

大承氣湯이 중대뇌동맥 폐쇄 흰쥐의 신경세포 자연사에 미치는 영향

최은빈 · 김연섭*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Effect of Daeseungki-tang on Apoptotic Neuronal Cell Death of MCAO Rats

Eun Bin Choi, Youn Sub Kim*

Department of Anatomy-Pointlogy, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

In Oriental medicine daeseungki-tang is one of the prescription that is used clinically for constipation of paralytics. The objective of the study was to observe the effect of daeseungki-tang on apoptotic neuronal cell death. In the present study, middle cerebral artery occlusion(MCAO) rats were treated with daeseungki-tang for 5 days and the edema percentage of cerebral hemisphere of MCAO rats were investigated primary. Secondary, appearances of Bax, Bcl-2,-factors that is related to apoptotic neuronal cell death - and HSP72 in the brain of MCAO rats were investigated via immunohistochemistry. Daeseungki-tang significantly decreased edema percentage of the cerebral hemisphere of MCAO rats. Daeseungki-tang significantly decreased Bax positive cells, but did not change the appearances of Bcl-2 positive cells in the penumbra of the cerebral cortex and the caudoputamen of MCAO rats. Daeseungki-tang significantly decreased HSP72 positive cells in the penumbra of the cerebral cortex, but not in the caudoputamen of MCAO rats. Based on the present results, it can be suggested that treatment with daeseungki-tang may decrease edema of the cerebral hemisphere and restrain apoptotic neuronal cell death in the penumbra of the cerebral cortex.

Key words : Daeseungki-tang, apoptotic neuronal cell death, Bax, Bcl-2, HSP72

서 론

중풍은 人事不省, 蒙昧, 暴仆, 痰涎壅盛, 牙關緊急, 神志變化, 呼吸障礙, 半身不遂, 偏枯, 言語不利, 暴暗 등의 다양한 임상증상은 물론 頭痛, 眩暈, 便秘, 腹脹, 二便自流 등의 부차적인 증상들을 수반한다.¹⁻³⁾ 중풍환자의 便閉는 大小便秘結하는 中臟證의 증상 중 하나로 陽亢風動, 痰火上搖, 邪熱內積하여 쉽게 大便秘結되고, 腑氣不通이 일어난다.^{4,5)} 중풍의 大便秘結 환자는 通腑瀉下하는 방법으로 신속히 通便시켜야 한다고 하였다.^{6,7)} 중풍환자의 변비에 대하여 大承氣湯,^{8,9)} 涼膈散火湯,¹⁰⁾ 疏風順氣元¹¹⁾ 등을 사용한 임상연구 보고가 있다.

大承氣湯은 陽明腑 實證의 不惡寒反惡熱하고, 潮熱譫語하며, 失氣頻轉, 大便不通한데 사용하는 처방으로,^{12,13)} 瀉熱通便, 瀉熱積滯의 효능이 있는 大黃과 瀉熱, 軟堅潤燥, 通便하는 芒硝, 下

氣除滿하는 厚朴과 破結消痞하는 枳實로 구성되어 있다.^{14,15)} 大便秘結의 종류 중에서 陽明胃實하여 생긴 實閉에 承氣湯을 쓴다고 하였으며,^{5,14)} 김 등은 흰쥐의 뇌허혈 손상에 대하여 유의한 신경방어효과가 있다고 보고한 바도 있다.¹⁶⁾

본 연구에서는 이러한 大承氣湯이 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상에서 나타나는 뇌부종과 신경세포의 자연사에 어떠한 효능을 나타내는지를 관찰하였다. 흰쥐에 중대뇌동맥을 일시적으로 폐쇄하여 뇌경색을 유발한 다음 5일간 大承氣湯을 경구 투여하고 뇌조직의 부종을 측정하였으며, 뇌신경세포의 자연사에 관련된 인자인 Bax와 Bcl-2 및 HSP72의 발현을 면역조직화학 염색을 통하여 관찰한바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 10주령, 약 250g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온

* 교신저자 : 김연섭, 경기 성남시 수정구 복정동 산65 경원대학교 한의과대학
· E-mail : ysk@kyungwon.ac.kr, · Tel : 031-750-5420
· 접수 : 2008/02/14 · 채택 : 2008/03/15

도(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. 약물의 조제 및 투여

본 실험에 사용한 약물은 大承氣湯(Daeseungki-tang, DSK)으로 처방의 내용은 아래와 같다. 약물의 조제는 일반적인 물추출액기스 제조방법에 의하여, 10첩 분량 200 g을 3,000 ml의 물과 함께 냉각기가 장착된 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축 후 동결건조하여 1첩 분량 당 14.4 g의 물추출액기스를 얻었다. 실험동물의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100 g 당 체중비례 계산량의 5배인 120 mg으로 하였다. 약물투여는 뇌경색 유발 3시간 전 1회 및 뇌경색 유발 후 1일 1회 5일간 경구투여 하였다.

