

전뇌 허혈성 흰쥐 모델에서 mBHT의 신경보호효과 연구

오태우^{1#}, 박용기^{1*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실

Neuroprotective effect of modify Bo-Yang-Hwan-O-Tang on global ischemia in rat

Tae-Woo Oh^{1#}, Yong-Ki Park^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Modified Bo-Yang-Hwan-O-Tang (mBHT) is a polyherbal medicine of twelve herbs traditionally used in the treatment of cerebral and cardiac stroke and vascular dementia. The purpose of this study was to evaluate the neuroprotective effect, pyramidal neuronal cell, inflammation and apoptosis of mBHT against global ischemia in rats.

Methods : Global ischemia was produced by two-vessel occlusion(2-VO) in SD male rats. mBHT at dose of 500 mg/kg was orally administrated for 2 weeks or 6 weeks after global ischemia. The histopathological changes of ischemic brain were observed by staining of hematoxylin and eosin (H&E) and Nissl and immunohistochemistry with anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) antibody as a astrocyte marker. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and apoptotic proteins such as Bax, Bcl-2 and caspase-3 was determined by western blot.

Results : mBHT treatment significantly inhibited the pyramidal neuronal loss in CA1 of hippocampus of global ischemic rats by 2-VO. mBHT also suppressed the activation of astrocytes in the CA1 at 6 weeks after ischemia. In addition, mBHT significantly increased the expression of anti-apoptotic protein, Bcl-2 on ischemic brain, and significantly attenuated the expression of apoptotic proteins, Bax and caspase-3.

Conclusions : These results indicate that mBHT inhibits neuronal cell damage induced in global ischemia by 2-VO, suggesting that mBHT may be a potential candidate for the treatment of vascular dementia.

Key words : mBHT, Neuroprotective effect, Global ischemia, Anti-apoptosis

서 론

뇌졸중은 대표적인 뇌 혈관질환으로 뇌중풍 또는 중풍이라고도 불리며 혈관 파열에 따른 출혈성 뇌졸중과 혈전 등으로 인한 허혈성 뇌졸중으로 분류 된다. 현재 우리나라는 허혈성 뇌졸중의 발병율이 출혈성 뇌졸중 보다 높으며, 단일 질환으로는 사망률 1위의 질환에 속한다¹⁾. 뇌에서 허혈성 손상에 신경세포의 손상 기전은 뇌에 혈액을 공급하는 혈관이 막혀 산소와 포도당 등 영양물질의 공급이 중단됨으로써 에너지 고갈과 함께 신경세포가 죽어 나감에 따라 뇌의 주변부로 염증 반응이 진행되면서 신경세포 사멸이 유도되는 것이며 염증반

응 발달은 지속적으로 지연형의 신경세포 사멸을 유도함으로써 병의 진행을 가속화한다. 이때는 막힌 혈관을 열어 산소와 포도당 등의 영양물질을 재공급한다고 하더라도 영구적인 뇌 손상이 생기게 된다. 뇌를 구성하는 세포 중 신경교세포(glia cell)와 혈관세포는 허혈성 손상에 비교적 강한 반면 신경세포는 상대적으로 매우 약하며, 신경세포의 허혈에 대한 취약성(selective cell vulnerability)은 부위에 따라 다르게 나타나서 대뇌피질의 3, 5, 6층(layer), 해마와 endfolium, 편도핵(amygdaloid nucleus), 소뇌의 Perkinje 세포나 basket 세포, 뇌간의 일부 등이 특히 약한 것으로 알려져 있다²⁻⁴⁾.

뇌 허혈은 허혈에 의해 손상되는 뇌의 범위에 따라 전(全)뇌

*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr
#제1저자 : 오태우, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 054-770-2646 · E-mail : taewoo2080@gmail.com
· 접수 : 2012년 10월 18일 · 수정 : 2012년 11월 3일 · 채택 : 2012년 11월 5일

허혈과 국소 뇌 허혈로 나눌 수 있으며, 허혈의 기전을 밝히기 위한 연구나 약물의 효과를 알기 위해 다양한 실험동물모델에 대한 연구들이 진행되어 왔다. 전뇌 허혈의 실험모델로는 양측 경동맥을 동시에 결찰하는 2-vessel occlusion(2-VO)과 양측 척추 동맥 폐쇄 후 양측 경동맥을 결찰하는 4-vessel occlusion(4-VO)법이 주로 사용되고 있다. 전뇌 허혈 모델에서는 주로 해마부위(hippocampus) CA1층 추체세포(pyramidal neuron)의 선택적인 사멸을 유발하게 되는데 이는 전뇌 허혈 후 재관류에 의해 뇌 혈류가 회복되어도 해마 CA1 부위와 같은 허혈 손상에 매우 취약한 부위가 선택적으로 손상을 받게 된다. 이러한 신경세포 손상은 즉각적으로 발생하지 않고 수 시간에서 수일에 걸쳐 지연성으로 일어나며 해마 부위 외 기저핵, 신피질 등의 특정부위에서 지연형의 신경세포사멸이 발생하게 된다(delayed neuronal death)⁵⁻⁷. 한편, 정상세포는 중추신경계 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 세포로 주로 신경세포에 대한 영양 공급과 지지 및 인접한 혈관 벽에 부착하여 신경세포의 신진대사를 조절하게 된다. 또한 뇌신경교세포(microglia)는 허혈성 손상에 따라 신경세포가 죽어나감으로써 활성화되어 각종 염증물질과 염증성 사이토카인을 분비함으로써 뇌 염증 발달에 기여하게 된다⁷⁻⁸.

