹⁴ 등이 알려져 있다.

뇌졸중은 노령에 호발하는 질환이지만, 이전 연구들은 대부분 건강하고 젊은 실험동물을 사용하였으나, 최근 노령 흰쥐를 대상으로 뇌졸중에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며¹⁵, 본 연구에서도 뇌허혈에 대한 신경세포 보호효능을 중풍발생기전과 유사한 노령 흰쥐에서 확인하기 위하여 18개월령의 노령 흰쥐에 뇌허혈을 유발하고, 뇌허혈에 민감한 해마(hippocampus)에서 전체적 또는 국소적 뇌허혈에 대한 반응으로 즉각 발현되는 immediate early genes(IEGs)의 일종인 c-Fos와 c-Jun 단백질¹⁶을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약물의 조제 및 투여

실험에 사용한 약물은 柴胡(Bupleuri Radix)로 약재 200g을 일반적인 물추출액 제조방법에 의하여 약재 4g 당 660mg의 추출액을 얻었다. 약물은 뇌허혈 유발 2시간 및 6시간 후에, 총 2회 경구투여 하였다. 1회 투여량은 11.0mg/100g으로 하였다.

2) 동물

체중 750~900g의 Sprague-Dawley계 18개월령

수컷 흰쥐(바이오지노믹스, 한국)를 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.

3) 실험군의 구분

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

2. 방법

1) 뇌허혈 손상 유발

뇌허혈은 Chan 등¹⁷의 방법에 따라 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 transient global ischemia(TGI) 방법을 적용하였다. 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 두었다.

저혈압의 유도는 Chan 등¹⁷의 방법과 Sugawara 등¹⁸의 연구결과에 근거하여 평균동맥혈압이 40mm Hg가 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).

2) 뇌조직의 처리

TGI 유발 24시간 후 각각의 실험동물에 sodium pentobarbital 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류시켰다. 이후 뇌를 두개골로부터 적출하여 24시간 정도 재고정하고, sucrose 용액에 넣어 침전시켰다. 다음 -40℃의 dry ice-isopentane으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

3) c-Fos 및 c-Jun 면역조직화학염색¹⁹

선택한 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10~15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain)과 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응

시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후, primary antibody로 처리하였다. c-Fos 및 c-Jun antibody(mouse monoclonal IgG, Oncogene Science)는 1:200의 희석배율로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후, 4℃에서 overnight으로 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법(ABC Vectastain Kit)으로 한 시간씩 반응시켰다. 다음으로 조직을 NiCl₂·H₂O(Sigma Co.)를 섞은 diaminobenzidine-tetrachloride(Sigma Co.)에서 5~10분간 발색시키고, poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2~3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

4) c-Fos 및 c-Jun 발현에 따른 면역염색농도의 측정

해마의 CA1, CA2, CA3 및 DG구역의 c-Fos 및 c-Jun 발현에 따른 면역염색농도(immuno-reaction density, ID)의 측정은 CCD 카메라와 영상분석시스템이 부착된 광학현미경과 NIH Image software (Ver. 1.62)를 사용하여 측정하였다. c-Fos 및 c-Jun 발현을 면역조직화학적으로 염색된 해마 조직의 각 부위를 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고, 해마의 기준구역과 측정하고자 하는 구역의 면역염색농도를 256등급의 흑백농도(grey level)에