Table 1. Herbal Components of Daeseungki-tang(DSK)

| 한약명 | 생약명 | 중량 |
|-------|-------------------------|--------|
| 大黃 | <i>Rhei Rhizoma</i> | 16.0 g |
| 芒硝 | <i>Natrii Sulfas</i> | 8.0 g |
| 厚朴 | <i>Magnoliae Cortex</i> | 8.0 g |
| 枳實 | <i>Ponciri Fructus</i> | 8.0 g |
| total | | 40.0 g |

3. 실험군의 구분

실험군은 뇌허혈을 유발하기 위한 준비수술과정은 시행하였으나 중대뇌동맥을 폐쇄시키지 않은 정상대조군(Sham), 일시적인 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 손상을 유발시킨 대조군(Control) 및 대조군과 동일한 상태에서 大承氣湯 물추출액기스를 5일간 경구투여한 大承氣湯 투여군(Sample)으로 나누었다. 大承氣湯 투여 5일 후에 각각 실험동물을 희생시켜 관련지표들을 관찰하였으며, 각 군 당 실험동물은 8마리씩 배정하였다.

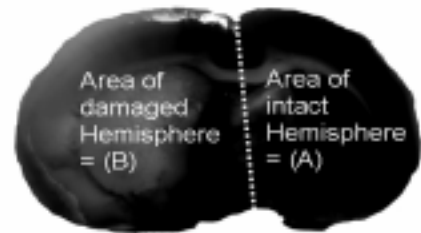
4. 국소뇌허혈의 유발

국소뇌허혈은 총경동맥으로 나일론 수술실을 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부를 폐쇄하는 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 전 과정 동안 37.0±0.5℃로 조절하였다. 전경부의 피부를 절개하고 총경동맥과 외경동맥 및 내경동맥의 분지 부위를 찾아 주위조직을 잘 정리하였다. 외경동맥에 나일론 수술실을 삽입할 수 있도록 입구를 만들고 절단한 다음, 총경동맥의 혈류를 일시적으로 차단한 상태에서, 약 4 cm 길이의 나일론 수술실(40 monofilament, Ethicon, Edinburgh, Scotland)을 내경동맥을 통하여 약 20 mm 까지 천천히 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부가 폐쇄되도록 하였다. 나일론 수술실의 삽입부 끝은 약 0.3 mm 크기로 둥글게 만들었으며, 실험 당일에 0.1% poly-L-lysine으로 코팅하여 사용하였다. 삽입된 나일론 수술실은 혈관과 함께 고정하고, 한쪽 끝은 피부 봉합부위 외부로 약간 노출되도록 한 상태로 전경부의 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다. 혈류의 재개통을 위하여, 폐쇄 2

시간 후에 다시 마취한 상태에서 피부 봉합부위 밖으로 노출된 나일론 수술실을 조심스럽게 당겨내어 혈류를 재개통시키고 곧바로 마취에서 깨어나게 하였다.¹⁷⁾

5. 뇌부종의 측정

실험동물을 pentobarbital sodium 복강주사로 깊게 마취한 다음 단두로 희생시키고, 즉시 뇌를 적출하여 흰쥐용 brain matrix(ASI, USA)를 사용하여 2 mm 두께의 뇌조직 절편으로 만들었다. 뇌조직 절편을 digital camera로 촬영, 저장한 다음 "NIH Image J" software를 사용하여 각각의 뇌 절편으로부터 정중선을 기준으로 손상측과 정상측의 대뇌반구 면적을 측정하고, 정상측 대뇌반구 면적에 대한 손상측 대뇌반구의 면적비율로 계산하였다.¹⁸⁾



Edema percentage (EP, %) = (B/Ax100)

Fig. 1. Calculation of edema percentage from areas of the intact and the damaged cerebral hemispheres.

