

원 저

血府逐瘀湯이 흰쥐의 전뇌허혈에 미치는 영향

조은희, 권정남, 김영균

동의대학교 부속한방병원 심계내과학교실

Neuroprotective Effects of *Hyulbuchookau-tang* (血府逐瘀湯) on Global Cerebral Ischemia of the Rats

Eun-hee Cho, Jung-nam Kwon, Young-gyun Kim

Dept. of Oriental Medicine, Graduate School, Donggeui University

Objectives : This study examined the neuroprotective effect of *Hyulbuchookau-tang* (血府逐瘀湯, HBCAT) against neural damage following global cerebral infarction.

Methods : Sprague-Dawley rats were induced with global cerebral infarction by occlusion of the bilateral common carotid artery with hypotension (CCAO). The rats were divided into 3 groups. We treated extract of HBCAT to one group after operation (sample group), one group wasn't induced with ischemic damage after operation (sham group), and one group was induced with ischemic damage after operation (control group) but not treated.

We observed neurological scores and cresyl violet-stained hippocampus CA1 area, TUNEL-positive neurons, and Bax-positive neurons in brain regions.

Results : HBCAT treatment after CCAO increased pyramidal neurons in CA1 hippocampus induced by CCAO. HBCAT treatment after CCAO reduced Bax-positive neurons in CA1 hippocampus of brain regions induced by CCAO.

HBCAT treatment after CCAO wasn't effective for HSP70-positive neurons in CA1 hippocampus induced by CCAO.

Conclusions : These results suggest that HBCAT has a neuroprotective effect against global cerebral ischemia.

Key Words : *Hyulbuchookau-tang* (血府逐瘀湯, HBCAT), common carotid artery occlusion (CCAO), neuroprotective effect, global cerebral infarction

緒 論

중풍은 卒倒, 言語乾澀, 口眼喎斜, 半身不遂, 人事不省등의 급격한 의식장애, 감각장애 같은 신경계통의 증상을 일으키는 질환으로 주로 內風, 火

熱, 濕痰 및 瘀血, 虛證 등의 원인으로 발생한다.¹⁾

어혈치료의 대표처방인 血府逐瘀湯은 王²⁾의 림개착에 처음으로 收載되었으며 活血祛瘀, 疎肝理氣, 行氣止痛의 효능을 갖고 胸脇疼痛과 頭痛, 內熱煩悶, 失眠多夢, 心悸怔忡 등의 證 즉, 頭部와 胸脇部에 발현되는 瘀血의 병증에 응용되어 왔다^{3,4)}.

血府逐瘀湯은 임상적으로 腦血管疾患, 心筋梗塞, 狹心症 및 혈전증 등에 유의한 효능이 있음⁵⁻⁸⁾이 실험적으로 보고되었고, 뇌세포와 중풍의 연관성에 관한 보고⁹⁻¹¹⁾, 血府逐瘀湯의 국소뇌허혈 손

· 접수 : 2007년 4월 4일 · 논문심사 : 2007년 4월 7일
· 채택 : 2007년 5월 2일
· 교신저자 : 권정남, 부산광역시 부산진구 양정 2동 산 45-1 동의대학교 부속 한방병원 한방 2내과 (Tel : 051-850-8622, Fax : 051-867-5162, E-mail : jnkwon@demc.or.kr)

상에 미치는 영향에 대한 보고¹²⁾ 등을 보아 중풍 등의 뇌질환에도 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

이에 저자는 血府逐瘀湯이 중풍 등 뇌허혈 질환에 대한 효능을 실험적으로 관찰하기 위해서, 흰쥐에 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법으로 허혈손상을 유발하고 血府逐瘀湯 추출물을 투여한 다음 뇌해마 CA1 구역에서 추체신경세포의 변화와 TUNEL-양성반응 및 Bax-양성반응 신경세포의 변화를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

實驗方法

1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 12주령, 약 300g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 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.

