

원 지

何首烏가 고지혈증 흰쥐의 허혈성 뇌손상에 미치는 영향

이영효, 이원철

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of *Polygoni Multiflori Radix* on Cerebral Ischemia of Hyperlipidemic Rats.

Young-Hyo Lee, Won-Chul Lee

Department of Oriental Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives : This study investigated neuroprotective effects of *Polygoni Multiflori Radix* on cerebral ischemia of hyperlipidemic rats.

Methods : Effects of *Polygoni Multiflori Radix* were evaluated with changes of infarct size after the focal cerebral ischemia induced by the middle cerebral artery occlusion, changes of pyramidal neurons and expressions of Bax and Bcl-2 apoptosis regulating factors after global cerebral ischemia, and changes of serum lipid levels after cerebral ischemia.

Results & Conclusions : Results obtained were as follows;

1. *Polygoni Multiflori Radix* did not reduce the focal cerebral infarct size induced by the middle cerebral artery occlusion under both hyperlipidemic and normal-lipid conditions.
2. *Polygoni Multiflori Radix* significantly reduced the increase of neuronal cell death in CA1 region of hippocampus induced by the global cerebral ischemia under both hyperlipidemic and normal-lipid conditions.
3. *Polygoni Multiflori Radix* significantly reduced the increase of Bax expression in the CA1 region of the hippocampus induced by global cerebral ischemia under both hyperlipidemic and normal-lipid conditions.
4. *Polygoni Multiflori Radix* significantly increased Bcl-2 expression in the CA1 region of the hippocampus after global cerebral ischemia under normal-lipid condition, but was not effective on that under hyperlipidemic condition.
5. *Polygoni Multiflori Radix* was not effective on serum total-cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglyceride levels under normal-lipid conditions, irrespective of focal cerebral infarct or global cerebral ischemia.
6. *Polygoni Multiflori Radix* significantly reduced the increase of serum total-cholesterol and triglyceride levels, and increased serum LDL-cholesterol level under hyperlipidemic conditions, irrespective of focal cerebral infarct or global cerebral ischemia.

Key Words: *Polygoni Multiflori Radix*, hyperlipidemia, hypoxia, apoptosis.

緒 論

- 접수 : 2005년 6월 8일 · 논문심사 : 2005년 7월 16일
- 채택 : 2005년 8월 12일
- 교신저자 : 황주원, 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2 동국대학교 분당한방병원 6층 의국
(Tel : 031-710-3734, 3735, Fax : 031-710-3780, E-mail : zilia@dreamwiz.com)

* 이 논문은 2004학년도 동국대학교 교내 연구비의 지원에 의해 이루어졌음.

최근 생활 수준 향상과 식생활의 서구화로 허혈성 뇌질환이 늘어나는 추세에 있어 사회적 문제가 되고 있다¹⁾. 죽상동맥경화의 가장 중요한 원인인 고지혈증²⁾이나 고콜레스테롤혈증이 심혈관계질환 발생의 원인이 된다는 것은 잘 알려져 있다^{3,4)}. 그러나 뇌

경색과의 관련성에 대하여는 상반된 견해가 존재한다. 즉 고지혈증 또는 고콜레스테롤혈증과 뇌경색 발병은 상관성이 낮거나 혹은 연관이 없다는 국내 외 임상연구결과 보고들^{5,7)}과 혈중 total-cholesterol과 Triglyceride의 농도 증가가 뇌졸중 발병의 위험인자라는 보고^{8,9)}, HDL-cholesterol의 농도가 뇌졸중의 중요한 독립적인 위험인자라는 보고^{8,10)} 및 혈중 지질치를 낮춤으로써 뇌졸중의 이차예방 뿐 아니라 일차 예방에도 효과가 있다는 보고들이 있는데¹¹⁻¹³⁾ 최근에는 약물을 사용하여 혈중지질치를 낮춤으로써 뇌졸중을 예방할 수 있다는 보고가 잇따라 발표됨으로써 고지혈증의 조기진단 및 치료에 대한 관심이 높아지고 있다.

何首烏는 마디풀과에 속하는 何首烏(*Polygonum multiflorum Thmdunb.*)의 덩이뿌리로서 補肝, 益腎, 養血, 祛風 등의 효능이 있어 鬚髮早白, 血虛頭暈, 腰膝軟弱, 筋骨痠痛, 遺精, 崩漏帶下, 久瘡, 久痢, 癰腫, 瘰癧, 腸風, 痔疾 등의 치료에 이용되어 왔다¹⁴⁾.

何首烏에 관한 실험적 연구로는 지질대사 향상^{15,16)}, triglyceride의 축적 억제¹⁷⁾ 및 관상동맥의 죽상경화 감소효과¹⁸⁾, 고지혈증 쥐에 대한 혈중 지질 강하 작용^{19,20)}, 혈당강하효과²¹⁾, 유기수은으로 손상된 생쥐의 배양대뇌신경세포의 독성에 대한 방어 효과²²⁾ 등이 보고된 바 있으나, 고지혈증을 유발시킨 실험동물 모델에서 何首烏가 중추신경계에 미치는 영향에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 何首烏가 고지혈증이 유도된 실험동물에서 허혈성 뇌손상에 미치는 영향을 관찰하기 위해 실험동물에 중대뇌동맥의 말단을 폐쇄하는 방법으로 대뇌피질에 국소 뇌경색을 유발한 후 何首烏를 투여하여 국소 뇌경색 면적을 측정하였으며, 아울러 총경동맥폐쇄와 저혈압 유도에 의하여 대뇌피질에 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여하여 전뇌허혈로 인한 조직학적 변화와 뇌경색 경계영역에서 신경세포 apoptosis에 관련된 지표들을 면역조직화학적 및 분자생물학적 방법을 통하여 관찰하고, 혈청 지질함량의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약물의 조제 및 투여

실험에 사용된 약물은 何首烏(*Polygoni Multiflori Radix*)로 약전 및 대한 약전 외 한약규격주해²³⁾에 근거하여 동국대학교 한방병원에서 구입하였으며, 何首烏 200g을 일반적인 물추출액 제조방법에 의하여 약제 4g 당 736.0mg의 물추출액을 얻었다. 약물은 뇌허혈 유발 3시간 후 및 1일 2회 4일간 경구투여 하였으며, 1회 투여량은 흰쥐 체중 100g당 18.0mg으로 하였다.

2) 동물

체중 250~260g의 Sprague-Dawley계 10주령 수컷 흰쥐(바이오지노믹스(주))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.

2. 방법

1) 고지혈증 유발

실험동물에 뇌경색 및 뇌허혈을 유발시키기 전 2주간 정상사료 대신에 고지방사료(Beef Tallow 30%, TD94095, Harlan, USA)를 자유롭게 섭취하도록 충분히 공급하며 사육하였다. 고지방사료의 kg당 조

Table 1. Composition of Hyperlipidemic Fodder

Casein, High Protein	260.0g
DL-Methionine	3.9g
Sucrose	161.7g
Corn Starch	160.0g
Beef Tallow	300.0g
Cellulose	50.0g
Mineral Mix, AIN-76	45.5g
Calcium Carbonate	3.9g
Vitamin Mix, Teklad	13.0g
Choline Dihydrogen citrate	2.0g
Total	1000.0g

성 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

2) 국소 뇌경색에 대한 실험

何首烏가 국소 뇌경색에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 실험군은 정상적인 혈청지질 수치의 실험 동물에 중대뇌동맥을 폐쇄하여 국소 뇌경색을 유발한 대조군-I(Control-I)과 여기에 何首烏 물추출액을 투여한 실험군-I(Sample-I) 및 고지혈증이 유도된 실험동물에 중대뇌동맥을 폐쇄하여 뇌경색을 유발한 대조군-II(Control-II)와 여기에 何首烏 물추출액을 투여한 실험군-II(Sample-II)로 구분하였다. 각 실험군에는 실험동물 10마리씩을 배정하였으며, 그 중 4마리는 실험 3일째에 혈청지질 함량의 측정을 위하여 희생시켰고, 나머지 6마리는 실험 5일째에 희생하여 뇌경색 면적 및 혈청지질 함량 변화를 측정하였다.