mBHT(modify Bo-Yang-Hwan-O-Tang)의 기본 처방인 補陽還五湯은 《醫林改錯》에 처음 수록된 처방으로 活血祛瘀작용이 있는 當歸尾, 赤芍藥, 川芎, 桃仁, 紅花와 補氣하는 黃芪와 通經活血하는 地龍으로 구성되어 있으며, 補氣, 活血化癥, 通絡하는 효능으로 氣虛로 인한 瘀血證을 치료하는 처방으로 활용되고 있다⁹⁻¹¹. 補陽還五湯의 효능에 대한 연구로는 항허혈 및 항염증¹², 세포사멸억제¹³⁻¹⁴ 및 뇌세포손상억제¹⁵⁻¹⁶, 국소 뇌 혈류량 증가^{17,18}, 뇌 혈전 억제 및 혈중 지질 개선¹⁹⁻²⁰, 고혈압과 고지혈증 개선²¹, 학습과 기억력 증가 및 치매 억제²² 등 다양하게 보고되었으며, 한방임상에서 보양환오탕의 方意를 이용하여 氣虛 血瘀로 인한 中風半身不遂의 치료에 활용해 오고 있고²³, 최근 허혈성 뇌졸중 뿐 아니라 다양한 혈관 질환에 널리 사용하고 있다²⁴. 본 연구자는 보양환오탕에 瘀血을 순환시키고 뇌신경을 보호하는 효과가 있는 한약재를 추가하여 가미보양환오탕(modified BHT, mBHT)을 구성하였으며, 이전 연구를 통해 mBHT의 일시적 중대뇌동맥 결찰에 의한 국소 허혈성 뇌졸중에 대한 치료효과^{45,47,48}, 뇌 신경교세포 활성제어를 통한 뇌염증 억제 효과⁴⁹, 뇌 신경보호효과⁵⁰ 및 뇌 혈관보호효과⁵¹에 대해 보고한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 2-VO에 의해 유도되는 전뇌 허혈 동물모델에서 mBHT의 해마부위 신경세포에 대한 보호효과와 관련 기전을 조사하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 약재

본 실험에서 사용된 가미보양환오탕(mBHT)의 구성약재는 黃芪(Astragali Radix), 丹蔘(Salviae Miltiorrhizae Radix), 當歸尾(Angelicae Gigantis Radix), 芍藥(Paeoniae Radix), 土牛膝(Achyranthes bidentata Blume), 桂枝(Cinnamomi

Ramulus), 遠志(Polygalae Radix), 石菖蒲(Acori Graminei Rhizoma), 紅花(Carthami Flos), 桃仁(Percicae Semen), 蚯蚓(Lumbricus), 川芎(Cnidii Rhizoma)으로 모두 규격에 적합한 원료성적서가 첨부된 한약재를 (주)광명당제약(울산, 한국)에서 구입하여 사용하였다(Table 1).

2. 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 체중이 200~250 g 내외의 주령 8주된 건강한 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 실험동물로 사용하였다. 모든 실험동물은 동물보호법 13조 및 동국대학교 동물실험 윤리위원회 규정에 따라 관리하였으며, 실험기간 동안 항온, 항습이 가능한 사육장에서 12시간 낮과 밤의 주기를 유지하는 환경에서 자유 섭식하도록 하였다. 구입 후 1주 동안 적응기간을 주었으며 일반적인 행동이상여부를 관찰하여 이상이 관찰되는 동물은 실험에 사용하지 않았다.

3. 약물 제조

본 실험에 사용한 mBHT 추출물은 黃芪, 丹蔘, 當歸尾, 芍藥, 土牛膝, 桂枝(Cinnamomi Ramulus), 遠志, 石菖蒲, 紅花, 桃仁, 蚯蚓, 川芎을 10:4:2:1.5:1.5:1:1:1:1:1:1:1의 비율로 정량하여 총 50 kg을 세말한 다음, GMP 시설업체로부터 물 1000 L를 용매로 98℃에서 3시간 동안 추출하여 연조엑스를 수득하였으며, 다시 700mmHg, 55℃에서 15시간 감압·건조하여 건조엑스를 얻었다(yield of 34.8%). mBHT 추출물은 밀폐용기에 넣어 -20℃ 냉동보관하고 실험직전 멸균된 생리식염수에 완전히 녹여 동물실험을 위한 약물로 사용하였다.

4. 전뇌 허혈 동물모델 제작

전뇌 허혈 동물모델은 2-VO 모델로서 Pilsinelli⁴⁶의 방법을 다소 변형하여 제작하였다. 즉, Sprague Dawley (SD) 흰쥐(rat)를 80% N₂O와 20% O₂에 혼합한 1.5% isoflurane으로 흡입 마취시키고, 보온패드에서 약 37±0.5℃의 일정 체온으로 마취상태를 유지시켰다. 그 후, 양측 전뇌허혈 손상을 유도하기 위하여 양와위로 고정시키고, 경부 정중선을 따라 경부를 절개한 후 양측 경부 근육을 조심스럽게 박리하면서 기도 옆에 존재하는 양측 총경동맥(Common carotid artery CCA)을 주위 조직과 미주신경(Vagosympathetic nerve)에 손상을 주지 않도록 주의하면서 박리하였다. 양측 총경동맥은 각각 상하 이중으로 결찰 한 후 절단하여 영구적으로 혈류를 차단시킴으로써 최종 전뇌 허혈 동물모델을 제작하였으며, 절개 부위의 봉합 후 회복 시 발작을 보이는 흰쥐는 제외시켰다.

5. 약물 투여

실험동물을 전뇌 허혈이 유발된 대조군(vehicle)과 전뇌 허혈이 유발된 동물에 mBHT를 처리한 실험군(sample group)으로 나누고, 실험군은 다시 mBHT를 500 mg/kg 용량으로 투여한 군으로 나누었다. 약물의 투여는 전뇌 허혈 유발 후 24시간부터 2주 또는 6주 동안 매일 1회 정해진 시간에 정해진 용량을 경구로 투여하였으며, 대조군은 약물 대신 멸균된 생리식염수를 투여하였다.

