

導痰湯이 고지혈증 흰쥐의 뇌허혈 손상에 미치는 영향

김경훈^{1#}, 김도훈², 김연섭^{1*}

1 : 가천대학교 한의과대학 해부정혈학교실, 2: 가천대학교 한의과대학 원전외사학교실

Effects of Dodam-tang on Cerebral Ischemic Damage of Hyperlipidemic Rats

Kyung-Hun Kim^{1#}, Do-Hoon Kim², Youn-Sub Kim^{1*}

1 : Department of Anatomy-Pointology, Gachon University,

2 : Oriental Medical Classics & History, Gachon University

ABSTRACT

Objectives : Dodam-tang has been reported to have a control effect against the hyperlipidemia and thrombosis. Based upon these previous reports, this study investigates the effects of Dodam-tang on the cerebral ischemic damage of the hyperlipidemic rats.

Methods : Hyperlipidemia was induced by the beef tallow 30% diet for 14 days on Sprague-Dawley rats. Ischemic damage was induced by the middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2 hours with the intraluminal thread method. Then water extract of Dodam-tang was administered daily for 5 days. The effect of Dodam-tang was evaluated with the serum lipids, infarct volume and edema percentage, and immunohistochemical expressions of iNOS, MMP-9, and GFAP in the brain tissue.

Results : The obtained results were as follows; Dodam-tang reduced significantly the infarct size in a TTC-stained 5th brain section of the hyperlipidemic MCAO rats. Dodam-tang suppressed the infarct volume of the hyperlipidemic MCAO rats, but not significant statistically. Dodam-tang suppressed the edema percentage of the hyperlipidemic MCAO rats significantly in the brain tissue. Dodam-tang suppressed significantly the iNOS expression in the cerebral penumbra and caudate putamen of the hyperlipidemic MCAO rats. Dodam-tang suppressed significantly the MMP-9 expression in the cerebral penumbra of the hyperlipidemic MCAO rats. Dodam-tang suppressed significantly the GFAP-expressed astrocytes in the cerebral penumbra of the hyperlipidemic MCAO rats.

Conclusions : These results suggest that Dodam-tang suppresses the brain edema formation through the suppression of the iNOS, MMP-9 and GFAP, but the neuroprotective effect against the cerebral infarct are not distinct.

Key words : Dodam-tang, iNOS, MMP-9, GFAP, edema, neuroprotective effect

서론

뇌허혈은 뇌조직 순환혈액량의 감소로 허혈상태가 일정시간 이상 지속되면 기질적인 병변으로 뇌경색이 유발된다. 허혈성 뇌졸중으로 인하여 뇌경색이 유발된 부위는 기질적으로 회복되지 않으며 영구적인 기능장애를 수반하므로 초기의 치료대책과 예방이 매우 중요하다^{1,2)}.

導痰湯은 濟生方³⁾에 痰涎壅盛, 胸膈留飲, 咳嗽惡心, 發熱背寒, 飲食少思, 中風痰盛, 語澁眩暈 등의 痰飲으로 인한 諸症狀을 치료하는데 응용되는 처방이다^{4,5)}. 최근에는 뇌동맥경화증, 뇌혈전, 뇌경색 및 간질 등의 질병을 치료하는데도 응용되고 있다. 이러한 導痰湯에 대한 실험연구는 주로 고지혈증과 혈전증에 대한 효능이 많이 연구되었고⁶⁻⁸⁾, 뇌손상에 대한

*Corresponding author : Youn-Sub Kim, Department of Anatomy-Pointology, Gachon University
· Tel : +82-31-750-5420 · E-mail : ysk5708@hanmail.net

#First author : Kyung-Hun Kim, Department of Anatomy-Pointology, Gachon University
· Tel : +82-31-750-5427 · E-mail : manandi@empas.com

· Received : 6 August 2014 · Revised : 16 September 2014 · Accepted : 16 September 2014

효능연구는 조 등⁹⁾의 보고 이외에는 매우 드물다.

