동의신경정신과학회지 제22권 제4호(2011년 12월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2011;22(4):201-218

歸脾湯의 濃度別 口腔投與가 白鼠의 虛血性 腦損傷에 미치는 影響

국윤재, 박장호, 김진형, 김향이[1], 강형원, 류영수

원광대학교 한의과대학 신경정신과교실, 원광대학교 한의학 전문대학원 한약자원개발학과[1]

The Dose-dependent Effects of *Guibi-Tang* on Focal Brain Ischemic Injury in Rats

Yun-Jai Gug, Jang-Ho Park, Jin-Hyung Kim, Hyang-Yi Kim[1], Hyung-Won Kang, Yeoung-Su Lyu

Dept. of Oriental Neuropsychiatry Medicine, College of Oriental Medicine, Won-Kwang University
Dept. of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Won-Kwang University[1]

Abstract

Objectives :
The aim of this study was to investigate the effects of *Guibi-Tang*(GBT) on focal brain ischemic injury induced by intraluminal filament insertion in rats.

Methods :
The ischemia was induced by intraluminal filament insertion into middle cerebral artery. Sprague-Dawley rats were divided into five groups, normal group(n=8); control group was ischemia induced and no treatment(n=8); GBT 1X group was ischemia induced and administrated 42.2 mg/ml/kg of *Guibi-Tang* orally(n=8); GBT 3X group was ischemia induced and administrated 126.6 mg/ml/kg of *Guibi-Tang* orally(n=8); GBT 6X group was ischemia induced and administrated 253.2 mg/ml/kg of *Guibi-Tang* orally(n=8) for 21 days. mGluR5, Bax, Bcl-2 and cytochrome C were investigated to observe the effects of *Guibi-Tang* on apoptosis. The effects of *Guibi-Tang* on neuroprotective/apoptotic agents in cresyl violet, choline acetyltranferase(ChAT) with ischemic injury were investigated.

Results :
The intensity of mGluR5 mRNA in the hippocampal CA1 was increased in normal and GBT(*Guibi-Tang*) 1X groups compared with the control group. The intensity of Bax mRNA in the hippocampal CA1 was decreased in normal and GBT 1X groups compared with the control group. However it was increased unexpectedly in GBT 3X group. The intensity of Bcl-2 mRNA in the hippocampal CA1 was increased in normal and GBT 1X groups compared with the control group. The intensity of Bax/Bcl-2 ratio in the hippocampal CA1 was decreased in normal and GBT 1X groups compared with the control group. The intensity of cytochrome C protein in the hippocampal CA1 was decreased in normal, GBT 1X and GBT 6X groups compared with the control group. The density of neurons stained by cresyl violet and ChAT was increased in normal and GBT 1X groups compared with the control group.

Conclusions :
These results suggest that *Guibi-Tang* may have protective effect on vascular dementia.

Key Words :
Guibi-Tang, herb, vascular dementia, ischemic injury, intraluminal filament insertion

투고 : 2011. 08. 15. 수정 : 2011. 09. 06. 채택 : 2011. 11. 01.
교신저자 : 류영수, 전북 전주시 덕진구 덕진동 2가 142-1 원광대학교 부속 전주한방병원 한방신경정신과
Tel) 063-270-1021, Fax) 063-270-1594, E-mail) yslyu@wonkwang.ac.kr
이 논문은 2011년 8월 원광대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 박사학위 논문임

Ⅰ. 서 론

腦虛血에 의한 신경세포의 손상은 초기와 후기로 나누어지는데 초기에는 대부분 腦卒中에 의해 유발된 虛血로 인해 일시적 혈관폐쇄가 일어나 산소부족으로 신경세포가 괴사하게 되고, 후기에는 재관류 후 활성산소에 의해 apoptosis, 즉 지연성 세포사(delayed neuronal death)가 일어나게 된다[1,2].

허혈성 신경세포 손상은 血管性 痴呆의 주된 원인으로[3] 다른 痴呆와 달리 예방과 치료에 가능성이 많은데도 불구하고[4] 상대적으로 많은 연구가 이루어지지는 않고 있다[5].

腦虛血을 유발하는 동물실험 모델로는 全腦虛血을 유발하는 방법[6-8]과 局所 虛血을 유발하는 방법[9]이 있는데, 전자의 방법으로 葛根[10], 凉膈散火湯[11], 후자의 방법으로 星香正氣散[12], 天麻[13], 釣鉤藤[14]의 유효성을 확인한 실험적 연구가 있었다. 본 실험에서는 白鼠의 우측 중대뇌동맥을 폐색시켜 腦虛血을 야기한 후 재관류를 시켜 局所 腦虛血을 유발하는 방법을 사용하였는데, 이 방법은 前腦 이외의 부분에서는 혈류 흐름에 별다른 영향이 없어 腦虛血 유발 중에 白鼠의 사망을 최소화 할 수 있을 뿐만 아니라 시술이 비교적 용이하여 널리 사용되고 있다[15].

본 실험에 사용된 歸脾湯은 항산화효과[16], glutamate에 의한 성상세포 손상에서의 회복능[17,18], 免疫細胞의 機能 활성[19], 止血作用[20], 그리고 鎭靜 및 鎭痛作用[21] 등의 실험적 연구가 있으나, 아직까지 중대뇌동맥 결찰을 이용한 局所 腦虛血 모델에서 歸脾湯을 이용한 실험적 연구는 접하기 힘든 실정이다.

이에 著者는 뇌기능 활성에 관한 실험적 유효성이 밝혀진 歸脾湯의 농도별 구강투여가 실험적으로 허혈성 국소 뇌손상을 일으킨 腦虛血 모델에 미치는 영향을 관찰해보고자, hippocampus의 CA1 부위에서 뇌신경세포 독성 및 사멸과 관련된 인자인 mGluR5, Bax, Bcl-2 및 cytochrome C의 발현을 전기영동법에 의하여 분석해보고, 또한 뇌신경 보호효과를 나타내는 cresyl violet 신경보호효과 관찰과 뇌신경 전달수용체와 관련된 ChAT 발현 등을 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 샘타코로부터 구입한 220~230 g, 7주령의 수컷 Sprague-Dawley계 白鼠로, 일주일 정도 실험실 환경(온도는 22±3℃, 습도는 50±10%)에 적응시킨 후 사용하였다. 각 cage당 3~4마리씩 넣어 두었으며, 물과 사료(pellet, GMO, Korea)를 자유로이 섭취하도록 하였다.

2. 약 재

본 실험에 사용된 歸脾湯은 『東醫寶鑑』[22]에 의거하였으며, 내용과 1貼 分量은 다음 과 같다. 약재는 원광대학교 부속 전주한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였다.

Table Ⅰ. Prescription

韓藥名	生藥名	用量
當歸	Angelicae gigantis Radix	4 g
龍眼肉	Longanae Arillus	4 g
酸棗仁 炒	Zizyphi Spinosae Semen	4 g
遠志 製	Polygalae Radix	4 g
人蔘	Ginseng Radix Alba	4 g
黃芪	Astragali Radix	4 g
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	4 g
白茯神	Hoelen cum Radix	4 g
木香	Aucklandiae Radix	2 g
甘草	Glycyrrhizae Radix	1.5 g
生薑	Zingiberis Rhizoma Crudus	5片(6 g)
大棗	Zizyphi jujubae Fructus	2個(4 g)
	Total Amount	45.5 g

3. 검액의 조제

歸脾湯 2첩 분량(91 g)을 증류수 1,000 ml와 함께 24시간 동안 증류수를 계속 보충해가며 끓인 다음 여과지로 여과한 후, 고속 원심분리기(Centricon T-42K, Italy)로 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 rotary vaccum evaporator(Buchi, Netherland)로 수분을 증발시켜 50 ml로 감압 농축하였으며, 농축된 검액을 동결건조기(삼원, 한국)로 -70℃에서 동결 건조시켜 최종적으로 15.2 g의 시료를 얻었다(수득율 16.7%). 최종적으로 얻어진 시료는 경구투여를 위하여 각 농도별로 증류수에 희석하여 사용하였다.

4. 실험군의 구성 및 절차

실험군들은 白鼠를 정상(normal, n=8)군, Ischemia 유발(control, n=8) 군, ischemia 유발 후 歸脾湯 각 1배 구강투여군(이하 GBT 1X군, 42.2 mg/ml, n=8), 3배 구강투여군(이하 GBT 3X군, 126.6 mg/ml, n=8), 6배 구강투여군(이하 GBT 6X군, 253.2 mg/ml, n=8)으로 5군으로 나누었다.

Ischemia 유발 3시간 후부터 각 군은 1回/1日(오전 10시) 처치를 시작하여, 21일간 歸脾湯을 각각 1.5 ml씩 구강 투여한 다음 22일부터 白鼠를 관류 고정하여 조직검사를 하였다.

