

공진단이 MCAO모델 흰쥐에서 gliosis 억제에 미치는 영향

성기문, 허래경, 송봉근
원광대학교 한의과대학 내과학교실

The Effect of *Gongjin-dan* on Gliosis in Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) Rats

Kee-moon Seong, Rae-kyong Hae, Bong-keun Song
Dept. of Oriental Medicine, Won-Kwang University, College of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : In conditions of brain infarction, irreversible axon damage occurs in the central nerve system (CNS), because gliosis becomes a physical and a mechanical barrier to axonal regeneration. Reactive gliosis induced by ischemic injury such as middle cerebral artery occlusion is involved with up-regulation of GFAP and CD81. This study was undertaken to examine the effect of the *Gongjin-dan* (GJD) on CD81 and GFAP expression and its pathway in the rat brain following middle cerebral artery occlusion (MCAO).

Methods : In order to study ischemic injuries on the brain, infarction was induced by MCAO using insertion of a single nylon thread, through the internal carotid artery, into a middle cerebral artery. Cresyl violet staining, cerebral infarction size measurement, immunohistochemistry and microscopic examination were used to detect the expression of CD81 and GFAP and the effect on the infarct size and pyramidal cell death in the brain of the rat with cerebral infarction induced by MCAO. Also, c-Fos and ERK expression were measured to investigate the signaling pathway after GJD administration in MCAO rats.

Results : Measuring the size of cerebral infarction induced by MCAO in the rat after injection of GJD showed the size had decreased. GJD administration showed pyramidal cell death protection in the hippocampus in the MCAO rat. GJD administration decreased GFAP expression in the MCAO rat. GJD administration decreased CD81 expression in the MCAO rat. GJD administration induced up-regulation of c-FOS expression compared with MCAO. GJD administration induced down-regulation of ERK expression compared with MCAO.

Conclusion : We observed that GJD could suppress the reactive gliosis, which disturbs the axonal regeneration in the brain of a rat with cerebral infarction after MCAO by controlling the expression of CD81 and GFAP. The effect may be modulated by the regulation of c-Fos and ERK. These results suggest that GJD can be a candidate to regenerate CNS injury.

Key words : *Gongjin-dan*, Gliosis, MCAO, Astrocyte, Pyramidal cell

1. 緒 論

허혈성 뇌혈관 질환 등의 중추신경계 손상 시

- 교신처: 송봉근 광주광역시 남구 주월동 543-8
원광대학교한방병원 6내과
TEL: 062-670-6422 FAX: 062-670-6767
E-mail: songbk@wonkwang.ac.kr
- 이 논문은 2007년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 연구되었음

말초신경 손상과 달리 중추신경은 재생되지 않고, 영구적인 장애를 가지게 된다. 중추신경계가 손상을 받게 되면 신경세포 괴사에 이어 공동이 생기게 되며, 그 후 reactive gliosis 반응에 의하여 공동 부위를 신경교세포가 감싸는 glial scar(신경교성 반흔)가 생기게 된다. 이는 매우 치밀하고 단단한 구조로 신경세포나 축삭의 재생에 물리적 및 기계적 장벽이 되기도 하며, 반흔을 이루고 있는 정상

교세포가 축삭의 재생을 억제하는 물질을 생성하여 신경의 재생을 방해하게 된다¹. glial scar를 이루는 대부분의 세포는 정상교세포로 손상에 대해 특이적으로 glial fibrillary acid protein(GFAP)이라는 단백질을 다량으로 발현시키게² 되는데 GFAP의 발현정도가 중추신경계 손상정도를 나타내는 지표가 된다³. 또한 중추신경계 손상 후 GFAP 증가와 같은 양상으로 CD81의 발현 증가가 동반된다⁴. 이러한 배경에서 최근의 연구에 따르면 실험적으로 척수손상을 가한 쥐에 항CD81항체를 투여한 결과 신경의 회복을 보였다고 하였으며⁵, GFAP를 제거한 결과 gliosis의 진행을 억제하여 신경의 성장 및 재생이 촉진되었다 보고되었다⁶.

허혈성 뇌손상 질환은 한의학에서 中風, 風痺, 偏枯 등의 범위에 속하며 血虛風乘證, 風陽阻絡證, 痰熱腑實證, 風痰阻絡證, 氣虛血瘀證, 腎虛精虧證으로 분류되며⁷ 氣와 血을 모두 補益하여 臟腑가 虛損된 상태를 치료 및 예방하는 공진단을 현재 臨床에서도 중풍후유증 및 예방에 널리 이용하고 있다.

그동안 공진단에 대한 실험적 연구로 金은 공진단이 고지질증 유발 억제 효과가 있다고 보고하였으며⁸, 崔는 공진단의 성분에는 항산화 및 항노화 작용이 있음을 보고하였고⁹, 黃은 Alzheimer's disease 생체 실험모델에서 공진단이 효과가 있다고 보고하였다¹⁰. 그러나 공진단의 뇌허혈에서의 뇌신경의 보호 및 재생 효과에 대해선 보고된 바가 없었다.