Table 1. Prescription of *Hyulbuchookau-tang*

한약명	생약명	용량
桃仁	<i>Periscae Semen</i>	16g
當歸	<i>Angelicae</i>	12g
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	12g
紅花	<i>Carthemi Flos</i>	12g
牛膝	<i>Achyranthis Radix</i>	12g
枳殼	<i>Aurantii Fructus</i>	8g
赤芍藥	<i>Paeoniae Radicis Rubra</i>	8g
桔梗	<i>Platycodi</i>	6g
川芎	<i>Chidii Rhizoma</i>	4g
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4g
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4g
계	<i>total amount</i>	98g

2. 약물의 조제

본 실험에 사용한 약물은 血府逐瘀湯으로 처방의 내용은 아래와 같다. 약물의 조제는 일반적인 물추출 액기스 제조방법에 의하여, 5첩 분량 500g을 3,000ml의 물과 함께 냉각기가 장착된 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축 후 동결건조하여 121.4g의 물추출 액기스를 얻었다. 실험동물의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100g 당 체중비례 계산량의 5배인 200mg으로 하였다. (Table.1)

3. 실험군의 구분

전뇌허혈 손상에 대한 血府逐瘀湯의 효능을 관찰하기 위하여, 실험군은 전뇌허혈을 유발하기 위한 수술은 시행하였으나 허혈손상을 유발시키지 않은 정상대조군 (Sham)과 전뇌허혈을 유발시킨 대조군 (Control) 및 허혈손상 유발 후 血府逐瘀湯 물추출 액기스를 1일 1회씩 5일간 경구투여한 血府逐瘀湯투여군 (Sample)으로 나누었다. 각 군 당 실험동물은 6마리씩을 배정하였다.

4. 전뇌허혈의 유발

전뇌허혈을 유발하기 위하여, Chan 등¹³⁾이 사용한 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 transient global ischemia (TGI) 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 서혜부의 대퇴동맥을 노출시킨 후 PE-50 polyethylene catheter를 장착시키고, 한쪽에는 phygiograph를 연결하여 동맥혈압을 수술 전과정 동안 지속적으로 기록하고, 다른 한쪽은 저혈압 유발을 위한 혈

액채취에 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 Sugawara 등¹⁴⁾의 연구결과에 근거하여 한쪽 대퇴동맥으로부터 빠르게 혈액을 제거하여 평균동맥혈압이 40mmHg에 이르게 하여 유지시켰다. 저혈압이 유발된 즉시 전경부의 총경동맥 폐쇄용 고리를 당기고 metal clip으로 고정하여 뇌허혈을 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.

5. 뇌조직의 처리

전뇌허혈 유발 5일째에 실험동물을 pentobarbital sodium의 복강주사로 깊게 마취한 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°C의 dry ice-isopentane에서 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80°C에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50 μ m 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

6. Cresyl violet 염색 및 신경세포 변화의 관찰

전뇌허혈을 유발한 실험동물의 뇌조직을 poly-L-lysine으로 코팅된 슬라이드에 붙여 건조시키고, 1% cresyl violet solution으로 2분간 염색하고¹⁵⁾ 일반적인 조직표본제작법에 따라 탈수, 봉합하여 전뇌허혈 유발 및 약물투여에 따른 뇌해마 (hippocampus) CA1영역에서 신경세포의 변화를 관찰하였다. 뇌해

마 CA1구역 추체신경세포 수 및 추체신경세포 층의 두께는 CCD 카메라와 영상분석시스템이 부착된 광학현미경으로 cresyl violet 염색된 조직에서 CA1의 일정길이 (400 μ m) 내에 존재하는 추체신경세포의 수를 “NIH Image” software로 측정하였다.

7. TUNEL과 Bax 염색 및 관찰

전뇌허혈을 유발한 실험동물의 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)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어낸 후, primary antibody를 처리하였다. Bax와 TUNEL antibody (mouse monoclonal IgG, Oncogene Science)는 1:200의 희석배율로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후, 4°C에서 overnight로 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다.^{16,17)} 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. TUNEL 및 Bax 발현의 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여, 뇌해마의 영상을 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고 “NIH Image” software를 사용하여 CA1 부위에서 양성반응 신경세포 수를 측정하였다.