5. Occlusion에 의한 허혈성 국소 뇌손상 유발

국소 腦虛血은 Zea Longa[9] 등의 방법에 따라 우측중대뇌동맥을 폐색(MCAO, middle cerebral artery occlusion)시켜 만들었다. 白鼠를 70% N_2와 30% O_2가 혼합된 5% isoflurane을 이용하여 흡입마취 유도를 한 후 2% isoflurane으로 계속 유지시켰다.

白鼠의 직장에 체온측정 probe를 삽입하고 가온등과 가온 메트리스를 이용하여 실험기간동안 체온을 38℃로 유지하였다. 우측 중대뇌동맥을 폐색하기 위하여 경부 정중선을 따라 피부를 절개하고 흉골혀근과 흉골저작근 사이에 우측총경동맥을 노출한 후 우측내경동맥의 원위부를 최대한 확보하고 난후 혈관 미세클립(WPI, USA)을 이용하여 결찰하였고, 우측내경동맥과 intraluminal filament사이의 출혈을 방지하기 위하여 6-0 silk suture실을 이용하여 우측총경동맥 근위부 및 우측외경동맥 분지부를 결찰하였다. 우측총경동맥에서 우측외경동맥과 우측내경동맥의 분지부에서 1 cm 정도 되는 우측 내경동맥의 원위부에 미세혈관 가위(WPI, USA)를 사용하여 구멍을 내었다. 미세혈관클립을 제거한 후 우측내경동맥 내로 20 mm의 치과 인상제(Durelon, Germany)가 발라진 intraluminal filament(직경 0.28 mm, rounded tip)를 우측 내경동맥상의 구멍에 intraluminal filament가 faint resistance의 느낌이 느껴질 때까지(약 17 mm)부드럽게 삽입하여 그 끝이 우측중대뇌동맥까지 도달하도록 한 후, 우측내경동맥상의 intraluminal filament 삽입부위를 가볍게 묶어 출혈을 방지하였다. 이를 2시간 동안 유지한 후 우측총경동맥과 우측외경동맥의 결찰부위를 풀고, 혈류차단 인상제가 중대뇌동맥 내에 위치하도록 intraluminal filament를 제거하고 측부순환을 통하여 재관류를 시켰다.

6. Total RNA 분리 및 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)

1) Total RNA 분리

Total RNA의 분리는 hippocampus 부위의 조직을 1 ml TRIZOL reagent(MRC, USA)로 균질

화하고 균질액에 대해 1 ㎖의 chloroform(Sigma, USA)을 가하여 15초 동안 흔들어 잘 혼합한 후, 실온상태에서 15분 방치하고 난 다음 세포 잔유물을 제거하기 위하여 4℃, 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리로 얻어진 상층액과 1 ㎖의 isopropanol(Sigma, USA)을 첨가하여 실온상태에서 5분 동안 방치한 후 RNA pellet을 얻기 위하여 4℃, 14,000 rpm에서 8분간 원심분리하고, 원심분리로 생긴 pellet에 냉장보관된 70% ethanol과 함께 DEPC를 넣고 4℃, 7,500 rpm에서 5분간 원심분리 후 pellet만 남기고 모두 제거하고, 남은 ethanol은 실온에서 10분간 방치시켜 건조시킨 다음 DEPC-treated water에 녹여 spectrophotometer(Eppendorf, Germany)에서 OD_{260} 값을 읽어 RNA의 순도 및 농도를 정량하였다. 이들 뇌조직의 total RNA는 사용시까지 -70℃에서 보관하였다.

2) RT-PCR

분리된 total RNA 3 ㎍과 2.5 ㎕ Oligo(dT), DEPC-treated water를 RT Premix(Bioneer, Korea)에 넣어 Mastercycler gradient(Eppendorf, Germany)를 이용하여 50 ㎕ cDNA를 합성하여 PCR 증폭을 위한 template로 사용하였다. Reverse transcription temperature cycle은 42℃에서 1시간 동안 cDNA synthesis, 94℃에서 5분 동안 denature 그리고 4℃에서 5분 동안 cooling시키는 단계를 거쳤다.

이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)(sense primer: 5′-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3′, antisense primer: 5′-CCTGCTTTCACCACCTTCTTG-3′)를 internal control로 사용하였다. 白鼠의 특이 primer는 PCR-premix kit(Bioneer, Korea)를 사용하였다. Bax polymerase chain reaction은 cDNA 2 ㎕, Bax sense primer 1 ㎕, Bax antisense primer 1 ㎕, DEPC-treated water를 PCR premix(Bioneer, Korea)에 넣는다. PCR temperature cycle은 cDNA의 증폭을 위하여 95℃에서 300초 동안 pre-denaturation, 94℃에서 40초 동안 melting, 54℃에서 40초 동안 annealing, 72℃에서 90초 동안 extension하는 과정을 30회 반복 수행하고 마지막 cycle에서 72℃에서 600초 동안 extension 단계를 거쳐 Bax 유전자증폭을 primer(sense primer: 5′-GTTTCAAGGATCGAGCAG-3′, antisense primer: 5′-CATCTTCTTCCAGATGGTGA-3′)를 이용하여 Mastercycler gradient(Eppendorf, Germany)에서 시행하였다.

Bcl-2 polymerase chain reaction은 cDNA 2 ㎕, Bcl-2 sense primer 1 ㎕, Bcl-2 antisense primer 1 ㎕, DEPC-treated water를 PCR premix (Bioneer, Korea)에 넣는다. PCR temperature cycle은 cDNA의 증폭을 위하여 95℃에서 300초 동안 pre-denaturation, 94℃에서 40초 동안 melting, 55℃에서 40초 동안 annealing, 72℃에서 90초 동안 extension하는 과정을 30회 반복 수행하고 마지막 cycle에서 72℃에서 600초 동안 extension 단계를 거쳐 Bcl-2 유전자증폭을 primer(sense primer: 5′-ACTTTGCACAGATGTCCAGT-3′, antisense primer: 5′-CGGTTCAGGTACTCAGTCAT-3′)를 이용하여 Mastercycler gradient(Eppendorf, Germany)에서 시행하였다.

mGluR5 polymerase chain reaction은 cDNA 2 ㎕, mGluR5 sense primer 1 ㎕, mGluR5 antisense primer 1 ㎕, DEPC-treated water를 PCR premix(Bioneer, Korea)에 넣는다. PCR temperature cycle은 cDNA의 증폭을 위하여 95℃에서 300초 동안 pre-denaturation, 94℃에서 40초 동안 melting, 55℃에서 40초 동안 annealing, 72℃에서 90초 동안 extension하는 과정을 30회 반복 수행하고 마지막 cycle에서 72℃에서 600초 동

안 extension 단계를 거쳐 mGluR5 유전자증폭을 primer(sense primer: 5′-TCCAATCTGCTCCTCCTACC-3′, antisense primer: 5′-CAACGATGAAGAACTCTGCG-3′)를 이용하여 Mastercycler gradient(Eppendorf, Germany)에서 시행하였다.

이렇게 증폭된 DNA를 ethidium bromide (EtBr, 10 ㎎/㎖)를 포함한 1.5% agarose gel상에서 0.5X TBE buffer(80 mM Tris-HCL, 80 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3)로 75 V에서 전기 영동시킨 후 UV transilluminator(Daihan Scientific, Korea)에 넣고 감광시킨다. Intensity는 Kodak MI Software(Kodak, USA)로 정량하였다.

7. Western blotting

1) Protein preparation

적출된 뇌의 hippocampus를 신속히 액체 질소에 급속 냉동시키고 분석할 때까지 -70℃에서 보관하여, cytochrome C 단백발현을 Western blot 방식을 이용하여 관찰했다. 白鼠의 hippocampus에 NP40 lysis buffer(pH 8.0 50 mM Tris HCl 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF (Phenylmethyl-sulfonylfluoride), 1% NP-40, 1 mM Benzamidine, 1 ㎍/㎖ Trypsin inhibitor)와 1X protease cocktail inhibitor(Roche) 혼합액 500 ㎕를 넣어 homogenization한다. 이 sample을 20분간 ice 상태에 놓아둔 다음 12,000 rpm에서 20분간(4℃ 상태) 원심분리한 후 상층액을 분리하고 bicinchonic acid assay kit(Bio Rad, CA)를 사용해 정량하였다. 96 well plate에 BCA 용액(A:B=20:1) 100 ㎕을 넣고 protein 5 ㎕를 넣은 후 37℃에서 20분간 방치시킨 후, 570 ㎚에서 ELISA reader(Molecular Devices, USA)를 사용해 측정하였다.