이에 저자는 중대뇌동맥폐쇄로 유발된 일시적 뇌허혈 모델에서의 공진단이 뇌신경의 보호 및 재생을 촉진할 수 있는 가능성을 관찰하기 위하여, 뇌허혈 부위의 크기와 해마의 세포사의 변화 그리고 GFAP 및 CD81, c-Fos, ERK(Extracellular signal-regulated kinase)의 발현의 변화를 관찰한바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 실험 동물

본 실험에 동물은 6 주령의 200-300 g의 웅성 Sprague-Dawley 흰쥐(샘타코, 한국)를 구입하여 일주일 정도 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 cage 당 3-4 마리씩 넣어두었으며 물과 사료를 자유로이 섭취하도록 하였다. 아울러 모든 실험은 NIH 동물실험 윤리규정에 따라 진행하였다. 동물은 조작을 가하지 않고 물과 식이를 공급한 대조군, 일과성 뇌허혈 유발을 위한 수술을 실시하고 생리식염수를 공급한 허혈군, 그리고 뇌허혈 유발 후 공진단을 투여한 공진단 투여군으로 구분하였으며, 각 군에 각 6 마리씩 배정하였다.

2. 약물제조 및 약물의 투여 방법

1) 약물제조

본 실험에 사용한 공진단은 원광대학교 광주한방병원에서 구입한 후 정선하여 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용한 공진단은 원방에 홍삼과 숙지황을 가하여 제조한 것으로 1 丸의 구성은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of *Gongjin-dan*

韓藥名	生藥名	用量(g)
蜂 蜜	Mel	12.00
當 歸	Radix Angelicae Sinens	2.40
鹿 茸	Cornu Crevi Pantotrichum	2.40
山茱萸	Frutus Corni	2.40
熟地黃	Radix Rehmanniae Preparat	2.40
紅 蔘	Ginseng Radix Rubra	2.40
麝 香	Moschus	0.29
總 計		24.29

2) 투여방법

공진단 3.75 g을 0.9% 생리식염수에 24시간 교반한 후 녹여 여과하였다. 여과된 약물은 187.5 mg/kg의 용량을 zonde를 이용하여 7일 동안 1일 2회 경구 투여하였다. 약물의 투여는 수술 1시간 전에 투여하고 수술 1시간 후에 투여하였으며 수술 다음

날부터는 1일 2회 오전 9시와 오후 5시에 7일간 투여하였다. 허혈군에는 같은 양의 생리식염수를 투여하였다.

3. MCAO에 의한 국소적 뇌허혈 손상의 유발

일시적인 국소 뇌허혈은 Longa 등의 방법¹¹에 따라 중대뇌동맥을 폐색시켜 만들었다. 실험동물을 70% N₂O, 30% O₂가 혼합된 5% isoflurane을 이용하여 흡입마취를 유도한 후 2% isoflurane으로 마취상태를 계속 유지시켰다.

중대뇌동맥을 폐색하기 위하여 경부 정중선을 따라 피부를 절개하고 흉골허근과 흉골저작근 사이의 총경동맥을 노출시킨 후 총경동맥을 결찰하여 폐쇄시키고 내경동맥과 외경동맥 분지 사이에 27 G 주사침을 이용하여 작은 구멍을 내고 내경동맥내로 치과 인상제(Durelon, Germany)가 발라진 4-0 nylon의 intraluminal filament(직경 0.28 mm, rounded tip)을 18.5-19.0 mm 정도 삽입하여 그 끝이 중대뇌동맥의 기시부를 지나 전대뇌동맥의 근위부까지 도달하도록 하였다. 그 후 총경동맥과 외경동맥을 결찰한 후 수술 부위를 봉합하였으며 혈류차단 2시간이 지난 후 intraluminal filament를 제거하여 측부 순환을 통하여 재관류를 시켰다. 모든 수술조작기간 및 마취회복기간에는 동물의 직장온도를 37±0.5℃로 유지하였다. 실험동물은 상처를 봉합하고 백열전등을 비춘 후 heating pad에 두어서 회복하도록 하였다. 중대뇌동맥 폐색 후 실험동물이 마취에서 깨어나면 신경학적 검사를 하여 동맥폐쇄를 확인하였다.

4. 고정액의 관류와 뇌조직의 적출

약물 투여 7일 후 흰쥐를 ketamine(50 mg/kg)과 xylazine(10 mg/kg)을 섞은 마취액을 복강으로 주사하여 마취를 유도하였다. 마취가 유도된 실험동물의 흉벽을 제거하고 왼쪽 심실에서 대동맥 방향으로 18 G 주사바늘을 삽입하였다. 오른쪽 심방귀를 가위로 절단한 뒤 50 ml/min의 속도로 연동펌프

(peristaltic pump)를 이용하여 phosphate buffered saline (PBS)으로 관류시켜 혈액을 제거하였다. 그리고 4% paraformaldehyde용액 250-300 ml를 관류시켜 고정을 시행하였다. 적출한 뇌조직은 4℃에서 24시간동안 4% paraformaldehyde 용액에 고정을 시행한 후 30% sucrose 용액에 4℃에서 하루 이상 보관하였다. 적출한 대뇌의 정수리점(bregma)에서 뒤로 3.0 mm에서 4.5 mm 떨어진 곳에 해당하는 부위(해마 부위)를 동결절편기를 이용하여 두께가 40 μm가 되게 관상으로 박절한 후, 조직 절편을 보존액(cryoprotectant solution)이 들어있는 24-well 배양기에 조직 절편을 매 절편마다 각 well에 순차적으로 반복하여 넣은 후 영하 20℃에서 보존하였다.