6. 뇌 조직의 면역조직화학염색

전뇌 허혈을 유도한 후 2주와 6주째에 각 실험동물을 1.5% isoflurane으로 흡입 마취시켜 뇌를 적출하고 4% paraformaldehyde 용액에 담가 4℃에서 2~3일간 고정하였다. 고정이 완료된 뇌 조직은 파라핀 포매하여 블록을 만든 후 microtome을 이용하여 선조체 부위의 위아래 축을 중심으로 7 μ m 두께로 잘라 슬라이드 표본을 제작하였다. 뇌 조직의 염색을 위해서 조직 슬라이드를 60℃에서 30분 동안 가열한 다음 xylene으로 15~20분간 탈파라핀화하고, 100%, 95%, 75% 알코올을 순서대로 함수시켰다. 조직 슬라이드를 건조시켜 hematoxylin & eosin (H&E), toluidine blue O 및 cresyl violet 염색약으로 염색하였다. 염색된 조직은 광학현미경(Leica Co., German)에서 해마부위를 중심으로 추체 신경세포의 분포와 형태학적 변화를 관찰하였다.

7. Western blot

전뇌 허혈을 유도한 후 2주와 6주째에 각 실험동물을 1.5% isoflurane으로 흡입 마취시켜 신속하게 뇌를 적출한 다음 허혈이 일어난 반구조직 총 부피 5배 용량의 M-PER protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 넣고 Telfon-glass 균질화기를 이용하여 균질화하였다. 균질액을 4℃에서 14,000 rpm으로 20분간 원심 분리하고 상층액을 분리하여 단백질 양을 protein assay 용액(Thermo Fisher Scientific Inc.)으로 정량하였다. 분리된 단백질 30 μ g을 5x sample buffer(100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)와 섞어 95℃에서 3분간 denaturation시킨 다음 15% SDS-PAGE를 수행하였다. 분리된 단백질을 nylon membrane(Bio-Rad, Berkeley, CA, USA)에 옮긴 후 blocking buffer(5% skim milk)로 실온에서 2시간 blocking함으로써 비특이반응을 제거하였다. 여기에 anti-iNOS(1:1000, Santa Cruz), anti-Bax(1:1000, Santa Cruz), anti-Bcl-2(1:1000, Santa Cruz), anti-caspase-3(1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) 및 anti- β -actin(1:5000, Sigma) 일차항체와 함께 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. 이를 0.05% Tween-20이 들어간 TBS(TBST)로 3회 세척한 후 HRP-conjugated anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG (1:5000, Santa Cruz) 항체를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 TBST로 3회 세척한 다음 ECL 용액을 이용하여 발색시키고 x-ray film에 감광시킴으로써 각 단백질의 발현 변화를 관찰하였다.

8. 통계처리

모든 결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean) \pm 표준오차(standard error; SE)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 GraphPad Prism program의 Student t-test를 수행하였으며, p값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 뇌 조직의 해마에서 형태학적 변화에 대한 효과

전뇌 허혈에 의해 손상을 받은 뇌 조직의 해마에서 mBHT 투여에 의한 신경보호효과를 확인하기 위해서 2-VO에 의해 허혈을 유발시킨 흰쥐에 2주와 6주간 약물을 투여한 후 뇌 조직을 수집하여 H&E 염색을 수행하였다(Fig. 1). 그 결과, 허혈성 손상을 입은 흰쥐의 뇌 조직에서는 해마부위 CA1의 추체신경세포가 허혈성 손상으로 핵의 분절(fragmentation), 뭉침(clumping), 농축(pyknosis) 등 변형된 형태(ghost cell)를 나타내었으며, 세포 수의 감소와 주변주 조직의 치밀도가 떨어지는 것으로 나타났다. 그러나 mBHT를 100 mg/kg 용량으로 투여한 실험군에서는 해마부위 CA1의 추체 신경세포가 대부분 생존함에 따라 전형적인 형태를 갖추고 있는 것을 관찰하였다. 한편, 해마부위 신경세포의 손상은 전뇌 허혈 유발 후 2주 보다 6주가 경과하였을 때 더욱 증가하였고 mBHT를 2주 투여한 경우 보다 6주 투여한 군에서 대조군에 비해 현저히 신경세포 손상이 감소하였다.

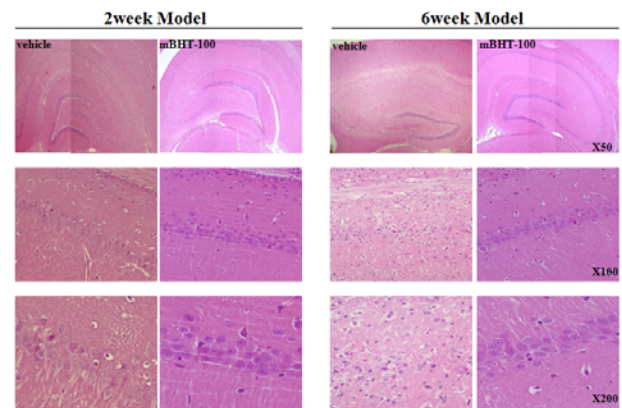


Fig. 1. Effect of mBHT on neuronal loss in the pyramidal cells layer of hippocampal CA1 area 2 weeks (left) or 6 weeks (right) after global ischemia. mBHT was administrated at dose of 100 mg for 2 weeks or 6 weeks after global ischemia. The brain tissues were stained with H&E and then observed by microscope.