2) Electrophoresis

15% polyacrylamide resolving gel은 30분간 굳히고, 4% polyacrylamide staking gel은 resolving gel 위에 붓고 comb을 꽂아 30분간 굳힌다. 각 sample은 4X SDS sample buffer(pH 6.8 100 mM Tris, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 200 mM DTT, 10% 2-mercaptoethanol) 5 ㎕에 정량된 단백질 sample을 넣어 100℃에서 5분간 끓인다. Gel은 Gel running tank에 장착하고 pH 8.3의 running buffer(0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 10% SDS)를 붓는다. 100 V(200 ㎃)로 전기 영동한다.

3) Electrotransfer

전기영동이 끝난 gel은 transfer buffer(25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol)에 filter paper, gel, nitrocellulose membrane 순서로 얹고 20 mA에서 20시간 transfer한다. Membrane은 5% nonfat milk와 TBST(0.1% Tween 20 in pH 7.4 Tris-based saline buffer)에 1시간 동안 blocking하고 TBST로 3회 washing한다. Cytochrome C antibody(BD, USA)를 TBST(1:2000 dilution)에 희석시켜 4℃에서 overnight한다. TBST로 4회 washing 후 horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG(Cell signalling, USA)를 TBST (1:2000 dilution)에 희석시켜 1시간 배양하고 TBST로 4회 washing한다. Membrane은 TBST를 제거한 후 enhanced chemiluminescence plus (Amersham, UK)를 넣은 후 3분 동안 반응시킨다. 발현된 cytochrome C의 band는 ECL film (Amersham, UK)을 develper(vivid, 1:5)와 fixer (vivid, 1:5)에서 현상하였다. 발현된 cytochrome C의 intensity는 Kodak MI Software(Kodak, USA)로 정량하였다.

8. Immunohistochemistry

1) Tissue preparation

白鼠를 25% urethane으로 마취시킨 후, 0.9% saline 200 ㎖에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액(fixative) 800 ㎖로 심장을 통해 관류하였다. 처음 고정액 200 ㎖는 10분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 800 ㎖는 50 분간에 걸쳐 천천히 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 경과 후 고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4℃에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 hippocampus 부위를 30 ㎛의 두께로 잘랐다.

2) Cresyl violet 염색

30㎛로 절편된 조직을 PBS로 몇 차례 씻고 xylene(5 min), 100% alcohol(2 min), 95% alcohol (1 min), 70% alcohol(1 min), D.W.(2 min)순으로 옮겨 담아 탈지, 탈수시킨 다음 cresyl violet buffer(5 min)로 염색을 하였다. 염색이 끝난 조직은 광학현미경(Olympus, Japan)을 사용하여 40배로 확대하여 관찰하였고, 신경세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, USA)을 이용하여 측정하였다.

3) Choline acetyltransferase(ChAT)염색

뇌 조직을 PBS에 3회 정도 세척한 후 ChAT 유전자 발현 연구에 다용되고 있는 primary sheep ChAT anti-body(1:1,500, polyclonal, Cambridge Research Bio-chemicals, Wilmington, DE, USA)를 사용하였다. 1차 항체는 PBS에 0.3% Triton X-100을 첨가한 PBST에서 2% 토끼 혈청과 0.1% sodium azide(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 2000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4℃에서 72시간 동안 지속적으로 흔들어 주면서 배양하였다. 그 후 3번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음 biotinylated universal secondary antibody(Quick kit : Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 3번 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 streptavidin peroxidase preformed complex(Quick kit : Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 위치시켰다. PBS로 몇 번 헹군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzidine (DAB)을 사용하여 발현시켰다. 통제군 조직에는 1차 항체를 생략하거나 nonimmuno sheep serum으로 대체하였는데, 이들 두 경우 다 특정 표지가 나타나지 않았다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 광학현미경(Nikon, Japan)으로 40배로 확대하여 hippocampus에서 ChAT-immunoreactive 신경 세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, USA)을 이용하여 측정하였다.

9. 통계처리

모든 측정값은 Excel statistic program(Excel 2002, Microsoft, USA)을 이용하여 평균치와 표준오차(mean±standard error)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Window용 SPSS (ver10.0.5, SPSS, USA)를 사용하여 비모수적 방법으로 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 각 실험군은 대조군에 비하여 $\alpha=0.05$ 수준($p<0.05$)과 $\alpha=0.01$ 수준($p<0.01$)에서 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 실험성적

1. mGluR5 발현

Hippocampus CA1 부위의 mGluR5 발현정도를 관찰한 결과, normal군은 104.8±4.47(*1000 OD), control군은 76.0±0.66(*1000 OD), GBT 1X군은 78.2±0.37(*1000 OD), GBT 3X군은 64.7±4.65(*1000 OD), GBT 6X군은 57.7±6.75(*1000 OD)로 각각 나타났으며, control군에 비해 GBT 1X군에서 유의하게($p<0.05$) 증가하였다(Fig. 1).

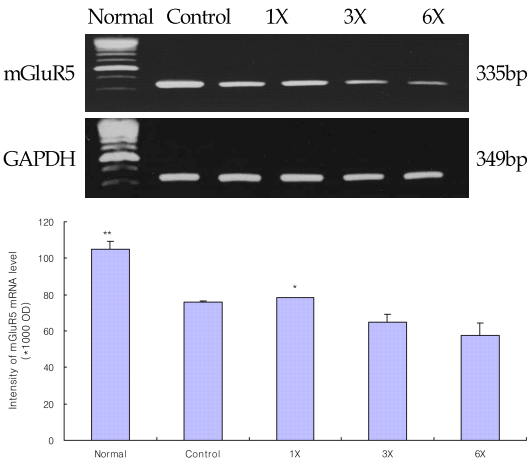


Fig. 1. Effect of *Guibi-Tang* oral administration on the intensity of mGluR5 mRNA in the left hippocampus in rats.
Results are shown as mean±SE. GAPDH, a housekeeping gene, was used as an internal control. Normal, intactness group; control group, no treatment group after being ischemia induced; 1X, 3X, 6X ; administered 42.2 mg/ml/kg, 126.6 mg/ml/kg and 253.2 mg/ml/kg of the *Guibi-Tang* orally in rats. *, P<0.05 , **,P<0.01 as compared with the control group.

2. Bax 발현

Hippocampus CA1 부위의 Bax 발현정도를 관찰한 결과 normal군은 57.2±0.65(*1000 OD), control군은 80.9±0.92(*1000 OD), GBT 1X군은 73.3±0.51(*1000 OD), GBT 3X군은 90.7±2.04(*1000 OD), GBT 6X군은 85.1±4.29(*1000 OD)로 각각 나타났으며, control군에 비해 GBT 1X군에서 유의하게($p<0.05$) 감소하였고, 3X군에서는 유의하게($p<0.05$) 증가하였다(Fig. 2).

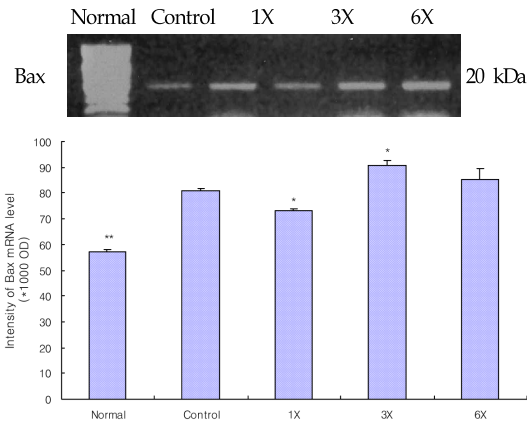


Fig. 2. Effect of *Guibi-Tang* oral administration on the intensity of Bax mRNA in the left hippocampus in rats.
Results are shown as mean±SE. Normal, intactness group; control group, no treatment group after being ischemia induced; 1X, 3X, 6X; administered 42.2 mg/ml/kg, 126.6 mg/ml/kg and 253.2 mg/ml/kg of the *Guibi-Tang* orally in rats. *, P<0.05 , **,P<0.01 as compared with the control group.

3. Bcl-2 발현

Hippocampus CA1 부위의 Bcl-2 발현정도를 관찰한 결과 normal군은 66.0±5.63(*1000 OD), control군은 82.9±1.11(*1000 OD), GBT 1X군은 88.6±1.37(*1000 OD), GBT 3X군은 81.0±2.66(*1000 OD), GBT 6X군은 83.3±0.94(*1000 OD)로 각각 나타났으며, control군에 비해 1X군이 유의하게($p<0.05$) 증가하였다(Fig. 3).