6. 뇌조직의 면역조직화염색

1) 뇌조직의 처리

실험동물을 pentobarbital sodium 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05 M phosphate buffered saline(PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출한 다음 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 담가 침전시켰다. 다음 뇌를 -40℃의 dry ice-isophentan 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50 μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

2) Bax, Bcl-2 및 HSP72의 염색

실험동물의 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10-15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum(Vectastain)과 bovine serum albumin (Sigma)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 각각 Bax(AB7977, 1:500 dilution, rabbit polyclonal; ABCAM, USA), Bcl-2(SC7382, 1:500 dilution, mouse monoclonal; Santa Cruz Bio, USA) 및 HSP72/73(HSP01, 1:500 dilution, mouse monoclonal; Oncogene, USA)를 사용하였으며, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4℃에서 overnight으로 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immuno-peroxidase의 방법(ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 diaminobenzidine tetrachloride(Sigma, USA)에서 5-10분간 발색 반응시키고, 조직

을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

7. 면역조직화학염색 결과의 관찰

면역조직화학적으로 염색된 Bax, Bcl-2 및 HSP72 발현의 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여, 면역조직화학적으로 염색된 뇌조직의 영상을 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고 "NIH Image J" software를 사용하여, 뇌경색이 유발된 대뇌반구 쪽 대뇌피질의 뇌경색 경계부위(cortex penumbra)와 선조체(caudoputamen)에서 동일한 일정한 면적 내에서 양성반응 신경세포 수를 측정하고 100,000 μm^2 당 세포 수를 계산하였다.

결 과

1. 뇌부종 비율의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군의 뇌부종 비율은 101.9 \pm 2.0%로 좌우 대뇌반구가 차이가 없었다. 중뇌동맥을 폐쇄한 control군은 136.4 \pm 7.0%로 손상측 대뇌반구에 심한 뇌부종이 발생하였다. 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군의 뇌부종 비율은 120.3 \pm 4.1%로 control군에 비하여 약 12% 감소한 유의한(P<0.05) 뇌부종의 감소를 나타내었다(Fig. 2).

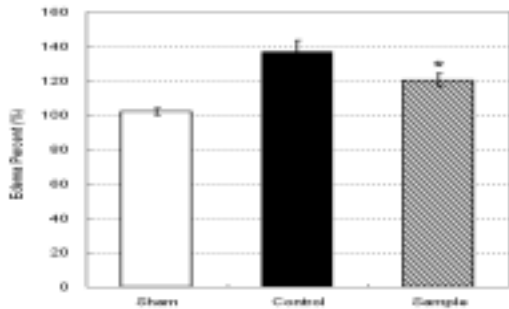


Fig. 2. Changes of edema percentage of the cerebral hemisphere of the MCAO rats. Sample(Daeseungki-tang) group demonstrated significant decrease of edema formation at 5 days after the MCAO, as compared with the control group(*, P<0.05; n=8).

2. Bax 발현의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군의 대뇌피질에서는 2.5 \pm 1.1개, 선조체에서는 1.5 \pm 0.8개의 미약한 Bax 양성반응 신경세포가 관찰되었다. 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 78.8 \pm 6.6개, 선조체에서는 38.1 \pm 6.7개의 매우 뚜렷한 Bax 양성반응 신경세포들이 관찰되었다. 또한 Bax에 강한 양성반응을 나타낸 신경세포들은 모두 그 형태가 위축되어 있는 양상을 나타내었다(Fig. 4-3, arrow heads). 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 38.1 \pm 6.7개의 Bax 양성반응 신경세포가 관찰되어 control군에 비하여 유의성(P<0.05) 있는 감소를 나타내었으며, 세포형태가 위축된 Bax 양성반응 신경세포(Fig. 4, 5, arrow heads)와 함께 비교적 정상적인 형태를 유지하는 Bax 발현이 미약한 신경세포(Fig. 4, 5, arrows)도 다수 관찰되었다. 선조체에서는 24.0 \pm 3.9개의 Bax 양성반응 신경세포들이

관찰되어 역시 control군에 비하여 유의성(P<0.05) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 3, 4).

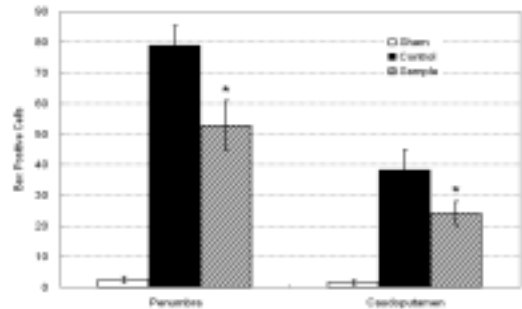


Fig. 3. Changes of Bax positive cells of the MCAO rats. Sample (Daeseungki-tang) group demonstrated significant decrease of Bax positive cells in the penumbra of the cerebral cortex and the caudoputamen as compared with the control group(*, P<0.05; n=8).

