

大承氣湯의 사하작용이 중대뇌동맥 폐쇄 흰쥐의 뇌경색에 미치는 영향

이규식, 김연섭*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Effects of *Daeseungkitang* on Cerebral Infarct of MCAO Rats

Kyu-sik Lee, Youn-sub Kim

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

ABSTRACT

Object : This study evaluated the effects of *Daeseungkitang*(DSK) on cerebral infarct of middle cerebral artery occlusion(MCAO).

Method : Sprague-Dawley rats are used for observing to induce cerebral infarction closing its middle cerebral artery temporarily and take DSK by mouth the next 5 days, observe the amount of feces and urine. It is investigated the correlation between them after examining neurological score.

Results : It is resulted the below. On the 2nd day of taking DSK, the total amount of feces of the cerebral infarct rats is increased significantly. After taking DSK, the urine volume of the cerebral infarct rats does not change at all. Taking DSK significantly improves neurological score of the cerebral infarct rats. There is a significant correlation between total amount of feces of the cerebral infarct rats and neurological score, otherwise there is no significant correlation between total amount of feces and neurological score which is taken DSK. By taking DSK, the volume of cerebral infarction does not decrease significantly. Taking DSK restrains the expression of iNOS in the cerebral cortex and striatum of the cerebral infarct rats. Taking DSK restrains the expression of MMP-9 in the cerebral cortex of the cerebral infarct rats. Taking DSK restrains the edema of astrocytes of the positive reaction of GFAP in the cerebral cortex of the cerebral infarct rats.

Conclusion : According to above results, *Daeseungkitang*(DSK) is assumed that showing reaction of protecting neuron cell by restraint brain tissue edema thorough controlling water balance.

Key words : *Daeseungkitang*, MCAO, iNOS, MMP-9, GFAP

서론

중풍은 뇌혈관의 폐쇄나 파열에 의한 급박한 의식장애와 운동장애 및 감각장애를 동반하는 중추신경계 질환으로서 뇌경색, 뇌출혈, 일과성 뇌허혈 발작, 고혈압성 뇌증 등이 여기에 속한다.^{1,2)} 중풍은 人事不省, 蒙昧, 暴仆, 痰涎壅盛, 牙關緊急, 神志變化, 呼吸障碍, 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.^{1,3,4)}

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 일어난다고 하였으며,^{5,6)} 중풍의 大便秘結 환자는 通腑瀉下하는 방법으로 신속히 通便시켜야 한다고 하였다.^{7,8)} 중풍환자의 변비에 대하여 大承氣湯,^{9,10)} 涼膈散火湯,¹¹⁾ 疏風順氣元¹²⁾ 등을 사용한 임상연구 보고는 있었으나 실험적 연구는 매우 드물다.

大承氣湯은 大熱, 大實, 大滿하여 급히 瀉下시켜야 하는 경우에 사용하는 처방으로 大黃, 芒硝, 厚朴, 枳實의 네 가지 약물로 구성되어 있으며, 泄熱, 通便, 除滿, 除하는 효능이 있어 주로 胃腑實證으로 인한 증상에 응용할 수 있다 하였다.^{13,14)} 또한 중풍에 발현되기 쉬운 大便不通의 종류를 實閉, 虛閉, 熱閉, 冷閉로 구분하고,^{5,6)} 그 중에서 陽明胃實하여 생긴 實閉

*교신저자 : 김연섭. 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실학.
이 연구는 2011년도 경원대학교 지원(2011-R243)에 의한 결과임.”
· Tel : 031-750-5420. · E-mail : ysk5708@hanmail.net.
· 접수 : 2011년 8월 13일 · 수정 : 2011년 9월 3일 · 채택 : 2011년 9월 17일

에는 承氣湯을 쓴다고 하였다.¹⁵⁾ 김 등은 흰쥐의 뇌허혈 손상에 대하여 유의한 신경방어효과가 있다고 보고한 바도 있다.¹⁶⁾

본 연구에서는 이러한 大承氣湯의 瀉下작용이 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상에 어떠한 효능을 나타내는지 관찰하였다. 흰쥐에 중대뇌동맥을 일시적으로 폐쇄하여 뇌경색을 유발한 다음 5일간 大承氣湯을 경구투여하면서 배변량과 소변량의 변화를 관찰하였으며, neurological score를 측정하고 이들 간의 상관관계를 조사하였다. 또한 뇌경색 면적에 미치는 영향을 관찰하였으며, 뇌혈관장벽 (blood-brain barrier, BBB)의 구성과 작용에 영향하여 뇌조직의 수분이동과 허혈손상 및 뇌부종 생성에 관여하는 인자인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), 성장아교세포 maker인 GFAP의 발현을 면역조직화학적 방법으로 관찰한바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

실험방법

1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 10주령, 약 250g 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.