(1) 국소 뇌경색 유발

국소 뇌경색을 유발하기 위하여, 중대뇌동맥의 폐쇄방법 중 한 쪽의 중대뇌동맥과 같은 쪽 총경동맥의 영구 폐쇄 및 반대 쪽 총경동맥의 일시적 폐쇄를 병행하는 방법을 사용하였다^{24,25}. 실험동물은 수술 시행 12 시간 전부터 절식시켰으며 수술의 절차는 다음과 같다.

실험동물에 sodium pentobarbital 50mg/kg을 복강주사하여 마취한 상태에서 흰쥐의 전정부 털을 깎은 후 정중선을 따라 피부를 절개하고, 흉선을 제거한 후 기관의 양측에서 총경동맥을 찾은 다음, 같은 쪽의 총경동맥은 나일론실을 사용하여 완전히 결찰하고, 반대쪽 총경동맥 둘레를 나일론실로 일시적으로 폐쇄와 재개통이 가능하도록 미리 고리를 만들어 장착하였다. 총경동맥에 고리를 장착한 상태로 흰쥐를 뇌정위고정장치(Narishige, SR-6, Japan)에 고정하고, heating pad를 사용하여 수술 전기간 동안 정상 체온을 유지시켰다. 외이도(external auditory meatus)와 외안각(lateral canthus) 사이에 수직으로 피부를 절개하고 측두근을 옆으로 충분히 벌려 두개골을 노출시키고, 수술용 현미경(Carl Zeiss, Zeiss, Germany) 하에서 두개골의 관골궁전방 2mm위치에 치과용 드릴(세신정밀, SS-79, 한국)을 사용하여 약

2mm크기의 두개골 구멍을 만들었다. 치과용 드릴을 사용하는 동안 생리식염수로 두개골을 적서 주어 드릴 부위의 온도상승에 의한 뇌손상을 방지하였다. 뇌경막(dura mater)과 지주막(arachnoid mater)을 조심스럽게 제거하고 중대뇌동맥을 약간 들어올린 다음 electric coagulator(Ellman, Dento-Surg 90 FFP, USA)를 사용하여 중대뇌동맥을 폐쇄하고, 곧바로 반대쪽 총경동맥의 고리를 당겨 총경동맥을 폐쇄하였다. 두개골의 구멍은 penicillin을 적신 여과지로 덮은 다음 측두근과 피부를 봉합하고 povidon 용액으로 상처부위를 소독하였다. 1시간동안 반대쪽 총경동맥 폐쇄상태를 유지한 다음 총경동맥의 고리를 풀어 혈액을 재개통 하였다. 이후 전정부의 피부를 봉합하고, 소독한 후 마취에서 깨어나도록 하였다.

(2) TTC 염색 및 국소 뇌경색 면적의 측정

국소 뇌경색 유발 및 약물투여 5일째에 국소 뇌경색 면적의 변화를 측정하기 위하여 다음과 같은 조직염색과 영상분석을 시행하였다. 실험동물을 sodium pentobarbital로 가볍게 마취한 후 단두하여 뇌를 적출하고 차가운 생리식염수에 넣어 약간 굳게 만든 다음 rat brain atlas의 이간선(interaural line)으로부터 2mm두께의 절편으로 만들었다. 뇌조직 절편에서 정상 뇌조직은 밝은 적색, 뇌경색 부위는 백색으로 구분이 잘 되도록 2% triphenyl tetrazolium chloride(TTC) 용액에서 30분간 염색하였다. TTC로 염색된 각각의 뇌조직 절편을 사진촬영하여 영상을 입력한 다음 영상분석용 "NIH Image" software(NIH, Ver. 1.66, USA)를 사용하여 뇌경색 면적을 측정하였다. 국소 뇌경색 부위의 면적 (A)는 부종에 의하여 면적이 늘어난 것을 보정하기 위하여, 먼저 정상측 대뇌반구의 면적 (B)를 측정하고 손상측 대뇌반구의 정상조직 면적 (C)를 측정한 다음 정상측 대뇌반구의 면적에서 손상측 대뇌반구의 정상조직 면적을 감하는 방법(A=B-C)으로 계산하였다.

또한 국소 뇌경색 총체적은 이웃한 각각의 뇌조직 절편에서 국소 뇌경색 면적의 평균을 구하고, 각각의 뇌경색 평균 면적을 모두 합한 값에 조직 두께 2mm를 곱하여 계산하였다²⁶.

3) 전뇌허혈에 대한 실험

何首烏가 전뇌허혈에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 실험군은 정상적인 혈청지질 수치의 실험동물에 총경동맥의 폐쇄와 저혈압 유도에 의하여 전뇌허혈을 유발한 대조군-I(Control-I)과 여기에 何首烏물추출액을 투여한 실험군-I(Sample-I) 및 고지혈증이 유도된 실험동물에 총경동맥의 폐쇄와 저혈압 유도에 의하여 전뇌허혈을 유발한 대조군-II(Control-II)와 여기에 何首烏물추출액을 투여한 실험군-II(Sample-II)로 구분하였다.

각 실험군에는 실험동물 10마리씩을 배정하였으며, 그 중 4마리는 실험 3일째에 혈청지질 함량의 측정을 위하여 희생시켰고, 나머지 6마리는 실험 5일째에 희생하여 전뇌허혈 손상에 대한 변화 및 혈청지질 함량 변화를 측정하였다.

3) 전뇌허혈에 대한 실험

何首烏가 전뇌허혈에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 실험군은 정상적인 혈청지질 수치의 실험동물에 총경동맥의 폐쇄와 저혈압 유도에 의하여 전뇌허혈을 유발한 대조군-I(Control-I)과 여기에 何首烏물추출액을 투여한 실험군-I(Sample-I) 및 고지혈증이 유도된 실험동물에 총경동맥의 폐쇄와 저혈압 유도에 의하여 전뇌허혈을 유발한 대조군-II(Control-II)와 여기에 何首烏물추출액을 투여한 실험군-II(Sample-II)로 구분하였다.

각 실험군에는 실험동물 10마리씩을 배정하였으며, 그 중 4마리는 실험 3일째에 혈청지질 함량의 측정을 위하여 희생시켰고, 나머지 6마리는 실험 5일째에 희생하여 전뇌허혈 손상에 대한 변화 및 혈청지질 함량 변화를 측정하였다.

(1) 전뇌허혈 유발

전뇌허혈을 유발하기 위하여, 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 transient global ischemia 방법을 사용하였다. 마취는 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

서해부의 대퇴동맥을 노출시킨 후 PE-50 polyethylene catheter를 장착시키고, 한쪽에는 physiograph를 연결하여 동맥혈압을 수술 전과정 동안 지속적으로 기록하고, 다른 한쪽은 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 주었다. 저혈압의 유도는 Chan²⁷⁾ 등의 방법과 Sugawara²⁸⁾ 등의 연구결과에 근거하여 한쪽 대퇴동맥으로부터 빠르게 혈액을 제거하여 평균동맥혈압이 40mmHg에 이르게 하여 유지시켰다. 저혈압이 유발된 즉시 전경부의 총경동맥 폐쇄용 고리를 당기고 metal clip으로 고정하여 전뇌허혈을 유발시켰다. 뇌허혈 유발 10분 후에 양측 총경동맥을 폐쇄한 metal clip을 제거하여 혈행을 재개통하고, 대퇴동맥을 통하여 혈액을 재주입하여 혈압을 정상으로 회복시켰다. 이후 상처부위를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다.

