

疏風湯이 고지혈증 흰쥐의 뇌경색에 미치는 영향

최서우[#], 김연섭^{*}

가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Effects of Sopung-tang on Cerebral Infarct Induced by MCAO in Hyperlipidemic Rats

Seo-Woo Choi[#], Youn-Sub Kim^{*}

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

ABSTRACT

Objectives : This study evaluates the neuroprotective effects of Sopung-tang, a mixture of *Notopterygii Rhizoma*, *Saposhnikovia Radix*, *Angelicae Gigantis Radix*, *Cnidii Rhizoma*, *Hoelen*, *Aurantii Nobilis Pericarpium*, *Pinelliae Tuber*, *Linderae Radix*, *Angelicae Dahuricae Radix*, *Cyperii Rhizoma*, *Cinnamomi Ramulus*, *Asari Radix*, *Glycyrrhizae Radix* on the cerebral infarct combined with hyperlipidemia.

Method : The hyperlipidemia was induced by the beef tallow 30% diet for 14 days on Sprague-Dawley rats. The cerebral infarct was induced by the middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2 hours with intraluminal thread method. Then the water extract of Sopung-tang was administered a day for 5 days at 3 hours after the cerebral infarct by MCAO. Effect of Sopung-tang was evaluated with the infarct volume and edema percentage by a TTC-stained brain section, and the expressions of Bax and Bcl-2 in the brain tissue by a immunohistochemical stain method.

Results : Sopung-tang reduced the infarct size partly in a TTC-stained brain section of the hyperlipidemic MCAO rats. Sopung-tang reduced the infarct volume of the hyperlipidemic MCAO rats significantly. Sopung-tang reduced the edema percentage of the hyperlipidemic MCAO rats, but not significant statistically. Sopung-tang suppressed the Bax expressions in the cerebral penumbra and caudate putamen of the hyperlipidemic MCAO rats significantly. Sopung-tang upregulated the Bcl-2 expression in the caudate putamen of the hyperlipidemic MCAO rats.

Conclusion : These results suggest that Sopung-tang plays an anti-apoptotic neuroprotective effect through the suppression of Bax and up-regulation of Bcl-2 expressions in the brain tissues.

Key words : Sopung-tang, Bax, Bcl-2, HSP72, neuroprotective effect

서론

중풍 즉 뇌졸중은 우리 사회의 3대 사망원인 중 하나이며, 사망에 이르지 않더라도 출혈이나 경색이 있었던 뇌부위에는 섬유교증 반흔을 남기고, 편마비, 언어장애, 인지장애 등 많은 후유증을 남기는 심각한 질병이다^{1,2)}. 한의학에서는 중풍의 병인으로서 간양상항, 소갈, 노령에 따른 원기의 허쇠 등을 설정하고 있으며²⁻⁴⁾, 이러한 병인은 뇌졸중의 선행인자로 논의되고 있는 고지혈증 및 고혈압, 당뇨, 노령 등과 일맥상

통하는 면이 있다⁵⁾. 그러므로 중풍에 대한 치료 및 예방에 있어서도 이러한 합병증들을 고려해야 한다고 하였다⁶⁾. 이러한 점을 감안한다면 중풍 연구에서 실험동물을 사용함에 있어서도 이러한 합병증이 수반된 실험동물을 사용하여야 할 필요성이 있다.

疏風湯은 龔廷賢의 『萬病回春』⁷⁾에 수록된 중부증의 수족 불인과 사지마목 등을 치료하는 처방으로, 거풍, 순기, 활혈, 거담하므로 중풍 제증의 개선을 목표로 사용된다^{8,9)}. 疏風湯

*교신저자 : 김연섭, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342, 가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실.
· Tel : 031-750-5420 · E-mail : ysk5708@hanmail.net.
#제1저자 : 최서우, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342, 가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실.
· Tel : 031-750-5427 · E-mail : manandi@empass.com
· 접수 : 2014년 4월 25일 · 수정 : 2014년 5월 20일 · 채택 : 2014년 5월 20일

의 실험연구 보고들을 살펴보면, 혈류량 증가 및 혈압강하 효과^{10,11)} 등 심혈관계에 대한 유의한 효능들이 보고되었으며, 나아가 뇌혈전¹²⁾과 뇌허혈 손상의 인지 및 운동기능 회복¹³⁾에도 효능이 있다고 보고되었다. 또한 疏風湯은 고지혈증 및 혈전증 등에 대하여도 유의한 혈중 지질 조절작용이 있는 것으로 보고되어 있다^{12,14)}. 그러나 이들은 심혈관계 효능이나 신경세포보호 효과를 각각 따로 관찰한 것이다. 이에 본 연구에서는 위와 같은 효능의 疏風湯이 합병증이 수반된 동물모형 즉, 고지혈증 상태의 뇌경색 동물모형에 대한 효능을 실험적으로 관찰해보고자 하였다.