2. 약물의 조제 및 투여

본 실험에 사용한 약물은 大承氣湯 (Daeseungkitang, DSK)으로 처방의 내용은 아래와 같다. 약물의 조제는 일반적인 물추출 엑기스 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 물추출엑기스를 얻었다. 실험동물의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100g 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 Daeseungkitang (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

물추출엑기스를 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 (4-0 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 2시간 후에 다시 마취한 상태에서 피부 봉합부위 밖으로 노출된 나일론 수술실을 조심스럽게 당겨내어 혈류를 재개통시키고 곧바로 마취에서 깨어나게 하였다.¹⁷⁾

5. 배변량 및 소변량의 측정

소변과 대변의 수집은 실험동물들을 개별 cage에 한 마리씩 옮겨서 일정시간 간격으로 수집하였다. 각각의 개별 cage 바닥에 높이 1-2 cm 정도의 공간을 남겨둔 채 미세한 구멍이 뚫려있는 스티로폼 막을 위치시키고 일정시간동안 배변상태를 관찰한 후, 정해진 시각에 흰쥐를 다른 cage로 옮기고 대변을 포함한 스티로폼 막의 중량을 측정한 다음 미리 알고 있는 스티로폼 막의 원중량을 뺀 값으로 배출 배변량을 계산하였다. 소변량은 스티로폼 막 아래 공간에 모아진 소변을 원심분리하여 고형물을 제거하고 용량을 측정하였다.

6. Neurological score의 측정

신경학적 행동증상의 측정은 중대뇌동맥 폐쇄 후 1일 및 5일에 시행하였다. 측정방법과 점수는 아래의 표와 같이 하였다.¹⁸⁾

Score	Evaluation
0	명확히 관찰할 수 있는 결함이 없음
1	꼬리를 들었을 때 반대쪽 앞다리를 굴곡시킴
2	꼬리를 당겼을 때 반대쪽 앞다리의 악력이 감소함
3	꼬리를 당겼을 때만 반대 방향 원형돌기를 나타냄
4	지속적인 반대방향 원형돌기를 나타냄

7. 뇌경색 체적의 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 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)로 염색하고,¹⁹⁾ digital camera로 촬영한 다음 “NIH Image J” software를 사용하여 각 절편으로부터 뇌경색 면적을 측정하고, 측정값으로부터 총체적을 계산하였다.

8. 뇌조직의 면역조직화학염색

1) 뇌조직의 처리

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

2) iNOS, MMP-9 및 GFAP의 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 iNOS (610329, 1:500 dilution, mouse monoclonal; BD Bioscience, USA), MMP-9 (AB7299, 1:500 dilution, rabbit polyclonal, ABCAM, USA), GFAP (G3893, 1:500 dilution, mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였으며, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 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, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

9. 면역조직화학염색 결과의 관찰

면역조직화학적으로 염색된 iNOS, MMP-9 및 GFAP 발현의 변화는 CCD카메라가 장착된 광학현미경을 사용하여 뇌조직의 영상을 컴퓨터에 저장하여 관찰하였다.

실험성적

1. 배변량의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군은 실험개시 후 날짜 경과에 따라 2.9±0.2, 2.7±0.2, 3.2±0.2, 2.9±0.3 및 2.9±0.4 g/day 이었고, 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 중대뇌동맥 폐쇄 후 날짜 경과에 따라 1.5±0.2, 0.9±0.1, 1.1±0.3, 1.7±0.4 및 1.7±0.4 g/day로 sham군에 비하여 전체적으로 대변배출량이 감소하였으며, 특히 중대뇌동맥 폐쇄 3일째까지는 심한 배변량의 감소를 나타내었다. 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군은 날짜 경과에 따라 1.8±0.3, 2.3±0.2, 3.4±0.5, 3.7±0.5 및 4.0±0.4 g/day로 control군에 비하여 투여 2일째부터 유의한 (P<0.01, P<0.001) 배변량의 증가를 나타내었으며, 4일째와 5일째에는 sham군보다도 더 많은 배변량을 나타내었다 (Fig. 1). 5일간의 배변총량은 sham군은 14.6±0.5 g, control군은 6.8±1.1 g으로 현저히 감소하였으며, sample군은 15.1±0.9 g으로 control군에 비하여 현저히 (P<0.001) 증가하였다 (Fig. 2).

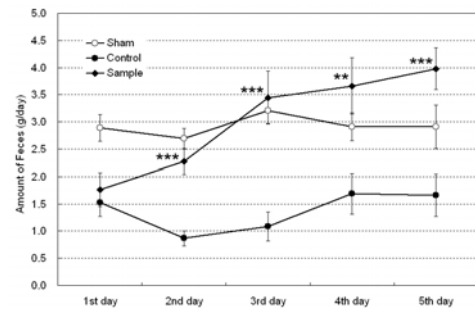


Fig. 1. Changes of the amount of feces of the MCAO rats. Sample (*Daeseungkitang*) group demonstrated significant increase of the amount of feces, from 2nd day after the MCAO, as compared with the control group (**, P<0.01; ***, P<0.001, n=8).

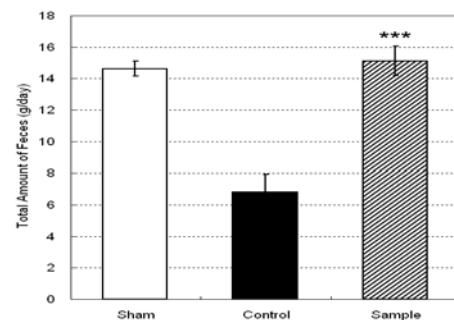


Fig. 2. Total amount of feces of the MCAO rats. Sample group demonstrated significant increase of total amount of feces as compared with the control group (***, P<0.001, n=8).