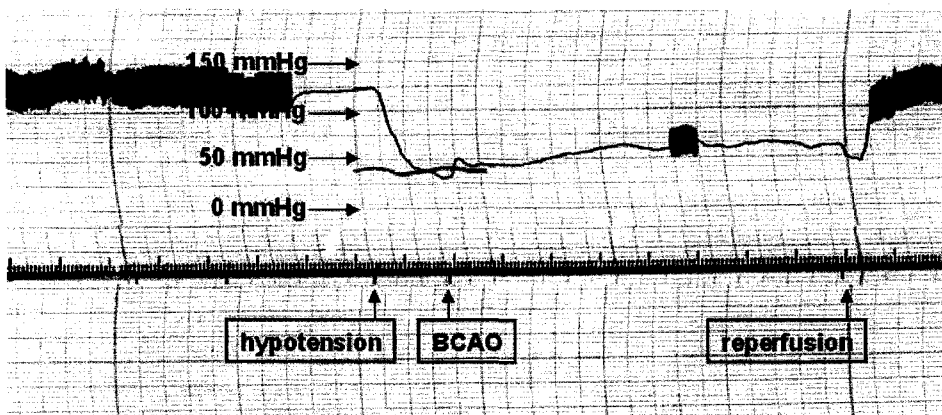


Fig. 1. A physiograph chart recorded the mean arterial blood pressure(MABP) from the femoral artery.

The MABP was decreased to 40 mmHg. Bilateral common carotid artery occlusion(BCAO) was maintained for 8 min. Then the blood flow was reperfused and the MABP was restored.

따라 측정하고, 측정구역의 측정값을 기준구역의 측정값에 대하여 표준화하는 방법으로 면역염색농도를 계산하였다. 기준구역은 CA1 하부의 해마 실질 조직 부위로 하였다.

3. 통계처리

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

III. 成 績

1. 해마 각 구역에서 c-Fos 및 c-Jun 발현의 변화
c-Fos와 c-Jun은 정상상태에서는 발현되지 않는 것이 일반적이다. 뇌허혈을 유발하지 않고 수술만을 시행한 sham군에서 해마 전 부위에서 미약한 발현이 관찰되었다. 이는 수술과 사육 환경의 변화 등 스트레스에 의한 것으로 추정된다. 대조군에서는 해마 전 영역에서 c-Fos와 c-Jun 모두의 발현이 현저히 증가되었는데, 특히 cornu ammonis(CA)1과 dentate gyrus(DG) 부위 증가가 확실하게 관찰되었다. 실험군에서는 전반적으로 c-Fos와 c-Jun 모두의 발현이 감소되었다. 이러한 발현 감소는 CA1과 DG 부위에서 특히 현저하였으며, c-Jun 보다는 c-Fos가 보다 더 현저하였다.

2. 해마 각 구역에서 c-Fos 발현에 따른 면역염색농도의 변화

해마 각 구역에서 c-Fos 면역염색농도는 저혈압과 뇌허혈을 유발하지 않은 sham군의 CA1구역에서는 22.5±7.5, CA2구역에서는 18.7±6.8, CA3구역에서는 11.8±7.8, DG구역에서는 16.3±7.5로 나타났다. 이러한 면역염색농도는 CA1, CA2, CA3 및 DG 전 구역에서는 c-Fos가 미약하게 발현되었음을 나타낸다. 저혈압과 뇌허혈이 유발된 대조군의 CA1구역에서는 91.1±10.6, CA2구역에서는 82.1±8.4, CA3구역에서는 54.0±10.4, DG구역에서는 100.9±14.3으로 측정되었다. 이는 뇌허혈 유발에 의하여 c-Fos 발현이 해마 전 구역에서 최소 400% 이상 증가되었음을 의미한다. 저혈압과 뇌허혈이 유발된 후 柴胡를 투여한 실험군의 CA1구역에서는 50.6±7.9로 대조군에 비하여 P<0.01의 유의한 감소를 나타내었다. CA2구역에서는 58.8±12.1로, CA3구역에서는 39.5±8.3으로 대조군에 비하여 감소되었으나 통계학적 유의성은 없었으며, DG구역에서는 45.7±8.3으로 대조군에 비하여 P<0.01의 유의한 감소를 나타내었다. 저혈압과 뇌허혈 유발에 의하여 증가된 c-Fos 발현이 柴胡의 투여에 의하여 CA1 구역과 DG 구역에서 현저히 감소된 이러한 결과는 柴胡가 일정한 신경세포 보호효능을 가지고 있음을 의미한다(Table 1, Fig. 2.).