실험동물에서 고지혈증은 고지방식을 통하여 유발하였으며, 고지혈증이 유발된 흰쥐의 중대뇌동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법으로 뇌경색을 유발하였다. 疏風湯 투여 후 뇌경색 크기 및 뇌부종 정도에 미치는 영향, 신경세포자연사 이전에 관련된 Bcl-2-associated X protein (Bax)와 B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) 발현¹⁵⁾ 및 뇌신경세포의 스트레스 반응 지표의 하나인 heat shock protein 72 (HSP72) 발현¹⁶⁾을 면역조직화학염색으로 관찰한바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 8주령, 약 250g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 (21-23°C), 습도 (40-60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물의 제조 및 투여

본 실험에 사용한 약물은 疏風湯 (Sopung-tang, SPT)으로 처방의 내용은 Table 1과 같으며 (주)허브메디에서 구입하여 사용하였다. 일반적인 물추출 엑기스 제조방법에 의하여, 10첩 분량 460 g을 3,000 ml의 물과 함께 냉각기가 장착된 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축 후 동결건조하여 1첩 당 7.8 g의 물추출엑기스를 얻었다. 실험동물의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100g 당 체중비례 계산량의 5배인 65.0 mg(650 mg/kg)으로 하였으며, 뇌허혈 손상 유발 3시간 이후부터 1일 1회 5일간 경구투여하였다. 사용한 약물의 일부는 밀봉하여 본 교실의 냉동고에 보관하고 있다.

Table 1. Contents of Sopung-tang

Ingredient	Weight
Notopterygii Rhizoma(羌活)	4.0 g
Saposhnikoviae Radix(防風)	4.0 g
Angelicae Gigantis Radix(當歸)	4.0 g
Cnidii Rhizoma(川芎)	4.0 g
Hoelen(赤茯苓)	4.0 g
Aurantii Nobilis Pericarpium(陳皮)	4.0 g
Pinelliae Tuber(半夏)	4.0 g
Linderae Radix(烏藥)	4.0 g
Angelicae Dahuricae Radix(白芷)	4.0 g
Cyperii Rhizoma(香附子)	4.0 g
Cinnamomi Ramulus(桂枝)	2.0 g
Asiasari Radix(細辛)	2.0 g
Glycyrrhizae Radix(甘草)	2.0 g
Total	46.0 g

3. 실험군의 구분

고지혈증 상태의 실험동물에서 뇌허혈 손상에 대한 疏風湯의 효능을 관찰하기 위하여 실험군을 다음과 같이 구분하였다. 고지방사료 (high-fat diet)를 14일간 공급한 다음 뇌허혈 손상을 유발하기 위한 마취와 전정부 피부절개 등의 준비 과정은 시행하였으나 중대뇌동맥은 폐쇄하지 않은 Sham군 (Sham), 일시적인 중대뇌동맥 폐쇄 (middle cerebral artery occlusion, MCAO)에 의하여 뇌허혈 손상을 유발시킨 Control군 (Control) 및 Control군과 같이 뇌허혈 손상을 유발한 다음 疏風湯을 투여한 Sopung-tang군으로 나누었다. 각 군당 실험동물은 6마리로 면역조직화학염색용으로 사용하였다. Sham군의 조직은 염색과정 등에서 정상대조군으로 사용하였으며, 그 자료는 실험결과로 제시하지 않았다.

4. 고지혈증의 유발

흰쥐의 실험실 적응기간 이후, 뇌허혈 손상유발 14일 전부터 일반사료를 중단하고 Beef Tallow 30%의 고지방사료 (Harlan, TD94095, USA)만을 공급하여 고지혈증을 유발하였다. 고지방사료의 구성 내용은 Table 2와 같다.

Table 2. Composition of High Fat Diet

Ingredients	%
Beef Tallow	30.00
Casein, High Protein	26.00
EL-Methionine	0.39
Sucrose	16.17
Corn Starch	16.00
Cellulose	5.00
Mineral Mix, AIN-76	4.55
Calcium Carbonate	0.39
Vitamin Mix, Teklad	1.30
Choline Dihydrogen citrate	0.20
Total	100.00

5. 뇌경색의 유발

뇌허혈 손상은 총경동맥으로 나일론 수술실을 삽입하여 중

대뇌동맥의 기시부를 일시적으로 폐쇄하는 방법을 사용하였으며 그 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다¹⁷⁾. 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. 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. 중대뇌동맥 폐쇄 2시간 후에 다시 마취한 상태에서 피부 봉합부위 밖으로 노출된 나일론 수술실을 조심스럽게 당겨내어 혈류를 재개통시키고 곧바로 마취에서 깨어나게 하였다.