5. Cresyl violet 염색

적출된 뇌조직의 관상절편을 0.05 M PBS으로 3회 세척하였다. 절편을 xylene에 5분 100% alcohol에 2분 그리고 95% alcohol에 1분 담그고 다시 70% alcohol에 1분 담근 후 증류수에 2분 세척하여 탈지와 탈수 과정을 거쳤다. 그리고 0.5% cresyl violet 용액으로 30 분간 염색하였다. 염색이 끝난 조직은 광학현미경 (Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

6. 뇌허혈 부위의 크기 측정

재관류 후 48시간 후에 실험동물을 희생시킨 후 즉시 단두하여 2 mm간격으로 관상절편을 얻어 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Sigma Chemical Co.)용액에 20분간 담가 두어 염색하였고, 염색된 조직을 10% 포르말린에서 고정한 후, 염색된 조직은 스캐너를 이용하여 전체 뇌반구 크기와 허혈 영역의 크기를 산출하였다.

7. 면역조직화학

조직절편을 24-well 배양기에 5-10 개씩 넣고, 0.05 M PBS 용액으로 10분씩 3회 교반기를 이용하여 세척하였다. 15-20분간 1.0% H₂O₂로 반응시

키고 같은 방법으로 세척한 후 0.2% Triton X-100 용액에 20분 반응시키고 PBS 용액으로 세척하였다. 그리고 말 혈청과 정상 염소 혈청을 1:100으로 희석시킨 차단항체를 실온에서 0.5-1시간 반응시킨 후 PBS 용액으로 세척하고, 48시간 동안 4°C에서 일차항체 (GFAP, CD81, c-Fos, ERK)를 가한 후 PBS 용액으로 세척하였다. 그리고 2시간 실온에서 이차항체 (horse anti-mouse IgG, goat anti-rabbit IgG, 1:100)를 가한 후 PBS 용액으로 세척하였다. Avidin-biotin peroxidase complex와 실온에서 1시간 반응시키고 PBS 용액으로 세척한 후 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA)로 발색시켰다. 그 다음 조직 절편을 30분 전에 꺼내놓은 gelatin coated slide에 올린 후 실온에서 2시간 건조하였다. 이후 슬라이드를 증류수에 10분 동안 세척한 다음 alcohol로 탈수시키고 xylene으로 투명화한 후 캐나다 발삼으로 봉입시키고 광학현미경으로 관찰하였다.

8. 광학현미경적 검사

염색된 조직은 슬라이드에 부착하였으며 광학현미경 (Olympus, Japan)을 이용하여 해마의 피라미드세포수를 CA1의 내측과 외측 두 부위, CA2 한 부위를 400 배 배율로 양측에서 각각 측정하여 평균치를 이용하였다.

9. 통계 분석

본 연구에 사용한 숫자는 mean±SEM으로 이루어졌다. 각 그룹 간의 차이는 t-검정 및 one-way ANOVA를 실시하였으며 통계학적으로 p값이 0.05 이하이면 의미가 있는 것으로 간주하였다.

III. 實驗結果

1. 공진단의 투여가 뇌허혈 부위의 감소에 미치는 영향

중대뇌동맥 폐쇄에 의한 일시적 뇌허혈 유발 흰 쥐에서 공진단 투여가 뇌허혈 부위의 감소에 미치

는 영향을 관찰하기 위하여 공진단 투여 후 뇌조직을 적출하여 뇌허혈 부위의 크기를 관찰하였다. 그 결과 공진단 투여 후 뇌허혈 부위의 크기는 허혈군에 비하여 공진단 투여군에서 유의하게 감소하였다. 즉 생리식염수만을 투여한 허혈군에 비하여 공진단 투여군에서 뇌허혈 손상부위는 12.5% 감소하였다(Fig. 1).

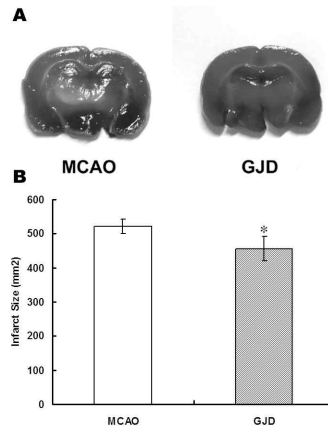


Fig. 1. Representative photomicrograph of TTC-stained coronal slices demonstrating infarcts (nonstained region) in the ipsilateral (left) cortex and striatum shows significant reduction in infarct size in GJD group compared with MCAO rats (A). The size of infarction in the GJD group was significantly reduced by 12.5 % compared with MCAO rats (B).

Bar graphs depict infarct size in all the animals. Results are given mean ± SE * p <0.05 vs MCAO.

2. 공진단의 투여가 해마의 뇌세포사에 미치는 영향

일시적 뇌허혈 후 공진단의 투여가 해마의 뇌세포사 보호효과를 관찰하기 위하여 피라미드세포의 사멸을 관찰하였다. 일시적 뇌허혈 손상 후 7 일에서는 CA1의 내측에서 피라미드세포핵의 신경세포가 허혈군에서 감소되었음을 볼 수 있었다. 양측 해마의 CA1에서 고배율(×200)로 측정한 평균 피라미드세포 수는 대조군에서 가장 많았으며, 허혈

군에서는 유의하게 감소되었다. 그러나 공진단 투여군에서는 유의하게 허혈군에 비하여 증가하였다. 그리고 CA2에서도 평균 피라미드 세포 수는 대조군에서 가장 많았고 허혈군에서 가장 감소하였으나 공진단 투여 후 세포 수는 허혈군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 2).