2. 소변량의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군은 실험개시 후 날짜 경과에 따라 5.9±0.9, 5.3±0.6, 6.3±0.7, 6.3±0.6 및 5.8±0.8 ml/day 이었고, 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 중대뇌동맥 폐쇄 후 날짜 경과에 따라 3.1±0.5, 2.8±0.4, 2.6±0.4, 4.3±1.0 및 4.0±1.0 ml/day로 sham군에 비하여 전체적으로 소변배출량이 감소하였다. 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군은 날짜 경과에 따라 3.6±1.0, 3.2±0.6, 4.3±0.9, 5.1±0.9 및 4.9±0.6

ml/day로 control군에 비하여 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 3). 5일간의 소변총량은 sham군은 29.5 ± 2.7 ml, control군은 16.8 ± 2.8 ml로 감소하였으며, sample군은 21.0 ± 1.9 ml로 control군에 비하여 증가는 하였으나 역시 통계적 유의성은 없었다.

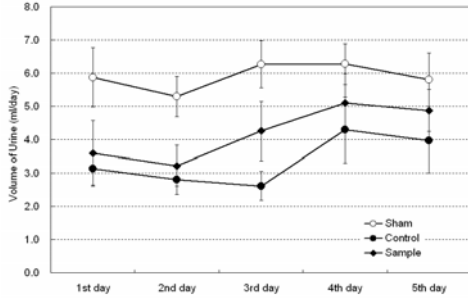


Fig. 3. Changes of the urine volume of the MCAO rats. Sample group was not different from the control group statistically.

3. Neurological score의 변화

신경학적 행동증상 성적은 sham군은 1일에만 0.3 ± 0.2 를 나타내어 수술 후유증을 나타내었으나 5일에서는 완전히 정상을 나타내었다. Control군은 1일에 2.9 ± 0.1 , 5일에 2.0 ± 0.3 를 나타내었고, sample군은 1일에 2.8 ± 0.2 , 5일에는 1.3 ± 0.3 를 나타내어 control군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 신경학적 행동증상의 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

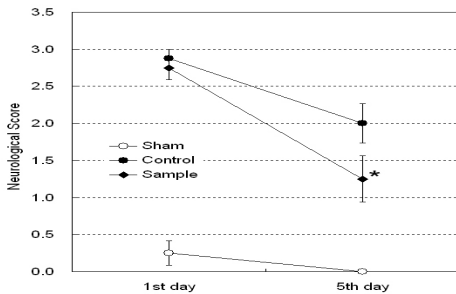


Fig. 4. Change of neurological score of the MCAO rats. Sample group demonstrated significant decrease of neurological score at 5th day after the MCAO and the treatment (*, $P < 0.05$, $n=8$).

4. 총배변량과 Neurological score와의 상관관계

중대뇌동맥 폐쇄에 의하여 뇌경색이 유발된 control군에서 개별 실험동물 각각의 총배변량과 neurological score와의 상관관계를 검증한바 상관계수가 0.9279로 $P < 0.01$ 이상의 상관관계가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 또한 control군과 sample군 각각 실험동물의 총배변량을 neurological score별로 평균을 계산한 결과, control군은 neurological score가 0점인 개체는 없었고, 1점인 개체들은 10.5 g/day, 2점인 개체들은 7.2 ± 0.5 g/day, 3점인 개체들은 2.4 ± 0.2 g/day 이었으며, sample군은 0점인 개체들은 14.9 ± 1.2 g/day, 1점인 개체들은 18.7 ± 0.5 g/day, 2점인 개체들은 13.4 ± 1.8 g/day 이었고 3점인 개체는 없었다. 이는 neurological score에 상관없이 총배변량이 증가한 것을 보

여주며, sample군에서 neurological score와 총배변량 사이의 상관관계를 검증한 결과 유의성이 없었다 (Fig. 6).

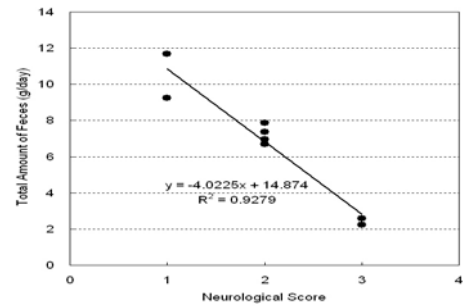


Fig. 5. Correlation between neurological score and total amount of feces of the MCAO rats. There was a significant correlation ($R^2=0.9279$, $P < 0.001$, $n=8$).

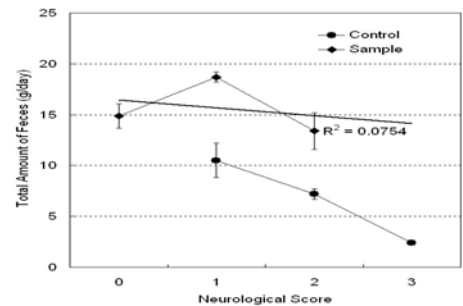


Fig. 6. Correlation between neurological score and total amount of feces of the sample group and the control MCAO rats. There was not a significant correlation in the sample group ($R^2=0.0754$, $P > 0.05$, $n=8$).