6. 뇌경색 면적, 체적 및 부종의 측정

뇌경색 유발 5일 후 실험동물에 pentobarbital sodium을 복강주사하여 깊게 마취한 상태에서, 심장으로부터 혈액을 채취한 다음, 즉시 단두로 희생시키고 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 흰쥐용 brain matrix (ASI, USA)를 사용하여 2 mm 두께의 뇌조직 절편으로 만들었다. 뇌조직 절편을 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)로 염색하고¹⁸⁾, digital camera로 촬영한 다음 "Image J" software를 사용하여 각 절편으로부터 뇌경색 면적을 측정하였으며, 측정값으로부터 총체적을 계산하였다. 뇌부종 정도는 각각의 뇌 절편으로부터 정중선을 기준으로 손상측과 정상측의 대뇌반구 면적을 측정하고, 정상측 대뇌반구 면적에 대한 손상측 대뇌반구의 면적비율로 계산하였다.

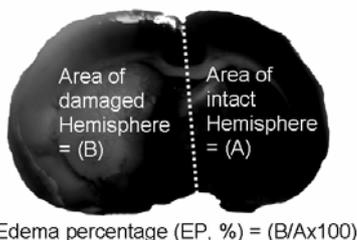


Fig. 1. Calculation of edema percentage from areas of the intact and damaged cerebral hemispheres.

7. Bax, Bcl-2 및 HSP72의 면역조직화학염색

1) 뇌조직의 처리

뇌경색 유발 5일 후에 실험동물을 pentobarbital sodium 의 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여

0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde 로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출한 다음 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 담귀 침전시켰다. 다음 뇌를 -40℃의 dry ice-isopentane 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50µm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

2) 면역조직화학염색

뇌조직 절편을 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 씻어낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 Bax (anti-mouse, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA), Bcl-2 (anti-rabbit, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA) 및 HSP72 (anti-mouse, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA) 이었으며, 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 Bax와 Bcl-2는 nickel choride를 첨가한 diaminobenzidine-tetrachloride (DAB, Sigma, USA)로, HSP72는 DAB로 5-10분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

3) 면역조직화학염색 양성반응 신경세포의 관찰

Bax, Bcl-2 및 HSP72 발현의 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여, 면역조직화학적으로 염색된 뇌조직의 영상을 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고 "NIH Image" software를 사용하여, 뇌경색이 유발된 대뇌반구 쪽 대뇌피질의 뇌경색 경계영역 (cortex penumbra)과 선조체 (caudate putamen)에서 동일한 일정면적 (100,000 µm²) 내에서의 양성반응 신경세포 수를 측정하였다.

8. 통계분석

뇌경색 면적 및 체적, 뇌부종 비율, 면역조직화학염색의 양성반응 세포수, 혈청 지질함량 등의 측정치에 대한 통계분석은 Student's T-test 방법을 사용하여 p<0.05 수준에서 대조군에 대해 검정하였다.

결 과

1. 뇌경색 및 뇌부종에 미치는 영향

1) 뇌경색 면적에 대한 영향

뇌의 전방에서부터 후방으로 2mm 두께의 뇌조직 절편 6개에서 TTC 염색된 뇌경색 면적을 측정할 때 Sham군에서는 뇌경색이 관찰되지 않았다. 14일간 고지방사료를 공급하고 중

대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 뇌조직절편 6개에서의 뇌경색 면적이 각각 $30.2 \pm 1.7 \text{ mm}^2$, $38.6 \pm 2.3 \text{ mm}^2$, $43.5 \pm 2.2 \text{ mm}^2$, $41.8 \pm 2.3 \text{ mm}^2$, $38.6 \pm 2.1 \text{ mm}^2$ 및 $23.5 \pm 1.7 \text{ mm}^2$ 이었다. 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 疏風湯을 투여한 Sopung-tang군은 각각 $28.8 \pm 1.6 \text{ mm}^2$, $35.8 \pm 1.9 \text{ mm}^2$, $37.1 \pm 1.8 \text{ mm}^2$, $37.5 \pm 2.1 \text{ mm}^2$, $31.4 \pm 1.9 \text{ mm}^2$ 및 $22.1 \pm 1.5 \text{ mm}^2$ 로 Control군에 비하여 3번째와 5번째 뇌조직 절편에서만 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 뇌경색의 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

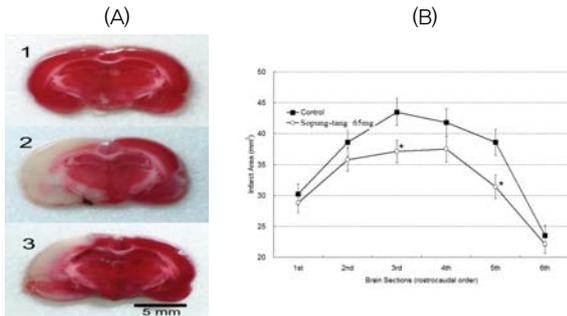


Fig. 2. (A) Representative TTC-stained brain sections of hyperlipidemic MCAO rats (1; Sham, 2; Control, 3; Sopung-tang). Red TTC-stained areas are intact and white unstained areas demonstrated infarct tissues. (B) Changes of infarct area of hyperlipidemic MCAO rats. Control: group of hyperlipidemic MCAO rats. Sopung-tang: group treated with Sopung-tang on hyperlipidemic MCAO rats. Sopung-tang treatment reduced infarct area on 3rd and 5th brain section significantly as compared with the control group (*; $P < 0.05$). Data presented as mean \pm standard error.