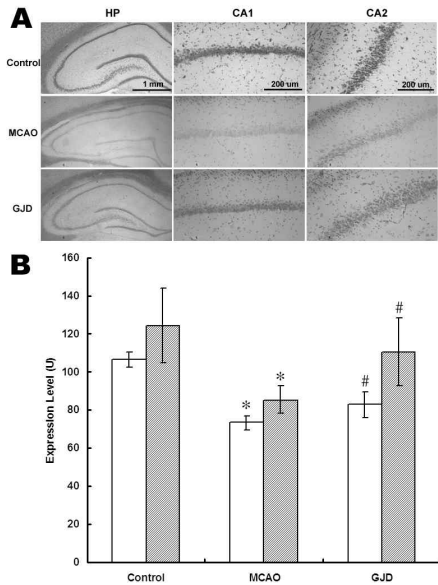


Fig. 2. The effect of GJD on pyramidal cell death protection measured after 7 day following MCAO in male SD rats.

Coronal sections were stained with cresyl violet. Number of Nissle Stained pyramidal cells measured in CA1 and CA2 of hippocampus was significantly decreased in MCAO group rats and increased after GJD administration significantly. The sections were taken pictures using microscope in HP at 40X, CA1 and CA2 at 200X (A) and converted into graphs (B). HP; Hippocampus. Scale bar =500 μ m at HP, 200 μ m at CA1 and CA2. * $p < 0.05$ vs Control, # $p < 0.05$ vs MCAO.

3. 공진단의 투여가 GFAP 활성화에 미치는 영향

공진단 투여가 뇌허혈 손상 후 중추신경계에 발생하는 gliosis의 억제에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 적출된 뇌조직을 세척한 다음 염색을 실시하여 GFAP의 발현여부를 관찰하였다. GFAP 면역

염색에 의하여 갈색으로 염색된 정상세포는 대조군에서는 발현이 감소되었으나 허혈군에서는 유의하게 발현이 증가하였다. 그러나 공진단 투여 후 증가된 GFAP는 발현은 허혈군에 비하여 감소하였다(Fig. 3).

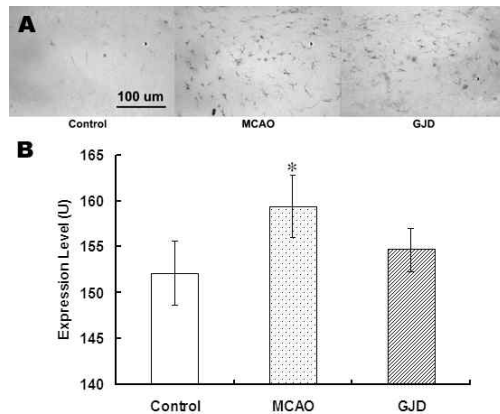


Fig. 3. Effects of GJD on GFAP expression following ischemic injury by MCAO in SD rats.

Coronal sections were rinsed and probed with GFAP antibody on the 7th day following MCAO. The sections were taken pictures using microscope. GFAP expression in hippocampus was increased after MCAO with darker staining and decreased with GJD administration. Photomicrographs were taken at X200 (A). GFAP expression was measured from coronal sections of the rat and converted into graphs (B). Data show mean and standard deviation between MCAO and control or GJD group with significant difference. * $p < 0.05$ vs Control.

4. 공진단의 투여가 CD81 활성화에 미치는 영향

공진단 투여가 뇌허혈 손상 후 나타나는 gliosis 과정에서 GFAP의 발현 증가와 더불어 동반되는 CD81의 발현 증가 억제 현상을 관찰하기 위하여 적출된 뇌조직을 세척한 다음 CD81으로 염색을 실시하여 CD81의 발현 여부를 관찰하였다. 그 결과 대조군에 비하여 허혈군에서 CD81은 발현이 증가하였다. 그러나 공진단 투여 후 허혈군에 비하여 대조군과 유사한 양상으로 CD81의 발현 감소 현상을 나타내었다(Fig. 4).

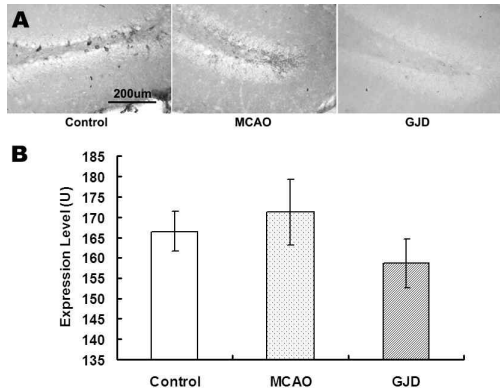


Fig. 4. Effects of GJD on CD81 expression following ischemic injury by MCAO in SD rats.

Coronal sections were rinsed and probed with CD81 antibody on the 7th day following MCAO. The sections were taken pictures using microscope at 200X (A). CD81 expression in dentate gyrus was increased after MCAO with darker staining and decreased with GJD administration. CD81 expression was measured from coronal sections of the rat and converted into graphs (B). Data show mean and standard deviation between groups.

5. 공진단의 투여가 c-Fos 활성화에 미치는 영향

공진단 투여가 허혈성 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 적출된 뇌조직에서 c-Fos 의 발현을 관찰하였다. 그 결과 해마부위에서 측정된 c-Fos의 발현은 대조군에 비하여 허혈군과 공진단 투여군에서 유의하게 감소하였다. 또 허혈군에 비하여 공진단 투여후 c-Fos 발현은 감소하였으나 유의성은 보이지 않았다(Fig. 5).