2. 뇌 조직의 해마에서 신경세포 손상에 대한 효과

전뇌 허혈에 의해 손상을 받은 뇌 조직의 해마에서 mBHT 투여에 의한 신경보호효과를 확인하기 위해서 2-VO에 의해 허혈을 유발시킨 흰쥐에 2주와 6주간 약물을 투여한 후 뇌 조직을 수집하여 니슬(Nissl) 염색을 수행하였다(Fig. 2). 그 결과, 허혈 유발 2주째 대조군의 해마 부위 추체 신경세포들은 허혈성 손상에 의해 형태학적 변화와 더불어 수의 감소를 나타내었으며, mBHT 투여에 의해 다소 억제되는 것을 관찰하였다. 그러나 허혈 유발 후 6주간 mBHT를 투여한 경우 대조군에 비해 해마 추체 세포들의 숫자가 증가되고 주위 세포의 형태적 붕괴가 현저히 개선되는 것을 확인하였다. 즉, 6주간 mBHT를 처리한 군에서는 2주에서 보다 해마 신경세포의 형태가 뚜렷하게 관찰되었고, 전형적인 피라미드 형태와 함께 대조군에 비해 핵의 분절이나 파괴 등과 같이 변성된 신경세포의 수가 현저히 감소됨으로써 해마 신경세포들이 허혈성 손상으로부터 보호됨을 확인하였다(Fig. 2.).

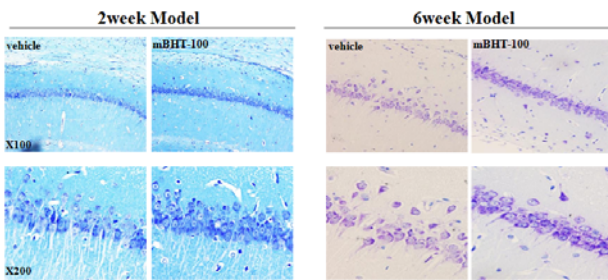


Fig. 2. Effects of mBHT-MC on histopathological changes in the pyramidal cells layer of hippocampal CA1 area 2 weeks (left) or 6 weeks (right) after global ischemia. mBHT was administrated at dose of 100 mg for 2 weeks or 6 weeks after global ischemia. The brain tissues were stained with toluidine blue or vresylviolet for Nissl staining and H&E, and then observed by microscope.

3. 뇌 조직의 해마에서 염증 및 세포사멸인자 발현에 대한 효과

전뇌 허혈에 의해 손상을 받은 뇌 조직의 해마에서 mBHT 투여에 의한 신경보호효과를 확인하기 위해서 2-VO에 의해 허혈을 유발시킨 흰쥐에 2주와 6주간 약물을 투여한 후 뇌 조직을 수집하여 염증단백질인 iNOS와 세포사멸 유도 단백질인 Bax, caspase-3 및 세포 생존 단백질인 Bcl-2의 발현을 Western blot 방법으로 확인하였다(Fig. 3).

그 결과, 허혈성 뇌졸중이 일어난 뇌 조직에서는 iNOS의 발현이 허혈 유발 후 2주와 6주째 현저히 증가하였으며, 허혈 유발 후 2주간 mBHT를 투여한 군에서는 iNOS의 발현이 억제되지 않았으며, 6주간 mBHT를 투여한 군에서 iNOS의 발현이 유의적으로 감소되었다.

한편 세포사멸유도 단백질인 Bax와 caspase-3의 발현에서도 iNOS와 유사하게 허혈성 손상 유발 후 대조군에서 현저히 증가한 반면, mBHT의 투여에 의해 감소되었고 특히 6주째 현저히 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 mBHT는 전뇌 허혈성 손상에 따른 뇌 조직에서 신경세포의 사멸과 생존을 조절하는 단백질들의 발현을 조절함으로써 신경세포의 사멸을 막고 뇌신경을 보호할 수 있는 것으로 나타났다 (Fig 3).

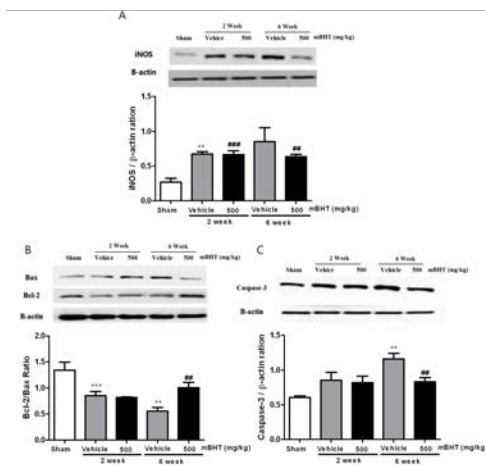


Fig. 3. Effects of mBHT-MC on the expression of Bax, Bcl-2 and caspase-3 in the pyramidal cells layer of hippocampal CA1 area 2 or 6 weeks after global ischemia. mBHT was administrated at

dose of 100 mg for 2 weeks or 6 weeks after global ischemia. Expression of iNOS (A), Bax, Bcl-2 (B) and caspase-3 (C) protein was determined by Western blot, respectively. Bar histogram shows changes the expression in the hippocampus. Values are means±SE of three indifferent experiments. ###p<0.001 vs. sham; and **p<0.01, ***p<0.001 vs. vehicle.

4. 뇌 조직의 해마에서 정상교세포(astrocyte) 활성화에 대한 효과

전뇌 허혈에 의해 손상을 받은 뇌 조직의 해마에서 mBHT 투여에 의한 정상교세포 활성화에 대한 억제효과를 확인하기 위해서 2-VO에 의해 허혈을 유발시킨 흰쥐에 2주와 6주간 약물을 투여한 후 뇌 조직을 수집하여 정상교세포의 마커인 GFAP에 대한 면역조직화학염색을 실시하였다(Fig. 4).