Table 1. Changes of Immuno-Reaction Densities depending on c-Fos Expression in Hippocampus of aged BCAO Rats

Groups	Sub-Regions of Hippocampus			
	CA1	CA2	CA3	DG
Sham	22.5±7.5	18.7±6.8	11.8±7.8	16.3±7.5
Control	91.1±10.6	82.1±8.4	54.0±10.4	100.9±14.3
Sample	50.6±7.9**	58.8±12.1	39.5±8.3	45.7±8.3**

Sham; Sham operated group without hypotension and BCAO on the aged rats

Control; Group operated with hypotension and BCAO for 8 minutes on the aged rats

Sample; Group treated with Bupleuri Radix extract after hypotension and BCAO for 8 minutes on the aged rats

Data demonstrated Mean ± Standard Error.

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

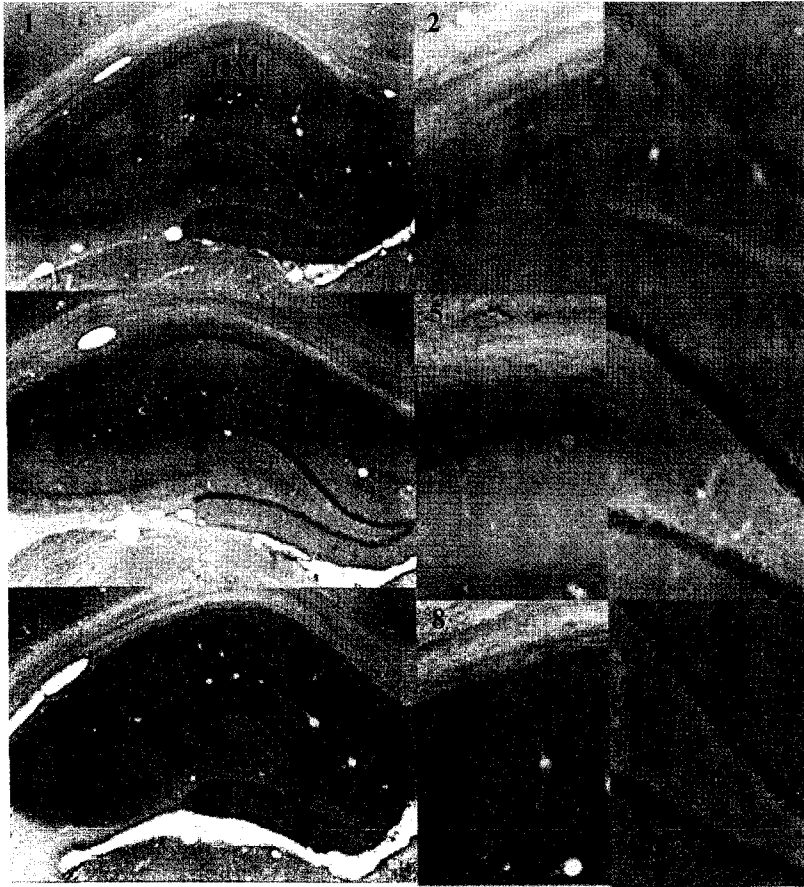


Fig. 2. Immunohistochemical expressions of c-Fos in hippocampal sub-regions of the aged B CAO rats(section 1, 2 and 3, Sham; section 4, 5 and 6, Control; section 7, 8 and 9, Sample).

The sample group(Bupleuri Radix treatment group) shows significant decrease of immuno-reaction in CA1 and DG of hippocampus as compared to the control group.

3. 해마 각 구역에서 c-Jun 발현에 따른 면역염색농도의 변화

해마 각 구역에서 c-Jun 면역염색농도는 저혈압과 뇌허혈을 유발하지 않은 sham군의 CA1구역에서는 12.7 ± 7.5 , CA2구역에서는 14.5 ± 7.3 , CA3구역에서는 11.7 ± 7.7 , DG구역에서는 12.0 ± 7.6 로 나타났다. 이러한 면역염색농도는 CA1, CA2, CA3 및 DG 전 구역에서는 c-Jun이 미약하게 발현되었음을 나타낸다. 저혈압과 뇌허혈이 유발된 대조군의 CA1 구역에서는 43.7 ± 7.7 , CA2구역에서는 35.6 ± 9.4 , CA3구역에서는 32.1 ± 9.7 , DG구역에서는 35.4 ± 7.8