6. 공진단의 투여가 ERK 활성화에 미치는 영향

허혈 손상 후 공진단 투여가 어떠한 경로를 통하여 작용을 발현하는가를 규명하기 위하여 적출된 뇌조직의 해마 부위에서 ERK 발현을 관찰하였다. 그 결과 ERK의 발현은 대조군에 비하여 허혈군과 공진단 투여군에서 발현이 증가하는 양상을 보였다. 공진단 투여 후 ERK의 발현은 허혈군에 비하여 증가하였으나 유의성은 나타내지 않았다(Fig. 6).

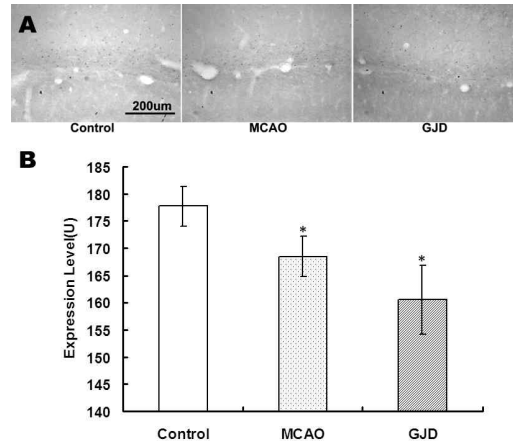


Fig. 5. The effect of GJD on c-Fos expression in the MCAO rats.

c-Fos expression in hippocampus was significantly decreased after MCAO and GJD administration. c-Fos expression was reduced after GJD administration in MCAO rats without significance (A). The expression was measured from coronal sections of the rat and converted into graphs (B). Data show mean and standard deviation between groups. * p<0.05 vs Control.

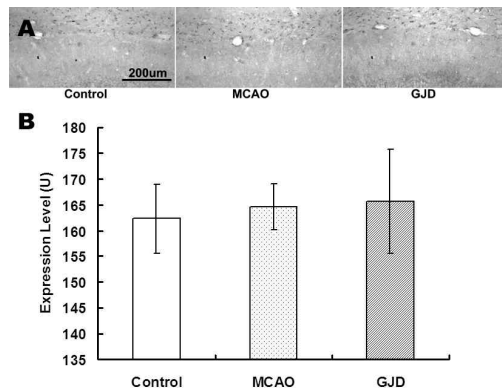


Fig. 6. The effect of GJD on ERK expression in the MCAO rats.

ERK expression was increased in MCAO and GJD group without significance. ERK expression was increased after GJD administration in MCAO rats without significance (B). The expression was measured from coronal sections of the rat and converted into graphs (B).

VI. 考 察

통계청의 2008년도 사망원인통계연보에 의하면 악성신생물에 이어서 뇌혈관질환이 2번째로 높으며, 미국의 경우 뇌혈관 질환의 75-80%가 허혈성 뇌혈관 질환이다¹². 허혈성 뇌혈관 질환은 갑작스럽게 발병하며 정상적인 신경학적 기능의 상실을 동반하며, 급격하게 질병의 경과가 진행되어 사망의 위험성이 높으며 사망하지 않더라도 지속적인 심각한 후유 장애로 인하여 개인의 삶의 질을 저하시키며 경제적, 사회적으로도 큰 손실이 되고 있다.

허혈성 뇌혈관 질환과 같은 중추신경계 질환의 경우 외과적 수술부터 다양한 치료 기법들이 시도되어 왔으나 신경기능의 회복에는 한계가 있으며 이러한 치료의 한계는 중추신경계의 손상 후 급속한 신경 세포의 사멸, 신경재생에 부적합한 외부 저해환경(myelin debris 및 glial scar 등), 신경세포의 자가 재생능력의 부재로 인한 것으로 생각된다¹³. 따라서 최근의 연구는 신경재생에 관련된 유전자(RAGs)를 활성화 시키거나 신경재생을 저해하는 myelin debris나 glial scar의 발생 및 기능을 억제하는 물질이나 방법의 개발에 초점이 맞추어져 있으며 신경성장인자 등을 이용한 약물치료와 줄기세포 등을 이용한 세포치료가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 Longa¹¹ 등의 방법에 따라 nylon intraluminal filament로 middle cerebral artery (MCA)의 기시부를 막아 일시적 국소 뇌허혈 모델을 만들었으며, 혈류차단 2시간 후에 nylon intraluminal filament을 제거하여 측부순환을 통하여 재관류하였다.

중추신경계에 손상을 받게 되면 신경세포의 세포사멸이 일어나고 조직의 공동화가 생기며 축삭(axon)과 수초(myelin)가 소실되어 신경간 전도가 차단된다. 그리고 reactive gliosis에 의하여 공동부위를 신경교세포가 감싸는 glial scar가 생기게 된

다³ Glial scar는 대부분 성상교세포로 구성되어 있는데 GFAP는 성상교세포의 intermediate filament의 core protein의 특이적인 구성물로 신경독성물질에 노출되었을 때 조직손상이 있는 부위에서만 국소적으로 증가되며 GFAP의 증가는 신경독성물질의 대사물이 신경조직을 파괴시키는 동안에만 증가되었다가 점차 감소되어 장기적으로는 정상치로 회복되는 일과성 특징을 갖는다고 알려져 있다^{14,15}.