2) 뇌경색 체적에 대한 영향

TTC 염색된 뇌조직 절편들로부터 뇌경색 체적을 측정한다. Sham군에서는 뇌경색이 관찰되지 않았다. 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 뇌경색 체적이 $432.4 \pm 12.5 \text{ mm}^3$ 이었고, 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 疏風湯을 투여한 Sopung-tang군은 $385.4 \pm 9.7 \text{ mm}^3$ 로 Control군에 비하여 뇌경색 체적이 약 10.9% 감소하였으며, Control군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 뇌경색 체적의 감소를 나타내었다 (Fig. 3).

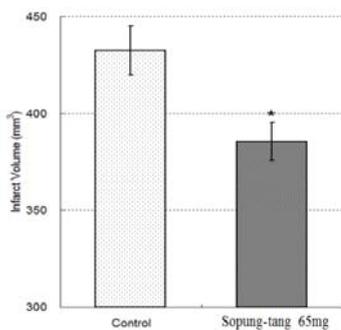


Fig. 3. Changes of infarct volume of hyperlipidemic MCAO rats. Sopung-tang treatment reduced infarct volume significantly as compared with the control group (*; $P < 0.05$).

3) 뇌부종에 대한 영향

TTC 염색된 뇌조직 절편들로부터 뇌부종 비율을 측정한다. Sham군에서는 뇌부종이 관찰되지 않았다. 14일간 고지방

사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 뇌부종 비율은 $131.9 \pm 4.4 \%$ 이었고, 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 疏風湯을 투여한 Sopung-tang군은 $123.6 \pm 3.8 \%$ 로 Control군에 비하여 약 6.3% 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 4).

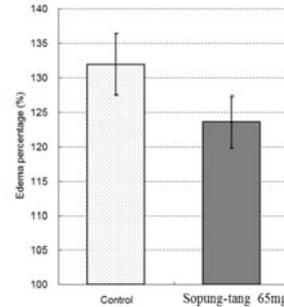


Fig. 4. Changes of edema percentage of hyperlipidemic MCAO rats. Sopung-tang treatment did not reduce edema percentage statistically as compared with the control group.

2. 뇌조직의 Bax, Bcl-2 및 HSP72 발현에 미치는 영향

1) Bax 발현에 미치는 영향

면역조직화학염색된 뇌조직 절편에서 Bax 양성반응세포 수를 측정한다. 대뇌피질 뇌경색 경계영역의 일정면적 ($100,000 \mu\text{m}^2$) 내에서 관찰되는 Bax 양성반응세포의 수는 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 53.2 ± 2.9 개, 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 疏風湯을 투여한 Sopung-tang군은 35.5 ± 4.1 개로 Control군에 비하여 $P < 0.01$ 의 유의한 Bax 양성반응세포 수의 감소가 관찰되었다. 선조체에서도 Control군은 42.7 ± 2.8 개, Sopung-tang군은 34.2 ± 2.5 개로 Control군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의한 Bax 양성반응세포 수의 감소가 관찰되었다 (Fig. 5).

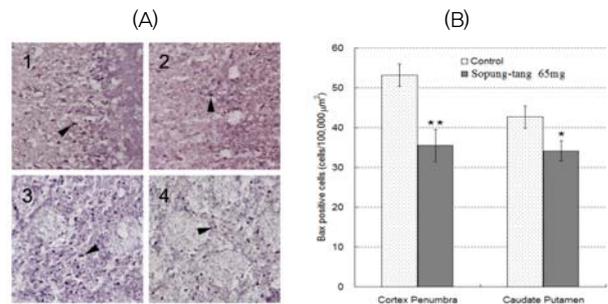


Fig. 5. (A) Representative Bax immunolabeled brain sections of hyperlipidemic MCAO rats (1; Control-cortex penumbra, 2; Sopung-tang-cortex penumbra, 3; Control-caudate putamen, 4; Sopung-tang-caudate putamen). (B) Changes of Bax positive cells in brain regions of hyperlipidemic MCAO rats. Sopung-tang treatment reduced Bax positive cells in both of the cortex penumbra (**; $P < 0.01$) and the caudate putamen (*; $P < 0.05$) significantly as compared with the control group.