한편 고지혈증, 고혈압, 당뇨 등은 중풍 발병의 주요한 원인 또는 위험인자이며, 특히 고지혈증은 혈중 total cholesterol 과 triglyceride 등 지질함량이 증가된 상태로 동맥경화증이나 뇌졸중 등의 순환기계 질환 발병의 유인으로 작용한다¹⁰⁻¹²⁾.

한의학적 관점에서 고지혈증은 痰濕과 瘀血 등 痰飲으로 인한 증으로 파악하고 있으며^{13,14)}, 이에 대한 導痰湯의 응용이 유의한 효능을 발휘한다는 것을 실험연구를 통하여 보고되었다⁶⁻⁸⁾. 이러한 관점에서 본다면 고지혈증 상태의 뇌허혈 손상에 대하여도 導痰湯이 유의한 효능을 발휘할 것으로 추측되나 이에 대한 연구보고는 찾아볼 수 없었다. 이에 저자는 고지혈증 상태의 뇌허혈 손상에 대한 導痰湯의 효능을 실험적으로 관찰하고자 하였다.

실험동물에서 고지혈증은 고지방식을 통하여 유발하였으며, 고지혈증이 유발된 흰쥐의 중대뇌동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법으로 뇌허혈 손상을 유발하였다. 1차적으로 혈청 지질 함량의 변화를 측정하고, 뇌경색 크기 및 뇌부종 정도에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 뇌허혈 손상 및 뇌부종과 관련된 인자들인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), matrix metalloproteinase (MMP)-9 및 성장아교세포 발현 glial fibrillary acidic protein (GFAP)의 변화를 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 약 250g 전후의 Sprague-Dawley계, 8주령 수컷 흰쥐를 바이오지노믹스(주)에서 구입하여 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 제조 및 투여

본 실험에 사용한 약물은 導痰湯 (Dodam-tang, DDT) 재료들 모두 (주)음니허브에서 구입하여 냉동보관 중이며 처방의 내용은 Table 1과 같다. 일반적인 물추출 엑기스 제조방법에 의하여, 10첩 분량 340 g을 2,500 ml의 물과 함께 냉각기가 장착된 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축 후 동결건조하여 1첩 당 6.5 g의 물추출엑기스를 얻었다. 실험동물의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100g 당 체중비례 계산량의 5배인 54.2 mg으로 하였으며, 뇌허혈 손상 유발 3시간 이후부터 1일 1회 5일간 경구투여 하였다.

Table 1. Contents of Dodam-tang

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight(g)
半夏(薑製)	Pinelliae Rhizoma	8.0 g
陳皮	Aurantii Nobilis Pericarpium	4.0 g
赤茯苓	Poria Cocos	4.0 g
天南星	Arisaematis Rhizoma	4.0 g
枳殼	Ponciri Fructus	4.0 g
甘草	Glycyrrhizae Radix	4.0 g
生薑	Zingiberis Rhizoma	6.0 g
total		34.0 g

3. 실험군의 구분

고지혈증 상태의 실험동물에서 뇌허혈 손상에 대한 導痰湯의 효능을 관찰하기 위하여 실험군을 다음과 같이 구분하였다. 흰쥐를 일반적인 정상사료로 사육한 정상군 (Normal) 이외의 Sham군, Control군 및 Dodam-tang군에 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 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군 (Dodam-tang)으로 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. 뇌허혈 손상의 유발

뇌허혈 손상은 총경동맥으로 나일론 수술실을 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부를 일시적으로 폐쇄하는 방법을 사용하였으며 그 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다¹⁵⁾. 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. 전정부의 피부를 절개하고 총

경동맥과 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, 심장에서부터 혈액을 채취한 다음, 즉시 단두로 희생시키고 뇌를 적출하였다. 적절한 뇌는 흰쥐용 brain matrix (ASI, USA)를 사용하여 2 mm 두께의 뇌조직 절편으로 만들었다. 뇌조직 절편을 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)로 염색하고¹⁶⁾, 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).