성상교세포는 중추신경계를 지지하는데 있어서 중요한 기능을 갖고 있으며, 손상된 신경조직이 있을 때 증식하여 더 이상 손상이 확산되는 것을 막아주는 역할을 한다고 생각되며¹⁶ 다양한 신경 손상에 대해 반응하여 신경전달물질, 신경 단백질, 사이토킨(Cytokine) 등 여러 종류의 물질들을 분비하기도 한다¹⁷. 또한 성상교세포는 세포내액과 세포외액의 이동을 조절하며, 글루탄산염을 흡수하여 흥분독성을 감소시키고 공간완충 역할을 한다¹⁸. 중추신경계의 손상시 reactive gliosis로 인하여 생긴 성상교세포는 정상적인 세포 환경을 유지시키는 역할을 하여 신경세포에 도움이 된다. 그러나 성상교세포의 증식으로 glial scar가 형성되어 신경재생의 방해요인이 되는 물리적 장벽이 되며¹⁹, 지속적인 reactive gliosis는 신경재생을 억제하거나 독성 물질을 분비하며 결국 신경원세포나 성상교세포의 세포죽음(cell death)을 유발하므로²⁰, reactive gliosis를 억제하려는 연구들도 있다^{22,22}.

CD81 또는 TAPA-1(target of antiproliferative antibody)은 사람의 염색체 11p.15.5 부위에 존재하는 유전자로 사람의 lymphoma 세포에서 처음 규명되었고, 237개의 아미노산, 26 kDa의 분자량을 가지며 TM4SF 단백질의 member인 CD37, CD63과 유사한 염기서열을 가지며²³ 중추신경계 내에서도 뇌, 척수에 존재하는 것으로 알려져 있다²⁴. CD81은 다양한 세포막 단백질과 연관이 있으며 세포의 부착, 이동성, 전이, 활성화, 증식, 분화 등 다양한 세포 기능에 관여한다고 보고되었고²⁵, CD81이 결핍된 생쥐가 보통 생쥐보다 뇌의 크기가 크며 뇌를

구성하는 교세포의 양이 현저히 증가되어 CD81이 세포증식을 조절한다는 것이 실험적으로 밝혀졌다²⁶.

중추신경계의 손상과정 및 그 이후 과정에서 뇌 세포는 유전자발현의 조절을 포함한 다양한 반응을 보인다. Immediate early genes(초기발현유전자, IEGs)는 신경 손상 직후에 발현되며 이들 유전자의 발현은 late response genes를 조절한다. 한편 손상 후 수 시간에서 수일까지 생존해 있는 세포에서 다양한 유전자의 발현이 증가된 것이 관찰되고 있어 뇌세포 손상에 적응하여 생존하는데 관여할 가능성을 제시하고 있다^{27,28}.

c-Fos의 발현에는 ERK/MAPK의 활성이 관여하는 것으로 알려져 있다. c-Fos는 신경세포의 사망과 증식에 영향을 미치는 단백질로 성장인자 등의 다양한 자극에 의하여 발현이 증가된다²⁹. 또한 신경 활동의 증가에 의하여도 c-Fos는 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다. 특히 c-Fos는 immediate early gene으로 뇌조직 손상 후 6-12시간에 최대로 발현이 증가하다가 72시간까지 발현이 지속되는 것으로 나타났으며 허혈성 뇌손상에서도 같은 양상으로 c-Fos가 발현된다³⁰. 또한 c-Fos는 뇌허혈로 인한 신경손상에 앞서 발현이 증가되며, 세포 사멸과 관련되는 것으로 알려지고 있다^{31,32}. 그러나 한편으로는 c-Fos는 뇌허혈의 회복에 깊이 관련되어 있는 것으로 보고되었다³³.

ERK는 protein kinase의 세포내 신호전달계로 감수분열, 유사분열 및 유사분열 후 기능에 영향을 미친다. 아울러 성장인자나 사이토카인 및 바이러스 감염 등 다양한 자극에 의하여 활성화 되는 것으로 알려져 있다³⁴. 특히 ERK는 gliosis와 관련되는 것으로 알려져 있으며 항산화제 투여 시 활성화되고 뇌세포 손상 후 회복기 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다³⁵. 또한 ERK/MAPK의 활성은 손상 후 신경세포 재생을 촉진한다고 보고되었다^{36,37}. 그러나 한편으로 ERK/MAPK의 활성은 손상 후 뇌신경 생존을 방해하는 요소로 작용하는 것으로 알려져 있다³⁸.

공진단은 元末 危亦林的 『世醫得效方』에 最初로 수록되었으며 鹿茸, 當歸, 山茱萸, 麝香의 4가지 약물에 추가로 紅蓼, 熟地黃으로 구성된 處方이다. 공진단의 主治症으로 危는 “固天元一氣 使水升火降 五臟自和 百病自去”라고 하였고³⁹ 許는 虛勞肝虛에 응용한다고 하였으며⁴⁰, 金은 稟賦가 본래 약한 경우에 가장 효과적인 處方이라 하였고⁴¹ 裴는 天稟이 虛弱한 體質에 복용하면 水升火降을 원활하게 하여 百病을 豫防할 수 있는 방제라고 하였다⁴².