8. 통계분석 방법

통계분석은 Student's t-test와 ANOVA를 사용하였고 P<0.05이하를 통계적 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

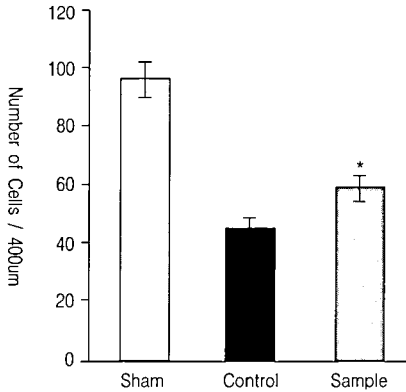


Fig. 1. Effect of *Hyulbuchookau-tang*(血府逐瘀湯) on the pyramidal neurons in the hippocampus CA1 of TGI rats. Sample group demonstrated significant (*; P<0.05) increase of the pyramidal neurons in the hippocampus CA1 as compared with the control group. Data presented as mean ± standard error.

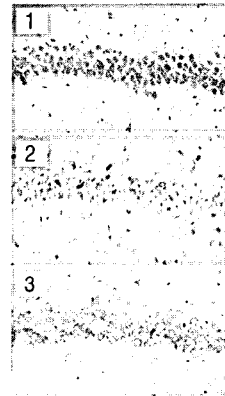


Fig. 2. Cresyl violet stained sections of the hippocampus of TGI rats. Section 1 shows sham group, section 2 shows control group, and section 3 shows Sample group. Sample group demonstrated significant increase of the pyramidal neurons in the hippocampus CA1 as compared with the control group.

實驗成績

1. 뇌해마 신경세포에 대한 영향

뇌허혈 유발 후 뇌해마 CA1 부위 400µm 길이에서 신경세포의 수를 측정할 때 Sham군에서는 96.0±4.2 개의 신경세포가 관찰되었고, Control군에서는 44.3±3.6 개의 신경세포가 관찰되어 뇌허혈에 의하여 신경세포가 현저하게 감소하였다. Sample군에서는 58.3±4.1 개의 신경세포가 관찰

되어 Control군에 비하여 31.6 % 증가하였으며, 통계학적으로 P<0.05의 유의성 있는 증가를 나타내어 血府逐瘀湯 투여에 의하여 유의한 뇌허혈 손상의 감소가 관찰되었다 (Table 2, Fig. 1, 2).

2. 뇌해마의 TUNEL-양성반응 신경세포에 대한 영향

뇌허혈 유발 후 뇌해마 CA1 부위 400µm 길이에서 TUNEL-양성반응 신경세포의 수를 측정할 때

Table 2. Effect of *Hyulbuchookau-tang*(血府逐瘀湯) on Pyramidal Neurons in CA1 Hippocampus of TGI Rats

	Number	Increase %	P-value
Sham	96.0±4.2	-	-
Control	44.3±3.6	-	-
Sample	58.3±4.1	31.6	<0.05

Sham: Group operated without TGI
 Control: Group operated with TGI
 Sample: Group operated with TGI and then treated with *Hyulbuchookau-tang*(血府逐瘀湯)
 Data presented as mean ± standard error.

Table 3. Effect of *Hyulbuchookau-tang*(血府逐瘀湯) on TUNEL- Positive Neurons in CA1 Hippocampus of TGI Rats

	Number	Decrease %	P-value
Sham	4.2±1.0	-	-
Control	52.5±2.5	-	-
Sample	44.3±4.8	15.6	non

Sham: Group operated without TGI
 Control: Group operated with TGI
 Sample: Group operated with TGI and then treated with *Hyulbuchookau-tang*(血府逐瘀湯)
 Data presented as mean ± standard error.