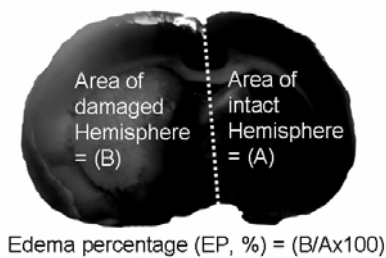


Fig. 1. Calculation of edema percentage from areas of the intact and damaged cerebral hemispheres.

8. iNOS, MMP-9 및 GFAP의 면역조직화학염색

1) 뇌조직의 처리

뇌경색 유발 5일 후에 실험동물을 pentobarbital sodium의 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 담궈 침전시켰다. 다음 뇌를 -40℃의 dry ice-isophentan 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사

용하였다.

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 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 iNOS (anti-mouse, 1:200, Cell Signaling Technology, USA), MMP-9 (anti-rabbit, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA) 및 GFAP (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 diaminobenzidine-tetrachloride (Sigma, USA)에서 5-10 분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

3) 면역조직화학염색 양성반응 신경세포의 관찰

iNOS, MMP-9 및 GFAP 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)에서 동일한 일정한 면적 (100,000 μm²) 내에서의 양성반응 신경세포 수를 측정하였다.

9. 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 뇌부중에 미치는 영향

1) 뇌경색 면적에 대한 영향

뇌의 전방에서부터 후방으로 2 mm 두께의 뇌조직 절편 6개에서 TTC 염색된 뇌경색 면적을 측정할 때 Sham군에서는 뇌경색이 관찰되지 않았다. 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 뇌조직절편 6개에서의 뇌경색 면적이 각각 30.2 ± 1.7 mm², 38.6 ± 2.3 mm², 43.5 ± 2.2 mm², 41.8 ± 2.3 mm², 38.6 ± 2.1 mm² 및 23.5 ± 1.7 mm² 이었다. 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군은 각각 29.4 ± 1.9 mm², 36.5 ± 2.1 mm², 40.8 ± 2.1 mm², 38.2 ± 2.0 mm², 31.8 ± 2.0 mm² 및 21.8 ± 1.8 mm²로 Control군에 비하여 5번째 뇌조직 절편에서만

$p < 0.05$ 의 유의성 있는 뇌경색의 감소를 나타내었다(Fig. 2).

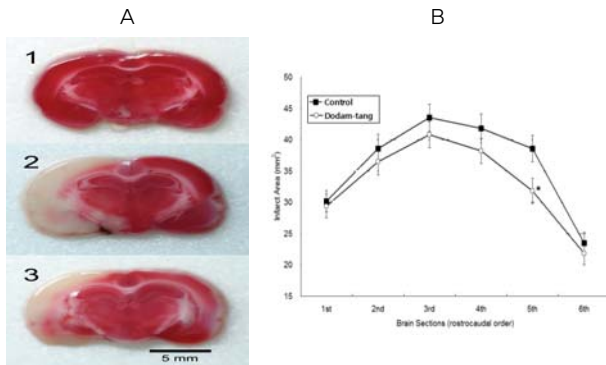


Fig. 2. A : Representative TTC-stained brain sections of hyperlipidemic MCAO rats (1; Sham, 2; Control, 3; Dodam-tang). Red TTC-stained areas are intact and white unstained areas demonstrated infarct tissues. Dodam-tang group reduced infarct area on 5th brain section significantly as compared with the control group. B : Changes of infarct area of hyperlipidemic MCAO rats. Dodam-tang group reduced infarct area on 5th brain section significantly as compared with the control group (*; $p < 0.05$)(n=6).

2) 뇌경색 체적에 대한 영향

TTC 염색된 뇌조직 절편들로부터 뇌경색 체적을 측정한다. Sham군에서는 뇌경색이 관찰되지 않았다. 14일간 고지방 사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 뇌경색 체적이 $432.4 \pm 12.5 \text{ mm}^3$ 이었고, 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군은 $397.0 \pm 10.2 \text{ mm}^3$ 로 Control군에 비하여 뇌경색 체적이 약 8.2% 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 3).