그 결과 대조군의 GFAP-positive astrocyte는 해마 병변의 중심부에서 강한 염색반응을 나타내었는데 특히 CA1 지역과 변연엽(DG, dentate gyrus) 부위의 신경세포 주변으로 모이는 현상을 관찰하였다. 또한 대조군의 해마 부위 GFAP-positive astrocyte는 세포돌기가 뚜렷하게 관찰됨으로써 전형적인 활성화된 형태의 정상교세포를 나타내었다. 반면 mBHT를 6주간 투여한 군에서는 활성화된 정상교세포의 형태적 변형과 더불어 수의 증가가 투여 용량에 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

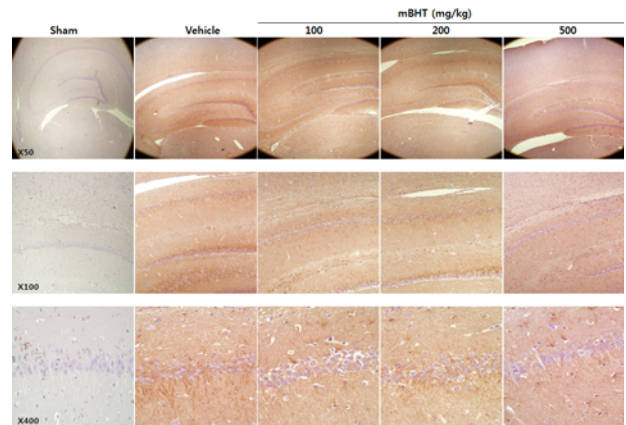


Fig. 4. Effect of mBHT on the activation of astrocyte in hippocampus region 2 or 6 weeks after global ischemia. The brain tissues were stained with anti-GFAP monoclonal antibody. mBHT was administrated at dose of 100 mg for 2 weeks or 6 weeks after global ischemia.

고찰

한의학에서 뇌졸중, 즉 뇌중풍은 暴仆, 卒暴僵仆, 人事不省, 暈倒, 昏不知人, 精神蒙昧등의 意識障礙와 偏枯, 四肢不舉, 手足癱瘓, 半身不遂, 口眼臥斜등의 運W動障礙, 舌強不語, 暴瘡, 言語蹇澁등의 言語障礙등의 증상이 나타나는 病證으로 정의 하고 있으며⁹⁾, 《金櫃要略中風歷節病脈證病治》에서 “夫風之爲病, 當半身不遂, 或但臂不遂者, 此爲痺, 脈微而數, 中風使然.” 이라 하며 오늘날의 中風에 해당하는 개념이 文獻 위에 처음 기록된 이래 歷代醫家들이 中風의 原因, 分類, 治法 등에 대해 다양하게 해석하였다. 한방임상에서 중풍의 後遺 障礙 치료와 개선을 위해 治療方法과 處方들이 다양하게 운용 되고 있는데 그 중 淸時代의 王淸任이 소개한 補陽還五湯이

대표적인 偏麻痺 처방 중 하나로 주로 氣虛血瘀로 인한 中風 半身不遂 治療에 활용되어 왔다¹¹⁾. 최근에는 虛血性 腦血管 疾患, 腦動脈 硬化 뿐 아니라 冠狀動脈硬化, 心筋梗塞, 狹心 症, 多發性神經炎, 血栓性靜脈炎 等の 疾患에도 응용되고 있다²³⁾. 본 연구에서 사용한 mBHT는 보양환오탕에 한방임상에서 뇌졸중 환자의 기억력 개선을 돕고 瘀血을 순환시키는 약재인 丹蔘, 牛膝, 桂枝와 뇌신경을 보호하는 遠志, 石菖蒲를 가감하여 창방한 복합전연약물로서 양측 총내경동맥을 영구적으로 결찰시켜(2-VO) 만성적인 뇌혈류 저하로 인한 해마부위 뇌신경세포 손상을 유발하게 되는 전뇌 허혈 흰쥐모델에서 mBHT의 투여에 따른 신경보호효과를 확인하였다.

본 연구에서 사용한 전뇌 허혈 동물모델은 뇌혈관 폐색 후 2주 또는 6주간 재관류를 하는 모델로서 재관류 후 5-7일 부터 해마부위의 신경세포 손상이 관찰되는데 이는 자연성 세포사멸로 특히 CA1 지역 추체신경세포가 허혈성 손상에 가장 예민하게 반응하는 것으로 알려져 있다³⁸⁾. 또한 전뇌 허혈 동물 모델은 조직학적 변화와 함께 다양한 유전자 및 단백질 발현의 변화가 나타나기 때문에 허혈성 신경세포 손상 기전 연구와 약물의 효능 연구에 가장 보편적으로 사용되는 모델이다^{39,40)}.

임상에서 볼 수 있는 뇌 허혈은 뇌 전체가 허혈이 되는 전뇌 허혈(global ischemia)과 국소 뇌 허혈(focal ischemia)로 구분할 수 있으며, 이러한 임상적으로 유발되는 뇌 허혈 연구를 위해 가급적 임상적 병태에 가까운 동물로서 실험모델이 다양하게 개발되어 왔다. 전뇌 허혈과 국소 뇌 허혈의 병태생리적 특성과 임상적 의미는 서로 다르며 전뇌 허혈 모델에서는 허혈 효과 검정을 위해 허혈 유발 후 3~7일에 대뇌 해마의 CA1층 추체 신경세포의 선택적인 세포사멸 정도로 측정하는 반면, 국소 허혈 모델에서는 손상 정도를 대뇌 경색 부위의 크기로 측정하게 되며 허혈 중심부의 괴사와 주변부의 자연성 세포사멸이 모두 공존하는 실험모델로 임상적인 중풍 환자의 병태와 유사하고, 행동양상이 비슷한 특징이 있어 사람의 중풍 실험모델로도 널리 사용되고 있다²⁵⁾. 본 연구에서는 마우스의 양측 총경동맥을 영구적으로 폐쇄함으로써 뇌 혈류량의 현저한 저하를 유발함으로써 전뇌 허혈을 유발하였으며, 설치류의 경우 혈관의 위치와 종류에 따라서 병변의 위치나 크기가 변하기 때문에 경동맥 차단 후 4주 정도 경과하면 국소 뇌 혈류량이 정상군에 비해 전반적으로 경미한 혈류량의 변화를 보이면서 유발된 저관류의 기간이 길어짐에 따라 허혈성 병변이 관찰되게 된다²⁶⁾. Heiss²⁷⁾ 등은 고양이에서 중뇌동맥 폐색 후 혈류량이 18 ml/100 g brain/min 이하로 떨어지면 뇌 피질 신경세포의 전기적 방전이 소실되며, 이상의 혈류량이 유지될 때는 전기생리학적 변화가 일어나지 않는다고 하였으며, Branston²⁸⁾ 등은 원숭이에서 중뇌동맥 폐색 후 혈류량이 12-16 ml/100 g brain/min 정도에서 유발 전위가 소실된다고 하였다. 이처럼 뇌 혈류가 일정 수준으로 감소하게 되면, 초기 뇌 신경세포로부터 단백질 합성 장애가 나타나면서 혈류 값 이하로 혈류가 감소하게 되고 이후 혐기성 당대사과정 시작되어 신경전달물질들의 분비와 에너지대사에 장애가 나타나게 된다. 이로 인해 무산소성 탈분극전위 현상이 나타나게 되면 뇌 조직에 허혈성 병변이 발생하게 된다.