로 측정되었다. 이는 뇌허혈 유발에 의하여 c-Jun 발현이 해마 전 구역에서 최소 200% 이상 증가되었음을 의미한다. 저혈압과 뇌허혈이 유발된 후 柴胡를 투여한 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의한 감소를 나타내었다. CA2구역에서는 23.4 ± 3.6 으로, CA3구역에서는 22.8 ± 3.6 으로 대조군에 비하여 감소되었으나 통계학적 유의성은 없었으며, DG구역에서는 20.3 ± 2.4 로 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의한 감소를 나타내었다. 저혈압과 뇌허혈 유발에 의하여 증가된 c-Jun 발현이 柴胡의 투여에 의하여 CA1 구역과 DG 구역에서 현저히 감소된 이러한 결과는

柴胡가 일정한 신경세포 보호효능을 가지고 있음을 의미한다(Table 2, Fig. 3).

Table 2. Changes of Immuno-Reaction Densities depending on c-Jun Expression in Hippocampus of Aged BCAA Rats

Groups	Sub-Regions of Hippocampus			
	CA1	CA2	CA3	DG
Sham	12.7±7.5	14.5±7.3	11.7±7.7	12.0±7.6
Control	43.7±7.7	35.6±9.4	32.1±9.7	35.4±7.8
Sample	26.3±3.9*	23.4±3.6	22.8±3.6	20.3±2.4*

Sham; Sham operated group without hypotension and BCAA on the aged rats

Control; Group operated with hypotension and BCAA for 8 minutes on the aged rats

Sample; Group treated with Bupleuri Radix extract after hypotension and BCAA for 8 minutes on the aged rats

Data demonstrated Mean ± Standard Error.

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



Fig. 3. Immunohistochemical expressions of c-Jun in hippocampal sub-regions of the aged BCAA rats(section 1, 2 and 3, Sham; section 4, 5 and 6, Control; section 7, 8 and 9, Sample).

The sample group(Bupleuri Radix treatment group) shows significant decrease of immuno-reaction in CA1 and DG of hippocampus as compared to the control group.

IV. 考 察

허혈성 뇌졸중은 中風의 범주에 속하는데, 中風은 증상변화가 暴急한 특징을 가지고 있다. 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, 苔黃膩 등과 같은 火熱의 증후가 의식, 운동, 언어장애 등의 주증상과 함께 나타나기 쉽다. 따라서 임상에서 中風 급성기의 경우 淸熱瀉火 및 通腑法을 이용한 치료법들이 많이 활용되고 있다²⁰.

柴胡는 산형과에 속한 다년생 초본인 柴胡의 뿌리를 건조한 약재로 『神農本草經』²¹에서 “味苦, 平. 主心腹腸胃中結氣, 飲食積聚, 寒熱邪氣, 推陳致新, 久服輕身, 明目益精”의 효능이 있음이 최초로 수록되었으며, 한약 처방에서 柴胡가 주약으로 구성되어 있는 柴胡湯類 역시 肝의 疏泄作用이 원활하지 못한 肝氣鬱結과 肝膽濕熱 등을 치료하는데 사용되고 있다²². 특히 中風急性期에 肝熱暴亢, 痰熱腑實로 大小便閉 등의 熱實證이 나타나는 경우 활용되는 大柴胡湯의 주된 약제이다⁶.

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 있다²³. 고혈압이 뇌졸중의 중요한 한 원인요소인 것과 관련하여 자발성 고혈압 흰쥐(SHR)를 사용한 연구는 많이 이루어졌으나, 노령이 중요한 원인요소인 뇌허혈에서 나이가 감안된 실험동물모형 연구는 거의 없었다. 젊은 흰쥐와 노령 흰쥐에서 국소 뇌허혈을 유발하고 그 결과를 비교 연구한 보고에 의하면, 뇌경색의 크기가 연령 의존적으로 증가하였으며²⁴, 신경검사지표에 따른 신경학적 결함을 관찰한 결과 젊은 흰쥐에서는 즉시적이고 심한 손상 후에도 회복기전이 진행되는 것에 비하여 노령 흰쥐에서는 손상이 지속적이고 회복기전이 제대로 진행되지 못하는 특징이 관찰되었다²⁵.