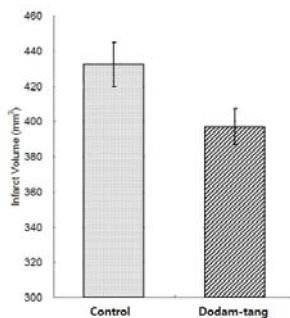


Fig. 3. Changes of infarct volume of hyperlipidemic MCAO rats. Dodam-tang group did not suppress infarct volume statistically as compared with the control group(n=6).

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 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군은 $114.6 \pm 3.0 \%$ 로 Control군에 비하여 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 뇌부종 비율의 감소를 나타내었다(Fig. 4).

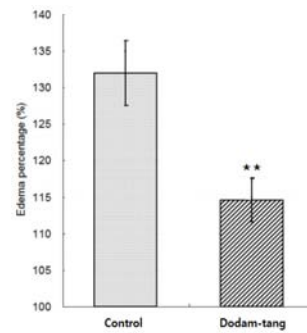


Fig. 4. Changes of edema percentage of hyperlipidemic MCAO rats. Dodam-tang group suppressed edema percentage significantly as compared with the control group (**; $p < 0.01$)(n=6).

2 뇌조직의 iNOS, MMP-9 및 GFAP 발현에 미치는 영향

1) iNOS 발현에 미치는 영향

면역조직화학염색된 뇌조직 절편에서 iNOS 양성반응세포 수를 측정한다. 대뇌피질 뇌허혈 손상 경계영역의 일정면적 ($100,000 \mu\text{m}^2$) 내에서 관찰되는 iNOS 양성반응세포의 수는 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 52.0 ± 2.6 개, 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군은 32.5 ± 3.9 개로 Control군에 비하여 $p < 0.01$ 의 유의한 iNOS 양성반응세포 수의 감소가 관찰되었다. 선조체에서도 Control군은 47.7 ± 3.1 개, Dodam-tang군은 33.5 ± 3.0 개로 Control군에 비하여 $P < 0.01$ 의 유의한 iNOS 양성반응세포 수의 감소가 관찰되었다(Fig. 5).

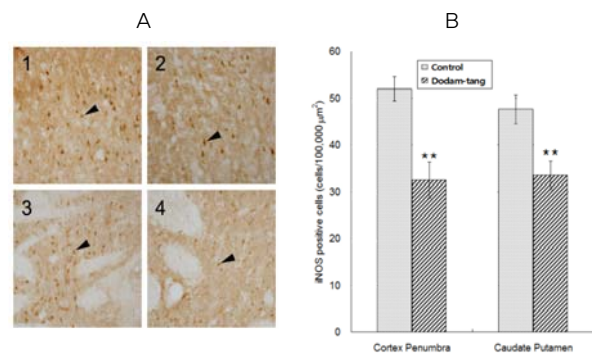


Fig. 5. A : Representative iNOS immunolabeled brain sections of hyperlipidemic MCAO rats (1; Control-cortex penumbra, 2; Dodam-tang-cortex penumbra, 3; Control-caudate putamen, 4; Dodam-tang-caudate putamen). Dodam-tang group reduced iNOS positive cells in both of the cortex penumbra and the caudate putamen significantly as compared with the control group. B : Changes of iNOS positive cells in brain regions of hyperlipidemic MCAO rats. Dodam-tang group reduced iNOS positive cells in both of the cortex penumbra and the caudate putamen significantly as compared with the control group (**; $p < 0.01$)(n=6).

2) MMP-9 발현에 미치는 영향

면역조직화학염색된 뇌조직 절편에서 MMP-9 양성반응세포 수를 측정한다. 대뇌피질 뇌허혈 손상 경계영역의 일정면적 ($100,000 \mu\text{m}^2$) 내에서 관찰되는 MMP-9 양성반응세포의

수는 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 30.7 ± 2.9 개, 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군은 22.7 ± 1.8 개로 Control군에 비하여 $p < 0.05$ 의 유의한 MMP-9 양성반응세포 수의 감소가 관찰되었다. 선조체에서는 Control군은 12.0 ± 1.9 개, Dodam-tang군은 10.5 ± 1.6 개로 Control군에 비하여 통계학적 유의성 있는 변화는 없었다(Fig. 6).