5. 뇌경색 체적의 변화

뇌조직을 TTC로 염색하여 뇌경색 체적을 측정된 결과 sham군은 정상이었고, control군은 248.5 ± 32.5 mm³ 이었으며, sample군은 192.3 ± 24.8 mm³으로 control군에 비하여 뇌경색 체적이 22.6% 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 7).

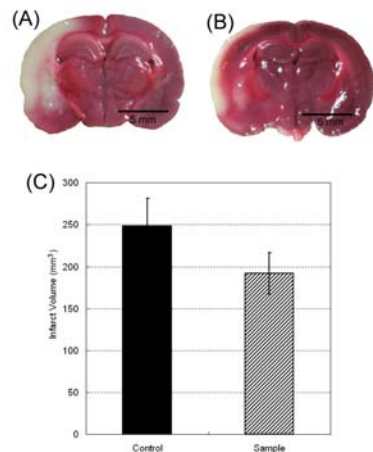


Fig. 7. Change of the infarct volume of the MCAO rats. The representative TTC-stained brain section of the control group (A) and the sample group (B). Infarct volume of the sample group was not different from the control group statistically (C, $n=8$).

6. iNOS 발현의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군에서는 실험동물에 따라 대뇌피질과 선조체에서 미약한 iNOS의 발현을 나타내는 개체들이 있었다 (Fig. 8-1, 2). 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 매우 뚜렷한 iNOS 양성반응의 신경세포들이 많이 관찰되었으며 (Fig. 8-3), 선조체에서도 iNOS 발현이 확연하게 관찰되었다 (Fig. 8-4). 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 iNOS 양성반응 신경세포들의 수가 control군에 비하여 감소하는 것은 물론 발현 강도 또한 감소되었다 (Fig. 8-5). 그러나 선조체에서는 iNOS 발현 세포들의 수는 감소하였으나 발현 강도는 control군과 비교하여 큰 변화가 없었다 (Fig. 8-6).

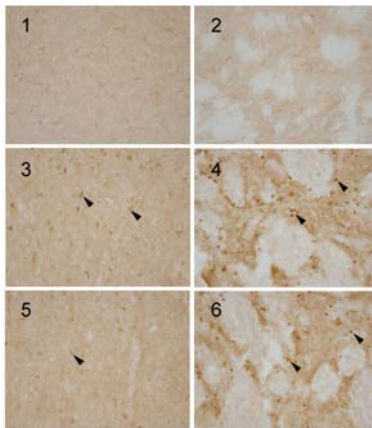


Fig. 8. Representative brain sections of the MCAO rats immunolabeled against iNOS antibody. Sections 1, 3, and 5 are the penumbra of the cerebral cortex and sections 2, 4, 6 are the caudoputamen. Sections 1 and 2 are the sham group. Section 5 (DSK treated sample group) shows significant decrease of immuno-density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

7. MMP-9 발현의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군에서는 대뇌피질과 선조체 모두에서 MMP-9 발현이 관찰되지 않았다 (Fig. 9-1). 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 매우 뚜렷한 MMP-9 양성반응의 신경세포들이 많이 관찰되었으며, 일부 모세혈관벽 주위에서도 양성반응이 관찰되었다 (Fig. 9-2). 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 MMP-9 양성반응 신경세포들의 수가 확연히 감소하였다. 그러나 모세혈관벽 주위에서의 발현은 control군에 비하여 감소하지 않는 특징을 나타내었다 (Fig. 9-3).

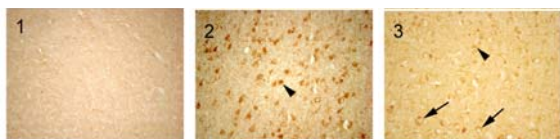


Fig. 9. Representative brain sections of the MCAO rats immunolabeled against MMP-9 antibody. Sections 1 is the penumbra of the cerebral cortex of the sham group. Section 3 (DSK treated sample group) shows significant decrease of immuno-density and number of MMP-9-positive neurons compared to section 2 (MCAO control group), but MMP-9-positive reactions around the microvessels are not reduced significantly.

7. 정상아교세포 GFAP 발현의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군에서는 대뇌피질에서 GFAP에 양성반응을 나타낸 정상아교세포들이 다수 관찰되었다 (Fig. 10-1). 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 GFAP에 양성반응을 나타낸 정상아교세포의 수는 큰 변화가 없으나 세포체가 더 커지고 돌기들이 더 확실하게 관찰되는 부종의 양상을 나타내었다. 특히 모세혈관 주위에 분포한 endfeet들이 잘 관찰되었다 (Fig. 10-2). 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 역시 GFAP에 양성반응을 나타낸 정상아교세포의 수는 큰 변화가 없으나, control군에 비하여 세포체의 크기가 다시 감소하고 돌기들 또한 그 굵기가 감소하였다 (Fig. 10-3).