따라서 뇌졸중의 실험연구에 원인요소를 감안한 실험동물모형을 사용하는 것이 약물효능을 확인하는 타당성있는 한 방법으로 생각되어, 본 연구에서는 18개월된 老齡 흰쥐에 일시적인 뇌허혈 손상을 유발한 후 뇌세포의 손상억제 및 보호효과를 면역조직화학적 염색을 통해 해마 부위에서 c-Fos과 c-Jun 단백질의 발현정도를 조사하여 관찰하였다.

c-Fos과 c-Jun은 immediate early genes(IEGs)에 의하여 발현되는 단백질들이다. IEGs는 중추신경계에서 다양한 요소들에 의해 발현이 유도된다. 그 예로 kindling, long-term potentiation, nociception 시 발현이 유도되며, 병적인 상태로는 간질, 허혈 시에도 이러한 유전자의 발현을 관찰할 수 있다. IEGs는 세포의 성장과 분열, 분화와 발달에 관여하며, 신경세포사, 축삭 발아 시 중요한 역할을 하고 다른 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다²⁶.

뇌허혈 발생 직후 즉시 뇌조직에서 생화학적인 변화가 야기되는데, 수분이내에 매우 빠른 발현 증가를 나타내는 신경세포 유전자들이 IEGs이다²⁷. 뇌허혈은 IEGs 발현의 강력한 자극요소이다. mRNA 발현의 해부학적 위치를 알 수 있는 in situ hybridization 방법을 사용한 실험연구에 의하면 IEGs 발현 증가는 뇌허혈에 가장 민감한 것으로 알려진 해마의 DG, CA1, CA3의 추체신경세포, neocortex, 소뇌의 Purkinje cells 등에서 c-fos 및 c-jun mRNA 발현을 크게 증가시킨다고 하였다¹⁹. 또한 미약한 국소 뇌허혈에서는 IEGs 발현이 허혈영역에만 제한되어 나타나지만, 심한 국소 뇌허혈에서는 IEGs 발현이 허혈영역 밖에서도 광범위하게 관찰된다²⁷. 뇌허혈 시간이 30분에서 90분으로 증가되면 IEGs의 발현이 허혈영역의 외부는 물론 반대측 해마에서도 관찰된다²⁸. 흰쥐에서 영구적으로 중대뇌동맥을 폐쇄한 경우에는 중대뇌동맥의 혈액공급부위는 물론 반대측의 대뇌피질 구조들에서도 c-Fos, c-Jun 및 zif/268의 발현이 관찰된다²⁹. 또다른 국소 뇌경색 모형에서는 thalamus, lateral and medial geniculate nuclei 및 substantia nigra 등 심부구조에서도 c-Fos와 Jun-B의 발현이 관찰되었다²⁷. 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 없었다는 보고가 있었으나³⁰, 본 연구에서는 실험에 사용될 수 있는 노령 흰쥐의 수적 제한 등의 이유로 다양한 시간대에 걸쳐 관찰할 수 없어 위의 연구결과를 바탕으로 c-Fos, c-Jun의 발현이 가장 현저한 뇌허혈 유발 후 24시간에柴胡의 효능을 관찰하였다.

본 연구 결과, c-Fos 및 c-Jun 발현은 sham군에서는 없거나 일부 실험동물에서 미약하게 발현된 것이 관찰되었다. c-Fos는 정상상태에서는 발현되지 않는 것이 일반적이는데, 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 명확하게 관찰되었다. c-Jun의 발현도 역시 현저하게 증가되었으나, 발현 강도는 전체적으로 c-Fos 발현 정도에는 미치지 못하였다.