공진단의 구성약물의 성미와 효능을 보면 鹿茸은 甘鹹·溫하며 肝·腎經에 들어가고 補精壯陽, 補精血強筋骨, 補肝腎調衝任의 效能이 있으며, 當歸는 甘辛苦·溫하고 心·肝·肺經에 들어가며 補血調經, 活血止痛, 潤腸通便의 效能이 뛰어나 臨床에서 “血病의 要藥”으로 널리 사용되고 있다. 山茱萸는 酸澁·微溫하며 肝·腎經에 들어가고 補益肝腎, 收斂固澁의 效能이 있으며 麝香은 性味が 辛·溫하고 心·脾經에 들어가며 開竅醒神, 活血散結, 消腫止痛, 催產不殆 등의 효능이 있다⁴³.

고지질증 억제 효과,⁸ 항산화 및 항노화 작용⁹ Alzheimer's disease에 효과가 있다고 보고된¹⁰ 공진단을 이용하여 MCAO 모델에서 gliosis에 미치는 영향을 통하여 공진단의 뇌허혈에서의 뇌신경의 보호 및 재생 효과에 대하여 관찰하였다.

결과적으로 본 실험에서 공진단의 투여는 뇌허혈로 인한 세포손상과 세포손상 시 함께 발현되는 CD81 및 GFAP의 발현을 억제하였다. 공진단의 투여가 세포손상을 억제하는 것으로 보아 공진단이 뇌세포의 허혈상태에서 뇌세포에 대한 보호작용이 있는 것으로 볼 수 있다. 또한 중추신경계 손상 시 reactive gliosis 반응으로 형성되는 glial scar에 동반되어 나타나는 GFAP와 CD81을 억제하였다. GFAP와 CD81의 발현 감소는 reactive gliosis를 억제하여 신경재생의 물리적 장벽을 완화하며 신경재생을 촉진할 것을 기대할 수 있다.

본 실험에서 공진단 투여군과 허혈군에서 대조

군과 비교하여 c-fos의 발현이 감소하였다. 이는 c-fos의 발현이 뇌손상 후 최대 72시간까지 발현이 지속되는데 본 실험에서 7일 후에 뇌조직을 적출하여 c-fos가 발현하는 시간이 지나서 나타난 현상으로 이해된다. 따라서 c-fos의 기전과 역할에 대하여 추가적인 검사가 필요하다 사료된다.

본 실험에서 ERK의 발현이 허혈군에 비하여 공진단 투여군에서 발현이 증가되었다. 따라서 공진단 투여군이 뇌세포 손상 시 ERK 발현 증가와 관련되어 gliosis와 관계하는 것으로 사료된다. 그러나 ERK가 신경세포 손상에 미치는 영향에 대하여 아직 논란 중이므로 ERK의 정확한 역할 및 기전에 대하여 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 실험에서 공진단 투여가 뇌허혈로 발생하는 뇌손상 부위의 크기 감소, 해마의 세포사 억제, gliosis 억제 등에 효과가 있음을 관찰하였다. 이상의 결과는 공진단이 허혈성 뇌혈관질환의 신경의 보호 및 재생에 효과가 있어 허혈성 뇌손상 시 임상에서 다용할 수 있으리라 사료된다.

V. 結 論

일시적 뇌허혈 후 회복에 미치는 영향을 규명하기 위하여 중대뇌동맥폐쇄를 유발시킨 흰쥐에 공진단을 투여하고 뇌경색 부위의 크기 감소, 피라미드 세포의 수 그리고 GFAP 및 CD81, c-Fos, ERK의 발현 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 공진단 투여는 MCAO 모델 흰쥐의 뇌허혈 부위의 크기를 감소시켰다.
2. 공진단 투여는 해마의 세포사를 억제하였다.
3. 공진단 투여는 GFAP 발현을 감소시켰다.
4. 공진단 투여는 CD81 발현을 감소시켰다.
5. 공진단의 투여는 c-Fos 발현을 감소시켰다.
6. 공진단의 투여는 ERK 발현을 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 공진단 투여는 뇌허혈 손상으로 발생하는 경색부위의 크기 감소, 세포사 억제, gliosis 억제 등에 효과가 있음을 관찰하였으며, 허혈성 뇌손상의 치료에 응용할 수 있다 사료된다.

參考文獻

1. Broude E, Mcatee M, Kelley MS, Bregman BS. Fetal spinal cord transplants and exogenous neurotrophic support enhance c-Jun expression in mature axotomized neurong after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 1999;155:439-55.
2. Eng LF, Reier PJ, Houle JD. Astrocyte activation and fibrou gliosis : Glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. *Prog Brain Res*. 1987;71:439-55.
3. Houle J. The structural integrity of glial scar tissue associated with a chronic spinal cord lesion can be altered by tansplated fetal spinal cord tissue. *J Neurosci Res*. 1992;31:120-30.
4. Miros Pekny, Michael Nilsson. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005;50:427-34.
5. Dijkstra S, Duis S, Pans IM, Lankhorst AJ, Hamers FP, Veldman H, Bar PR, Gispen WH, Joosten EA, Geisert EE Jr. Intraspinal administration of an antibody against CD81 enhances functional recovery and tissue sparing after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2006;202(1):57-66.
6. Menet V, Gimenez Y, Ribotta M, Sandillon F, Privat A. GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia*. 2000;31(3):267-72.
7. 김갑성, 김명동, 김윤범, 김장현, 김중호, 이원철, 임양근, 정찬길. 실용동서의학임상총서 3권. 서울: 도서출판정담; 2001, p. 22-30.
8. 김영훈, 배만중. 공진단이 백서의 고지혈증 지질