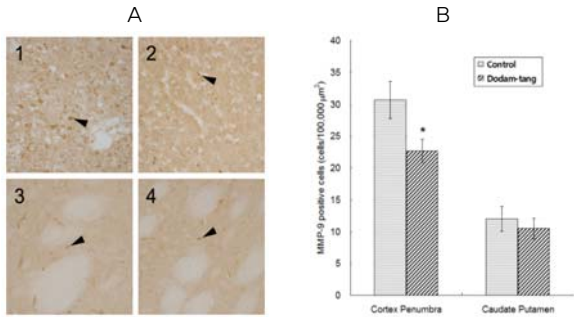


Fig. 6. A: Representative MMP-9 immuno-labeled brain sections of hyperlipidemic MCAO rats (1; Control-cortex penumbra, 2; Dodam-tang-cortex penumbra, 3; Control-caudate putamen, 4; Dodam-tang-caudate putamen). Dodam-tang group reduced MMP-9 positive cells in the cortex penumbra significantly as compared with the control group. B: Changes of MMP-9 positive cells in brain regions of hyperlipidemic MCAO rats. Dodam-tang group reduced MMP-9 positive cells in the cortex penumbra significantly as compared with the control group (*; $p < 0.05$)(n=6).

3) GFAP 발현에 미치는 영향

면역조직화학염색된 뇌조직 절편에서 GFAP 양성반응의 성상아교세포 수를 측정한다. 대뇌피질 뇌허혈 손상 경계영역의 일정면적 ($100,000 \mu\text{m}^2$) 내에서 관찰되는 GFAP 양성반응 성상아교세포의 수는 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 Control군은 41.3 ± 2.1 개, 14일간 고지방사료를 공급하고 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군은 31.0 ± 3.0 개로 Control군에 비하여 $p < 0.05$ 의 유의한 GFAP 양성반응 성상아교세포 수의 감소가 관찰되었다(Fig. 7).

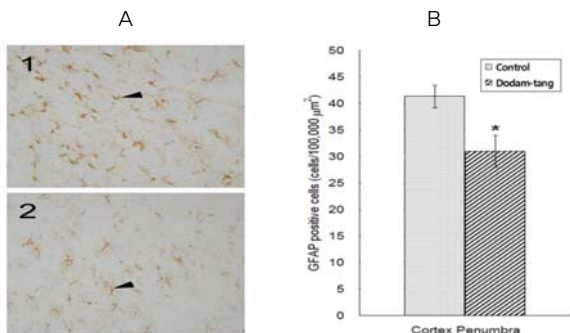


Fig. 7. A: Representative GFAP immuno-labeled brain sections of hyperlipidemic MCAO rats (1; Control-cortex penumbra, 2; Dodam-tang-cortex penumbra). Dodam-tang group reduced GFAP positive astrocytes in the cortex penumbra significantly as compared with the control group. B: Changes of GFAP positive astrocytes in cortex penumbra of hyperlipidemic MCAO rats. Dodam-tang group reduced GFAP positive astrocytes in the cortex penumbra significantly as compared with the control group (*; $p < 0.05$)(n=6).

고찰

고지혈증은 심장이나 말초혈관 또는 뇌혈관에 죽상동맥경화증으로 인한 허혈성 질환을 유발시키므로 고혈압, 당뇨병 등과 함께 가장 대표적인 뇌졸중 유발인자로 이들을 함께 고려한 치료와 예방 대책이 매우 중요하다¹⁷⁾.