2) Bcl-2 발현에 미치는 영향

면역조직화학염색된 뇌조직 절편에서 Bcl-2 양성반응세포

수를 측정한다. 대뇌피질 뇌경색 경계영역의 일정면적 (100,000 μm^2) 내에서 관찰되는 Bcl-2 양성반응세포의 수는 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control 군은 26.7 ± 3.3 개, 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 疏風湯을 투여한 Sopung-tang 군은 27.7 ± 2.1 개로 Control 군과 큰 차이가 없었다. 선조체에서는 Control 군은 27.3 ± 2.2 개, Sopung-tang 군은 33.8 ± 2.9 개로 Control 군에 비하여 23.8% 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 6).

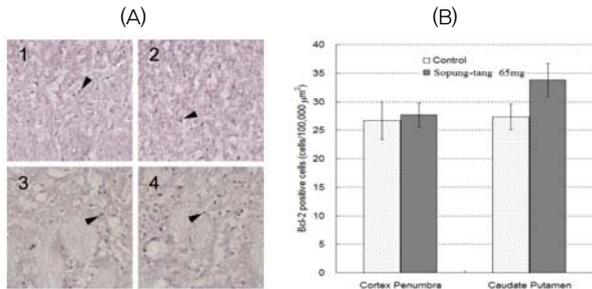


Fig. 6. (A) Representative Bcl-2 immuno-labeled brain sections of hyperlipidemic MCAO rats (1; Control-cortex penumbra, 2; Sopung-tang-cortex penumbra, 3; Control-caudate putamen, 4; Sopung-tang-caudate putamen). (B) Changes of Bcl-2 positive cells in brain regions of hyperlipidemic MCAO rats. Sopung-tang treatment increased Bcl-2 positive cells in the caudate putamen, but it was not significant statistically as compared with the control group.

3) HSP72 발현에 미치는 영향

면역조직화학염색된 뇌조직 절편에서 HSP72 양성반응세포 수를 측정한다. 대뇌피질 뇌경색 경계영역의 일정면적 (100,000 μm^2) 내에서 관찰되는 HSP72 양성반응세포 수는 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control 군은 36.3 ± 3.5 개, 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 疏風湯을 투여한 Sopung-tang 군은 51.0 ± 5.2 개로 Control 군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의한 HSP72 양성반응세포 수의 증가가 관찰되었다 (Fig. 7).

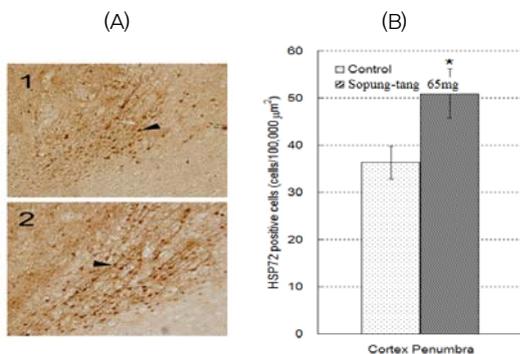


Fig. 7. (A) Representative HSP72 immuno-labeled brain sections of hyperlipidemic MCAO rats (1; Control-cortex penumbra, 2; Sopung-tang-cortex penumbra). (B) Changes of HSP72 positive cells in cortex penumbra of hyperlipidemic MCAO rats. Sopung-tang treatment significantly increased HSP72 positive cells in the cortex penumbra significantly as compared with the control group (*; $P < 0.05$).

고찰

뇌졸중은 발생이후 각종 후유증을 동반하여 삶의 질을 떨어뜨린다는 점에서 예방이 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 최근의 연구들은 만성 고혈압, 당뇨 그리고 고지혈증 등은 뇌경색을 유발시키는 위험인자이며, 이러한 질환을 가진 경우의 뇌경색 환자는 그 예후 또한 매우 좋지 않음을 보고하고 있다^{5,6}. 치료적인 면에서도 뇌졸중의 형태와 정도뿐만 아니라 고혈압이나 당뇨, 고지혈증과 같은 합병증을 고려하여야 한다고 하였다¹⁹.

고지혈증은 고혈압, 당뇨병과 함께 가장 대표적인 뇌졸중 유발인자이며, 혈청 total-cholesterol이나 HDL-cholesterol 수치와 뇌졸중 발생의 상관관계는 뇌졸중의 병리적인 구분 즉, 허혈성과 출혈성 뇌졸중 및 큰 동맥의 죽상혈전색전증 등의 경우 각기 다른 양상을 나타낸다²⁰. 그러나 혈청 cholesterol 수치의 증가가 허혈성 뇌졸중의 발생을 증가시키며, 혈청 cholesterol 수치의 감소는 출혈성 뇌졸중 발생을 증가시킨다는 상관관계가 보고되었다^{21,22}. 또한 total-cholesterol 수치가 감소하였을 때 뇌졸중 발병율이 비례하여 감소한다고 하였다²³. 이와 같이, cholesterol을 중심으로 한 고지혈증은 뇌졸중의 발병과 밀접한 상관관계를 가지고 있으며, 혈청 지질 함량의 조절이 뇌졸중의 예방 및 재발방지에 대한 적절한 대책이 된다.