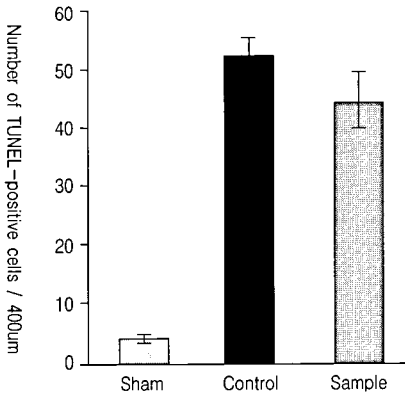


Fig. 3. Effect of *Hyulbuchookau-tang*(血府逐瘀湯) on TUNEL-positive neurons in the hippocampus CA1 of TGI rats. Sample group did not demonstrate significant decrease of TUNEL-positive neurons in the hippocampus CA1 as compared with the control group. Data presented as mean ± standard error.

Sham군에서는 4.2±1.0개의 신경세포가 관찰되었고, Control군에서는 52.5±2.5개의 신경세포가 관찰되어 뇌허혈에 의하여 TUNEL-양성반응을 나타낸 신경세포가 현저하게 증가하였다. Sample군에서는 44.3±4.8개의 신경세포가 관찰되어 Control군에 비하여 15.6% 감소하였으나 통계학적으로 유의성은 없었다 (Table 3, Fig. 3, 4).

Table 4. Effect of *Hyulbuchookau-tang*(血府逐瘀湯) on Bax-Positive Neurons in CA1 Hippicampus of TGI Rats

	Number	Decrease %	P-value
Sham	3.2±0.7	-	-
Control	74.7±7.7	-	-
Sample	53.5±5.7	28.3	<0.05

Sham: Group operated without TGI
 Control: Group operated with TGI
 Sample: Group operated with TGI and then treated with *Hyulbuchookau-tang*(血府逐瘀湯)
 Data presented as mean ± standard error.

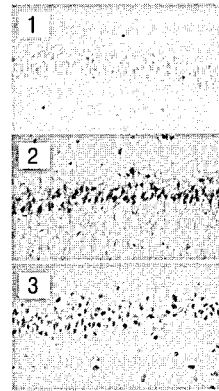


Fig. 4. TUNEL stained sections of the hippocampus of TGI rats. section 1 shows sham group, section 2 shows control group, and section 3 shows sample group. Sample group did not demonstrate significant decrease of TUNEL-positive neurons in the hippocampus CA1 as compared with the control group.

3. 뇌해마의 Bax-양성반응 신경세포에 대한 영향

뇌허혈 유발 후 뇌해마 CA1 부위 400µm 길이에서 Bax-양성반응 신경세포의 수를 측정된 바 Sham군에서는 3.2±0.7개의 신경세포가 관찰되었고, Control군에서는 74.7±7.7개의 신경세포가 관찰되어 뇌허혈에 의하여 Bax-양성반응을 나타낸 신경세포가 현저하게 증가하였다. Sample군에서는 53.5±5.7개의 신경세포가 관찰되어 Control군에 비하여 28.3% 감소하였으며, 통계학적으로 P<0.05의 유의성 있는 감소를 나타내어 血府逐瘀湯 투여에 의하여 유의한 뇌허혈 손상의 감소가 관찰되었다 (Table 4, Fig. 5, 6).

考 察

중풍은 內生風, 火熱, 濕痰 및 瘀血, 虛證을 원인¹⁾으로 뇌혈관의 파열이나 폐색이나 파열과 같은 순환기문제를 야기 시켜 급격한 의식장애나 운동장애, 감각장애 같은 신경계통의 증상을 일으키는 질환이다.¹⁸⁾

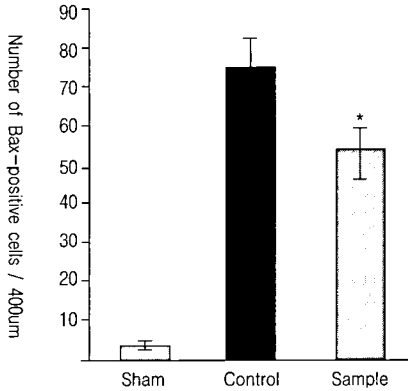


Fig. 5. Effect of *Hyulbuchookau-tang*(血府逐瘀湯) on Bax-positive neurons in the hippocampus CA1 of TGI rats. Sample group demonstrated significant (*; $P < 0.05$) decrease of Bax-positive neurons in the hippocampus CA1 as compared with the control group. Data presented as mean \pm standard error.