導痰湯은 中風痰盛, 語澀眩暈 등의 痰飲으로 인한 諸症狀을 치료하는 처방으로 뇌동맥경화증, 뇌혈전, 뇌경색 등에 응용되고 있다. 실험연구를 통하여 導痰湯은 고지혈증을 경감시키고 혈전 형성을 억제하는 효능이 보고되었으며³⁻⁸⁾, 導痰湯을 기본으로 한 가감방인 淸熱導痰湯¹⁸⁾, 平胃導痰湯¹⁹⁾, 順氣導痰湯²⁰⁾ 등도 유의한 고지혈증 억제효과가 있는 것으로 보고되어 있다. 또한 導痰湯은 뇌손상에 대하여도 일정한 보호효능을 나타낸다고 하였다⁹⁾. 그러므로 본 연구에서는 고지혈증 상태의 뇌허혈 손상에 대한 導痰湯의 효능을 관찰해보고자 하였다.

중대뇌동맥의 일시적인 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상에 대한 導痰湯의 효능을 TTC염색을 통하여 관찰한바, 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군은 Control군에 비하여 일부 뇌조직 절편에서 유의한 뇌경색 면적의 감소가 관찰되기는 하였으나 전체적으로 뇌경색 체적은 Control군에 비하여 약 8.2% 감소하기는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 이에 비하여 뇌부종에 대해서는 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군은 Control군에 비하여 약 13.1%, $P < 0.01$ 의 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 導痰湯이 뇌경색의 크기를 감소시키는 효능은 명확하지 않으나 뇌부종을 감소시키는 효능은 명확한 것을 보여준다.

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 작용한다²¹⁻²³⁾. 그러므로 본 연구의 결과로 보아 導痰湯은 직접적인 뇌경색을 억제하기보다는 뇌부종을 억제하는 효능에 의하여 뇌손상에 유의한 효능을 발휘하는 것을 추측하게 한다.

뇌허혈에 의하여 뇌부종이 형성되는 기전은 뇌허혈이 일어나면 뇌혈관의 투과성이 항진되고 뇌혈관장벽이 느슨해지게 되며, 이 때 iNOS와 MMP-9의 발현이 관여하는 것으로 알려져 있다^{24,25)}. iNOS는 nitric oxide (NO)를 생성하는 효소의 일종으로 free radical인 NO를 생성시켜 다양한 생리적 및 병리적 작용을 일으킨다. 고농도에서는 뇌경색의 병리기전 뿐만 아니라 뇌허혈이나 외상성 뇌손상과 신경퇴행성 질환에도 관여하고 있다^{26,27)}. 특히 iNOS에 의하여 생성되는 NO는 비교적 장시간 분비되며, 세포내 Ca^{2+} 농도에 비존존적으로 NO를 생성하게 되고, 뇌허혈에서는 뇌경색 크기를 증가시키는 작용을 한다²⁸⁾. 또한 NO는 뇌허혈 또는 염증성으로 유발되는 BBB의 손상에 직접적으로 관여한다는 보고가 아주 많다^{24,29,30)}. BBB의 손상은 뇌경색 등 다양한 뇌조직의 병리적 상태에서 일어나며, 뇌혈관 투과성을 증가시켜서 결과적으로 뇌조직의 부종을 유발하게 된다³¹⁾. 뇌조직에서 iNOS 양성반응세포 수를 측정한다. 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군은 Control군에 비하여 대뇌피질 경계영역과 선조체 모두에서 $P < 0.01$ 의 유의한 iNOS 양성반응세포 수의 감소가 관찰되었다.

MMP-9은 endopeptidase의 일종으로 혈관 기저층의 구

조를 이루는 type IV collagen이나 laminin, fibronectin 같은 세포외기질을 구성하는 분자들을 분해시키는 작용을 한다^{32,33}. 이러한 MMP-9의 효소적 기능은 뇌허혈 손상은 물론 염증이나 동맥경화의 진행과정에서 매우 중요한 역할을 한다^{28,34}. 뇌조직에서 MMP-9 발현의 증가는 BBB를 손상시키고 결과적으로 신경세포의 사망을 유도하며, 뇌허혈에 의한 oxidative stress가 MMP-9 발현을 증가시켜서 BBB 손상을 촉진하는 것으로 보고되어 있다^{35,36}. 뇌조직에서 MMP-9 양성반응세포 수를 측정하면, 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군은 Control군에 비하여 대뇌피질 경계영역에서 $P<0.05$ 의 유의한 MMP-9 양성반응세포 수의 감소가 관찰되었다. 뇌허혈 손상에 의하여 증가된 iNOS와 MMP-9 발현을 유의하게 억제시키는 導痰湯의 작용은 뇌부종을 유의하게 억제하는 導痰湯의 효능을 재차 확인하는 것이며, 또한 작용기전을 보여주는 것이다.