(2) 뇌조직 처리

전뇌허혈 유발과 약물투여 5일째 실험동물에 sodium pentobarbital을 복강주사하여 깊게 마취시킨 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline(PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 두개골로부터 제거한 다음 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 넣어 침전시켰다. 다음 -40℃의 dry ice-isophentan에서 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

(3) Cresyl violet 염색 및 전뇌허혈부위의 신경세포수와 신경세포층 두께 측정

선택한 뇌조직을 poly-L-lysine으로 코팅된 슬라이드에 붙여 건조시키고, 1% cresyl violet solution으로 2분간 염색한 다음 일반적인 조직표본제작법에 따라 탈수, 봉합하여 전뇌허혈 유발 및 약물투여에 따른 뇌해마(hippocampus) CA1영역에서 신경세포의 변화를 관찰하였다¹⁸⁾. 뇌해마 CA1구역 추체신경세포

수 및 추체신경세포 층의 두께는 CCD 카메라와 영상분석시스템이 부착된 광학현미경으로 cresyl violet 염색된 조직에서 CA1의 일정길이(1,000 μ m) 내에 존재하는 추체신경의 수를 NIH Image software로 측정하였으며, 그 부위의 추체신경세포 층 두께를 측정하였다.

(4) Bax와 Bcl-2의 면역조직화학염색 변화 관찰

선택한 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10분~15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum(Vectastain)과 bovine serum albumin(Sigma)을 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후, primary antibody로 처리하였다. Bax antibody(mouse, B-9, Santa Cruz, USA)는 1:2000의 희석배율로, Bcl-2 antibody(mouse, C-2, Santa Cruz, USA)는 1:100의 희석배율로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 overnight으로 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법(ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl₂·H₂O(Sigma)를 섞은 diaminobenzidine-tetrachloride(Sigma)에서 5~10분간 발색 반응 시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2~3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다. Bax와 Bcl-2 발현 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여, 뇌해마 CA1영역의 영상을 CCD 카메라를 통하여 영상분석 시스템에 저장하고 NIH Image software를 사용하여 광밀도(optical density)를 256등급의 흑백농도(grey level)에 따라 측정하였다. 기준구역의 측정값에 대한 CA1영역 측정값의 증가율을 자료로 사용하였으며, 기준구역은 CA1 하부의 뇌해마 실질조직 부위로 하였다.^{10,29)}

4) 혈청 지질함량의 측정

국소 뇌경색과 전뇌허혈 유발 및 약물투여 후 3일과 5일째에 각 군의 실험동물을 sodium pentobarbital로 가볍게 마취한 상태에서 심장에서 혈액을 채취한 후 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하고, 혈청 total-cholesterol, HDL-cholesterol 및

LDL-cholesterol, triglyceride 함량을 효소법에 따른 각각의 전용 측정용 kit를 사용하여 측정하였다. 혈청 지질함량은 국소 뇌경색에 대한 실험과 전뇌허혈에 대한 실험 모두에서 측정하였다.

3. 통계처리

자료의 처리는 통계학적 검증(student t-test)을 실시하였다.

결 과

1. 국소 뇌경색에 대한 실험

1) 국소 뇌경색 면적에 미치는 영향

이간선 12mm에서부터 2mm까지 각 2mm간격의 뇌조직 절편에서 뇌경색 면적의 변화를 보면, 정상 혈청 지질 상태에서 뇌경색을 유발한 대조군-I의 국소 뇌경색 면적은 각각 2.7 \pm 0.8mm², 14.7 \pm 1.4mm², 20.4 \pm 1.8mm², 21.5 \pm 2.2mm², 13.4 \pm 1.6mm² 및 3.8 \pm 0.8mm²이었다. 고지혈증 상태에서 뇌경색을 유발한 대조군-II의 국소 뇌경색 면적은 각각 3.3 \pm 1.1mm², 16.2 \pm 1.7mm², 25.8 \pm 2.1mm², 27.7 \pm 2.0mm², 15.2 \pm 1.3mm² 및 5.2 \pm 1.2이었다.

대조군-I군에 비하여 대조군-II에서 이간선 8mm 및 6mm절편에서 유의한(p<0.05) 뇌경색 면적 증가가 관찰되어 고지혈증 상태에서 뇌경색이 유발될 경우 혈청 지질함량이 정상인 경우에 비하여 뇌경색 면적이 증가되는 것으로 관찰되었다. 정상 혈청지질 상태에서 뇌경색을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-I의 뇌경색 면적은 3.2 \pm 0.6mm², 14.2 \pm 1.8mm², 19.6 \pm 2.0mm², 18.4 \pm 1.6mm², 11.3 \pm 0.6mm² 및 2.5 \pm 0.7mm²로 대조군-I에 비하여 유의한 감소를 나타내지 못하였다. 고지혈증 상태에서 뇌경색을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-II의 뇌경색 면적은 2.3 \pm 0.8mm², 15.4 \pm 1.6mm², 21.8 \pm 1.9mm², 22.8 \pm 1.8mm², 16.5 \pm 1.2mm² 및 4.1 \pm 0.7mm²로 대조군-II에 비하여 이간선 6mm절편에서 유의한(p<0.05) 감소가 나타났으나 전체적으로는 유의한 감소를 나타내지 못하였다(Table 2, Fig. 1).

2) 국소 뇌경색 체적에 미치는 영향

정상 혈청지질 상태에서 국소 뇌경색을 유발한 대

Table 2. Effect of *Polygoni Multiflori Radix* on Cerebral Infarct Area Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion in Normal and Hyperlipidemic Rats

Group	Infarct Area (mm ²)					
	Distance from Interaural Line (mm ²)					
	12	10	8	6	4	2
Control-I	2.7±0.8	14.7±1.4	20.4±1.8	21.5±2.2	13.4±1.6	3.8±0.8
Sample-I	3.2±0.6	14.2±1.8	19.6±2.0	18.4±1.6	11.3±0.6	2.5±0.7
Control-II	3.3±1.1	16.2±1.7	25.8±2.1*	27.7±2.0*	15.2±1.3	5.2±1.2
Sample-II	2.3±0.8	15.4±1.6	21.8±1.9	22.8±1.8†	16.5±1.2	4.1±0.7

Data presented mean ± standard error (n=6).

Control-I; group of middle cerebral artery occlusion in normal rats

Sample-I; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on middle cerebral artery occlusion in normal rats

Control-II; group of middle cerebral artery occlusion in hyperlipidemic rats

Sample-II; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on middle cerebral artery occlusion in hyperlipidemic rats

; statistical significance compared between Control I and II group (; p<0.05)

†; statistical significance compared between Sample and Control group (†; p<0.05)

Table 3. Effect of *Polygoni Multiflori Radix* on Cerebral Infarct Volume Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion in Normal and Hyperlipidemic Rats

Group	Infarct Volume (mm ³)	Increase & Decrease %
Control-I	153.0±10.7	-
Sample-I	138.4±11.4	-9.5
Control-II	186.8±14.3*	22.1
Sample-II	165.8±12.8	-11.2

Data presented mean ± standard error (n=6).

Control-I; group of middle cerebral artery occlusion in normal rats

Sample-I; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on middle cerebral artery occlusion in normal rats

Control-II; group of middle cerebral artery occlusion in hyperlipidemic rats

Sample-II; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on middle cerebral artery occlusion in hyperlipidemic rats

; statistical significance compared between Control I and II group (; p<0.05)

†; statistical significance compared between Sample and Control group

Increase % was calculated between Control I and Control II, decrease % was calculated between Sample and Control groups.