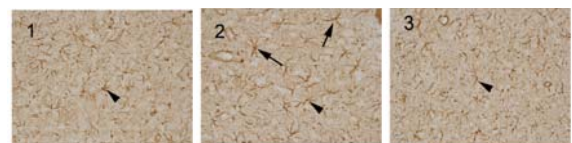


Fig. 10. Representative brain sections of the MCAO rats immunolabeled against GFAP antibody. Sections 1 (sham group) shows several GFAP-positive astrocytes in the penumbra of the cerebral cortex. Section 2 (MCAO control group) shows swelling of the cell bodies and processes of astrocytes compared to section 1. Section 3 (DSK treated sample group) shows significant decrease of astrocyte swelling compared to section 2.

고찰

중풍환자는 大便秘結과 腑氣不通이 주로 나타나며, 陽亢風動, 痰火上搖, 邪熱內積하여 쉽게 大便秘結이 유발된다고 하였다.^{1,5,6)} 서양의학에서도 뇌졸중환자의 변비에 대해 요실금 및 배변실조는 초기의 뇌졸중 중증도와 밀접한 관련이 있다는 보고가 있으며,²⁰⁾ 한의학에서는 중풍환자의 변비에 대해서 보다 큰 의미를 두고 있다.⁵⁻⁷⁾ 특히 중풍환자의 변비에 大承氣湯이 미치는 영향,⁹⁾ 大承氣湯 보류관장을 시행하여 중풍 변폐 환자 45명의 임상적 고찰,¹⁰⁾ 급성기 중풍환자에 있어서 보류관장과 일반관장의 瀉下효과에 대한 비교연구³⁾ 등 大承氣湯이나 사하요법에 대한 임상연구가 다수 보고된바 있으며, 흰쥐의 뇌허혈 손상에 대하여 유의한 신경방어효과가 있다고 보고된 바도 있다.¹⁶⁾

大承氣湯은 주로 邪氣入裏하여 熱盛傷津하고 實證과 積滯가 腸胃에 內結된 陽明腑의 實證을 치료하는 傷寒論 처방이다.^{13,14)} 또한 大承氣湯을 구성하는 한약물 중 大黃은 清熱攻下, 瀉火解毒, 清熱涼血, 活血祛瘀의 효능이 있으며,²¹⁾ 실험적으로 각종 병리적인 상태의 원인이 되는 활성산소를 제거하는 superoxide dismutase (SOD) 활성을 증가시킨다고 하였으

며,²²⁾ 혈청 lipid peroxidase 활성을 감소시키고 유해한 nitric oxide의 제거효능이 강력하므로 항감염, 항염증 작용 및 항산화 효능을 갖는다고 하였다.²³⁾ 또한 大黃은 매우 우수한 항응혈 활성을 가지고 있다고 보고된 바 있고,²⁴⁾ endotoxin으로 유발된 어혈병태모형에도 유의한 효과를 나타낸다고 하였으며,²⁵⁾ 중경동맥과 추골동맥의 폐쇄에 의한 전뇌 허혈의 동물실험에서 大黃이 신경세포 손상에 대한 방어효과가 있다고 보고된바 있다.²⁶⁾ 또한 본 교실의 선행연구에서도 大黃이 H₂O₂ 및 nitric oxide 손상의 미교세포 BV-2 세포와 뇌해마의 장기양조직배양 연구에서 유의한 항산화 효능과 신경세포손상 보호효능이 있음을 보고한 바도 있다.²⁷⁾ 또한 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.^{21,28,29)}

본 연구에서는 이러한 大承氣湯의 사하작용이 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상에 미치는 효능을 관찰하고자 하였다. 일차적으로 중대뇌동맥을 폐쇄하여 뇌경색을 유발한 실험 동물에서도 배변량의 감소가 일어나는지를 관찰하고 이에 대한 大承氣湯의 영향과 뇌경색이 유발된 실험동물이 나타내는 신경학적 행동증상과 배변량 사이에 상관관계가 있는지를 관찰하였다.

중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 중대뇌동맥 폐쇄 후 날짜 경과에 따라 전체적으로 대변배출량이 감소하였으며, 특히 중대뇌동맥 폐쇄 3일째까지는 심한 배변량의 감소를 나타내었다. 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군은 control군에 비하여 투여 2일째부터 유의한 배변량의 증가를 나타내었으며, 4일째와 5일째에는 sham군보다도 더 많은 배변량을 나타내었다. 소변량은 중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군에 비하여 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군과 여기에 大承氣湯을 투여한 군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는 중대뇌동맥을 폐쇄하여 뇌경색을 유발한 실험동물에서도 유의한 배변량의 감소가 일어난다는 것과 이에 대하여 大承氣湯이 유의한 효능을 나타낸다는 것을 보여준다. 하지만 중대뇌동맥을 폐쇄한 실험동물에서 나타나는 배변량의 감소가 반드시 한의학에서 설명하는 중풍 환자에서 변폐가 발생하는 기전과는 동일하지는 않을 것으로 생각되며, 이에 대해서는 보다 더 구체적인 연구관찰이 필요할 것으로 생각된다.