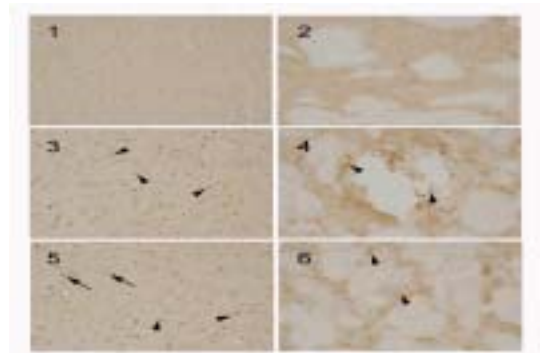


Fig. 4. Representative brain sections of the MCAO rats immuno-labeled against Bax antibody. Sections 1, 3, and 5 are the penumbra of the cerebral cortex and sections 2, 4, 6 are the caudoputamen. Sections 1 and 2 are the sham group. Section 5 and 6(DSK treated sample group) shows significant decrease of immuno-density and number of Bax positive neurons compared to section 3 and 4(MCAO control group).

3. Bcl-2 발현의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군의 대뇌피질에서는 1.4 \pm 0.7개, 선조체에서는 2.1 \pm 0.9개의 미약한 Bcl-2 양성반응 신경세포가 관찰되었다. 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 43.8 \pm 7.7개, 선조체에서는 27.9 \pm 5.2개의 매우 뚜렷한 Bcl-2 양성반응 신경세포들이 관찰되었다. 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 40.3 \pm 5.7개, 선조체에서는 30.3 \pm 4.4개의 Bcl-2 양성반응 신경세포들이 관찰되어 모두에서 control군에 비하여 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 또한 양성반응의 염색 강도에 있어서도 control군과 sample군 사이에 큰 차이점이 없었다(Fig. 5, 6).

4. HSP72 발현의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군의 대뇌피질에서는 0.5 \pm 0.4개, 선조체에서는 0.6 \pm 0.3개의 미약한 HSP72 양성반응 신경세포가 관찰되었다. 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 47.5 \pm 4.1개, 선조체에서는 28.6 \pm 3.3개의 매우 뚜렷한 HSP72 양성반응 신경세포들이 관찰되었다.

또한 전체적으로 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서의 양성반응이 선조체에 비하여 더 강한 반응을 나타내었다. 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 37.8±2.9개의 HSP72 양성반응 신경세포들이 관찰되어 control군에 비하여 유의성(P<0.05) 있는 감소가 관찰되었다. 그러나 선조체에서는 26.5±2.4개의 HSP72 양성반응 신경세포들이 관찰되어 control군에 비하여 유의성 있는 변화를 보이지 못하였으며, 염색 강도 역시 control군과 차이가 없었다(Fig. 7, 8).

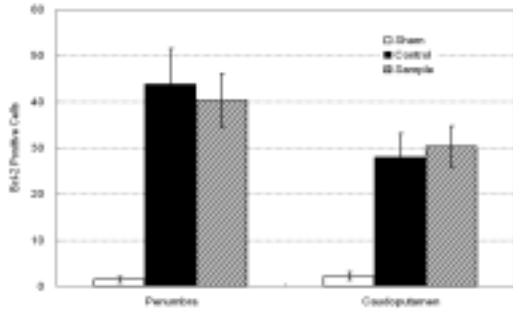


Fig. 5. Changes of Bcl-2 positive cells of the MCAO rats. Sample (Daeseungki-tang) group did not demonstrate changes of Bcl-2 positive cells in the penumbra of the cerebral cortex and the caudoputamen as compared with the control group(*, P<0.05; n=8).

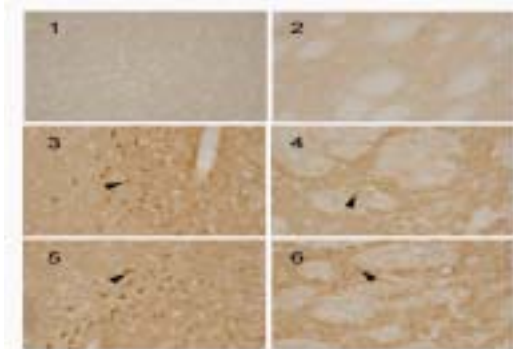


Fig. 6. Representative brain sections of the MCAO rats immunolabeled against Bcl-2 antibody. Sections 1, 3, and 5 are the penumbra of the cerebral cortex and sections 2, 4, 6 are the caudoputamen. Sections 1 and 2 are the sham group. Section 5 and 6(DSK treated sample group) does not show significant changes of immuno-density and number of Bcl-2 positive neurons compared to section 3 and 4(MCAO control group).