조군-I의 국소 뇌경색 체적은 153.0±10.7mm³, 고지혈증 상태에서 뇌경색을 유발한 대조군-II의 국소 뇌경색 체적은 186.8±14.3mm³이었다. 대조군-I에 비하여 대조군-II는 22.1%의 유의한(p<0.05) 증가가 관찰되어, 고지혈증 상태에서 뇌경색이 유발된 경우 혈청 지질함량이 정상인 경우에 비하여 뇌경색 체적이 증가하는 것으로 나타났다. 정상 혈청지질 상태에서 뇌경색을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-I의 국소 뇌경색 체적은 138.4±11.4mm³로 대조군-I에 비하여 9.5% 감소되었으나 통계학적 유의성은 없었

으며, 고지혈증 상태에서 뇌경색을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-II의 국소 뇌경색 체적은 165.8±12.8mm³로 대조군-II에 비하여 11.2% 감소되었으나 역시 통계학적 유의성은 없었다(Table 3, Fig. 1).

2. 전뇌허혈에 대한 실험

1) 전뇌허혈 뇌해마의 신경세포에 미치는 영향
정상 혈청지질 상태에서 전뇌허혈을 유발한 대조군-I의 뇌해마의 CA1영역에서 추체신경세포 수는 198.5±18.2개, 층의 두께는 18.4±2.6µm 이었다. 고

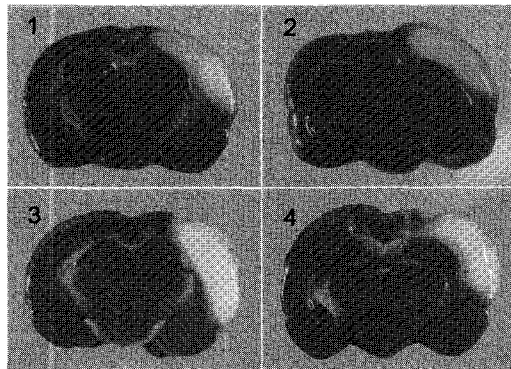


Fig. 1. TTC stained brain sections of middle cerebral artery occlusion in normal and hyperlipidemic rats. Red colored area are intact, white colored area are infarct area. (section 1; control-I, section 2; sample-I, section 3; control-II, section 4; sample-II, interaural line 8 mm or 6 mm sections)

Table 4. Effect of *Polygoni Multiflora Radix* on Pyramidal Cell Number and Layer Thickness of CA1 Hippocampus in Global Ischemia of Normal and Hyperlipidemic Rats

Group	Cell Number (EA)	Increase & Decrease %	Layer Thickness of CA1	Increase & Decrease %
Control-I	198.5 ± 18.2	-	18.4 ± 2.6	-
Sample-I	259.3 ± 25.8 [†]	30.6	35.8 ± 4.7 ^{††}	94.6
Control-II	146.4 ± 17.6 [*]	-26.2	15.6 ± 2.9	-15.2
Sample-II	202.7 ± 24.8 [†]	38.5	24.7 ± 3.1 [†]	58.3

Data presented mean ± standard error (n=6).

Control-I; group of global ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion and hypotension in normal rats

Sample-I; group administered water extract of *Polygoni Multiflora Radix* on global ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion and hypotension in normal rats

Control-II; group of global ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion and hypotension in hyperlipidemic rats

Sample-II; group administered water extract of *Polygoni Multiflora Radix* on global ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion and hypotension in hyperlipidemic rats

; statistical significance compared between Control I and II group (; $p < 0.05$)

†; statistical significance compared between Sample and Control group (†; $P < 0.05$, ††; $p < 0.01$)

Increase % was calculated between Control I and Control II, decrease % was calculated between Sample and Control groups.

지혈증 상태에서 전뇌허혈을 유발한 대조군-II의 뇌해마 CA1영역에서 추체신경세포 수는 146.4 ± 17.6 개, 층의 두께는 $15.6 \pm 2.9 \mu\text{m}$ 로 각각 대조군-I에 비하여 26.2%, 15.2%의 유의한($p < 0.05$) 감소를 나타내어, 고지혈증 상태에서 전뇌허혈 유발이 뇌해마 신경세포에 심한 손상을 유발하는 것으로 관찰되었다. 정상 혈청지질 상태에서 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-I의 뇌해마 CA1영역에서

추체신경세포 수는 259.3 ± 25.8 개로 대조군-I에 비하여 30.6%($p < 0.05$)의 유의한 증가를 나타내었으며, 층의 두께는 $35.8 \pm 4.7 \mu\text{m}$ 로 역시 대조군-I에 비하여 94.6%($p < 0.01$)의 유의한 증가를 나타내었다. 고지혈증 상태에서 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-II의 뇌해마의 CA1영역에서 추체신경세포 수는 202.7 ± 24.8 개로 대조군-II에 비하여 24.7%($p < 0.05$)의 유의한 증가를 나타내었으며, 층의

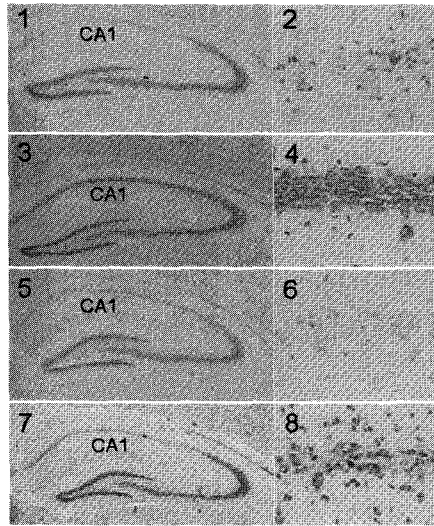


Fig. 2. Cresyl violet stained hippocampus sections of global ischemia in normal and hyperlipidemic rats. Pyramidal cell numbers and layer thickness were measured in CA1 of hippocampus. (section 1 and 2; control-I, section 3 and 4; sample-I, section 5 and 6; control-II, section 7 and 8; sample-II)

Table 5. Effect of *Polygoni Multiflori Radix* on Bax and Bcl-2 Expressions of CA1 Hippocampus in Global Ischemia of Normal and Hyperlipidemic Rats

Group	Bax (% of standard)	Increase & Decrease %	Bcl-2 (% of standard)	Increase & Decrease %
Control-I	124.7 ± 18.3	-	10.2 ± 1.3	-
Sample-I	72.5 ± 15.2 [†]	-41.9	36.8 ± 7.5 ^{††}	260.8
Control-II	262.4 ± 36.2 ^{**}	110.4	12.8 ± 2.9	25.5
Sample-II	115.8 ± 17.7 ^{††}	-55.9	20.4 ± 3.6	59.4

Data presented mean ± standard error (n=6).

Control-I; group of global ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion and hypotension in normal rats

Sample-I; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on global ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion and hypotension in normal rats

Control-II; group of global ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion and hypotension in hyperlipidemic rats

Sample-II; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on global ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion and hypotension in hyperlipidemic rats

*; statistical significance compared between Control I and II group (**; $p < 0.01$)

[†]; statistical significance compared between Sample and Control group ([†]; $p < 0.05$, ^{††}; $p < 0.01$)

Increase % was calculated between Control I and Control II, decrease % was calculated between Sample and Control groups.

두께는 $24.7 \pm 3.1 \mu\text{m}$ 로 역시 대조군-II에 비하여 58.3%($p < 0.05$)의 유의한 증가를 나타내었다(Table 4, Fig. 2).