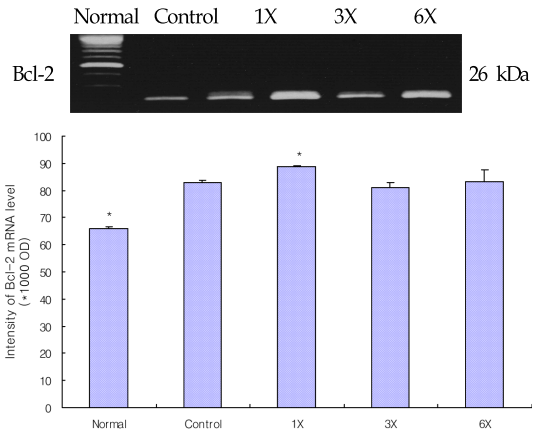


Fig. 3. Effect of *Guibi-Tang* oral administration on the intensity of Bcl-2 mRNA in the left hippocampus in rats.
Results are shown as mean±SE. Normal, intactness group; control group, no treatment group after being ischemia induced; 1X, 3X, 6X; administered 42.2 mg/ml/kg, 126.6 mg/ml/kg and 253.2 mg/ml /kg of the *Guibi-Tang* orally in rats. *, P<0.05 as compared with the control group.

4. Bax/Bcl-2 ratio 변화

Hippocampus CA1 부위의 Bax/Bcl-2 ratio 변화를 관찰한 결과, normal군은 0.9±0.09(*1000 OD), control군은 1.0±0.00(*1000 OD), GBT 1X군은 0.8±0.01(*1000 OD), GBT 3X군은 1.1±0.06 (*1000 OD), GBT 6X군은 1.0±0.05(*1000 OD)로 각각 나타났으며, control군에 비해 GBT 1X군에서 유의한(p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 4).

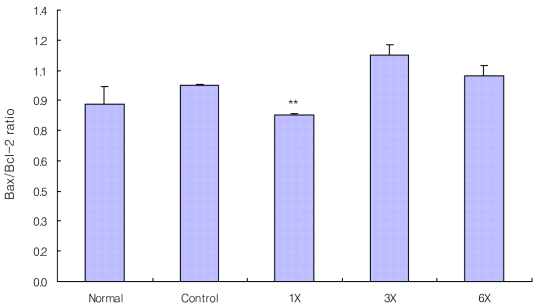


Fig. 4. Effect of *Guibi-Tang* oral administration on the intensity of Bax/Bcl-2 ratio in the left hippocampus in rats.
Results are shown as mean±SE. Normal, intactness group; control group, no treatment group after being ischemia induced; 1X, 3X, 6X; administered 42.2 mg/ml/kg, 126.6 mg/ml/kg and 253.2 mg/ml /kg of the *Guibi-Tang* orally in rats. *, P<0.01 as compared with the control group.

5. Cytochrome C 발현

Hippocampus CA1 부위의 cytochrome C 발현정도를 관찰한 결과, normal군은 123.4±2.70 (*1000 OD), control군은 155.3±4.34(*1000 OD), GBT 1X군은 138.3±2.06(*1000 OD), GBT 3X군은 143.0±3.99(*1000 OD), GBT 6X군은 130.9±3.94 (*1000 OD)로 각각 나타났으며, control군에 비해 GBT 1X군(p<0.05), GBT 6X군(p<0.05)에서 각각 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

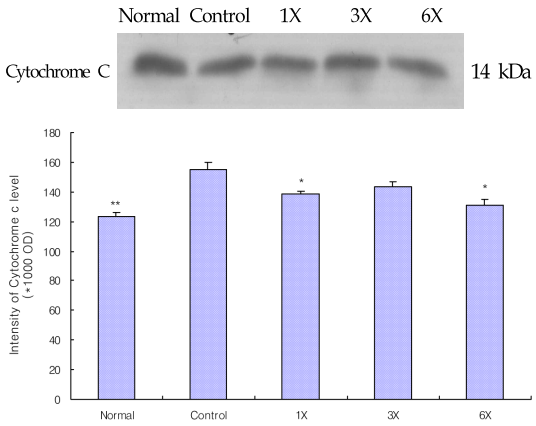


Fig. 5. Effect of *Guibi-Tang* oral administration on the intensity of cytochrome C protein in the left hippocampus in rats.
Results are shown as mean±SE. Normal, intactness group; control group, no treatment group after being ischemia induced; 1X, 3X, 6X; administered 42.2 mg/ml/kg, 126.6 mg/ml/kg and 253.2 mg/ml /kg of the *Guibi-Tang* orally in rats. *, P<0.05, **, P<0.01 as compared with the control group.

6. Cresyl violet을 이용한 신경세포 손상 방어효과

Hippocampus의 CA1 부위를 cresyl violet에 염색하여 신경세포의 손상방어 효과를 정량적으로 평가한 결과, normal군은 66.9±2.34(Density), control군은 53.9±3.77(Density), GBT 1X군은 63.7±2.28(Density), GBT 3X군은 60.9±3.81(Density), GBT 6X군은 60.4±2.48(Density)로 각각 나타났으며, control군에 비해 GBT 1X군에서 유의하게 ($p<0.05$) 증가하였다(Fig. 6).

Hippocampus CA1 부위를 cresyl violet에 염색하여 신경세포의 손상방어 효과를 조직학적으로 관찰한 결과, normal군은 control군에 비하여 신경세포 발현의 농도가 높게 나타났으며, GBT 1X군은 control에 비하여 높은 상태를 보였고, GBT 3X과 GBT 6X군은 control에 비하여 신경세포의 발현 농도는 비슷한 정도로 나타났다(Fig. 7).

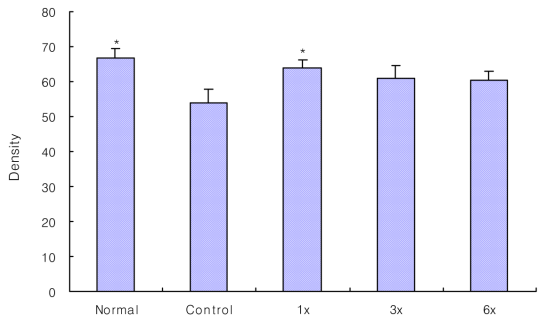


Fig. 6. Effect of *Guibi-Tang* oral administration on the density of cresyl violet-stained neural cell sections in the left hippocampus in rats.
Results are shown as mean±SE. Normal, intactness group; control group, no treatment group after being ischemia induced; 1X, 3X, 6X; administered 42.2 mg/ml/kg, 126.6 mg/ml/kg and 253.2 mg/ml /kg of the *Guibi-Tang* orally in rats. *, $P<0.05$, as compared with the control group.

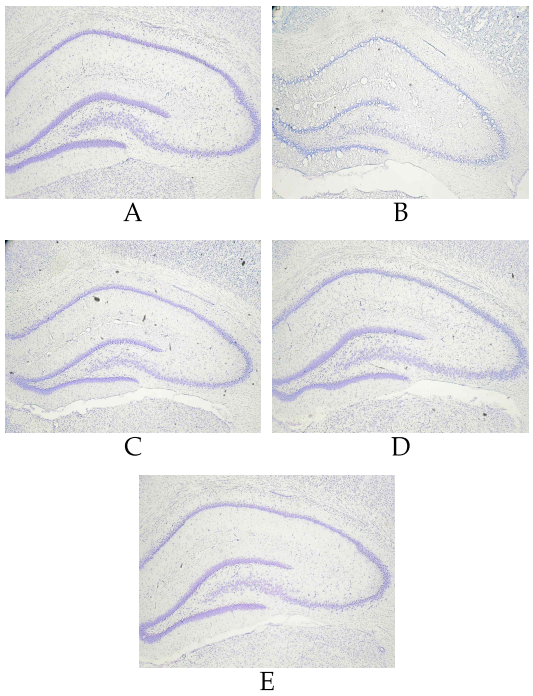


Fig. 7. Representative photomicrographs of coronal sections in the hippocampal CA1.
A, normal group; B, control group; C, GBT 1X group; D, GBT 3X group; E, GBT 6X group. Cresyl violet-stain. ×40.

7. ChAT 발현

Hippocampus CA1 부위의 ChAT-immunoreactive 신경세포 발현 정도를 정량적으로 평가한 결과, normal군은 43.9±1.42(Density), control군은 27.6±1.91(Density), GBT 1X군은 33.1±1.68(Density), GBT 3X군은 31.1±2.21(Density), GBT 6X군은 30.0±1.21(Density)로 각각 나타났으며, control군에 비해 GBT 1X군($p<0.05$)에서 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

Hippocampus CA1 부위의 ChAT-immunoreactive 신경세포 발현 상태를 조직학적으로 관찰한 결과, normal군은 control군에 비하여 신경세포 발현의 농도가 높게 나타났으며, GBT 1X군은 control에 비하여 높은 상태를 유지하였고, GBT 3X군과

GBT 6X군은 control에 비하여 비슷한 상태의 경향을 보였다(Fig. 9).