신경세포손상에 대한 약물의 효능을 정확히 예측하기 위해서는 뇌경색의 임상증상과 유사한 실험동물모형이 필요하다. 실제 뇌졸중 환자에 있어서는 뇌혈류 상태와 뇌경색 크기, 뇌의 구조적 상태와 뇌경색 발생의 위치 등에 따라 그 상관관계가 가변적이며 임상증상이 매우 다양하게 나타나지만 실험동물모형에서는 단일한 손상 유발만 나타나는 것이 단점이다²⁴. 또한 합병증을 동반한 뇌졸중에 대한 실험연구들은 주로 고혈압이 뇌졸중의 중요한 한 원인요소인 것과 관련하여 자발성 고혈압 흰쥐를 사용한 연구가 많이 이루어졌다^{25,26}. 그러나 노령이나 당뇨, 고지혈증 등을 수반한 뇌졸중에 대한 한약물의 효능 연구는 미약한 것이 현실이다.

그러므로 본 연구는 합병증을 갖은 뇌졸중에 대한 한약물 효능 연구의 일환으로, 특히 고지혈증을 수반한 뇌경색 실험동물 모형에 대한 연구로서, 대상 한약물은 疏風湯을 선정하였다. 疏風湯은 거풍, 순기, 활혈, 거담하는 효능으로 중풍 제증을 치료하는 처방이며¹⁻³, 혈류량 증가와 혈압강하 등 심혈관계에 대한 효능^{10,11}과 뇌혈전과 뇌허혈에 대한 효능^{12,13} 및 고지혈증에 대한 조절작용¹⁴ 등이 기존 연구를 통하여 보고된바 있다.

흰쥐에 14일간 beef tallow 30%의 고지방사료를 공급하여 고지혈증을 유도하고, 중대뇌동맥을 2시간 동안 일시적으로 폐쇄하는 방법으로 뇌경색을 유발한 다음 5일간의 疏風湯 투여 후에 TTC염색을 통하여 뇌경색 크기의 변화를 관찰한바, 疏風湯을 투여한 Sopung-tang 군은 Control 군에 비하여 일부 뇌조직 절편에서 유의한 뇌경색 면적의 감소가 관찰되었으며, 전체적으로 뇌경색 체적을 유의하게 감소시켜 疏風湯은 고지혈증을 동반한 뇌경색에 대해서도 유의한 신경세포손상 보호효능이 있는 것으로 관찰되었다.

뇌부종은 뇌허혈, 외상 등 각종 뇌질환에서 2차적으로 모세혈관의 투과성 항진과 불안정한 뇌혈관장벽 (blood-brain

barrier, BBB)에 의해 혈관으로부터 수분이 뇌조직으로 유입되어 발생하는 것으로 각종 뇌질환의 증상을 악화시키고 사망률을 증가시키는 요인으로 작용한다^{27,28)}. 본 연구의 결과, 疏風湯을 투여한 Sopung-tang군은 Control군에 비하여 약 6.3% 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 이로 보아 導痰湯은 뇌부종을 억제하는 효능은 미약한 것으로 추정된다.

疏風湯의 신경세포손상 보호효능을 확인하기 위해서 Bax와 Bcl-2 단백질 발현을 면역조직화학염색으로 관찰하였다. Bax와 Bcl-2는 모두 Bcl-2계열의 단백질들로, caspase계열 단백질과 함께 신경세포가 미토콘드리아의 손상에 의하여 DNA 절단으로 사망하는 자연사기전에 관여하는 주요 인자이다^{29,30)}. 이들 중 Bax는 신경세포의 자연사를 유도하는 pro-apoptotic molecule로 작용하며, Bcl-2는 anti-apoptotic molecule로 발현의 감소와 증가 등 매우 다양한 양상을 나타낸다^{31,32)}. 그러므로 Bax와 Bcl-2 발현의 상대적인 비율이 세포의 사망과 생존을 결정한다고 하였으며³³⁾, 한편으로 Bcl-2 발현 자체가 신경세포를 손상으로부터 보호한다는 것이 보고되어 있다³⁴⁾. 뇌조직 절편에서 Bax 양성반응세포 수를 측정한 본 실험의 결과, 疏風湯을 투여한 Sopung-tang군은 대뇌피질 뇌경색 경계영역과 선조체 모두에서 Control군에 비하여 유의한 Bax 양성반응세포 수의 감소가 관찰되었다. 또한 Bcl-2 양성반응세포 수는 疏風湯을 투여한 Sopung-tang군이 Control군에 비하여 통계학적으로 유의하지는 않았지만 선조체에서 약 23.8% 증가하는 결과를 보여주었다. 이러한 결과는 疏風湯이 뇌허혈 손상에 의한 Bax 발현을 억제하고, 상대적으로 Bcl-2 발현을 증가시키는 작용에 의하여 신경세포의 자연사를 억제함으로써 뇌경색의 크기를 감소시키는 효능을 발휘한 것을 추정하게 하는 결과이다.