2) 뇌해마의 Bax 및 Bcl-2 발현에 미치는 영향
정상 혈청지질 상태에서 전뇌허혈을 유발한 대조

군-I의 뇌해마 CA1영역에서 Bax 발현은 $124.7 \pm 18.3\%$ 였으며, 고지혈증 상태에서 전뇌허혈을 유발한 대조군-II의 뇌해마의 CA1영역에서 Bax 발현은 $262.4 \pm 36.2\%$ 로 대조군-I에 비하여 110.4%($p < 0.01$)의 유의한 증가를 나타내었다. 이는 고지혈증 상태

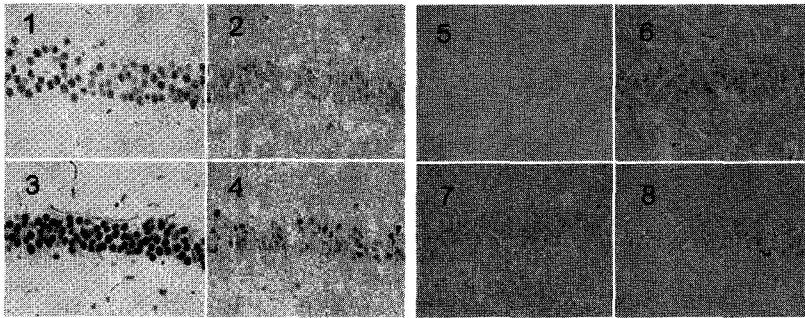


Fig. 3. Immunohistochemical Bax and Bcl-2 stained hippocampus CA1 sections of global ischemia in normal and hyperlipidemic rats. Sections 1-4 show Bax expressions and sections 5-8 show Bcl-2 expressions in CA1 hippocampus. (section 1 and 5; control-I, section 2 and 6; sample-I, section 3 and 7; control-II, section 4 and 8; sample-II)

Table 6. Effect of *Polygoni Multiflori Radix* on Serum Total-Cholesterol Levels in Ischemic Brain Damage of Normal and Hyperlipidemic Rats

Group	mg/dl	
	3rd Day	5th Day
Control-I	61.3 ± 5.4	63.2 ± 4.8
Sample-I	60.8 ± 4.4	57.5 ± 5.1
Control-II	98.2 ± 8.3**	112.3 ± 8.6***
Sample-II	82.3 ± 6.6	83.1 ± 5.2††

Data presented mean ± standard error (3rd day; n=8, 5th day; n=12).

Control-I; group of ischemic brain damage in normal rats

Sample-I; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on ischemic brain damage in normal rats

Control-II; group of ischemic brain damage in hyperlipidemic rats

Sample-II; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on ischemic brain damage in hyperlipidemic rats

*; statistical significance compared between Control I and II group (**; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$)

†; statistical significance compared between Sample and Control group (††; $p < 0.01$)

에서 전뇌허혈을 유발하면 뇌해마 신경세포는 심한 apoptosis가 유발됨을 나타낸다. 정상 혈청지질 상태에서 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-I의 뇌해마 CA1영역에서 Bax 발현은 $72.5 \pm 15.2\%$ 로 대조군-I에 비하여 41.9% ($p < 0.05$)의 유의한 감소를 나타내었으며, 고지혈증 상태에서 뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-II의 뇌해마 CA1영역에서 Bax 발현은 $115.8 \pm 17.7\%$ 로 대조군-II에 비하여 55.9% ($p < 0.01$)의 유의한 감소를 나타내었다 (Table 5, Fig. 3).

정상 혈청지질 상태에서 뇌허혈을 유발한 대조군-I의 뇌해마 CA1영역에서 Bcl-2 발현은 $10.2 \pm 1.3\%$ 였으며, 고지혈증 상태에서 뇌허혈을 유발한

대조군-II의 뇌해마 CA1영역에서 Bcl-2 발현은 $12.8 \pm 2.9\%$ 로 대조군-I과 대조군-II 사이에 현저한 변화는 없었다. 정상 혈청지질 상태에서 뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-I의 뇌해마의 CA1영역에서 Bcl-2 발현은 $36.8 \pm 7.5\%$ 로 대조군-I에 비하여 260.8% ($p < 0.01$)의 유의한 증가를 나타내었으며, 고지혈증 상태에서 뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-II의 뇌해마의 CA1영역에서 Bcl-2 발현은 $20.4 \pm 3.6\%$ 로 대조군-II에 비하여 59.4% 증가되었으나 통계학적 유의성은 없었다 (Table 5, Fig. 3).

3. 혈청 total-cholesterol에 미치는 영향

정상 혈청지질 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈

Table 7. Effect of *Polygoni Multiflori Radix* on Serum HDL-Cholesterol Levels in Ischemic Brain Damage of Normal and Hyperlipidemic Rats

mg/dl		
Group	3rd Day	5th Day
Control-I	31.5±1.5	27.8±1.8
Sample-I	30.8±1.4	30.1±1.5
Control-II	23.1±1.3***	20.7±1.6**
Sample-II	24.4±1.6	21.6±1.3

Data presented mean±standard error (3rd day; n=8, 5th day; n=12).

Control-I; group of ischemic brain damage in normal rats

Sample-I; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on ischemic brain damage in normal rats

Control-II; group of ischemic brain damage in hyperlipidemic rats

Sample-II; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on ischemic brain damage in hyperlipidemic rats

*; statistical significance compared between Control I and II group (**; $p<0.01$, ***; $p<0.001$)

†; statistical significance compared between Sample and Control group

을 유발한 대조군-I의 혈청 total-cholesterol 수치는 3일째에 61.3±5.4mg/dl, 5일째에 63.2±4.8mg/dl였으며, 고지혈증 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 대조군-II의 혈청 total-cholesterol 수치는 3일째에 98.2±8.3mg/dl, 5일째에 112.3±8.6mg/dl로 대조군-I에 비하여 $p<0.01$ 및 $p<0.001$ 의 유의한 증가를 나타내었다. 정상 혈청지질 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-I의 혈청 total-cholesterol 수치는 3일째에 60.8±4.4mg/dl, 5일째에 57.5±5.1mg/dl로 대조군-I에 비하여 감소되었으나 유의한 변화는 없었다. 고지혈증 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏

를 투여한 실험군-II의 혈청 total-cholesterol 수치는 3일째에 82.3±6.6mg/dl, 5일째에 83.1±5.2mg/dl로 대조군-II에 비하여 5일째에 $p<0.01$ 의 유의한 감소를 나타내었다(Table 6).

4. 혈청 HDL-cholesterol에 미치는 영향정상 정상 혈청지질 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 대조군-I의 혈청 HDL-cholesterol 수치는 3일째에 31.5±1.5mg/dl, 5일째에 27.8±1.8mg/dl 이었으며, 고지혈증 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 대조군-II의 혈청 HDL-cholesterol 수치는 3일째에 23.1±1.3mg/dl, 5일째에 20.7±1.6mg/dl로 대조군-

Table 8. Effect of *Polygoni Multiflori Radix* on Serum LDL-Cholesterol Levels in Ischemic Brain Damage of Normal and Hyperlipidemic Rats

mg/dl		
Group	3rd Day	5th Day
Control-I	25.1±1.8	26.3±2.1
Sample-I	24.8±2.2	27.7±2.6
Control-II	51.7±3.3***	52.1±4.1***
Sample-II	46.3±3.1	43.0±2.9†

Data presented mean±standard error (3rd day; n=8, 5th day; n=12).

Control-I; group of ischemic brain damage in normal rats

Sample-I; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on ischemic brain damage in normal rats

Control-II; group of ischemic brain damage in hyperlipidemic rats

Sample-II; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on ischemic brain damage in hyperlipidemic rats

*; statistical significance compared between Control I and II group (**; $p<0.001$)

†; statistical significance compared between Sample and Control group (†; $p<0.05$)

Table 9. Effect of *Polygoni Multiflori Radix* on Serum Triglyceride Levels in Ischemic Brain Damage of Normal and Hyperlipidemic Rats

Group	3rd Day	5th Day
Control-I	112.3±8.9	127.5±9.1
Sample-I	108.5±10.2	107.3±9.6
Control-II	357.8±32.1***	362.1±38.4***
Sample-II	283.4±23.8 [†]	274.5±25.4 [†]

Data presented mean ± standard error (3rd day; n=8, 5th day; n=12).