신경학적 행동증상 성적을 측정한 결과, 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군은 5일째에서 control군에 비하여 유의성 있는 신경학적 행동증상의 개선을 나타내었다. 또한 각각의 개별 실험동물에서 이러한 신경학적 행동증상과 총배변량의 상관성을 검증한 바, 중대뇌동맥 폐쇄에 의하여 뇌경색이 유발된 control군에서는 총배변량이 많은 개체에서 신경학적 행동증상들이 보다 더 개선된 점수를 나타내는 유의한 상관관계가 있었다. 그러나 大承氣湯을 투여한 군에서는 이러한 상관관계가 검증되지 않았다. 이러한 결과는 大承氣湯의 사하작용이 체내 수분대사에 강력하게 영향을 미치고 있다는 것과 한편으로는 이러한 大承氣湯의 사하작용이 직접적으로 뇌신경손상에 영향을 미치는 것이 아니라 뇌허혈 손상시 나타나는 뇌조직에서의 수분대사나 뇌혈관장벽 (Blood-Brain Barror, BBB) 등 주변환경 변화에 영향을 미치는 것을 통하여 작용한다는 것을 가정하게 한다. 뇌조직을 TTC로 염색하

여 뇌경색 체적을 측정한 결과 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군은 control군에 비하여 뇌경색 체적이 22.6% 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. 이러한 결과 위의 가정을 뒷받침 한다.

그러므로 이차적으로 뇌조직에서 BBB의 구성과 작용에 영향하여 뇌조직의 수분이동과 허혈손상 및 뇌부종 생성에 관여하는 인자인 iNOS 및 MMP-9의 발현과 성상아교세포의 변화를 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

iNOS는 Nitric oxide (NO)를 생성하는 효소의 일종이다. NO는 내재적으로 생성되는 free radical의 일종으로서 다양한 생리적 및 병리적 작용을 가지고 있으며, 고농도에서는 뇌경색의 병리기전 뿐만 아니라 뇌허혈이나 외상성 뇌손상과 신경퇴행성 질환에도 관여하고 있다.^{30,31)} 특히 iNOS에 의하여 생성되는 NO는 비교적 장시간 분비되며, 세포내 Ca²⁺ 농도에 비존존적으로 NO를 생성하게 되고, 뇌허혈에서는 뇌경색 크기를 증가시키는 작용을 한다.³¹⁾ 또한 NO는 뇌허혈 또는 염증성으로 유발되는 BBB의 손상에 직접적으로 관여한다는 보고가 아주 많다.^{32,33)} BBB의 손상은 뇌경색 등 다양한 뇌조직의 병리적 상태에서 일어나며, 뇌혈관 투과성을 증가시켜서 결과적으로 뇌조직의 부종을 유발하게 된다.³⁴⁾ 본 실험의 결과, 중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군에서는 실험동물에 따라 대뇌피질과 선조체에서 미약한 iNOS의 발현을 나타내는 개체들이 있었으며, 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 매우 뚜렷한 iNOS 양성반응의 신경세포들이 많이 관찰되었다. 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 iNOS 양성반응 신경세포들의 수가 control군에 비하여 감소하는 것은 물론 발현 강도 또한 감소되었으며, 선조체에서는 iNOS 발현 세포들의 수는 감소하였으나 발현 강도는 control군과 비교하여 큰 변화가 없었다.

MMPs는 Zn²⁺에 의존적인 endopeptidase의 일종이다. 혈관 기저층의 구조를 이루는 type IV collagen이나 laminin, fibronectin 같은 세포외기질 (extracellular matrix)을 구성하는 분자들이 이 MMP-9에 의하여 분해된다.³⁵⁾ 이러한 MMP-9의 효소적 기능은 뇌허혈 손상은 물론 염증이나 동맥경화의 진행과정에서 매우 중요한 역할을 한다.³⁶⁾ 뇌조직에서 MMP-9 발현의 증가는 BBB를 손상시키고 결과적으로 신경세포의 사멸을 유도한다.³⁷⁾ 또한 뇌허혈에 의한 oxidative stress가 MMP-9 발현을 증가시켜서 BBB 손상을 촉진하는 것으로 보고되어 있다.³⁸⁾ 본 실험의 결과, 중대뇌동맥을 폐쇄하지 않은 sham군에서는 대뇌피질과 선조체 모두에서 MMP-9 발현이 관찰되지 않았으며, 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 매우 뚜렷한 MMP-9 양성반응의 신경세포들이 많이 관찰되었고 일부 모세혈관벽 주위에서도 양성반응이 관찰되었다. 이에 비하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 MMP-9 양성반응 신경세포들의 수가 확연히 감소하였으나, 모세혈관벽 주위에서의 발현은 control군에 비하여 감소하지 않는 특징을 나타내었다. 이러한 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 iNOS와 MMP-9 발현의 증가가 大承氣湯 투여에 의하여 억제되는 것은 大承氣湯이 뇌경색에 의한 BBB 손상을 억제하는 효능이 있는 것을 추정하게 한다.