신경세포에 허혈성 손상이 유발되면 세포의 산소공급이 차단되어 미토콘드리아에서 에너지 생산이 결핍되고 혐기성 대사로 인한 유산의 증가로 세포 내 산증이 발생하며 이 기간이

지속되면 세포가 죽게 된다. 또한 단시간 허혈 후 재관류되면 신경세포에서 흥분성 신경전달물질 분비가 증가되고 세포내로 칼슘이 유입되면서 이차적인 신경손상과 함께 염증반응과 같은 요인들이 복합적으로 어울려 지연성 신경손상의 원인이 되는 것으로 보고 있다²⁹⁻³⁰⁾. 허혈 손상에 따른 세포사멸은 미토콘드리아-매개 내인성과 수용체-매개 외인성 및 caspase 비의존형 기전으로 나누어지며 이들 중 내인성 기전은 허혈 발생에 따라 미토콘드리아로부터 유리되는 cytochrome c에 의해 세포사멸유도 단백질인 Bax 발현에 의해 조절되게 된다. 즉, 유리된 cytochrome c는 caspase 9을 활성화시키고 다시 caspase 3가 활성화되면서 결국 세포사멸이 일어나게 된다³¹⁾. 한편, Bcl-2 family의 유전자들은 다양한 자극에 의해 세포사멸을 조절하는 단백질들을 합성하게 하는데, Bcl-2와 Bcl-xl은 세포사멸을 억제하는 생존 단백질이며, Bax는 세포사멸 유도 단백질로 알려져 있고 이들의 발현 여부에 따라 신경세포의 운명이 결정되는 것으로 보고 있다³²⁻³⁴⁾. 본 연구에서 mBHT의 투여는 전뇌 허혈이 유발된 흰쥐의 뇌 조직에서 Bax의 발현을 억제시키고 Bcl-2의 발현을 증가시킴으로써 허혈 손상에 따른 세포사멸의 내인성 기전을 mBHT가 효과적으로 차단함으로써 세포사멸로부터 신경세포를 보호하는 것으로 나타났다. 아직까지 구체적인 기전은 밝혀져 있지 않지만 Bcl-2는 endoplasmic reticulum에서 비정상적인 칼슘 유리를 방해함으로써 세포사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다³⁵⁾. 최근 보고에 따르면 전뇌 허혈 동물모델에서 저체온 상태가 Bcl-2 발현을 증가시켜 뇌 조직을 보호한다고 하여 최근 저체온 요법에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다^{36,37)}.

성상아교세포(astrocyte)는 세포질과 돌기에 직경이 10 nm 정도의 수많은 아교미세섬유(glial filament)를 가지고 있는 뇌 세포이며 아교미세섬유는 성상아교세포에만 존재하므로 아교섬유산성단백질(glial fibroacidic protein, GFAP) 염색을 통해 성상아교세포의 활성화 정도를 측정할 수 있다^{41,42)}. 허혈성 손상을 받은 뇌 조직은 수 시간 이내 성상아교세포의 크기가 커지면서 GFAP에 대한 염색강도가 강해지는데 시간 경과와 더불어 허혈 손상의 강도에 비례하여 활성화된 성상아교세포의 분포가 증가하게 된다^{43,44)}. 따라서 신경세포의 괴사와 뇌경색을 동반한 허혈손상에서는 GFAP 양성반응을 보이는 성상아교세포가 손상된 신경세포 주변부에 강한 분포를 보이며 이는 손상의 확산을 방지하는 역할을 하기 위한 것으로도 알려져 있다^{39,41)}. 한편, 대뇌 피질에서는 조직 손상 유무와 상관없이 허혈에 의하여 GFAP 양성반응을 보이는 성상아교세포의 분포가 증가하므로 허혈 손상의 진행 정도를 파악하는 지표로도 활용되고 있다⁴¹⁻⁴²⁾. 본 연구에서 mBHT의 투여는 전뇌 허혈에 의해 해마부위 CA1 지역 신경세포 주변으로 강한 분포를 보이는 GFAP 양성 성상아교세포의 활성화가 억제되었으며 이는 mBHT에 의해 허혈성 손상으로부터 해마부위 CA1 추체 신경세포들이 보호됨으로써 성상아교세포의 활성화도 억제됨을 의미한다.