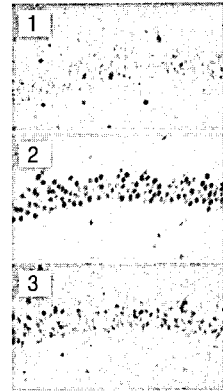


Fig. 6. Immuno-reacted brain sections against Bax on the hippocampus of TGI rats. Section 1 shows Sham group, section 2 shows control group, and section 3 shows Sample group. Sample group demonstrated significant (*; $P < 0.05$) decrease of Bax-positive neurons in the hippocampus CA1 as compared with the control group.

중풍을 일으키는 원인 중 하나인 어혈은, 어혈이란 용어는 A.D 200년경 장기(張機)에 이르러 비로소 사용되었고 특히 1830년 왕청임은 거의 모든 질병의 원인을 어혈로 보는 이론을 주장하고 血府逐瘀湯 등의 처방을 창안하여 활용하는 경향을 나타내었다. 그 이후 다수의 의가들은 타박상상으로 인하여 발생하는 어혈에 血府逐瘀湯을 중점적으로 취급하였다.¹⁹⁾

현재의 어혈은 전신의 혈액순행이 순탄치 못하거나 혹은 몸의 어느 부분에 혈액의 순행이 막히거나 또는 맥관에서 혈이 흘러나와 정체되어 소산되지 않은 상태 등을 포함하는 개념인데²⁰⁾, 동의보감에서는 축혈이란 어혈이 쌓인 것으로 축혈의 증상은 가래가 나오고 갈증이 나며 귀가 먹고 정신이 흐리고 잊어먹기를 잘한다²¹⁾하였다. 이는 중풍의 神志不清, 痰涎壅盛 등의 증상과 유사한 부분으로 중풍에 대하여 어혈의 개념으로 접근이 가능하다고 생각된다.

허혈은 어떤 조직에서 필요한 충분한 산소를 공급하지 못하여 혈류의 부족으로 인한 증상이 발

현될 때의 상태를 말하고 있다. 뇌허혈은 원인에 따라 국소뇌허혈과 전뇌허혈이 나타난다. 국소뇌허혈의 경우는 주로 뇌동맥류의 파열, 동정맥기형, 색전을 일으킬 수 있는 판막성 심질환이나 동맥경화증에 의해 이차적으로 나타나는 색전형 뇌졸중, thromboembolic stroke, 우연적 힘에 의하거나 뇌손상 등에 의하여 일어날 수 있다. 전뇌허혈은 주로 심정지에 의하여 발생된다.²²⁾

뇌허혈 손상에 대한 연구에 사용되는 동물실험 모형은 크게 국소뇌허혈 (focal ischemia)와 전뇌허혈 (global ischemia)의 두가지 모형으로 구분할 수 있다.²³⁾ 전뇌허혈 모형 중 혈압을 50mmHg 이하로 낮춘 상태에서 양측의 총경동맥을 폐쇄하는 방법은 뇌혈류를 약 15% 정도 감소시켜 뇌해마 (hippocampus), 대뇌피질 (cerebral cortex) 및 선조체 (striatum) 모두에 허혈손상을 유발한다. 이러한 정도의 허혈 손상은 비교적 심하지 않은 손상을 유발하므로 약물의 효능을 검증하는데 유용하게 사용된다.^{24,25)}