또한 성상아교세포는 BBB의 기본적인 구성요소가 되고, 뇌부종 형성에 직접적으로 관여하고 있다.³⁹⁾ 성상아교세포의 변화를 GFAP에 대한 면역조직화학적 염색을 통하여 관찰한 바, 중대뇌동맥을 폐쇄한 control군은 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 GFAP에 양성반응을 나타낸 성상아교세포의 수는 큰 변화가 없으나 세포체가 더 커지고 돌기들이 더 확실하게 관찰되는 부종의 양상을 나타내었으며, 중대뇌동맥 폐쇄 후 大承氣湯을 투여한 sample군에서는 대뇌피질의 뇌경색 경계부위에서 역시 GFAP에 양성반응을 나타낸 성상아교세포의 수는 큰 변화가 없으나, control군에 비하여 세포체의 크기가 다시 감소하고 돌기들 또한 그 굵기가 감소한 것이 관찰되었다.

이러한 연구결과들을 총괄하면, 大承氣湯은 뇌경색 유발의 부차적인 증상인 배변량 감소를 유의하게 개선하며, 이를 통하여 뇌조직의 수분이동에 관여하는 BBB의 손상을 억제하여 일정한 뇌신경세포 보호효능을 나타내는 것으로 생각되며, 향후의 보다 더 구체적인 연구를 통하여 검증될 수 있을 것이다.

결 론

중풍환자의 변폐에 사용되는 大承氣湯의 사하작용이 중대 뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌혈 손상에 미치는 효능을 관찰하고자 흰쥐를 사용하여 중대뇌동맥을 일시적으로 폐쇄하여 뇌경색을 유발한 다음 5일간 大承氣湯을 경구투여하면서 배변량과 소변량의 변화를 관찰하였으며, neurological score를 측정하고 이들 간의 상관관계를 조사하였다. 또한 뇌경색 면과 뇌혈관 장벽의 구성과 작용에 영향하여 뇌조직의 수분이동과 허혈 손상 및 뇌부종 생성에 관여하는 인자인 iNOS와 MMP-9의 발현, 성상아교세포의 변화를 관찰한바 아래와 같은 결과들을 얻었다.

1. 大承氣湯 투여에 의하여 뇌경색 흰쥐의 배변량이 투여 2 일째부터 유의하게 증가하였다.
2. 大承氣湯 투여에 의하여 뇌경색 흰쥐의 소변량은 변화하지 않았다.
3. 大承氣湯 투여는 뇌경색 흰쥐의 신경학적 행동증상을 유의하게 개선하였다.
4. 뇌경색 흰쥐의 총배변량과 신경학적 행동증상 사이에는 유의한 상관관계가 있었으나, 大承氣湯 투여군에서는 총배변량과 신경학적 행동증상 사이에 상관관계가 없었다.
5. 大承氣湯 투여에 의하여 뇌경색 체적은 유의하게 감소하지 않았다.
6. 大承氣湯 투여는 뇌경색 흰쥐의 대뇌피질과 선조체에서 iNOS 발현을 유의하게 억제하였다.
7. 大承氣湯 투여는 뇌경색 흰쥐의 대뇌피질에서 MMP-9 발

현을 유의하게 억제하였다.

8. 大承氣湯 투여는 뇌경색 흰쥐의 대뇌피질에서 GFAP 양성 반응의 성상아교세포의 부종을 억제하였다.

이상의 결과를 보아, 大承氣湯은 뇌경색의 크기를 직접적으로 감소시키지는 못하지만 사하작용에 의한 수분대사의 조절을 통하여 뇌조직 부종을 억제함으로써 일정한 신경세포 보호 작용을 나타내는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Kim YS, Clinic stroke. Seoul : seowondang. 1997 : 311-312, 349-350, 432-436.
2. HA YG, Jung GY, Ko HY, Jung SM, Jung H, Kang MS, Kim DW, Han CH, Cho GH, Jun CY. Study on complications of acute ischemic cerebrovascular disease patients. JKOIM. 2007 ; 28(1) : 25-33.
3. Son DH, Jang YS, Yoo KS, Youn HS, Lee YG, Kang HC. A Clinical study on the patient admitted acute stroke. JKOIM. 2000 ; 21(2) : 203-212.
4. Son YG, Jeong JC, Lee YC. Clinical study of senile stroke . JKOIM. 1993 ; 14(2) : 50-68.
5. Im SY. Clinical study of constipation of stroke patient. J Korean computer science. 1997 ; 3(1) : 7-11.
6. Kang JC. Library study of constipation. JKOIM. 1994 ; 15(2) : 165-173.
7. Lee YC. Research on xiafa used at the acute stages of stroke. KJOM. 1998 ; 19(1) : 385-390.
8. Son DH, Cho GH, Kim YS, Bae HS, Lee KS, Lee YK. The comparison study on the effect bowl movement of of general and Bo-Ryu enema of in the patient at acute stage of Cerebrovascular accident. KIOM. 2001 ; 22(3) : 51-62.
9. Gu BS, Kim YS, Lee DS, Mun SG, Ko CN, Cho GH, Bae HS, Lee KS. Effects of daesunggi-tang on consipated stroke patient. KIOM. 2000 ; 21(2) : 3-13.
10. Kang YL, Kim YJ, Hang CY. Clinical study on the 45 cases constipation patients caused by C.V.A, who were treated with Bo-Riu Enema. KJOIM. 2000 ; 21(2) : 329-336.
11. Kim SJ, Kim MS, Seo BI, Gu DM, Seo HK, An HD. One case report of urinary and bowel dysfunction treated with Yangkyuksanwha-tang in cerebr ovascular accident. Kor J Herbology. 2003 ; 18(3) : 1-8.
12. Jeong JO, Seo SH, Lee EH, Kim JD, Hong SH, Kim WI. Research about the effect of Sopung soongiwon on constipated stroke patients. 2005 ;