본 연구에서 허혈성 손상 유발 후 2주와 6주 동안 재관류를 유지하면서 두 모델에서의 해마부위 CA1 지역 추체 신경세포의 자연성 세포손상에 따른 변화를 관찰하였으며 전뇌 허혈 2주 모델에서는 6주 모델에 비해 해마부위 CA1 추체신경세포가 비교적 정상에 가깝고 형태학적 변화나 소실의 현상이 초기 단계로 미비하게 관찰되었다. 그러나 신경세포사멸 단백질

질이나 염증 단백질의 발현은 2주 모델에서도 증가하여 허혈성 손상 초기에 세포사멸 과정이 시작되었음을 알 수 있었고, 6주 모델에서는 2주 모델에서 보다 신경세포 손상이 더욱 진행되어 유령세포(ghost cell) 형태 신경세포 증가와 Bax, caspase-3의 발현이 더욱 증가하는 것으로 나타났다. 또한 2주 모델 보다 6주 모델에서 해마부위 주변으로 GFAP 양성 반응의 활성화된 성상아교세포의 분포가 현저히 증가되는 것을 관찰하였다. 따라서 mBHT 투여에 따른 효과도 2주 모델 보다 6주 모델에서 더욱 증가하였으며 이는 mBHT가 전뇌 허혈에서 기억과 감정을 담당하는 해마부위의 지연성 신경세포사멸을 보다 효과적으로 차단함으로써 신경세포를 잘 보호할 수 있음을 의미한다.

결론

본 연구에서는 양측 총내경동맥 영구 폐쇄(2-VO)로 전뇌 허혈이 유발된 흰쥐에서 mBHT의 뇌신경보호효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. mBHT는 전뇌 허혈 동물에서 해마부위 CA1 추체신경세포의 형태학적 손상과 세포사멸을 억제하였다.
2. mBHT는 전뇌 허혈 동물의 뇌 조직에서 염증단백질인 iNOS와 세포사멸 유도 단백질인 Bax, Caspas-3의 발현을 유의적으로 억제함으로써 신경세포사멸을 억제하였다.
3. mBHT는 전뇌 허혈 동물에서 신경세포 손상에 따른 해마부위 CA1 주변부의 GFAP 양성반응 신경아교세포의 활성화를 억제하였다.

따라서 mBHT는 전뇌 허혈 동물에서 해마부위 CA1 신경세포사멸을 억제함으로써 허혈성 손상에 따른 지연성 신경세포사멸로부터 신경세포를 보호하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 보건산업진흥원 한의약선도기술개발사업 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다(B100049).

참고문헌

1. Kang SD, Jeong JW, Moon BS, Kim JM. Current Epidemiological Status of Cerebrovascular Disease. *J Korean Neurosurg Soc.* 1999 ; 28 : 509-13.
2. Brierley JB, Graham DI. Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. In: Greenfield's neuropathology. Edited by Adams JH, Corsellis JAN, Duchen LW. London : Edward Arnold, 1984 : 125-207.
3. Plum F. What causes infarction in ischemic brain?: the Robert Wartenberg Lecture. *Neurology.* 1983 ; 33 : 222-33.
4. Wieloch T. Neurochemical correlates to selective

- neuronal vulnerability. *Prog Brain Res.* 1985 ; 63 : 69-85.
5. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982 ; 239 : 57-69.
6. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-Nitrosylation of Matrix Metalloproteinases: Signaling Pathway to Neuronal Cell Death. *Science.* 2002 ; 297(5584) : 1186-90.
7. Halliwell B, Gutteridge JM, editors. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford : Clarendon Press, 1989 : 86-9.
8. Grundman M, Corey-Bloom J, Thal LJ. Perspectives in clinical Alzheimer's disease research and the development of antidementia drugs. *J Neural Transm Suppl.* 1998 ; 53 : 255-75.
9. Shin MK. Medical Herbalogy. Seoul : Yeonglimsa, 1986 : 169-71, 221-3, 249-50, 300-1, 464-8, 662-3.
10. Shin GG. Herbalogy of Shin. Seoul : Sumunsa, 1988 : 9-12, 80-4, 448-50, 521-2, 554-6, 562-4, 600-3.
11. Kim CM. Chinese Medicine Dictionary. Seoul : Jeongdam, 1998 : 592-9, 1159-68, 1353-8, 4839-45, 5258-65, 6357-62, 6460-71.
12. Son HY, Park YK. Anti-inflammatory Effects of Different Fractions Isolated from Modified Boyanghwano-tang Extract in LPS-stimulated Microglial Cells. *Korean J Herbol.* 2009 ; 24(4) : 173-9.
13. Han HS, Lee JA, Park YK. Protective effects of modified Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang on H2O2-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuronal cells. *Korean J Herbol.* 2006 ; 21(4) : 85-92.
14. Choi EJ. The effect of Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang on reversible forebrain ischemia model of mongolian gerbil. Graduate school of Dongguk University, 1999.
15. Kim YH. Immunomodulating effect of Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang, the anticoagulation medicine. Graduate school of Jeonju University, 2002.
16. Jung HN. Selective modulation of Th1/Th2 type immune response by oral administration of Korean medicinal herb. Graduate school of Jeonbuk University, 2004.
17. Moon BS. The effect of Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang water extract on blood pressure lowering of house rabbit. Graduate school of Wonkwang University, 1985.
18. Kim NY. The effect of Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang on Blood pressure and Regional Cerebral blood flow. Graduate school of Wonkwang University, 1985.