뇌해마 중 CA1 구역의 추체신경세포들은 뇌허

혈 손상에 가장 민감하게 반응하는 신경세포이다. 뇌해마 CA1 구역의 모든 신경세포들은 약 5분 정도의 전뇌허혈 유발상태에서 손상을 받기 시작하는데 비하여 CA3 구역은 약 20분 정도의 허혈유발이 요구된다고 하였다.²⁶⁾ 또한 뇌해마 CA1 구역의 추체신경세포들은 허혈손상이 가해진 후 약 12시간부터 사망하기 시작하여 수일간에 걸쳐 점차적으로 사망하는 세포지연사 (delayed cell death)의 경향을 나타내며,^{27,28)} 약 10분 이상의 전뇌허혈 유발상태에서는 약 7일후 거의 모든 신경세포가 사망한다고 보고되어 있다.²⁹⁾ 그러므로 5-10분간의 전뇌허혈 유발상태에서 뇌해마 CA1 구역의 추체신경세포가 나타내는 세포수의 변화, 각종 유전자 및 단백질 발현의 변화 등은 뇌허혈에 대한 신경세포 손상 기전에 대한 연구와 약물의 신경손상에 대한 보호 효능을 연구하는데 가장 흔히 사용되는 지표가 된다. 본 실험의 결과, 뇌허혈 유발 후 뇌해마 CA1 부위 400 μ m 길이에서 신경세포의 수를 측정할 때 Sham군에서는 96.0 \pm 4.2개의 신경세포가 관찰되었고, Control군에서는 44.3 \pm 3.6개의 신경세포가 관찰되어 뇌허혈에 의하여 신경세포가 현저하게 감소하였다. Sample군에서는 58.3 \pm 4.1개의 신경세포가 관찰되어 Control군에 비하여 31.6% 증가하였으며, 통계학적으로 P<0.05의 유의성 있는 증가를 나타내어 血府逐瘀湯 투여에 의하여 유의한 뇌허혈 손상의 감소가 관찰되었다.

신경세포의 자연사는 비교적 덜 강력하고 만성적인 조직손상에 관련된 비염증성의 ATP소모가 요구되는 조절된 세포사멸 과정으로, 세포막의 특성이 유지되는 상태에서 세포핵의 절단과 염색질의 응축에 이어 세포 응축이 나타나고 세포소기관들과 염색질이 자연사체 (apoptotic body)를 형성한 다음 주변 세포들의 식작용에 의하여 사멸하는 과정을 거친다.^{30,31)} 세포의 자연사를 관찰하는 방법은 자연사 과정 중 DNA가 internucleosomal 180-200 base의 조각으로 갈라지는 현상 (DNA laddering)과 DNA fragmentation이 일어나는 것을 이용하여 terminal

deoxynucleotidyl transferase-

mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)을 하는 방법이 가장 널리 사용되고 있다.^{32,33)} 본 실험의 결과, 뇌허혈 유발 후 뇌해마 CA1 부위 400 μ m 길이에서 TUNEL-양성반응 신경세포의 수를 측정할 때 Sham군에서는 4.2 \pm 1.0개의 신경세포가 관찰되었고, Control군에서는 52.5 \pm 2.5개의 신경세포가 관찰되어 뇌허혈에 의하여 TUNEL-양성반응을 나타낸 신경세포가 현저하게 증가하였다. Sample군에서는 44.3 \pm 4.8개의 신경세포가 관찰되어 Control군에 비하여 15.6% 감소하였으나 통계학적으로 유의성은 없었다. 血府逐瘀湯이 위의 결과에서 추체신경세포수의 유의한 증가를 나타낸 것으로 보아 TUNEL-양성반응 신경세포 수는 유의하게 감소할 것으로 기대하였으나 결과는 일치하지 않았다. 이는 아마도 뇌해마 CA1 구역에서 나타나는 신경세포사망의 시간적 지연과 DNA fragmentation 손상의 시간적 차이에 의한 결과로 생각된다. 하지만 구체적인 차이의 기전에 대해서는 보다 진척된 연구가 필요할 것이다.