컴퓨터영상분석기를 이용하여 해마의 각 구역별 c-Fos와 c-Jun의 발현 면역염색농도를 측정된 결과, 뇌허혈 유발에 의한 대조군에서의 c-Fos 면역염색농도는 해마 각 구역에서 최소 400% 이상 증가되었다. 저혈압과 뇌허혈이 유발된 후柴胡를 투여한 실험군의 CA1구역과 DG구역에서는 대조군에 비하여 $P<0.01$ 의 유의한 감소를 나타내었으나, CA2 및 CA3구역에서는 대조군에 비하여 감소는 되었으나 통계학적 유의성은 없었다. 대조군에서의 c-Jun 면역염색농도는 해마 각 구역에서 뇌허혈 유발에 의하여 최소 200% 이상 증가되었다. 저혈압과 뇌허혈이 유발된 후柴胡를 투여한 실험군의 CA1 구역과 DG구역에서는 대조군에 비하여 $P<0.05$ 의 유의한 감소를 나타내었으며, CA2 및 CA3구역에

서는 c-Fos와 마찬가지로 대조군에 비하여 감소는 되었으나 통계학적 유의성은 없었다.

해마 중 CA1 구역의 추체신경세포는 뇌허혈에 가장 민감하게 반응하는 신경세포로 CA1 추체신경세포가 나타내는 세포수의 변화, 각종 유전자 및 단백질 발현의 변화 등은 뇌허혈에 대한 신경세포 손상 기전과 약물의 신경손상에 대한 보호효능을 연구하는데 가장 많이 사용되는 지표이다. 따라서 뇌허혈로 인하여 증가된 CA1 구역의 c-Fos 및 c-Jun 발현이柴胡 투여로 유의하게 감소된다는 결과는柴胡가 IEGs 조절작용을 통하여 뇌허혈 신경세포 보호효능을 가지고 있다는 것을 직접적으로 보여주는 결과이다.

이상의 결과로 볼 때柴胡는 뇌허혈 손상 초기에 신경세포 보호효능이 있어 신경세포 손상을 감소시키는 효능이 있을 것으로 생각된다.

아울러 이러한柴胡의 효능이 老齡의 흰쥐에서만 나타나는 특징적인 것인지 본 연구만으로는 명확히 알 수가 없으므로, 향후 젊은 흰쥐에서의 효능과 老齡 흰쥐에서의 효능의 비교연구 및 효능기전에 대한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

V. 結 論

柴胡의 뇌허혈에 대한 신경세포 보호효능을 알아보기 위하여 18개월령 노령 흰쥐에 저혈압 상태에서 뇌허혈을 유발하고,柴胡를 투여한 다음 해마 각 구역에서 c-Fos와 c-Jun 발현에 대한 영향을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 뇌허혈이 유발된 대조군에서는 해마 전영역에서 c-Fos와 c-Jun의 발현이 현저히 증가하였으며,柴胡 추출물을 투여한 군에서는 대조군에 비하여 c-Fos와 c-Jun의 발현이 감소되었으며, 특히 CA1구역과 DG구역에서 가장 명확하게 관찰되었다.
2. 해마 각 구역에서 c-Fos 발현에 따른 면역염색

농도는 柴胡 추출물 투여에 의하여 CA1구역과 DG구역에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었으며, CA2와 CA3구역에서는 대조군에 비하여 감소되었으나 유의성은 없었다.

3. 해마 각 구역에서 c-Jun 발현에 따른 면역염색농도는 柴胡 추출물 투여에 의하여 CA1구역과 DG 구역에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었으며, CA2와 CA3구역에서는 대조군에 비하여 감소되었으나 유의성은 없었다.

이상의 결과로 柴胡는 뇌허혈에 의한 신경세포의 손상초기에 발현되는 c-Fos와 c-Jun 등의 발현을 억제함으로써 신경세포 보호효능을 나타내는 것으로 생각된다.