Control-I; group of ischemic brain damage in normal rats

Sample-I; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on ischemic brain damage in normal rats

Control-II; group of ischemic brain damage in hyperlipidemic rats

Sample-II; group administered water extract of *Polygoni Multiflori Radix* on ischemic brain damage in hyperlipidemic rats

*; statistical significance compared between Control I and II group (***; $p < 0.001$)

[†]; statistical significance compared between Sample and Control group ([†]; $p < 0.05$)

I에 비하여 $p < 0.001$ 및 $p < 0.01$ 의 유의한 감소를 나타내었다. 정상 혈청지질 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-I의 혈청 HDL-cholesterol 수치는 3일째에 $30.8 \pm 1.4 \text{ mg/dl}$, 5일째에 $30.1 \pm 1.5 \text{ mg/dl}$ 로 대조군-I에 비하여 유의한 변화는 없었다. 고지혈증 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-II의 혈청 HDL-cholesterol 수치는 3일째에 $24.4 \pm 1.6 \text{ mg/dl}$, 5일째에 $21.6 \pm 1.3 \text{ mg/dl}$ 로 역시 대조군-II에 비하여 유의한 변화는 없었다(Table 7).

5. 혈청 LDL-cholesterol에 미치는 영향

정상 혈청지질 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 대조군-I의 혈청 LDL-cholesterol 수치는 3일째에 $25.1 \pm 1.8 \text{ mg/dl}$, 5일째에 $26.3 \pm 2.1 \text{ mg/dl}$ 이었으며, 고지혈증 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 대조군-II의 혈청 LDL-cholesterol 수치는 3일째에 $51.7 \pm 3.3 \text{ mg/dl}$, 5일째에 $52.1 \pm 4.1 \text{ mg/dl}$ 로 대조군-I에 비하여 모두 $p < 0.001$ 의 유의한 증가를 나타내었다. 정상 혈청지질 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-I의 혈청 LDL-cholesterol 수치는 3일째에 $24.8 \pm 2.2 \text{ mg/dl}$, 5일째에 $27.7 \pm 2.6 \text{ mg/dl}$ 로 대조군-I에 비하여 유의한 변화는 없었다. 고지혈증 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험

군-II의 혈청 LDL-cholesterol 수치는 3일째에 $46.3 \pm 3.1 \text{ mg/dl}$, 5일째에 $43.0 \pm 2.9 \text{ mg/dl}$ 로 대조군-II에 비하여 3일째에는 감소되었으나 유의성은 없었고, 5일째에는 $p < 0.05$ 의 유의한 감소를 나타내었다(Table 8).

6. 혈청 triglyceride에 미치는 영향

정상 혈청지질 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 대조군-I의 혈청 triglyceride 수치는 3일째에 $112.3 \pm 8.9 \text{ mg/dl}$, 5일째에 $127.5 \pm 9.1 \text{ mg/dl}$ 였으며, 고지혈증 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 대조군-II의 혈청 triglyceride 수치는 3일째에 $357.8 \pm 32.1 \text{ mg/dl}$, 5일째에 $362.1 \pm 38.4 \text{ mg/dl}$ 로 대조군-I에 비하여 모두 $p < 0.001$ 의 유의한 증가를 나타내었다. 정상 혈청지질 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-I의 혈청 triglyceride 수치는 3일째에 $108.5 \pm 10.2 \text{ mg/dl}$, 5일째에 $107.3 \pm 9.6 \text{ mg/dl}$ 로 대조군-I에 비하여 감소하는 경향성은 있었으나 유의한 변화는 없었다.

고지혈증 상태에서 국소 뇌경색 및 전뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-II의 혈청 triglyceride 수치는 3일째에 $283.4 \pm 23.8 \text{ mg/dl}$, 5일째에 $274.5 \pm 25.4 \text{ mg/dl}$ 로 대조군-II에 비하여 3일째와 5일째 모두 $p < 0.05$ 의 유의한 감소를 나타내었다(Table 9).

고 찰

뇌경색은 뇌동맥 경화에 의한 협착이나 폐색 혹은 혈전으로 인해 뇌에 허혈, 괴사 및 연화병소가 발생된 것으로, 고혈압, 뇌혈관질환의 과거력, 심장질환, 당뇨병, 고지혈증 등이 위험인자로 알려져 있다³⁰.

뇌졸중과 혈청지질치의 관련성에 대해서는 다양한 보고들이 있다. 고지혈증과 뇌경색과의 발생 관계에 대해서 상관성이 낮거나 혹은 연관이 없다는 보고들⁵⁻⁷⁾이 있으며, total-cholesterol 과 LDL-cholesterol 수치가 일부 역학조사와 환자-대조군 연구에서 뇌졸중과 연관성이 없다는 보고³¹⁾가 있고, triglyceride 역시 뇌졸중 발생과는 뚜렷한 연관성이 없다는 보고³²⁾가 있다.

그러나 혈중 total cholesterol 농도 및 Triglyceride 농도 증가가 뇌졸중 발병의 위험인자라는 보고들^{8,9)}과 낮은 혈중 cholesterol 농도가 출혈성 뇌졸중의 발병을 증가시킨다는 연구들^{33,34)} 및 total cholesterol, HDL-cholesterol triglyceride의 농도는 허혈성 뇌졸중과 큰 관련성이 없으나, total cholesterol과 HDL-cholesterol의 비율이 허혈성 뇌졸중의 위험성을 증가시킨다는 보고³⁵⁾가 있으며, 특히 HDL-cholesterol의 농도는 뇌졸중 발병과 역상관 관계를 가지고 있어서 뇌졸중의 중요한 독립적인 위험인자로서 인식된다는 보고^{8,10)} 및 뇌경색의 부위에 따라 혈청지질의 변화가 관련여부가 다르다는 보고²⁹⁾가 있다.

국내의 연구로는 신 등³⁶⁾이 HDL-cholesterol 이 뇌경색, 뇌출혈 및 지주막하출혈군에서 높았으며 총지질치(total lipid)와 total-cholesterol 수치의 평균값이 허혈성 뇌졸중에서 높았다고 보고하였고, 위 등³⁷⁾은 뇌혈전증 환자와 정상대조군의 비교연구에서 total-cholesterol 과 HDL-cholesterol 의 비율이 유의한 차이가 있다고 보고하였으며, 배 등⁶⁾은 뇌경색환자에서 total-cholesterol, LDL-cholesterol치는 유의하게 높았으나 Triglyceride 및 HDL-cholesterol치의 농도는 변화가 없다는 보고가 있고, 안 등³⁸⁾은 HDL-cholesterol, LDL-cholesterol은 정상대조군과 뇌경색군과의 차이가 없으며 triglyceride 만이 유의하게 증

가되었다는 보고가 있다. 또한 박 등³⁹⁾은 허혈성 뇌졸중은 total-cholesterol과 triglyceride와는 관련이 있으나 LDL-cholesterol 이나 HDL-cholesterol 과는 무관하다고 하였으며, 최 등⁴⁰⁾은 Triglyceride 가 죽상경화 발생에 있어 중요한 위험인자로 뇌졸중발생과 관련성이 깊고, total cholesterol은 뇌졸중의 위험인자가 아니며 오히려 지방섭취의 감소와 음주, 영양결핍 등이 뇌출혈과 관련있다고 하였다.

혈청지질치와 뇌졸중에 대해서는 이와같이 다양한 의견이 있으나, 최근 HMG-CoA reductase 억제제인 statin계 약물을 복용하여 혈중 지질치를 낮춤으로써 뇌졸중의 이차예방 뿐만 아니라 일차예방에도 효과가 있다는 것이 보고됨¹¹⁻¹³⁾으로써 고지혈증의 조기진단 및 치료에 대한 관심이 높아지고 있다.

미국 국립보건원 National Cholesterol Education Program(NCEP)의 고지혈증 진단기준은 혈장내 총 cholesterol 농도가 240mg/dl 이상, LDL-cholesterol 농도가 160mg/dl 이상, triglyceride 농도가 200mg/dl 이상, HDL-cholesterol 농도가 40mg/dl 미만 중 하나라도 이상수치를 나타내는 경우이다⁴¹⁾.