성상아교세포는 BBB의 기본적인 구성요소가 되고, 뇌부종 형성에 직접적으로 관여하고 있다^{22,37}. 또한 뇌조직이 손상 받으면 성상아교세포의 증식 및 비후와 성상아교세포 내에 특이적으로 존재하는 아교섬유성단백질 (GFAP)이 특이적으로 증가하여 반응성 아교증식증 (reactive gliosis)이 일어난다³⁸. 그러므로 성상아교세포의 변화를 GFAP에 대한 면역조직화학적 염색을 통하여 관찰한 바, 導痰湯을 투여한 Dodam-tang군 대뇌피질 경계영역에서 Control군에 비하여 $P<0.05$ 의 유의한 GFAP 양성반응 성상아교세포 수의 감소가 관찰되었다. 이러한 결과 역시 iNOS와 MMP-9 발현을 유의하게 억제시키는 導痰湯의 작용과 함께 생각할 때 導痰湯이 BBB의 손상을 억제하여 뇌부종을 억제하는 기전을 갖는 것을 추측하게 한다.

이러한 연구결과들을 종합해보면, 導痰湯은 직접적인 뇌경색 크기의 감소작용은 미약하나 고지혈증을 억제하고, iNOS 및 MMP-9 발현을 억제함으로써 뇌혈관관문의 손상을 완화하여 뇌부종을 억제하는 효능이 있는 것으로 생각된다.

결론

고지혈증 상태의 뇌허혈 손상에 대한 導痰湯의 효능을 실험적으로 연구하기 위하여, 고지방식을 통하여 고지혈증을 유도한 흰쥐에 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상을 유발하고 導痰湯을 투여한 다음 뇌경색의 크기와 뇌부종 정도, 뇌허혈 손상 및 뇌부종과 관련된 인자들인 iNOS, MMP-9 및 성상아교세포 발현 GFAP의 변화를 면역조직화학염색으로 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 導痰湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌경색 면적을 일부 뇌조직 절편에서 유의하게 감소시켰다.
2. 導痰湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌경색 체적을 감소시켰으나 통계적으로 유의하지는 못하였다.
3. 導痰湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌부종을 유의하게 억제하였다.

4. 導痰湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 iNOS 발현 증가를 대뇌피질 경계영역과 선조체 모두에서 유의하게 억제하였다.
5. 導痰湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 MMP-9 발현 증가를 대뇌피질 경계영역에서 유의하게 억제하였다.
6. 導痰湯은 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 성상아교세포 GFAP 발현 증가를 대뇌피질 경계영역에서 유의하게 억제하였다.

이상의 결과로 보아, 導痰湯은 뇌경색 크기의 감소작용은 미약하나 iNOS 및 MMP-9 발현을 억제함으로써 뇌부종을 억제하는 효능이 있는 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 2013년도 가천대학교 지원(2012-R059)에 의한 결과임.