Heat-shock protein (HSP)은 세포에 가해진 스트레스에 의하여 유발되는 단백질의 일종으로, 열충격이나 허혈 등 변성 단백질을 생산하는 모든 스트레스에 대한 반응으로 그 발현이 증가한다^{16,35)}. 발현된 HSP 단백질은 변성단백질과 결합하여 HSP72 단백질 발현을 자극하며, 그 결과 발현된 HSP70은 변성단백질의 구조와 기능을 복원하는 것으로 알려져 있다^{36,37)}. 최근 연구에 의하면 HSP72의 발현은 *in vitro* 실험에서 세포 괴사 및 세포자연사를 유발하는 손상으로부터 뇌세포 보호효과가 있으며, *in vivo* 실험에서도 HSP72의 발현이 뇌허혈이나 amyloid toxicity에 대하여 손상억제효과가 보고되었다³⁸⁻⁴⁰⁾. 본 실험의 결과, 대뇌피질 뇌경색 경계영역에서 疏風湯을 투여한 Sopung-tang군은 Control군에 비하여 유의한 HSP72 양성반응세포 수의 증가가 관찰되었다. 이는 최근의 HSP72에 대한 연구보고들과 관련하여보면 疏風湯이 손상 받은 신경세포의 회복기전에도 유의한 작용을 한다는 것을 추정하게 하는 결과이다. 그러나 본 결과만으로는 확정할 수 없으며, 이에 대하여는 향후의 추가적인 연구가 기대된다.

이러한 연구결과들을 종합해보면, 疏風湯은 고지혈증과 뇌경색이 동반된 상태에서 뇌조직의 Bax 발현을 억제하고, Bcl-2와 HSP72 발현을 증가시킴으로써 신경세포의 자연사를 억제하여 뇌경색 크기를 감소시키는 효능을 나타내는 것으로 생각된다.

결론

고지혈증 상태의 뇌경색에 대한 疏風湯의 효능을 실험적으로 연구하기 위하여, 고지방식이를 통하여 고지혈증을 유도한 흰쥐에 중대뇌동맥을 폐쇄하여 뇌경색을 유발하고 疏風湯을 투여한 다음 뇌경색의 크기와 뇌부종 정도를 측정하였으며, 뇌신경세포의 자연사기전과 관련된 인자들인 Bax, Bcl-2 및 HSP72 발현의 변화를 면역조직화학염색으로 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 疏風湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌경색 면적을 일부 뇌조직 절편에서 유의하게 감소시켰다.
2. 疏風湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌경색 체적을 유의하게 감소시켰다.
3. 疏風湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌부종을 억제하였으나 통계적으로 유의하지는 못하였다.
4. 疏風湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 Bax 발현 증가를 대뇌피질 경계영역과 선조체 모두에서 유의하게 억제하였다.
5. 疏風湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 Bcl-2 발현을 선조체에서 증가시켰으나 통계적으로 유의하지는 못하였다.
6. 疏風湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 HSP72 발현을 대뇌피질 경계영역에서 유의하게 증가시켰다.

이상의 결과로 보아, 疏風湯은 뇌조직에서 Bax 발현을 억제하고 Bcl-2 및 HSP72 발현을 증가시키는 작용을 통하여 신경세포자연사 억제 효능을 발휘하는 것으로 생각된다.

References

1. Kim YS, Clinical Stroke, Seoul : Seowondang, 1997 : 303-8, 317-29.
2. Kim YS, Etiopathology, demondtration and treatment of stroke. J Kor Ori Chr Dis, 1995 ; 1(1) : 113-40.
3. Do KD, Jeong SH, Shin GC, Lee WC, The study on the complications of Xiaoke(消渴). J Kor Ori Int Med, 1997 ; 18(2) : 40-52.
4. Neo HT, Kim BT, The bibliographical study of factors including wind-stroke. J Daejeon Univ, 1997 ; 5(2) : 305-17.
5. Pinto A, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Fernandez P, Licata G, Cerebrovascular risk factors and clinical classification of strokes. Semin Vasc Med, 2004 ; 4(3) : 287-303.
6. Alberts MJ, Ovbiagele B, Current strategies for ischemic stroke prevention: role of multimodal combination