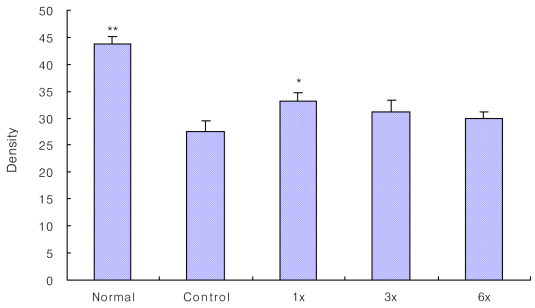


Fig. 8. Effect of *Guibi-Tang* oral administration on the density of choline acetyltransferase(ChAT)-stained sections in the left hippocampus in rats.

Results are shown as mean±SE. Normal, intactness group; control group, no treatment group after being ischemia induced; 1X, 3X, 6X; administered 42.2 mg/ml/kg, 126.6 mg/ml/kg and 253.2 mg/ml /kg of the *Guibi-Tang* orally in rats. *, P<0.05, **, P<0.01 as compared with the control group.

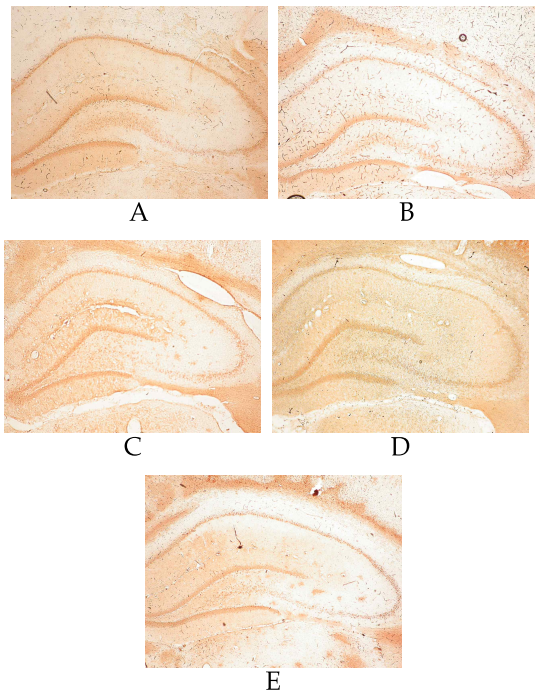


Fig. 9. Representative photomicrographs of coronal sections in the hippocampal CA1.

A, normal group; B, control group; C, GBT 1X group; D, GBT 3X group; E, GBT 6X group. Cresyl violet-stain. ×40.

Ⅳ. 고 찰

대표적인 뇌의 퇴행성 질환으로 中風과 痴呆를 들 수 있는데 모두 腦虛血에 의한 변성이 주된 원인으로 알려져 있다. 腦虛血에 의한 신경세포의 손상기전은 그 시기에 따라 초기와 후기로 나누어 볼 수 있다. 대부분의 腦虛血은 초기에 일시적 혈관폐쇄로 인해 혈류의 제한을 받아 조직의 산소와 포도당 고갈에 의한 에너지 대사 이상이 유발되며, 신경연접부위로 방출된 glutamate의 재흡수가 방해를 받아 세포사이 공간에 glutamate의 과다 축적이 일어나고 세포막 투과성에 변화가 일어나 Ca^{2+}등 양이온의 세포내 대량 유입이 일어난다. 세포는 결국 산소와 혈당 공급의 소실로 acidosis와 세포부종 및 단백질 변성 등이 일어나 신경세포가 괴사하여 사망하게 된다[23]. 후기에는 재관류 후 세포막의 붕괴와 에너지 생산과정의 와해로 세포대사의 변화가 일어나 허혈 상태보다 더욱 심한 조직손상을 가중시키는 apoptosis, 즉 지연성 세포사(delayed neuronal death)가 일어나는데[2], 허혈 후 주어진 자극에 대한 예민성 증가에 의한 신경세포의 과활동, 칼슘을 매개로 하는 글루탐산 흥분독성, 미토콘드리아 손상과 단백질 합성의 장애, 유리산소기에 의한 손상, 에너지 대사와 뇌혈액 순환이상 등이 관여할 것으로 여겨지고 있으며[24], 최근 치료약물로 glutamate receptor antagonists[25], calcium channel antagoist[26], GABA neurotransmission 촉진제[27], NOS inhibitions[28], antidoxidants[29]등이 연구되고 있으나 효과와 안정성문제가 제기되고 있다. 따라서 신경세포손상을 최소화하기 위해서는 우선 혈류량을 다시 회

복시켜 주어야 하며, 허혈성 신경세포손상의 기전을 차단하여 신경세포의 사망을 방지하여야 한다. 이러한 痴呆의 주원인인 腦虛血에 대해 근래에는 주로 前者에 대한 연구가 대부분이었으나 현재는 後者에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[1,2].

미국의 경우 알쯔하이머 병이 전체 痴呆 환자의 50~60%, 血管性 痴呆가 15~20%, 알쯔하이머병과 血管性 痴呆를 함께 갖는 경우가 15~20%, 기타가 약 10~20% 되는 것으로 추정되고 있다[30-33].

알쯔하이머형 痴呆는 점진적인 뇌위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 한 원발성 퇴행성 대뇌질환으로[34,35], 신경반 구조의 주된 구성 성분이며 amyloid precursor protein(APP)로 부터 잘려 나온 amyloid β protein(이하 Aβ)이 되기 직전의 물질로 추정되는 C 단백질이 주된 병인 물질로 알려지고 있다[36].

이와는 달리 血管性 痴呆는 뇌혈관 병변으로 뇌의 기질성 장애에 의해, 발달된 지적 기능이 지속적으로 저하된 상태로 대다수는 腦卒中 이후에 나타난다[30]. 그래서 痴呆와 원인적으로 관련이 있다고 판단되는 뇌혈관 질환의 증거가 있어야 血管性 痴呆라고 할 수 있다[34]. 腦卒中에 의한 뇌신경세포의 손상은 허혈로 야기되는 산소부족에 의한 것과 재관류시에 나타나는 활성산소에 의한 것이 있는데, 대부분의 腦虛血은 일시적이며 腦虛血 당시보다는 재관류시에 산소가 조직으로 재공급될 때 활성산소가 생성되어 조직 손상이 더욱 강하게 일어난다[37].

뇌혈관 질환이 우리나라에서 발병률이 높고[3] 다른 痴呆와 달리 血管性 痴呆는 예방과 치료에 가능성이 많은데도 불구하고[4] 상대적으로 많은 연구가 이루어지지는 않고 있다[5].

韓醫學界에서 최근에 血管性 痴呆에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 실험적으로 염[38]과 문[39]은 hypoxia-reoxygenation에 의해 손상받은 neuroblastoma 2a cells을 대상으로 健腦湯, 淸肺瀉肝湯이 LDH, MTT assay에서 유의한 효과를 나타내었다고 하였다.

腦虛血을 유발하는 동물실험 모델로는 전뇌허혈을 유발하는 방법[6-8]과 국소 허혈을 유발하는 방법[9]이 있다. 전뇌 허혈을 유발하는 방법으로는 Pulsinelli WA 등의 양측 추골동맥 및 양측 경동맥 결찰법[6], Smith ML등의 양측 경동맥 결찰 및 저혈압유도법[7], Ogata J등의 선천성 고혈압 白鼠에서의 양측 경동맥 결찰법[8] 등이 있고, 한약 처방을 이용한 실험으로는 부[10]가 TGI (transient global ischemia) 방식을 적용한 모델에서 추체신경세포를 조직학적으로 관찰하여 葛根이 신경세포 보호효과를 나타낸다고 하였고, 박[11]이 TGI(BCAO) 방식을 이용한 모델에서 추체신경세포의 변화와 HSP72의 발현을 면역조직화학 염색을 통하여 관찰한 결과 凉膈散火湯이 腦虛血 損傷에 유의한 효능이 있다고 하였다. 국소 허혈을 유발하는 방법으로는 Zea Longa 등의 중대뇌동맥 결찰법[9] 등이 있는데, 한약 처방을 이용한 실험으로 이[40]는 MCAO 방식을 이용한 기억력 손상 모델에서 Morris 수중미로와 방사형 미로, 조직화학적 기법을 이용하여 黃連解毒湯·祛風至寶丹·加味四物湯이 학습과 기억손상에 대한 회복을 증진시키고 신경세포 보호효과를 보여준다고 하였고, 석[41]과 김[12]은 MCAO 방식을 이용한 모델에서 腦梗塞 부위의 용적을 측정하고 피라미드 신경세포의 변화를 광학현미경으로 관찰한 결과 각각 Hirudin 藥鍼[41], 星香正氣散[12]이 腦虛血로 인한 신경세포 손상에 대하여 효과를 보인다고 하였으며, 김[42]은 NMDA(*N*-methyl-*D*-aspartate), AMPA(alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), kainate로 뇌신경세포 손상을 유발시키는 방식과 BSO, Fe2+

등의 free radical로 뇌신경세포 손상을 유발시키는 방식, MCAO 방식을 이용한 모델에서 加味六味地黃湯이 뇌손상을 억제하고 뇌신경세포 손상을 보호한다고 하였다. 또 김[13], 이[43], 이[14], 김[44], 안[45]은 4-vessel occlusion에 의한 TFI(transient forebrain ischemia) 모델에서 체온에 대한 영향과 면역조직화학적 기법을 통한 관찰 결과 각각 天麻[13], 黃芩[43], 釣鉤藤[14], 石菖蒲[44], 大黃[45]이 腦虛血 損傷에 유의한 효능이 있다고 하였다.