References

1. Ng YS, Stein J, Ning M, Black-Schaffer RM. Comparison of clinical characteristics and functional outcomes of ischemic stroke in different vascular territories. *Stroke*. 2007 ; 38(8) : 2309-14.
2. Alberts MJ, Ovbiagele B. Current strategies for ischemic stroke prevention: role of multimodal combination therapies. *J Neurol*. 2007 ; 254(10) : 1414-26.
3. Eom YH. Eomssijesaeng-bang. Beijing : Renminweisheng-chubanshe. 1980 : 79.
4. Yun GY, Dongui-imsangbangjehak, Seoul : Myeongbo-chulpansa. 1985 : 99.
5. Wang A, Uibangjipae. Seoul : Seongbo-sa. 1983 : 314-6.
6. Sin WT, Heo JE, Kim TH, Hong SH, Kwon OS, Kim KT, Hong SH. Clinical effect of Dodam-tang on hyperlipidemia. *J Kor Orien Intern Med*. 2007 ; 10(1) : 113-8.
7. Kim YD, Mun BS, Park YS, Kim SG. Effects of Dodamtang on the Hyperlipidemia and Intravascular Coagulation Induced Rabbits. *J Trad Kor Med*. 1994 ; 4(1) : 85-128.
8. Kim TS, An GS. Effect of Dangkwisooosan and Dodamtang on the Intravascular Coagulation Induced by Endotoxin in Rats. *Kor J Orien Pathol*. 1988 ; 3(1) : 91-8.
9. Cho HK, Im SM, An JJ, Choe Y, Kim YJ, Yu HR, Park YC, Seol IC, Hwang CW. Effect of Dodamtang (DDT) on Brain damage and Hypertension. *J Kor Orien Internal Med*. 2001 ; 22(4) : 503-12.

10. 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.
11. Futterman LG, Lemberg L. Stroke risk, cholesterol and statins. *Am J Crit Care.* 1999 ; 8(6) : 416-9.
12. Sin GJ, Park SS. A Study on the level of Serum Lipids in Stroke. *J Korean Inst Orient Med Inform.* 1995 ; 1(1) : 37-55.
13. Kim YS. Integrated clinical approach to stroke. Seoul : Seowon-dang. 1997 : 335-48.
14. Chae IS. Hanbang-imsanghak. Seoul : Daeseong-munhwasa. 1987 : 145-50.
15. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *stroke.* 1989 ; 20(1) : 84-91.
16. 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.
17. Simons LA, McCallum J, Friedlander Y, Simons J. Risk factors for ischemic stroke: Dubbo Study of the elderly. *Stroke.* 1998 ; 29(7) : 1341-6.
18. Lee DS, Sin GJ, Cho GH, Kim YS, Bae HS, Lee KS. Experimental study on the effects of Chungyeuldodamtang upon hypertension and hyperlipidemia. *J Kor Orient Intern Med.* 1992 ; 12(2) : 16-25.
19. Park WH. A Study on The Effects of The Pungwidodamtang on High Lipid Diethylhyperlipidemia Rats. *Kor J Orient Pathol.* 1996 ; 10(2) : 103-11.
20. Park WH, Choe DY, Mun JJ. A Study of the influence of both of Shunqidaotantang and Huayutnag on thrombosis, contysion-hyperemia, and hyperlipidemia. *J Dongguk Resear Instit Orient Med.* 1993 ; 2(1) : 19-54.
21. Hawkins BT, Davis TP. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol Rev.* 2005 ; 57(2) : 173-85.
22. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006 ; 7(1) : 41-53.
23. 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.
24. Thiel VE, Audus KL. Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxid Redox Signal.* 2001 ; 3 : 273-8.
25. Yong VW, Kerkoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci.* 1998 ; 21(2): 75-80.
26. 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(4) : 1077-86.
27. 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(17) : 1985-96.
28. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994 ; 94(6) : 2493-503.
29. 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(12) : 1749-59.
30. Tan KH, Harrington S, Purcell WM, Hurst RD. Peroxynitrite mediates nitric oxide-induced blood-brain barrier damage. *Neurochem Res.* 2004 ; 29(3) : 579-87.
31. 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(2) : 177-92.
32. Yurchenco PD, Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 1990 ; 4(6) : 1577-90.
33. Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LLJ, del Zoppo GJ. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke.* 2004 ; 35(4) : 998-1004.
34. 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) : 360-6.
35. Liu KJ, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2005 ; 39(1) : 71-80.
36. Gasche Y, Copin J-C, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 ; 21(12) : 1393-400.
37. Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular

- physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 2001 ; 24(12) : 719-25.
38. Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol.* 2004 ; 204(4) : 428-37.