19. Kim SH. The effect of Bok-Won-Hwal-Hyol-Tang and Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang on inhibition of endotoxin-derived thrombus formation. Graduate school of Dong-Eui University, 1994.
20. Jung WS. An experimental study for Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang on hypertension and hyperlipidemia. Graduate school of Kyung Hee University, 1998.
21. Seol IS. The effect of modified Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang on Hyperlipidemia, blood clots, highly viscous blood, hypertension and brain damage. Graduate school of Daejeon University, 1998.
22. Kang KM, Condensed prescription dictionary. Shanghai : Science and Technology Press, 1990 : 571.
23. Jeon YS. The effect of Bo-Yang-Hwan-Oh-Tang and modified Bo-Yang-Hwan-Oh Tang on inhibition of endotoxin-derived thrombus formation in rat. Korean J Ori Med Pathol. 1993 ; 8 : 157-76.
24. Kim HC, Ahn DG. Neuroprotective Effect of Gastrodiae Rhizoma on Global Ischemia Induced by 4-Vessel Occlusion in Rats. Korean J Herbol, 1999 ; 14(1) : 121-30.
25. McBean DE, Kelly PAT. Rodent Models of Global Cerebral Ischemia: A Comparison of Two-Vessel Occlusion and Four-Vessel Occlusion. Gen Pharmac. 1998 ; 30(4) : 431-4.
26. Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. Physiol Rev. 1999; 79(4):1431-518.
27. Heiss WD, Hayakawa T, Waltz AG. Cortical neuronal function during ischemia. Arch Neurol. 1976 ; 33 : 813-20.
28. Branston NM, Symon L, Crockard HA, Pastzor E. Relationship between the cortical evoked potential and local cortical blood flow following acute middle cerebral artery occlusion in baboon. Exp Neurol. 1974 ; 45 : 195-208.
29. Sarraf-Yazdi S, Sheng H, Miura Y, McFarlane C, Dexter F, Pearlstein R, et al. Relative neuroprotective effects of dizocilpine and isoflurane during focal cerebral ischemia in the rat. Anesth Analg. 1998 ; 87 : 72-8.
30. Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? J Cereb Blood Flow Metab. 1996 ; 16 : 195-201.
31. Zheng Z, Zhao H, Steinberg GK, Yenari MA. Cellular and molecular events underlying ischemia-induced neuronal apoptosis. Drug News Perspect. 2003 ; 16 : 497-503.
32. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science. 1998 ; 281 : 1322-6.
33. Wei H, Wei W, Bredesen DE, Perry DC. Bcl-2 protects against apoptosis in neuronal cell line caused by thapsigargin-induced depletion of intracellular calcium stores. J Neurochem. 1998 ; 70 : 2305-14.
34. Wei H, Leeds P, Chen RW, Wei W, Leng Y, Bredesen DE, et al. Neuronal apoptosis induced by pharmacological concentrations of 3-hydroxykynurenine: characterization and protection by dantrolene and Bcl-2 overexpression. J Neurochem. 2000 ; 75 : 81-90.
35. He H, Lam M, McCormick TS, Distelhorst CW. Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. J Cell Biol. 1997 ; 138 : 1219-28.
36. Zhang Z, Sobel RA, Cheng D, Steinberg GK, Yenari MA. Mild hypothermia increases Bcl-2 protein expression following global cerebral ischemia. Brain Res Mol Brain Res. 2001 ; 95 : 75-85.
37. Eberspächer E, Werner C, Engelhard K, Pape M, Laacke L, Winner D, et al. Long-term effects of hypothermia on neuronal cell death and the concentration of apoptotic proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. Acta Anaesthesiol Scand. 2005 ; 49 : 477-87.
38. Ginsberg MD, Busto R. Rodent Models of Cerebral Ischemia. Stroke. 1989 ; 20 : 1627-42.
39. 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.
40. Wessel TC, Joh TH, Volpe BT. In situ hybridization analysis of c-fos and c-jun expression in the rat brain following transient forebrain ischemia. Brain Res. 1991 ; 567 : 231-40.
41. Schmidt-Kastner R, Wietasch K, Weigel H, Eysel UT. Immunohistochemical staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) after deafferentation or ischemic infarction in rat visual system: features of reactive and damaged astrocytes. Int J Dev Neurosci. 1993 ; 11(2) : 157-74.
42. Yamamoto K, Akai F, Yoshimine T, Yanagihara T. Immunohistochemical investigation of cerebral ischemia after middle cerebral artery occlusion in gerbils. J Neurosurg. 1987 ; 67(3) : 414-20.
43. Kunkler PE, Kraig RP. Reactive astrocytosis from excitotoxic injury in hippocampal organ culture parallels that seen in vivo. J Cereb Blood Flow Metab. 1999 ; 17(1) : 26-43.
44. Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Roberts EF, Johnstone, EM, Sharp JD, Little SP, Kramer RM. Reactive glia express cytosolic phospholipase A2 after transient global forebrain ischemia in the

- rat. *Stroke*. 1996 ; 27(3) : 527-35.
45. Tak ES. Effects of Bo Yang Hwan Oh Tang on experimental thrombosis. Graduate school of Dongguk University. 1990.
46. Petito CK, Torres-Munoz J, Roberts B, Olarte JP, Nowak TS Jr, Pulsinelli WA. DNA fragmentation follows delayed neuronal death in CA1 neurons exposed to transient global ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997 ; 17(9) : 967-76.
47. Choi Y, Kim SK, Choi IY, Ju C, Nam KW, Hwang S, Kim BW, Yoon MJ, Won MH, Park YK, Kim WK. Amelioration of cerebral infarction and improvement of neurological deficit by a Korean herbal medicine, modified Bo-Yang-Hwan-O-Tang. *J Pharm Pharmacol*. 2011 ; 63(5) : 695-706.
48. Jung HW, Mahesh R, Bae HS, Kim YH, Kang JS, Park YK. The antioxidant effects of Joongpoongtang 05 on brain injury after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Nat Med*. 2011 ; 65(2) : 322-9.
49. Jung HW, Oh TW, Jung JK, Lee JH, Shin GJ, Park YK. Inhibitory effects of the methylene chloride fraction of JP05 on the production of inflammatory mediators in LPS-activated BV2 microglia. *Inflammation*. 2012 ; 35(1) : 332-41.
50. Mahesh R, Jung HW, Han CH, Cho CW, Park YK. Joongpoongtang 05 (JP05) confers neuroprotection via anti-apoptotic activities in Neuro-2a cells during oxygen-glucose deprivation and reperfusion. *Toxicol In Vitro*. 2011 ; 25(1) : 177-84.
51. Son HY, Jung HW, Kim WK, Park YK. The vasoprotective effect of JP05 through the activation of PI3K/Akt-dependent eNOS and MEK/ERK pathways in brain endothelial cells. *J Ethnopharmacol*. 2010 ; 130(3) : 607-13.