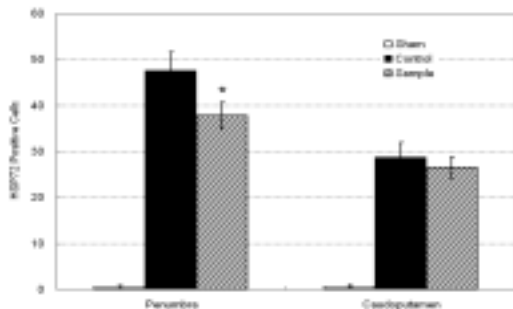


Fig. 7. Changes of HSP72 positive cells of the MCAO rats. Sample(Daeseungki-tang) group demonstrated significant decrease of HSP72 positive cells in the penumbra of the cerebral cortex, but not in the caudoputamen, as compared with the control group(*, P<0.05; n=8).

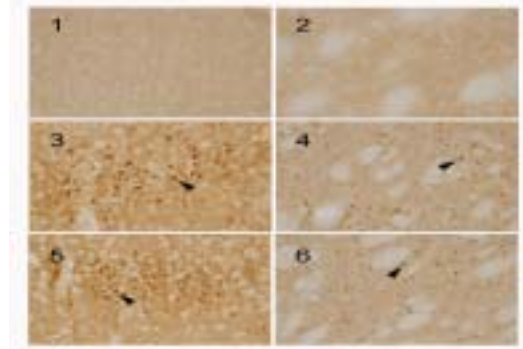


Fig. 8. Representative brain sections of the MCAO rats immunolabeled against HSP72 antibody. Sections 1, 3, and 5 are the penumbra of the cerebral cortex and sections 2, 4, 6 are the caudoputamen. Sections 1 and 2 are the sham group. Section 5(DSK treated sample group) shows significant decrease of HSP72 positive neurons compared to section 3(MCAO control group), but not between sections 6 and 4.

고찰

大承氣湯은 주로 邪氣入裏하여 熱盛傷津하고 實熱과 積滯가 腸胃에 內結된 陽明腑의 實證을 치료하는 傷寒論 처방이다.^{12,13} 이러한 大承氣湯이 중풍환자의 便秘, 煩燥, 不眠은 물론 전반적인 증상을 유의하게 호전시켰다는 임상연구 보고가 있으며,¹⁹ 중풍환자의 변비에 大承氣湯이 미치는 영향,⁸ 大承氣湯 보류관장을 시행하여 중풍 변폐 환자 45명의 임상적 고찰,⁹ 급성기 중풍환자에 있어서 보류관장과 일반관장의 瀉下효과에 대한 비교연구⁷ 등 大承氣湯에 대한 임상연구는 다수 보고된 바 있으며, 暈厥의 뇌허혈 손상에 대하여 유의한 신경방어효과가 있다고 보고된 바도 있다.¹⁶

大承氣湯을 구성하는 한약물 중 하나인 大黃은 清熱攻下, 瀉火解毒, 清熱涼血, 活血祛瘀의 효능이 있으며,¹⁵ 실험적으로 활성산소를 제거하는 superoxide dismutase(SOD) 활성을 증가시킨다고 하였으며,²⁰ 혈청 lipid peroxidase 활성을 감소시키고 유해한 nitric oxide의 제거효능이 강력하므로 항감염, 항염증 작용 및 항산화 효능을 갖는다고 하였다.²¹ 또한 大黃은 매우 우수한 항응혈 활성을 가지고 있다고 보고된 바 있고,²² endotoxin으로 유발된 어혈병태모형에도 유의한 효과를 나타낸다고 하였으며,²³ 총경동맥과 추골동맥의 폐쇄에 의한 전뇌허혈의 동물실험에서 大黃이 신경세포 손상에 대한 방어효과가 있다고 보고된 바 있다.²⁴ 또한 본 교실의 선행연구에서도 대황이 H₂O₂ 및 nitric oxide 손상의 미교세포 BV-2 세포와 뇌해마의 장기양조직배양 연구에서 유의한 항산화 효능과 신경세포손상 보호효능이 있음을 보고한 바도 있다.²⁵ 破氣消積, 化痰消痞하는 효능의 枳實과 行氣燥濕, 消痞除滿하는 효능의 厚朴 역시 유의한 항산화 효능과 항염증 효능을 나타내는 것으로 보고되어 있다.^{15,26,27}

P로, 뇌부종은 중추신경계의 외상, 허혈 및 저산소 등에 여러 가지 원인에 의하여 유발되는 아주 중요한 합병증이다.²⁸ 뇌부종의 진행은 두개강 내압을 증가시켜 뇌를 압박하게 되고, 뇌조직에 혈액 및 산소공급에 장애를 일으키고, 뇌조직을 연화시킴으로써 결과적으로 뇌의 압박에 의한 사망이나 뇌신경세포의 사망을 유발하게 된다.^{29,30} 이러한 뇌부종 발생의 기전에는 뇌혈관