본 실험에서는 白鼠의 중대뇌동맥 폐쇄를 통해 腦虛血을 야기하는 방법을 사용하였는데 이러한 방법은 腦虛血이 前腦 부분에만 국한되고 後腦 부분에서는 혈류흐름에 영향을 주지 않기 때문에 腦虛血 유발 중에 白鼠의 사망을 최소화할 수 있을 뿐만 아니라 시술이 비교적 용이하고, 두개골 절개가 필요 없어 손상 범위가 넓지 않아 널리 사용되고 있는 방법이다[15].

白鼠의 뇌에 공급되는 중대뇌동맥을 차단한 후 주위 혈관을 통해 재관류하게 되면 5-7일 경과 후에 apoptosis와 비슷한 세포 손상과 인지 및 학습장애를 일으키게 되는데[31,46], 신경세포의 손상은 다른 부위에 비해 hippocampus의 CA1 pyramidal neuron 등에서 선택적으로 발생 하게 되며 그 기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다[47].

血管性 痴呆에 대한 여러 가지 處方 중 본 연구에서는 歸脾湯으로 실험하였는데, 歸脾湯은 神經精神科에서 다용하는 처방이다. 宋代 嚴用和가 『濟生方』[48]에 처음으로 수록한 처방으로 思慮過多, 勞傷心脾로 인한 健忘, 怔忡 등을 치료할 목적으로 立方되었으며, 元代 危亦林의 『世醫得效方』[49]에 이르러서 脾不統血로 인한 吐血, 下血 등에까지 확대 處方되었고, 明代 薛己[50]가 當歸와 遠志를 첨가하여 驚悸, 盜汗, 嗜臥少食, 月經不調, 赤白帶下 등에도 폭넓게 활용되었다[16]. 補氣와 養血의 약물과 安神行氣약물이 조합되어 益氣補血 健脾養心하는 효능으로, 歷代 醫家들이 歸脾湯을 활용한 主治 病證은 心神不寧, 氣血虧虛, 脾不統血證의 心脾虛損證에 응용되고 있다[51].

근래에 들어서 歸脾湯으로 한 실험적 연구로는 박[16]이 in vitro 연구에서 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical, superoxide, hydroxy radical 억제효과가 있다고 하였고, in vivo에서는 LPO(lipid peroxide), MDA(malon-dialdehyde) 함량을 감소시킨다고 하였다. 전[17]은 성상세포가 glutamate로 손상되었을 때 세포고사 현상과 염색사 응축을 억제하였고, Bcl-2 단백질의 분해를 억제하였으며, PARP(poly-ADP-ribose polymerase) 분절을 억제한다고 하였다. 강[18]은 glutamate로 C6 glial 세포를 손상시켰을 때 세포생존율을 증가시키고 활성산소의 생성을 억제시켰으며, GSH (glutathione) contents의 감소를 억제시켰다고 하였다. 박[19]은 接觸性 過敏反應 및 免疫細胞의 機能을 측정한 결과 接觸性 過敏反應을 억제하고, 복강내 대식세포의 탐식능을 증가시켰으며, NK cell 활성도를 증가시켰다고 하였다. 유[20]는 止血作用과 摘出子宮筋에 미치는 影響을 확인한 결과 prothrombin time을 단축시켰고 혈소판 수치가 증가하였으며 摘出子宮筋을 수축시켰다고 하였다. 이[21]는 睡眠, 鎭靜, 鎭痛作用을 확인한 결과 thiopental sodium에 의한 睡眠時間 연장을 보였고, climbing test에서 鎭靜作用이 있었으며, acetic acid 방법에서 鎭痛作用이 있었다고 보고하였다. 歸脾湯이 健忘뿐만 아니라 痴呆에도 일정한 효과가 있을 것으로 사료되지만 아직까지 歸脾湯을 이용한 痴呆 실험연구는 매우 적은 실정이다.

본 실험 연구에서는 뇌기능 활성에 밀접한 연관이 있는 歸脾湯의 구강투여가 실험적으로 허혈성 국소 뇌손상을 일으킨 腦虛血 모델에 미치

는 영향을 관찰해보고자, hippocampus CA1부위의 mGluR5, Bax, Bcl-2, cytochrome C, cresyl violet 신경세포손상, ChAT 등의 변화를 관찰하였다.

mGluR5(Metabotropic glutamate receptors)은 뇌에 있어서 주요한 신경독성 물질이며 허혈이나 저혈당 및 산소결핍 후에 손상을 일으키게 하는 glutamate의 수용체 아형 단위로, glutamate의 조정반응을 매개하게 한다. mGluR5는 신경세포 흥분효과와 억제효과 등의 이중성이 연구 보고되고 있는데, 흥분효과에 대한 약리학적 특징을 보고한 것은 많지는 않으며, 현재 glutamatergic terminal에서의 시냅스 전 억제작용을 함으로써 신경보호작용이 있다고 보고되고 있다[52,53].

본 연구에서는 hippocampus CA1 부위의 mGluR5 발현 변화를 관찰한 결과 Control군에 비해 GBT 1X군에서 유의하게 증가하였으나, GBT 3X 및 GBT 6X군에서는 유의한 증가를 보이지 않았다. 즉 歸脾湯의 효과가 mGluR5의 활성을 통하여 뇌신경독성작용을 완화하는 작용을 발휘할 수 있는 농도는 본 연구에서 설정한 1배 농도가 적절한 것으로 사료되며, 농도가 높아지게 되면 뇌신경 독성 완화 효과는 상쇄되는 것으로 추론되어진다.

세포사멸은 정상적인 세포의 발생, 교체, 종양의 퇴화, 호르몬 변화에 의한 조직의 위축, 세포매개면역 등에서 일어나는 것으로 알려져 있으나 腦虛血, 뇌손상, 파킨슨씨병 등과 같은 병리적인 현상에 의해서도 일어날 수 있다. 세포손상을 일으키는 스트레스나 자극은 세포적응, 손상 및 세포사멸의 분자수준 변화를 형태학적인 변화로 관찰할 수 있다. 腦虛血이 발생하면 대뇌피질 뿐만 아니라 전반적인 뇌에서 형태학적인 변화가 일어나고 주변의 신경세포에서도 세포사멸이 진행되어 뇌손상이 온다. Bax는 Bcl-2 등의 BCL-family와 결합하여 평형 상태를 유지하게 되는데, 다량의 Bax 분자는 활성을 가지게 되어 Pro ICE/caspase를 활성화시키며, 전자 전달계의 조효소로 작용하고 있는 cytochrome C와 같은 세포사멸 촉진인자를 방출하도록 하여 세포사멸을 촉진시킨다[54-56].

본 실험에서는 pro-apoptotic member인 Bax 발현에 있어서 control군에 비해 GBT 1X군이 유의하게 감소함을 나타낸 것으로 보아 歸脾湯을 1배 농도로 구강 투여한 것은 뇌세포의 사멸과 관련한 인자인 Bax를 억제시켜 pro-caspase와 같은 뇌세포 사멸을 억제할 수 있음을 나타낸다고 보인다. 그러나 본 연구에서 control군에 비해 GBT 3X군이 오히려 상승했는데, 이는 세포사멸 인자 방출이 증가됨을 의미하는 것으로 해석될 수 있지만 실험적 오차에 의한 것인지 혹은 실제 고농도에서 나타날 수 있는 영향인지에 대하여 추후 검증이 요구된다.