- therapies. *J Neurol*, 2007 ; 254(10) : 1414-26.
7. Gong ZX, Manbyeonghoichun, Seoul : Haenglimseowon, 1975 : 49.
 8. Yoon GY, Korean Prescription, Seoul : Gomunsa, 1971 : 109, 149.
 9. Kim JJ, Clinic text, 2nd vol, Seoul : Oriental medicine institute, 1974 : 210, 320.
 10. Jung CK, Effects of Sopungtang on the Cardiovascular System in the Experimental animals. *Kor J Ori Physiol Pathol*, 1995 ; 10 : 317-40.
 11. Moon YH, Chung MH, Jhoo HK, Lim DY, Yoo HJ, Influence of Sopung-Tang on the Blood Pressure Response of the Rat. *Kor J Pharmacogn*, 1990 ; 21(2) : 173-8.
 12. Jeong JG, Ahn IH, The Effect of the Sopuntang on the patients of early cerebral thrombosis. *J Wonkwang Ori Med*, 1995 ; 5 : 181-95.
 13. Choo MG, Choi JB, Shin MS, Kim SJ, Neuroprotective Effects of Sopung-tang(Shufeng-tang) on Cognition and Motor Function Recovery after Ischemic Brain Injury in Rats. *Kor J Ori Rehab Med*, 2008 ; 18(2) : 45-60.
 14. Kwon YC, Lee KS, Experimental study on the Effect of Sopoong-Tang and Kami-Sopoon-Tang to the Induced Hypercholesteremic rabbit. *K H Univ O Mdd J*, 1982 ; 5 : 269- 79.
 15. Nicholson DW, Mechanisms of apoptotic control. *Nature*, 2000 ; 407 : 810-6.
 16. Welch WJ, Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1993 ; 339 : 327-33.
 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. 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) : 290-3.
 19. Durukan A, Tatlisumak T, Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007 ; 87(1) : 179-97.
 20. Laloux P, Galanti L, Jamart J, Lipids in ischemic stroke subtypes. *Acta Neurol Belg*, 2004 ; 104(1) : 13-9.
 21. Eastern Stroke and Coronary Heart Disease Collaborative Research Group, Blood pressure, cholesterol and stroke in Eastern Asia. *Lancet*, 1998 ; 352 : 1801-7.
 22. Iso H, Jacobs DR Jr, Wentworth D, Neaton JD, Cohen JD, Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the multiple risk factor intervention trial. *N Engl J Med*, 1989 ; 320(14) : 904-10.
 23. Di Mascio R, Marchioli R, Tognoni G, Cholesterol reduction and stroke occurrence: an overview of randomised clinical trials. *Cerebrovasc Dis*, 2000 ; 10 : 85-92.
 24. DeGraba TJ, Pettigrew LC, Why do neuroprotective drugs work in animals but not in humans?. *Neurol Clin*, 2000 ; 18 : 475-93.
 25. Barone FC, Price WJ, White RF, Willette RN, Feuerstein GZ, Genetic hypertension and increased susceptibility to cerebral ischemia. *Neurosci Biobehav Rev*, 1992 ; 16(2) : 219-33.
 26. Higuchi Y, Yamashita K, Taniyama K, Satake M, Ozaki M, Shichimotsu-koka-to prevents stroke and changes free-radical-related enzymes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 1996 ; 108(1) : 13-22.
 27. Hawkins BT, Davis TP, The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol Rev*, 2005 ; 57(2) : 173-85.
 28. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD, Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2006 ; 1(3): 223-36.
 29. Putcha GV, Deshmukh M, Johnson EM Jr, BAX translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, Bcl-2, and caspases. *J Neurosci*, 1999 ; 19 : 7476-85.
 30. Neame SJ, Rubin LL, Philpott KL, Blocking cytochrome c activity within intact neurons inhibits apoptosis. *J Cell Biol*, 1998 ; 142 : 1583-93.
 31. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ, Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Develop*, 1999 ; 13 : 1899-911.
 32. Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mossakowski MJ, Reed JC, Upregulation of Bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci*, 1995 ; 15 : 6364-76.
 33. Gibson ME, Han BH, Choi J, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Parsadanian M, Holtzman DM, BAX contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia: evidence for distinct apoptosis pathways. *Mol Med*, 2001 ; 7(9) : 644-55.
 34. Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C, Huarte J, Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and

- experimental ischemia. *Neuron*, 1994 ; 13(4) : 1017-30.
35. Lindquist S. Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Curr Opin Genet Dev*, 1992 ; 2(5) : 748-55.
36. Bruce BD, Churchich J. Characterization of the molecular-chaperone function of the heat-shock-cognate-70-interacting protein. *Eur J Biochem*, 1997 ; 245 : 738-44.
37. Gebauer M, Zeiner M, Gehring U. Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity. *FEBS Lett*, 1997 ; 417 : 109-13.
38. Lowenstein DH, Chan PH, Miles MF. The stress protein response in cultured neurons: characterization and evidence for a protective role in excitotoxicity. *Neuron*, 1991 ; 7 : 1053-60.
39. Khomenko IP, Bakhtina LY, Zelenina OM, Kruglov SV, Manukhina EB, Bayda LA, Malyshev IY. Role of heat shock proteins HSP70 and HSP32 in the protective effect of adaptation of cultured HT22 hippocampal cells to oxidative stress. *Bull Exp Biol Med*, 2007 ; 144(2) : 174-7.
40. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med*, 2008 ; 12(3) : 743-61.