장벽(blood-brain barrier, BBB)의 손상에 의한 혈관과 뇌조직 사이의 수분이동 장애가 가장 큰 원인이다.^{31,32)}

그러므로 일차적으로 大承氣湯이 뇌부종에 어떠한 효능이 있는가를 실험적으로 관찰하였다. 실험 결과, 중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군은 좌우 대뇌반구가 면적에서 큰 차이가 없었으나, 중뇌동맥을 폐쇄한 control군은 손상측 대뇌반구가 정상측 대뇌반구에 비하여 약 136%의 심한 뇌부종이 발생하였다. 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군은 뇌부종 비율이 약 120%로 감소하여 control에 비하여 유의한 뇌부종의 감소 효능을 나타내었다. 이러한 결과는 大承氣湯의 사하작용이 뇌조직의 수분이동 및 BBB 손상에 유의한 효능을 갖는다는 것을 추측하게 한다.

이차적으로 뇌신경세포의 자연사에 관련된 인자인 Bax와 Bcl-2 및 HSP72의 발현을 면역조직화학 염색을 통하여 관찰하였다. Bax는 Bcl-2(B-cell lymphoma 2)와 함께 세포자연사를 조절하는 인자이다. Bax가 과도하게 발현될 경우 mitochondria로부터 cytochrome C를 분비하게 하여 세포가 자연사 과정을 일으키게 한다는 것은 잘 알려진 사실이다.^{33,34)} 특히 뇌허혈과 같은 다양한 세포 외부로부터의 유해자극에 대하여 신경세포의 손상 가능성 여부를 결정하거나, 자연사가 일어나는 신경세포에서 장차 신경세포가 사망할 것이라는 것을 판별할 수 있는 중요한 지표로 사용되고 있다.³⁵⁾ 본 연구에서는 대뇌피질 뇌경색의 경계부위(penumbra)와 선조체(caudoputamen)에서 Bax 양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정할 때, 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체에서 강한 Bax 양성반응 신경세포들이 현저히 증가하였으며, Bax에 강한 양성반응을 나타낸 신경세포들은 모두 그 형태가 위축되어 있는 양상을 나타내었다. 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체 모두에서 control군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었으며, 세포 형태가 위축된 Bax 양성반응 신경세포와 함께 비교적 정상적인 형태를 유지하는 Bax 발현이 미약한 신경세포도 다수 관찰되었다. 그러나 大承氣湯 투여는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체 모두에서 Bcl-2 발현에는 유의한 영향을 미치지 못하였다. Bax 발현의 증가와 Bcl-2 발현의 감소가 신경세포 자연사를 촉진하고, Bax 발현의 억제와 Bcl-2 발현의 증가가 신경세포의 자연사를 억제할 수 있는 유의한 기전이 되지만, 또한 Bax 발현과 Bcl-2 발현의 상대적인 비율이 중요하게 작용한다³⁶⁾는 점을 감안할 때 위와 같은 大承氣湯의 Bax 발현 억제 효능은 의미가 있는 결과로 생각된다.

Heat-shock protein(HSP)은 스트레스유발 단백질(stress-induced proteins)의 일종으로, heat-shock gene은 열충격이나 허혈 또는 각종 스트레스 등 변성단백질을 생산하는 모든 스트레스에 대한 반응으로 그 발현이 증가된다.³⁷⁾ HSP family에는 그 분자량에 의하여 명칭이 붙여진 HSP10, HSP27, HSP60, HSP70(or HSP72) HSP90 등과 ubiquitin 등이 존재한다. HSP72는 HSP70으로도 불리며, 모든 살아있는 세포에서 발견되는 가장 대표적인 inducible HSP이다. HSP72는 열, 중금속, 독소, 허혈 등 여러 스트레스에

대한 반응으로 합성된다.^{37,38)} 국소뇌허혈 후 뇌혈류량이 매우 낮은 부위를 제외한 모든 허혈세포에서 HSP72 mRNA가 발현되었다고 보고되어 있으며, 뇌경색 바깥영역에서의 HSP72 발현은 뇌허혈의 penumbra를 규정하거나 뇌허혈영역 중에서 단백질변성구역(zone of protein denaturation)을 결정하는 지표로 사용된다.^{39,40)} 본 실험의 결과, 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위와 선조체에서 매우 뚜렷한 HSP72 양성반응 신경세포들의 증가가 관찰되었다. 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 control군에 비하여 유의성 있는 감소가 관찰되었다. 이러한 결과는 大承氣湯이 뇌경색의 경계영역을 감소시키는 효능이 있음을 추측하게 한다.