- 26(4) : 776-784.
13. Jang JK, Chae IS. *Shanghanlun*. Seoul : komunsa, 1984 : 360.
 14. Lee BJ, Kim DH, Kim SH. Study on Seunggitan in *Shanghanlun*, *JOMDJU*. 1999 ; 8(1) : 205-221.
 15. Chae BY. Study on Seungkitang syndrome in *Sang-Han-Ron*, *JOMSOO*. 1993 ; 6(1) : 71.
 16. Kim YS, An DK, Kim HC. Neuroprotective Effects of Daeseungkitang on the Brain Ischemia induced by Four-Vessel Occlusion in Rats. *Kor J Herbology*. 1999 ; 14(1) : 131-138.
 17. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *stroke*. 1989 ; 20 : 84-91.
 18. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion : Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986 ; 17 : 472-476.
 19. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990 ; 10(2) : 290-293.
 20. Han TL. Prognostic Evaluation in Stroke. *J Korean Acad Rehabil*. 1997 ; 21(5) : 817-824.
 21. Kim HC. *Oriental herbal pharmacology*. Seoul : Jipmundang. 2001 : 174-177, 211-213, 270-271.
 22. Tian J, Du H, Yang H, Liu X, Li Z : A clinical study on compound da huang (radix et rhizoma rhei) preparations for improvement of senile persons' memory ability. *J Tradit Chin Med*. 1997 ; 17(3) : 168-173.
 23. Yokozawa T, Chen CP, Tanaka T : Direct scavenging of nitric oxide by traditional crude drugs. *Phytomedicine*. 2000 ; 6(6) : 453-463.
 24. Yook CS. Studies on Active Substance in the Crude drugs Used for Blood Stasis and Blood coagulation. *JPCCKHU*. 1992 ; 20 : 59-62.
 25. Kim DW, Park CG. The effect of alcohol-steamed and row Rhei Rhizoma on varied extraction time in blood stasis model. *JKOPM*. 1998 ; 19(1) : 114-133.
 26. An DK, Won DH, Kim JH. Neuroprotective Effects of the Rhei Rhizoma on the Rats' Transient Forebrain Ischemia caused by 4-bessel-occlusion4-vessel occlusion. *Kor J Herbology*. 1999 ; 14(1) : 111-120.
 27. Myung SH, Kim YS. Anti-Oxidative and Neuroprotective Effects of Rhei Rhizoma on BV-2 Microglia Cells and Hippocampal Neurons. *KJOPH*. 2005 ; 19(3):647-655.
 28. Na HJ, Jeong HJ, Hwang WJ, Cho KH, Kim HM. Effect of *Poncirus fructus* on stem cell factor-induced mast cell migration. *Pharmacol Res*. 2003 ; 48(3) : 267-271.
 29. Tang SY, Whiteman M, Peng ZF, Jenner A, Yong EL, Halliwell B. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional chinese medicines. *Free Radic Biol Med*. 2004 ; 36(12) : 1575-1587.
 30. Luo CX, Zhu XJ, Zhang AX, Wang W, Yang XM, Liu SH, Han X, Sun J, Zhang SG, Lu Y, Zhu DY. Blockade of L-type voltagegated Ca²⁺ channel inhibits ischemia-induced neurogenesis by downregulating iNOS expression in adult mouse. *J Neurochem*. 2005 ; 94 : 1077-1086.
 31. Zhu DY, Deng Q, Yao HH, Wang DC, Deng Y, Liu GQ. Inducible nitric oxide synthase expression in the ischemic core and penumbra after transient focal cerebral ischemia in mice. *Life Sci*. 2002 ; 71 : 1985-1996.
 32. Thiel VE, Audus KL. Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxid Redox Signal*. 2001 ; 3 : 273-278.
 33. Winkler F, Koedel U, Kastenbauer S, Pfister HW. Differential expression of nitric oxide synthases in bacterial meningitis : role of the inducible isoform for blood-brain barrier breakdown. *J Infect Dis*. 2001 ; 183 : 1749-1759.
 34. Khan M, Sekhon B, Giri S, Jatana M, Gilg AG, Ayasolla K, Elango C, Singh I. S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005 ; 25 : 177-192.
 35. Yurchenco PD, Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J*. 1990 ; 4 : 1577-1590.
 36. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996 ; 16(3) : 360-366.
 37. Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung J-C, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2001 ; 21 : 7724-7732.
 38. Liu KJ, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2005 ; 39 : 71-80.
 39. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Rev*. 2006 ; 7 : 41-53.