參考文獻

1. 강성돈, 정진원, 문병순, 김종문. 뇌졸중의 역학적 동향에 대한 연구. 대한신경외과학회지. 1999; 28:509-13.
2. Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allplurinol. *Pediatr Res*. 1990;27:332-6.
3. 李時珍. 本草綱目. 北京: 人民衛生出版社; 1982, p.786-8.
4. 이상인. 본초학. 서울: 수서원; 1981, p.198.
5. 채인식. 시호제(柴胡劑)의 임상치료에 대하여. 대한한의학회지. 1963;1(5):10-3.
6. 김지형. 대시호탕이 배양신경세포를 이용한 저산소증에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(1):63-75.
7. 김승모, 왕오호, 박재현. 시호가 총담관결찰 및 taurocholate 부가 흰쥐 간의 MAO활성에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000;21(2):275-81.
8. Kok LD, Wong CK, Leung KN, Tsang SF, Fung KP, Choy YM. Activation of the anti-tumor effector cells by *Radix bupleuri*. *Immunopharmacology*. 1995;30(1):79-87.
9. Izumi S, Ohno N, Kawakita T, Nomoto K, Yadomae T. Wide range of molecular weight distribution of mitogenic substance(s) in the hot water extract of a Chinese herbal medicine, *Bupleurum chinense*. *Biol Pharm Bull*. 1997;20(7):759-64.
10. Jung DW, Sung CK. Production of antibody against saikosaponin a, an active component of *Bupleuri Radix*. *Arch Pharm Res*. 1998;21(2): 135-39.
11. Liu Y, Wu H, Ge F. Chemical constituents analysis on anticonvulsive effect of three extracts from *radix bupleuri*. *Zhong Yao Cai*. 2002;25(9):635-7.
12. Sugiyama K, Muteki T, Kano T. The Japanese herbal medicine 'saiko-keishi-to' activates GABA receptors of rat sensory neurons in culture. *Neurosci Lett*. 1996;216(3):147-50.
13. 최삼열, 정승현, 신길조, 문일수, 이원철. PC12 손상 세포 및 전뇌허혈 유발 Gerbil에 대한 시호의 세포보호효과. 대한한의학회지. 2002;23(4):113-24.
14. 신광식, 이원철. 柴胡의 뇌해마 신경세포 보호 효능에 대한 연구. 대한한방내과학회지. 2004;25(4):227-42.
15. 손철훈, 신정원, 손영주, 정혁상, 원란, 손낙원. 노령 흰쥐의 뇌허혈 손상시 뇌대사활성의 변화 및 凉膈散火湯의 영향에 대한 [¹⁴C]2-Deoxyglucose Autoradiography 연구. 대한한의학회지. 2003;24(3):51-64.
16. Kiessling M, Stumm G, Xie Y, Herdegen T, Aguzzi A, Bravo R, Gass P. Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993;13: 914-24.
17. Chan PH, Kawase M, Murakami K, Chen SF, Li Y, Calagui B et al. 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 et al. Effect of hypotension severity on hippocampal CA1 neurons in a rat global ischemia model. *Brain Res.* 2000;877:281-7.
 19. 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.
 20. 이원철. 腦卒中 急性期에 응용되는 下法에 대한 연구. 대한한의학회지. 1998;19(1):385-91.
 21. 한기광, 김성훈, 성락기. 시호에 대한 문헌 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집 1999;7(2):1-13.
 22. 손갑호, 정찬길, 김성훈. 상한시호탕류의 병리 변증 임상 및 실험에 대한 문헌적 고찰. 대한한 의학회지. 1994;15(2):445-510.
 23. Millikan C. Animal stroke model. *Stroke.* 1992; 23:795-7.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 김선국, 이용만, 방선웅, 이에영, 김재문, 유택근 외. 벤자틴 페니실린에 의해 유도된 국소 발작 간 간질양 파형이 백서 대뇌에서 c-jun 단백질 발현 양상에 미치는 영향. 대한신경과학회지. 2000;18(5):617-23.
 27. 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.
 28. 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.
 29. Collaco-Moraes Y, Aspey BS, de Bellerocche JS, Harrison MJ. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to MK-801. *Stroke.* 1994;25: 1855-60.
 30. 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.