- 대사에 미치는 영향. 東西醫學. 1989;14(2):61-78.
9. 최금희, 박치상. 공진단의 성분 분석 및 항산화 작용에 미치는 영향. 大韓本草學會. 2007;22(2):51-633.
 10. 黃善美. 공진단이 CT105와 β -amyloid로 유발된 Alzheimer's disease 病態 모델에 미치는 영향. 대구한의대학교 대학원. 2004.
 11. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84-91.
 12. 김진호, 한태균. 재활의학. 서울: 군자출판사; 2003, p. 349-53.
 13. PH Horner, FH Gage. Regeneratiing the damaged central nervous system. *Nature*. 2000;407:963.
 14. O'Callaghan JP. Assessment of neurotoxicology -use of glial fivrillary acidic protein as a biomarker. *Biomedical and envionmental sciences*. 1991;4:197-206.
 15. O'Callaghan JP. Assessment of neurotoxic using assays of neurin and glial localized proteins -chronology and critique. *Neurotoxicology*. New York: Ravin Press Ltd. ; 1992, p. 83-99.
 16. Barres BA, Chun LLY, Corey DP. Ion channels in certebate glia. *Annu Rev. Neurosci*. 1990;13:441-74.
 17. Malhotra S, Shnitka T, Elbrink J. Reactive astrocyte-a review. *Cytobios*. 1990;61:133-60.
 18. Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M. Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res*. 2003 ;28(2):293-305.
 19. Norenberg MD. Astrocytes responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994;53:213-20.
 20. Norenberg MD. Reactive astrocytosis. *the Role of gloa in Neurotoxicity*. 1996:93-107.
 21. O'Callaghan JP, Brinton R, McEwen BS. Glucocorticoids regulate the synthesis of glialfibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. *J Neurochem* 1991;57:860-9.
 22. Vijayan VK, Lee YI, Eng LF. Increase in glial fibrillary acidic protein following neural trauma. *Mol. Chem. Neuropathol*. 1990;13:107-18.
 23. Oren R, Takahashi S, Doss C, Hersey P. *Biochem. Biophys Res Com*. 1966;222:13-8.
 24. Dijkstra S, Geisert EJ, Gipsen WH, Bar PR, Joosten EA. Up-regulation of CD81(target of the antiproliferative antibody; TAPA) by reactive microglia and astrocytes after spinal cord injury in the rat. *J Comp Neurol*. 2000;428:266-77.
 25. Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD 81(TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:89-109.
 26. Dijkstra S, Geisert EE Jr., Dijkstra CD, Bar PR, Joosten EA. CD81 and microglial activation in vitro proliferation, phagocytosis and nitric oxide production. *J Neuroimmunol*. 2001;114:151-9.
 27. Koistinaho J, Shimohama S, Sato M, Nishikawa H, Madono K, Akaike A, Kimura J. Differential expression of small heat shock proteins in reactive astorcytes after focal ischemia: possible role of beta-adrenergic receptor. *J Neurosci*. 1999;19(22):9768-79.
 28. Yamaguchi A, Hori O, Stern DM, Hartmann E, Ogawa S, Tohyama M. Stress-Associated endoplasmic reticulum protein 1(SERP1)/ribosome-associated membrane protein4(RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and faciliates subsequent glycosylation. *Journal of Cell Biology*. 1999;147:1195-204.

29. Onodera H, Kogure K, Ono Y, Igarishi K, Kiyota Y, Nagaoka A. Proto-oncogene c-fos is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. *Neurosci. Lett.* 1989;98(1):101-4.
30. Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Prog. Neurobiol.* 1996;50(2-3):83-107.
31. Gubits RM, Burke RE, Casey-McIntosh G, Bandele A, Munell F. Immediate-early gene induction after neuronal hypoxiaischemia. *Mol Brain Res.* 1993;18:228-38.
32. Hafezi F, Steinbach JP, Marti A, Munez K, Wang Z-Q, Wagner EF, Aguzzi A, Reme C. The absence of c-Fos prevents light induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat Med.* 1997;3:346-9.
33. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: friend or foe? *Stroke.* 1996;27:1682-7.
34. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995;9:726-35.
35. Masuhara K, Ohmichi M, Kurachi H, Tasaka K, Kanzaki T, Kimura A, Hayakawa J, Hisamoto K, Koike K, Murata Y. Involvement of extracellular signal-regulated protein kinase in gliosis induced during recovery from metabolic inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;267(3):892-96.
36. Bonni A, Brunet A, West AE et al. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science.* 1999;286:1358-62.
37. Han B, Holtzman DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci.* 2000 ;20:5775-81.
38. Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K, Moskowitz MA, Bonventre JV, Alessandrini A. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 aVords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(20):11569-74.
39. 危亦林. 世醫得效方. 北京: 人民衛生出版社; 1990, p. 271.
40. 許浚. 東醫寶鑑(雜病篇). 서울: 法印文化史; 2005, p. 828.
41. 金定濟. 診療要覽(下). 서울: 東洋醫學研究院; 1974, p. 438.
42. 裴元植. 韓方臨床學. 서울: 南山堂; 1986, p. 820-1.
43. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 完譯中藥大辭典. 서울: 도서출판정담; 1998, p. 1036-43, 1159-68, 2589-94, 2667-72.