본 연구의 결과들을 총괄적으로 살펴보면, 大承氣湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 뇌부종 형성을 억제하며, 신경세포의 자연사를 억제하고 뇌경색 손상의 확대를 억제하는 효능이 있을 것으로 생각된다. 이러한 결과들은 大承氣湯의 사하작용이 뇌경색에 유의하게 작용할 수 있음을 추측하게 하는 매우 기초적인 자료이며, 보다 더 구체적인 실험연구를 수행할 기본 자료가 된다고 생각한다.

결 론

大承氣湯이 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상에서 나타나는 뇌부종과 신경세포의 자연사에 어떠한 효능을 나타내는지 관찰하기 위해서 환류에 중대뇌동맥을 일시적으로 폐쇄하여 뇌경색을 유발한 다음 5일간 大承氣湯을 경구투여하고 뇌조직의 부종을 측정하였으며, 뇌신경세포의 자연사에 관련된 인자인 Bax와 Bcl-2 및 HSP72의 발현을 면역조직화학 염색을 통하여 관찰한 바 아래와 같은 결과들을 얻었다.

大承氣湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌부종 형성을 유의하게 억제하였다. 大承氣湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 대뇌피질 뇌경색 경계구역과 선조체에서 Bax 발현을 유의하게 억제하였으나, Bcl-2 발현에 영향을 미치지 못하였다. 大承氣湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 대뇌피질 뇌경색 경계구역의 HSP72 발현을 유의하게 억제하였으나 선조체의 HSP72 발현에는 영향을 미치지 못하였다.

이상의 결과를 보아, 大承氣湯은 뇌부종을 감소시키고 대뇌피질 뇌경색 경계영역에서 신경세포 자연사를 억제하는 작용이 있는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 김영석. 임상중풍학. 서울, 서원당, pp 311-312, 349-350, 432-436, 1997.
2. 손동혁, 장인수, 유경숙, 이진구, 윤희석, 이영구, 강현철. 급성기 뇌조중환자에 대한 임상적 고찰. 대한한방내과학회지 21(2):203-212, 2000.
3. 서운교, 정지천, 이원철. 노인 뇌졸중에 대한 임상적 고찰. 대