또한 anti-apoptotic member인 Bcl-2 발현에 있어서 control군에 비해 GBT 1X군이 유의하게 증가하였는데, 이는 歸脾湯이 세포사멸을 억제하는 anti-apoptosis 작용 발휘에 관여할 수 있는 것으로 생각되어진다. 하지만 normal군에 비해서 control군에서도 발현이 증가한 것은, 세포사멸이 진행하면서 방어기제에 의해 Bcl-2 단백 발현이 증가한 것이 아닌지 추론되고 이에 대해서 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

Bax와 Bcl-2는 각각 독립적으로 세포자연사를 조절한다고 알려지기도 하였지만[57], 두 단백질은 서로 결합하여 heterodimer를 이루며 각각의 비율에 따라 세포자연사를 결정한다는 게 현재 지배적인 의견이다[58]. Tilly 등[59]과 Ginger 등[60]은 동물실험을 통해 퇴화 중인 난포와 난자에서 Bax 유전자의 비율이 Bcl-2 유전자 비율보다 높게 나왔고 이 과정에서 Bax가 중요한 기능을 수

행한다고 보고하였다. 본 실험에서는 Bax/Bcl-2 ratio에 있어서 contro군에 비해 GBT 1X군이 유의하게 감소함을 나타낸 것으로 보아 歸脾湯의 1배 구강투여가 뇌세포사멸을 억제하는 작용을 할 것으로 생각된다.

세포사멸을 촉진하는 인자인 cytochrome C의 발현에 있어서 control군에 비해 GBT 1X군, GBT 6X군에서 유의하게 감소하였는데, 이는 歸脾湯의 1배와 6배 구강투여가 뇌세포 고사 방어 작용을 발휘할 수 있음을 의미한다고 여겨진다. Cytochrome C의 발현에 있어서 歸脾湯의 6배 구강투여가 감소를 보인 것은 다른 인자에 있어서 고농도에서 유효성이 상쇄되어지는 것과는 차이가 있는 결과로 보인다.

위의 뇌세포 apoptosis와 관련된 인자인 Bax, Bcl-2, cytochrome C 발현에서 歸脾湯의 구강투여는 뇌세포의 세포고사기전 방어에 유효한 영향을 주고 있음을 관찰할 수 있었으며, 저농도에서 효과적임을 나타낸 것으로 추론되어진다.

뇌신경세포의 손상 방어 효과를 cresyl violet에 의하여 관찰한 결과 GBT 1X군에서 유의한 증가를 보였는데, 이는 歸脾湯 1배 구강투여가 효과적으로 뇌신경세포의 손상을 방어함을 나타낸다고 보여진다.

Cholinergic system은 신경전달물질의 acetycholine (ACh), ACh의 합성효소인 choline acetyltransferase (ChAT), Ach을 분해하는 분해효소인 acetylcholinesterase (AchE) 및 ACh 전달물질의 수용체가 포함된다. 그 중 AchE는 cholinergic synapse에 존재하여, 신경전달 물질인 acetylcholine(ACh)을 choline과 acetic acid로 가수분해시키는 효소이다. 이 효소는 post-sysnaptic membrane의 수용체에 결합하는 ACh를 가수분해시켜 수용체의 정상적인 기능을 유지시키며, ACh의 생합성에 필요한 choline을 공급함으로써, 신경계가 원활하게 작용하는데 매우 중요한 역할을 하게 된다.

본 연구에서 ChAT에 있어서 GBT 1X를 투여한 군에서 유의하게 증가됨을 나타내었는데, 이는 歸脾湯 1배 구강투여는 뇌신경의 ACh 등 신경전달물질 수용체와 관련된 기능을 활성화시켜 줄 수 있음을 시사한다고 생각된다.

이상의 결과로 보아 본 연구의 腦虛血 모델에 대한 歸脾湯의 구강투여를 농도별로 투여하여 그 효과를 관찰한 결과, 뇌신경세포 독성 및 사멸에 관련된 인자인 mGluR5, Bax, Bcl-2 및 cytochrome C에 있어서 저농도에 해당하는 1배 구강투여군이 보다 유효한 것으로 나타났다. 즉 이는 본 연구의 조건에서 歸脾湯 1배 구강투여군이 뇌신경 세포고사 기전에 영향을 미쳐 뇌세포 사멸촉진을 억제하는 기전에 유효하게 발휘될 수 있음을 나타낸다고 사료된다. 더불어 cresyl violet에 의한 뇌신경세포 손상정도 관찰과 ChAT에 의한 신경전달 수용체 작용정도 관찰에서도 歸脾湯 1배 구강투여군이 유의한 결과를 나타낸 것으로 보아 腦虛血에 의한 뇌신경 보호 및 활성화에 대한 歸脾湯의 가장 적합한 농도는 1배 농도로 구강투여하는 것이 가장 타당하다고 여겨지며, 농도가 상승될 시에 그러한 효과들이 상쇄되는 것에 대하여서는 추후 계속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

歸脾湯의 농도별 구강투여가 白鼠의 중대뇌동맥 폐색으로 유발된 focal ischemia에 미치는 영향을 관찰해 보고자, hippocampus CA1 부위에서 뇌신경세포 독성 및 사멸과 관련된 인자인 mGluR5, Bax, Bcl-2 및 cytochrome C의 발현을 전기영동법에 의해 분석하고, 뇌신경 보호효과를

나타내는 cresyl violet 염색과 뇌신경 전달수용체와 관련된 ChAT 발현을 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Hippocampus CA1 부위의 mGluR5 발현 변화에서 대조군에 비해 歸脾湯 1배 구강투여군이 유의하게 증가하였다.
2. Hippocampus CA1 부위의 Bax 발현 변화에서 대조군에 비해 歸脾湯 1배 구강투여군이 유의하게 감소하였다.
3. Hippocampus CA1 부위의 Bcl-2 발현 변화에서 대조군에 비해 歸脾湯 1배 구강투여군이 유의하게 증가하였다.
4. Hippocampus CA1 부위의 Bax/Bcl-2 ratio 변화에서 대조군에 비해 歸脾湯 1배 구강투여군이 유의하게 감소하였다.
5. Hippocampus CA1 부위의 cytochrome C 발현 변화에서 대조군에 비해 歸脾湯 1배 구강투여군과 6배 구강투여군이 유의하게 감소하였다.
6. Hippocampus CA1 부위의 cresyl violet 염색을 통한 신경세포 손상방어 효과에서 대조군에 비해 歸脾湯 1배 구강투여군이 유의하게 증가하였다.
7. Hippocampus CA1 부위의 ChAT 발현에서 대조군에 비해 歸脾湯 1배 구강투여군이 유의하게 증가하였다.

이상의 연구결과를 종합하여 보면 歸脾湯은 腦虛血로 유발된 白鼠의 뇌신경세포 손상을 억제하였으므로, 뇌의 血管性 虛血 증후에 의한 痴呆에 대해서도 효과가 있을 것으로 사료되며 향후 이에 대해 고농도에서의 유독성과 행동실험 등의 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. 정광식, 김범회, 황원덕. 淸肺瀉肝湯이 MCAO에 의한 흰쥐의 뇌허혈 손상에 미치는 영향. 대한예방한의학회지. 2009;13(1):13-27.
2. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia -reversible and irreversible types of ischemic cell damage. Progress in Brain Res. 1985;63 :39-58.
3. 김원찬, 김영석, 문상관, 고창남, 조기호, 배영섭, 이경섭, 박정미. 中風 환자의 血管性痴呆에 대한 임상적 관찰. 대한한방내과학회지. 1998; 19(2):50-9.
4. 대한치매학회. 치매 임상적 접근. 서울:아카데이마. 2006:347-447.
5. Yamaguchi S, Matsubara M, Kobayashi S. Event-related brain potential changes after Choto-san administration in stroke patients with mild cognitive impairments. Psychopharmacology. 2004;171:241-9.
6. Pulsinelli WA and Brierley JB. A new method of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke. 1979;10:267-72.
7. Smith ML, Bendek G, et al. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat, 2. A 2-vessel occlusion model. Acta Neural Scand. 1984;69:385.
8. Ogata J, Fujishima M, Tamaki K, Nakatomi Y,

Omae T. An ultra-structural study of developing cerebral infarction following bilateral carotid artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. Act Neuropath. 1997;40:171-7.

9. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Summins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989;20:84-91.
10. 부일권, 김연섭. 갈근이 腦虛血 손상 흰쥐의 해마신경세포 손상에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2004;19(1):77-82.
11. 박은경, 신정원, 손영주, 정혁상, 원란, 손낙원. 노령 흰쥐의 뇌혀혈 손상시 凉膈散火湯이 뇌해마의 신경세포 및 HSP72 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(3):791-7.
12. 김선영, 이원철. 흰쥐의 중대뇌동맥 결찰로 유발된 腦虛血에서 星香正氣散과 藿香正氣散이 신경세포에 미치는 효과. 대한한의학회지. 2001;22(4):142-50.
13. 김호철, 안덕균. 천마(天麻)의 4-Vessel Occlusion으로 유발한 흰쥐 前腦虛血에 대한 신경보호효과. 대한본초학회지. 1999;14(1):121-9.
14. 이인환, 임강현, 이종석, 석경호, 안덕균, 박호군, 김호철. 조구등(釣鉤藤)의 4-VO로 유발한 흰쥐 腦虛血에 대한 신경방어 효과. 대한본초학회지. 1999;14(2):97-103.
15. 김인세, 박두진, 권재영, 김해규, 백승완, 신상욱. 白鼠의 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 허혈성 뇌손상 모델에서 Dexamethasone과 MK-801이 뇌부종 형성에 미치는 영향. 대한마취과학회지. 1999;37:327-33.
16. 박선동, 박현준, 주왕석. 歸脾湯 및 그 구성 약물군이 항산화효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001;16(1):11-27.
17. 전희준, 박세욱, 이인, 문병순. 歸脾湯이 Glutamate에 의한 성상세포의 손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2004;25(2):184-93.
18. 강익현, 이인, 한상혁, 문병순. 歸脾湯이 Glutamate에 의한 C6 glial Cell의 Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(4):45-57.
19. 박은정, 정규만. 歸脾湯과 歸脾湯加味方이 마우스의 過敏反應 및 免疫細胞의 機能에 미치는 影響. 대한한의학회지. 1990;11(2):149-69.
20. 유동렬. 複合生藥製劑의 止血作用과 摘出子宮筋에 미치는 影響(第1報); 歸脾湯에 대하여. 생약학회지. 1998;72('88.3):39-46.
21. 이동건. 歸脾湯加熟地黃이 생쥐의 睡眠時間 鎭靜 및 鎭痛作用에 미치는 影響. 동서의학. 1987;12(2):5-16.
22. 許俊. 東醫寶鑑. 서울:여강출판사. 1994:123-6.
23. Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. Curr Opin Neurobiology. 1996;6:667-72.
24. Fujusawa A, Matsumoto M, Matsuyama T, et al. The effect of the calcium antagonist nimodipine on the gerbil model of experimental cerebral ischemia. Stroke. 1986; 17:748-52.
25. Gill R, Foster A, Woodruff G. MK-801 is neuroprotective in gerbils when administered during the post-ischemic period. Neuroscience. 1998;25:847-55, 254.
26. Krieglstein J. Pharmacology and drug therapy of cerebral ishcemia : In Cerebral ishcemia and resuscitation(Schurr A, Rigor BM, eds). Boca Raton. CRC. 1990:347-71.
27. Stermau LL, Lust WD, Ricci AJ, Ratcheson R. Role for ɣ-adminobutyric acid in selective vulnerability in gerbils. Stroke. 1989;20:281-7.
28. Moncada C, Lekieffre D, Arvin B, Meldrum B. Effect of NO synthase inhibition on NMDA-

and ischemia-induced hippocampal lesions. Neuroreport. 1992;3:530-2.
29. Hall ED, Andrus PK, Smith SL, Fleck TJ, Scherch HM, Tzke BS et al. Pyrrolopyrimidines: novel brain-penetration antioxidants with neuroprotective activity in brain injury and ishcemia models. J Pharmacol Exp Ther. 1997;281:895-904.
30. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원 편. 한의신경정신과학. 파주:집문당. 2011:35-42, 332-41, 567-72.
31. 아담스신경과학 편찬위원회편. 신경과학. 서울:정담. 1998:383-92.
32. 김현아. 노인성 痴呆에 관한 동서의학적 비교 考察. 대한한방내과학회지. 1992;13(2):58-62, 66-7.
33. Weiner MF. The dementias, diagnosis and management. Washington:American Psychiatric Press. 1992:77-166, 227-48.
34. 미국정신의학회. 정신장애의 진단 및 통계편람 제4판. 서울:하나의학회. 1995:184-9, 191-4, 197-9.
35. Hamdy RC, Tumbull JM, Clark W, Lancaster MM. Alzheimer's disease. A handbook for caregivers 2nd edition. Activities. 1995;19(3):65-6.
36. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK. Suppression of an amyliod beta peptide-mediated calcium channel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. Neuroscience. 2000;95(1):1-4.
37. 양제훈, 고필옥, 곽수동. 일시적 大腦虛血에 의한 gerbil 해마의 피라밋층에 조직학적 변화. 대한수의학회지. 2001;41(4):467-75.
38. 염창섭, 김종우, 강철훈, 황의완. 健腦湯과 單味들이 Hypoxia-Reoxygenation에 의해 손상받은 Mouse Neuroblastoma 2a Cells에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2005;16(2):73-88.
39. 문하경, 김종우, 강철훈, 황의완. 淸肺瀉肝湯과 單味들이 Hypoxia-Reoxygenation에 의해 손상받은 Mouse Neuroblastoma 2a Cells에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2005;16(2):89-112.
40. 이봄비, 정진용, 김선녀, 김호철, 권용준, 함대현, 이혜정, 심인섭. 中風 한방처방전의 효능비교 연구; 黃連解毒湯·祛風至寶丹·加味四物湯이 국소 前腦虛血에 의한 학습과 기억에 미치는 효과. 경락경혈학회지. 2002;19(2):63-78.
41. 석재욱, 정태영, 임성철, 서정철, 김미려, 양재하, 한상원. Hirudin 藥鍼이 中大腦動脈閉塞으로 誘發된 흰쥐의 神經損傷 保護 效果. 대한침구학회지. 2004;21(4):207-15.
42. 김진형, 김윤식, 설인찬, 김동희. 加味六味地黃湯이 腦神經細胞 損傷 및 腦虛血 病態 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(2):467-75.
43. 이병철, 임강현, 김영옥, 김선려, 안덕균, 박호군, 김호철. 황금(黃芩)의 4-VO로 유발한 흰쥐 腦虛血에 대한 신경방어 효과. 대한본초학회지. 1999;14(2):89-96.
44. 김영옥, 김형수, 임강현, 석경호, 김선려, 박주영, 안덕균, 김호철. 석창포(石菖蒲)의 4-VO로 유발한 흰쥐 腦虛血의 신경방어 효과. 대한본초학회지. 2000;15(2):79-85.
45. 안덕균, 원도희, 김종호. 4-vessel occlusion으로 誘發한 흰쥐 前腦虛血의 神經細胞 損傷에 대한 大黃의 防禦效果. 대한본초학회지. 1999;14(1):111-20.
46. Buchan AM, Pulsinelli WA. Hpothermia but

not the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. J Neurosci. 1990;11:1049-50.
47. Kirino T. Aoki M, Kawagoe J, et al. Ischemic delayed neuronal death-a mitochondrial hypothesis. Stroke. 1995;26:1478-89.
48. 嚴用和. 濟生方. 北京:人民衛生出版社. 1980:117.
49. 危亦林. 世醫得效方. 北京:中國中醫藥出版社. 1996:115.
50. 薛己. 內科摘要. 江蘇:江蘇科學技術出版社. 1985 :41-2.
51. 劉玉茂 主編. 中醫十大名方-歸脾湯. 北京:中 國中醫藥出版社. 1997:2-3.
52. 박선화, 박준원, 오수자. 당뇨병 흰쥐 망막에서 대사자극성 glutamate 수용체 mGluR1, mGlR5 및 mGluR2/3의 발현 변화. 대한해부학회지. 2003;36(6):491-8.
53. Bruno V, Copani A, Battaglia G, Raffaele R, Shinozaki H, Nicoletti F. Protective effect of the metabotropic glutamate receptor agonist, DCG-IV, against excitotoxic neuronal death. Eur J Pharmacol. 1994;256(1):109-12.
54. Chong MJ, Murray MR, Gosink EC, Russell HR, Srinivasan A, Kapsetaki M et al. Atm and Bax cooperate in ionizing radiation-induced apoptosis in the central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(2):889-94.
55. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell. 1993;74(4):609-19.
56. Lee MS, Kang G. A study for apoptosis induced by microinjection of cytochrome c protein into mouse 3T3 fibroblast. The Korean journal of pathol. 2002;36:1-6.
57. Kunson CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 and bax function independently to regulate cell death. Nat Genet. 1997;16:358-63.
58. 김종식, 김명신, 양현원, 류재혁, 윤용달, 배인하, 정병준, 송현진. 분절화된 인간 배아에서 세포자연사와 Fas, Fas-ligand, Bax, Bcl-2 발현에 관한 연구. 대한불임학회지. 2002;29(3) :167-78.
59. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the bcl-2 gene family in the mature rat ovary : Equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is a associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xong messenger ribonucleic acid levels. Endocrinology. 1995;136:232-41.
60. Ginger EE, Chaoyu T, Abigail SM, Carol MW. Expression of caspase and Bcl-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embroys. Biol Reprod. 1999;61:231-9.