何首烏의 성분으로는 Lecithin 및 Anthraquinone 유도체(유리 및 결합상태)가 함유되고 Chrysophanic acid, Chrysophanol, Emodin을 주성분으로 한다. Lecithin은 신경조직을 구성하는데 특히 뇌척수액의 주요성분이며 동시에 혈구 및 기타 세포막의 중요한 성분으로 혈청 콜레스테롤 농도를 저하시키고 콜레스테롤의 간내 침착을 저지하며 동맥 죽상경화를 경감시키는 작용을 가진다고 하였으며⁴²⁾, 부신을 절제한 굼긴 흰쥐의 간 glycogen의 축적을 높이는 작용이 있다고 한다⁴³⁾.

본 연구에서는 何首烏가 국소 뇌경색에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 우선 고지혈증이 유도된 흰쥐에 Chen등²⁵⁾의 중대뇌동맥 폐쇄방법 중 한 쪽의 중대뇌동맥과 같은 쪽의 총경동맥의 영구 폐쇄 및 반대측 총경동맥의 일시적 폐쇄를 병행하는 방법을 사용하였으며, 뇌경색 면적의 변화를 측정하기 위해 뇌경색 유발 및 약물투여 5일 후에 흰쥐의 뇌를 적출하여 뇌절편을 제작하고 대조군과 何首烏를 투

여한 실험군의 뇌경색 면적과 체적을 TTC 염색소견을 통하여 비교 관찰하였다.

실험에서 사용된 TTC는 정상세포의 미토콘드리아에 있는 dehydrogenase와 반응하여 붉게 염색되는 특징을 가지고 있어, 뇌경색이 발생되어 dehydrogenase가 소실되면 염색이 되지 않고 백색으로 관찰된다. 따라서 염색여부를 통하여 세포의 비가역적 손상 유무를 판단할 수 있는 지표로서 널리 사용되는 약품이다.

그 결과 정상 혈청지질 상태에서 뇌경색을 유발한 대조군-I에 비하여, 고지혈증 상태에서 뇌경색을 유발한 대조군-II의 이간선 6mm 및 8mm 절편에서 유의한($p<0.05$) 뇌경색 면적의 증가가 관찰되었고, 체적 역시 유의하게 증가하는 것으로 관찰되었다. 즉 고지혈증 상태에서 뇌경색이 유발될 경우 혈청 지질 함량이 정상인 경우에 비하여 뇌경색 면적이 증가하는 것으로 관찰되었다. 그러나 정상혈청지질 상태에서 뇌경색을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-I과 고지혈증 상태에서 뇌경색을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-II는 각각 대조군-I, 대조군-II에 비하여 통계학적으로 유의한 감소를 나타내지 않았다.

다음으로 何首烏가 전뇌허혈에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Chan 등²⁹⁾의 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 transient global ischemia 방법을 사용하였으며, 전뇌허혈 유발과 약물투여 5일째에 뇌조직을 50 μ m 두께의 관상절편으로 제작한 후 각각의 절편을 Cresyl violet 염색하여 광학현미경(Olympus, VANOX AHBS-3, Japan)으로 조직학적 변화를 관찰하고 동일한 일정 면적 내에 나타나는 살아있는 신경세포의 수를 측정된 결과, 고지혈증이 유발된 실험동물의 경우 뇌 신경세포 수가 더욱 현저하게 감소되었고, 何首烏 투여에 의하여 각각 대조군에 비하여 유의한 신경세포 수 감소 억제효과가 관찰되었다.

Bcl-2는 세포내 미토콘드리아 막이나 핵막에 존재하는 단백질로 세포 내에서 이중체(dimer)를 형성하여 작용하는데, Bcl-2/Bcl-2인 동종이중체

(homodimer)를 형성하여 작용하거나, 또 다른 Bcl-2 family 단백질인 Bax와 Bcl-2/Bax의 이종이중체(heterodimer)를 형성하여 작용하는 것으로 알려져 있다. Bcl-2/Bcl-2 동종이중체는 세포의 apoptosis를 억제하는 기능을 가지며, Bax의 양에 따라 이 동종이중체의 양이 결정되어 사망에 대한 세포의 감수성이 결정되는 것으로 추정된다⁴⁰⁾.

본 실험에서는 CA1영역에서 Bax 발현은 고지혈증 상태에서 전뇌허혈을 유발한 대조군-II가 대조군-I에 비하여 유의한 증가를 나타내는데 이는 고지혈증 상태에서 전뇌허혈은 뇌해마 신경세포의 더욱 심한 apoptosis를 유발하는 것을 의미한다. 정상 혈청 지질 상태에서 뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-I은 대조군-I에 비하여 유의성 있는 Bax 발현의 감소를 나타내었으며, 고지혈증 상태에서 뇌허혈을 유발한 후 何首烏를 투여한 실험군-II는 대조군-II에 비하여 유의성 있는 Bax 발현의 감소를 나타내었다.

CA1영역에서 Bcl-2 발현은 대조군-I과 대조군-II 사이에 현저한 변화는 없었으나, 실험군-I은 대조군-I에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었다. Bax와 Bcl-2 발현의 이러한 결과는 何首烏가 뇌허혈에 의한 신경세포의 apoptosis를 유의하게 억제하는 것을 나타내며, 고지혈증 상태에서는 Bcl-2 발현을 증가시키지는 못하였으나, Bax 발현을 유의하게 억제한 것으로 보아 何首烏는 신경세포 보호효능이 있을 것으로 생각된다.

뇌허혈 유발 3일째 및 5일째에 정상 혈청지질 상태에서 국소 뇌경색과 전뇌허혈을 유발한 후 혈청 지질치를 측정된 결과 혈청 total-cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, 및 triglyceride 수치는 何首烏의 투여가 모두 유의한 영향을 미치지 못했다. 그러나 고지혈증이 유발된 상태에서 국소 뇌경색과 전뇌허혈을 유발한 경우에는 혈청 total-cholesterol과 triglyceride 수치를 유의하게 감소시키고, LDL-cholesterol 수치를 증가시켰으나, HDL-cholesterol 수치에는 유의한 영향을 미치지 못하였다.

이상의 실험 결과로 고지혈증이 유도된 흰쥐에 뇌

허혈 손상에 있어서 何首烏 물추출액의 투여는 직접적으로 국소뇌경색의 크기를 감소시키지는 못하지만 전뇌허혈모델에서 신경세포 사멸을 억제하고, apoptosis 기전 관련 인자인 Bax의 발현증가를 억제시키며, 혈청 total-cholesterol과 triglyceride 함량을 유의하게 감소시키는 것이 관찰되었다. 따라서 何首烏는 고지혈증이 유도된 환쥐에 뇌허혈 손상에 있어서 세포사 방지에 효과가 있는 것으로 사료된다.

結 論

何首烏가 고지혈증 상태의 실험동물에서 허혈성 뇌손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 국소 뇌경색 유발 실험모형에서 뇌경색 크기에 미치는 영향과 전뇌허혈 상태에서 뇌해마의 신경세포 및 신경세포 apoptosis에 관련된 인자인 Bax와 Bcl-2 발현에 미치는 영향 및 혈청지질에 미치는 영향을 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 何首烏는 정상 혈청지질 상태와 고지혈증이 유도된 상태 모두에서 국소 뇌경색의 크기를 유의하게 감소시키지 못하였다.
2. 何首烏는 정상 혈청지질 상태와 고지혈증이 유도된 상태 모두에서 전뇌허혈에 의한 뇌해마 CA1영역의 신경세포 손상을 유의하게 억제하였다.
3. 何首烏는 정상 혈청지질 상태와 고지혈증이 유도된 상태 모두에서 전뇌허혈에 의한 뇌해마 CA1영역의 Bax 발현을 유의하게 억제하였다.
4. 何首烏는 정상 혈청지질 상태의 전뇌허혈 유발 후 뇌해마 CA1영역의 Bcl-2 발현을 유의하게 증가시켰으나, 고지혈증이 유도된 상태의 전뇌허혈에서는 효과가 없었다.
5. 何首烏는 정상 혈청지질 상태에서 국소 뇌경색과 전뇌허혈이 유발된 경우에 혈청 total-cholesterol,

HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 및 triglyceride 수치에 유의한 변화가 없었다.