- 한한방내과학회지 14(2):50-68, 1993.
4. 임성우. 중풍환자의 변비증에 관한 임상적 고찰. 대한정보학회지 3(1):7-11, 1997.
 5. 강제춘. 변비에 관한 문헌적 고찰(원인, 종류, 치법, 지방을 중심으로). 대한한방내과학회지 15(2):165-173, 1994.
 6. 이원철. 뇌졸중 급성기에 응용되는 하법에 대한 연구. 대한한의학회지 19(1):385-390, 1998.
 7. 손동혁, 조기호, 김영석, 배형섭, 이경섭, 이영구. 급성기 중풍 환자에 있어서 보류관장과 일반관장의 사후효과에 대한 비교연구 대한한의학회지 22(3):51-62, 2001.
 8. 구본수, 김영석, 이대식, 문상관, 고창남, 조기호, 배형섭, 이경섭. 중풍환자의 변비에 대한 대승기탕의 임상적 연구. 대한한의학회지 21(2):3-13, 2000.
 9. 강영록, 김연진, 황치원. 대승기탕 보류관장을 시행한 중풍 변폐 환자 45례에 대한 임상적 고찰. 대한한방내과학회지 21(2):329-336, 2000.
 10. 김상진, 김민수, 서부일, 구덕모, 서해경, 안희덕. 중풍으로 유발된 배뇨·배변 장애에 양격산화당을 위주로 한 치험1례. 본초학회지 18(3):1-8, 2003.
 11. 정재욱, 서상호, 이은형, 김종득, 홍수현, 김원일. 중풍환자의 변비에 대한 소풍순기원의 효능에 관한 고찰 대한한방내과학회지 26(4):776-784, 2005.
 12. 장중경. 채인식 편역. 상한론역전. 서울, 고문사, p 360, 1984.
 13. 이병주, 김동희, 김성훈. 傷寒論中 承氣湯類에 관한 研究. 大田大學校韓醫學研究所論文集, 8(1):205-221, 1999.
 14. 蔡炳允. 傷寒論 陽明病에 있어서 承氣湯證에 관한 研究. 외관과학회지 6(1):71, 1993.
 15. 김호철. 한약약리학. 서울, 집문당, pp 174-177, 211-213, 270-271, 2001.
 16. 김준석, 안덕균, 김영석. 대승기탕의 4-VO로 유발한 흰쥐 뇌허혈에 대한 신경방어효과. 大韓本草學會誌 14(1):131-138, 1999.
 17. Zea Longa, E.L., Weinstein, P.R., Carlson, S, Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 20: 84-91, 1989.
 18. Shimamura, N., Matchett, G., Yatsushige, H., Calvert, J.W., Ohkuma, H., Zhang, J. Inhibition of integrin alphavbeta3 ameliorates focal cerebral ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. Stroke. 37(7):1902-1909, 2006.
 19. 오중환, 김봉석, 임희용, 최빈혜, 김대준, 전연이, 조종관, 변준석. 大承氣湯투여 후 便閉, 煩燥, 不眠 호전된 중풍 환자 치험 1례. 대한한방내과학회지 25(2):307-313, 2004.
 20. 'linical study on compound da huang(radix et rhizoma rhei) preparations for improvement od senile persons' memory ability. J Tradit Chin Med, 17(3):168-173, 1997.
 21. Yokozawa, T., Chen, C.P., Tanaka, T. Direct scavenging of nitric oxide by traditional crude drugs. Phytomedicine, 6(6):453-463, 2000.
 22. 육창수. 어혈에 사용되는 생약(大黃, 三稜)의 항응혈 활성. 경회약대논문집, 20: 59-62, 1992.
 23. 김도완, 박창국. 전탕시간에 따른 생대황(生大黃) 및 주대황(酒大黃)이 어혈병태모형에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 19(1):114-133, 1998.
 24. 안덕균, 원도희, 김종호. 4-vessel occlusion으로 유발한 흰쥐 전뇌허혈의 신경세포 손상에 대한 대황의 방어효과. 대한본초학회지 14(1):111-120, 1999.
 25. 명성하, 김연섭. 대황의 항산화와 신경세포손상 보호효능에 대한 연구. 동의생리병리학회지 19(3):647-655, 2005.
 26. Na, H.J., Jeong, H.J., Hwang, W.J., Cho, K.H., Kim, H.M. Effect of Poncirus fructus on stem cell factor-induced mast cell migration. Pharmacol Res. 48(3):267-271, 2003.
 27. Tang, S.Y., Whiteman, M., Peng, Z.F., Jenner, A., Yong, E.L., Halliwell, B. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional chinese medicines. Free Radic Biol Med. 36(12):1575-1587, 2004.
 28. Unterberg, A.W., Stover, J., Kress, B., Kiening, K.L. Edema and brain trauma. Neuroscience. 29(4):1021-1029, 2004.
 29. Sharma, H.S., Westman, J., Nyberg, F. Pathophysiology of brain edema and cell changes following hyperthermic brain injury. Prog Brain Res. 115: 351-412, 1998.
 30. Sahuquillo, J., Poca, M.A., Amoros, S. Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. Curr Pharm Des. 7(15):1475-1503, 2001.
 31. Abbott, N.J., Ronnback, L., Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nature Rev. 7: 41-53, 2006.
 32. Huber, J.D., Egleton, R.D., Davis, T.P. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood - rain barrier. Trends Neurosci. 24: 719-725, 2001.
 33. Nicholson, D.W. Mechanisms of apoptotic control. Nature. 407: 810-816, 2000.
 34. Gillardon, F., Wickert, H., Zimmermann, M. Up-regulation of Bax and down- regulation of Bcl-2 is associated with NLet. 192: 85-88, 1995.
 35. 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.
 36. Brambrink, A.M., Schneider, A., Noga, H., Astheimer, A., Gotz, B., Korner, I., Heimann, A., Welschof, M., Kempfski, O. Tolerance-Inducing dose of 3-nitropropionic acid modulates bcl-2 and bax balance in the rat brain: a potential mechanism of chemical preconditioning. J Cereb Blood Flow Metab. 20(10):1425-1436, 2000.
 37. Welch, W.J. Heat shock proteins functioning as molecular

- chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 339: 327-333, 1993.
38. Abe, K., Lee, T.H., Aoki, M., Nitta, Y., Ioyama, S. Preferential expression of HSC70 heat shock mRNA in gerbil heart after transient brain ischemia, *J Mol Cell Cardiol.* 25: 1131-1135, 1993.
39. Hossmann, K.A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol.* 36: 557-565, 1994.
40. Kinouchi, H., Sharp, F.R., Koistinaho, J., Hicks, K., Kamii, H., Chan, P.H. Induction of heat shock hsp70 mRNA and HSP70 kDa protein in neurons in the 'penumbra' following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 619: 334-338, 1993.