Bax는 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)와 함께 세포자연사를 조절하는 인자이다. Bax는 Bcl-2와 거의 유사한 아미노산 서열을 가지고 있으며, 과도하게 발현될 경우 세포가 자연사 과정을 일으키게 된다. 이러한 Bax는 중추신경계의 신경세포에서 약간 볼 수 있으며 노화와 함께 증가하는 경향을 나타낸다. 이에 비하여 Bcl-2는 세포자연사를 억제하여 세포의 생존을 촉진하며, 성장기의 신경세포에 다량으로 존재하나 노화와 함께 급격히 감소한다. Bcl-2의 세포자연사 억제효능은 Bax와 결합하여 Bax가 세포자연사를 일으키는 기능을 저해하여 나타난다. 그러므로 Bax와 Bcl-2는 세포의 생존과 사망에 상반된 역할을 수행하고 있는 것으로 알려져 있다.^{34,35)} 특히 Bax는 뇌허혈과 같은 다양한 세포 외부로부터의 유해자극에 대하여 신경세포의 손상 가능성 여부를 결정하는 것으로 보고되어 있다.³⁵⁾ 그러므로

뇌허혈에 의하여 가장 민감하게 신경세포의 자연사가 일어나는 뇌해마 추체신경세포에서 Bax의 발현은 장차 신경세포가 사망할 것이라는 것을 판별할 수 있는 중요한 지표로 사용되고 있다.^{16,35)} 본 실험에서 뇌허혈 유발 후 뇌해마 CA1 부위 400 μm 길이에서 Bax-양성반응 신경세포의 수를 측정 한 바 Sham군에서는 3.2±0.7개의 신경세포가 관찰되었고, Control군에서는 74.7±

7.7개의 신경세포가 관찰되어 뇌허혈에 의하여 Bax-양성반응을 나타낸 신경세포가 현저하게 증가하였다. Sample군에서는 53.5±5.7개의 신경세포가 관찰되어 Control군에 비하여 28.3% 감소하였으며, 통계학적으로 P<0.05의 유의성 있는 감소를 나타내어 血府逐瘀湯 투여에 의하여 유의한 뇌허혈 손상의 감소가 관찰되었다.

이상의 결과들을 고찰할 때 血府逐瘀湯은 전뇌허혈로 인한 신경세포의 자연사를 억제하는 기전에 의하여 신경세포손상에 대한 보호효능을 나타내는 것으로 생각되며 향후 血府逐瘀湯이 어혈로 인한 중풍의 치료효과에 미치는 영향에 대하여 임상적인 연구가 필요하다고 생각된다.

結 論

血府逐瘀湯이 전뇌허혈에 미치는 효능을 연구하기 위해서, 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법으로 허혈손상을 유발하고 血府逐瘀湯 물추출물을 투여한 다음 뇌해마 CA1 구역에서 추체신경세포의 변화와 TUNEL-양성반응 및 Bax-양성반응 신경세포의 변화를 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 血府逐瘀湯투여군은 전뇌허혈의 뇌해마 추체신경세포에 대하여 유의한 신경세포 수의 증가를 나타내었다.
2. 血府逐瘀湯투여군은 전뇌허혈의 뇌해마 CA1 구역에서 TUNEL-양성반응 신경세포에 대하여 유의한 효능을 나타내지 못하였다.

3. 血府逐瘀湯투여군은 전뇌허혈의 뇌해마 CA1 구역에서 Bax-양성반응 신경세포에 대하여 유의한 Bax-양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 血府逐瘀湯은 전뇌허혈에 대하여 일정한 신경세포손상 보호효능이 있는 것으로 판단된다.

參考文獻

1. 김영석. 임상중풍학, 서울, 서현당. p.303-308, 1997.
2. 王淸任. 의림개착, 상해, 상해과학기술출판사. p.19, 1966.
3. 상해중의학원. 방제학, 香港, 상무인서관, p.177, 1977.
4. 광둥중의학원. 신편중의학개요, 香港, 상무인서관, pp.299-300, 1976.
5. 陸乾人. 血府逐瘀湯加味治療冠心病84例. 中國中西醫結合雜誌, 15(1):44- 45, 1995.
6. 鄧世發. 血府逐瘀湯加味治療瘀血性高血壓短痛初探, 中醫雜誌, 5:50-53, 1985.
7. 王益全. 血府逐瘀湯治療外傷頭痛的體會, 中醫雜誌, 1:67-69, 1982.
8. 劉選淸. 血府逐瘀湯治療血性頭痛55例, 新中醫, 6:29, 1984.
9. 정성재. 血府逐瘀湯이 뇌세포의 arachinodic acid 대사 유전자 발현에 미치는 영향. 성남 : 경원대 대학원.2004.
10. 김용. 血府逐瘀湯이 교원효소로 유발된 흰쥐의 출혈성 뇌졸중에 미치는 영향. 제천 : 세명대 대학원. 2004.
11. 심문기. 血府逐瘀湯이 중풍관련인자에 미치는 영향. 성남 : 경원대 대학원. 2003.
12. 조은희. 血府逐瘀湯이 흰쥐의 국소뇌허혈 손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2006;27(2):70-85
13. Chan PH, Kawase M, Murakami K, Chen SF, Li Y, Calagui B, Reola L, Carlson E, Epstein CJ : Overexpression of SOD1 in transgenic

- rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci*, 18(20):8292-8299, 1998.
14. Sugawara T, Kawase M, Lewen A, Noshita N, Gasche Y, Fujimura M, Chan PH : Effect of hypotension severity on hippocampal CA1 neurons in a rat global ischemia model. *Brain Res*, 877:281-287, 2000.
 15. Derugin N, Wendland M, Muramatsu K, Roberts TP, Gregory G, Ferriero DM, Vexler ZS : Evolution of brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in neonatal rats. *Stroke*, 31(7):1752-1761, 2000.
 16. Hara A, Iwai T, Niwa M : Immunohistochemical detection of BAX and BCL-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 711:249-253, 1996.
 17. Hilton DA, Love S, Barber R : Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by in situ hybridization using digoxigenin-labeled poly(A) oligonucleotide probes to detect thymidine-rich DNA sequences. *J Histochem Cytochem*, 45:13-20, 1997.
 18. 이문호 등. 내과학 하. 서울박애출판사. 1971. 1502-4
 19. 인규석. 어혈의 병리에 관한 문헌적 고찰, 동서 의학지. 1980;5(1):43
 20. 허준. 동의보감. 법민문화사. 1999:212,947
 21. 류지윤 외. 변증시치임상요강. 영림사. 1993:152
 22. 김인세. 뇌허혈과 뇌보호. 대한마취과학회지. 1997;33:195-203
 23. Ginsberg MD, Busto R : Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, 20:1627-1642, 1989.
 24. mith ML, Auer RN, Siesjo BK : The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol*, 64:319-332, 1984.
 25. Swan JH, Meldrum BS : Long term development of selective neuronal loss and the mechanism of protection by 2-amino-7-phosphonoheptanoate in a rat model of incomplete forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8:64-78, 1988.
 26. Kirino T, Tamura A, Sano K : Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Prog Brain Res*, 63:39-58, 1985.
 27. Pulsinelli WA, Brierly JB : A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanaesthetized rat. *Stroke*, 10:267-272, 1979.
 28. Pulsinelli WA, Brierly JB, Plum F : Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*, 11:491-498, 1982.
 29. Coimbra C, Wieloch T : Moderate hypothermia mitigates neuronal damage in the rat brain when initiated several hours following transient cerebral ischemia. *Acta Neuropathol*, 87:325-331, 1994.
 30. Hengartner M : The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407:770-777, 2000.
 31. Nicholson DW : Mechanisms of apoptotic control. *Nature*, 407:810-816, 2000.
 32. Hilton DA, Love S, Barber R : Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by in situ hybridization using digoxigenin-labeled poly(A) oligonucleotide probes to detect thymidine-rich DNA sequences. *J Histochem Cytochem*, 45:13-20, 1997.
 33. Love S, Hilton DA : Comparison of methods for the detection of cells in different stages of apoptosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 22:161-162, 1996.
 34. Chen J, Zhu RL, Nakayama M : Expression of the apoptosis-effector gene, BAX, is upregulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem*, 67:64-71, 1996.

35. Gillardon F, Wickert H, Zimmermann M : apoptosis in mouse brain. *Neurosci Lett*, 192: 85-88, 1995.
Up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 is associated with kainate-induced