6. 何首烏는 고지혈증이 유도된 상태에서 국소 뇌경색과 전뇌허혈이 유발된 경우 혈청 total-cholesterol과 triglyceride 수치를 모두 유의하게 감소시켰으며, LDL-cholesterol 수치를 유의하게 증가시켰다.

참고문헌

1. 안재훈. 열공경색과 피질 경색에 있어서의 혈청지질에 대한 연구. 대한의학협회지. 1991;34(1):78-82.
2. Kannel WB. Contributions of the Framingham study to the conquest of coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 1988;62:1109-12.
3. Saini HK, Arneja AS, Dhalla NS. Role of cholesterol in cardiovascular dysfunction. *Can J Cardiol.* 2004 Mar 1;20(3):333-46.
4. Marques-Vidal P, Ruidavets JB, Amouyel P, Ducimetiere P, Arveiler D, Montaye M et al. Change in cardiovascular risk factors in France, 1985-1997. *Eur J Epidemiol.* 2004;19(1):25-32.
5. 신길조, 박성식. 뇌졸중과 고지혈증과의 관련성에 대한 연구. 한의정보학회지. 1995;1(1):37-55.
6. 배충근, 채성철, 전재은, 박의현, 변영주. 뇌경색증의 위험인자로서의 혈장지질분획 및 Apolipoprotein. 대한내과학회지. 1993;44(1):78-85.
7. Prospective Studies Collaboration. Cholesterol, diastolic blood pressure, and stroke. 13000 strokes in 450000 people in 45 prospective cohorts. *Lancet.* 1995;346:1647-53.
8. Tanne D, Yaari S, Goldbourt U. High density lipoprotein cholesterol and risk of ischemic stroke mortality. *Stroke.* 1997;28:83-7.

9. Laloux P, Galanti L, Jamart J. Lipids in ischemic stroke subtypes. *Acta Neurol Belg.* 2004 Mar;104(1):13-19.
10. Hully SB, Rosenman RH, Bawol RD, Brand RJ. Epidemiology as a guide to clinical decisions. The association between triglyceride and coronary heart disease, *New Eng/J Med.* 1980;302:1383.
11. Brendan M Buckley. Lipids and stroke. *Br J Diabetes Vasc Dis.* 2003;3(3):170-6.
12. Scandinavian simvastatin survival study group. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. *Lancet.* 1994;344:1383-9.
13. Sasaki J, Arakawa K, Iwashita M, Matsushita Y, Kono S; Kyushu Lipid Intervention Study (KLIS) Group. Reduction in serum total cholesterol and risks of coronary events and cerebral infarction in Japanese men. the Kyushu Lipid Intervention Study. *Circ J.* 2003;67(6):473-478.
14. 진국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울:영림사. 1998:583.
15. Wang, W., Wang, J.H., Shi, T.R.. Effect of *Polygonum multiflorum* on the life-span and lipid metabolism in senile Japanese quails. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih.* 1988;8(4):223-4.
16. 이영중, 손영중. 何首烏가 고지혈증 흰쥐의 혈중지질 및 효소활성에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1999;14(1):69-77.
17. Liu, C., Zhang, Q., Lin, J.. Effect of the root of *Polygonum multiflorum* Thumb. and its processed products on fat accumulation in the liver of mice. *Chung Kuo Chung yao Tsa Chih.* 1992;17(10):595-6.
18. 이원철. 赤何首烏(何首烏)가 고cholesterol식이(食餌)에 의하여 유발된 가토(家兔) 관상동맥의 죽상경화에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1995;16(1):425-36.
19. Yin, J.H., Zhou, X.Y., Zhu, X.Q.. Pharmacological and clinical studies on the processed products of radix *Polygonum multiflori.* *Chung Kuo Chung yao Tsa Chih.* 1992;17(12):722-4.
20. 박원환. 내관 족삼리혈의 何首烏약침이 고콜레스테롤 혈증 병태 백서에 미치는 영향. 동의병리학회지. 2000;14(1):135-47.
21. 옥은성. 何首烏 추출물이 고혈당증 흰쥐에 미치는 영향. 호남대학교논문집 제16집. 1998;261-7.
22. 유교상, 이용석, 손영우, 홍기연. 何首烏가 유기수은으로 손상된 생쥐의 배양대뇌신경세포에 미치는 영향에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2002;16(6):1134-7.
23. 지형준. 대한 약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울:한국메디칼인텍스사. 1998:577-578.
24. Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W. Focal brain ischemia in the rat. Methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988;8:474-85.
25. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, and Balentine JD. A model of focal ischemic stroke in the rat. Reproducible extensive cortical infarction. *Stroke.* 1986;17(4):738-743.
26. Bartus RT, Dean RL, Cavanaugh K, Eveleth D, Carrero D, Lynch G. Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion. Implications for therapeutic intervention and the role of calpain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:969-79.
27. 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.
28. 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.
29. Atushi M, Tomoji T, Taduio M, Masakuni K. Lipoprotein abnormality in the pathogenesis of cerebral infarction and transient ischemic attack. *Stroke.* 1981;12:167.
 30. 서정규. 뇌혈관질환의 진단과 치료방침. 대한 의학협회지. 1990; 33(8):850-8.
 31. Juan PB, Mariano S, Xavier N, Juan RP, Jaume R, Luis D. Lipoprotein and apolipoprotein profile in men with ischemic stroke. *Stroke.* 1992;23:11:1556-62.
 32. Juan PB, Mariano S, Xavier N, Juan RP, Jaume R, Luis D. Lipoprotein and apolipoprotein profile in men with ischemic stroke. *Stroke.* 1992;23:11:1556-62.
 33. Puddey IB: Low serum cholesterol and risk of cerebral hemorrhage. *Atherosclerosis.* 1996;119:1-6.
 34. Smith GD. Low blood cholesterol and non-atherosclerotic disease mortality. where do we stand?. *Eur Heart J.* 1997;19:6-9.
 35. Bowman TS, Sesso HD, Ma J, Kurth T, Kase CS, Stampfer MJ et al. Cholesterol and the risk of ischemic stroke. *Stroke.* 2003 Dec;34(12):2930-4.
 36. 신건민 외. 뇌졸중의 위험인자에 관한 조사. 대한신경과학회지. 1998;6:2.218-27.
 37. Wie BA, Han MG, Jeon JH, Yim MJ, Chung CS. Serum lipids in the patients with cerebral thrombosis. *J Kor Neurol Ass.* 1989;7(2):258-65.
 38. 안재훈 외. 열공경색과 피질경색에 있어서의 혈청지질에 대한 연구. 대한내과학회지. 1992;43:5.
 39. 박진석, 최진영. 뇌경색 환자와 정상인에 있어서의 혈중 지질치 비교. 대한신경과학회지. 1998;16(1):8-14.
 40. Choi-Kwon S, Yang YH, Kim EK, Jeon MY, Kim JS. Nutritional status in acute stroke. undernutrition versus overnutrition in different stroke subtypes. *Acta Neurol Scand.* 1998;98:187-92.
 41. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of high Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program(NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of high Blood Cholesterol in Adults(Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285(19):2486-509.
 42. 江蘇新醫學院. 新編中藥大辭典. 서울:醫聖堂. 1992:862-865.
 43. 圖說漢方醫藥大辭典. 中國藥學大典. 北京:人民衛生出版社. 1991:124-127.
 44. Volpe BT, Wessel TC, Mukherjee B, Federoff HJ. Temporal pattern of internucleosomal DNA fragmentation in the striatum and hippocampus after transient forebrain ischemia, *Neurosci Lett.* 1995;186(2-3):157-160.