

신우황청심원의 뇌허혈 및 중추신경계에 대한 약효

조태순* · 이선미 · 이은방* · 조성익* · 김용기** · 신대회** · 박대규**

성균관대학교 약학대학, *서울대학교 천연물과학연구소, **조선무약(자) 생명과학연구소

(Received October 22, 1997)

Pharmacological Actions of New Woohwangchungsimwon Pill on Cerebral Ischemia and Central Nervous System

Tai-Soon Cho*, Sun-Mee Lee, Eun-Bang Lee*, Sung-Ig Cho*,
Yong-Kee Kim**, Dae-Hee Shin** and Dai-kyu Park**

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746

*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460

**Institute of Life Science Research, Cho Seon Pharm. & Trading Co., Ltd.,
Ansan, Kyunggi 425-120, Korea

Abstract—In order to investigate pharmacological properties of New Woohwangchungsimwon Pill (NWCH) and Woohwangchungsimwon Pill(WCH), effects of NWCH and WCH on cerebral ischemia and central nervous system were compared. Cerebral ischemia insult was performed using unilateral carotid artery occlusion in Mongolian gerbils. The histological observations showed preventive effect of NWCH and WCH treatments with ischemia-induced brain damage. The ATP in brain tissue was decreased in vehicle-treated ischemic gerbils. This decrease was prevented by NWCH and WCH treatment. In contrast to what was seen with ATP, the lactate and lipid peroxide were both elevated in vehicle-treated ischemic gerbils. This elevation was inhibited by NWCH and WCH treatments. In central nervous system, NWCH and WCH had sedative effect in rotarod and spontaneous activity test, but no effects on the hexobarbital-induced sleeping time. And, NWCH and WCH had weak anti-convulsion effects in electric shock- and pentetrazol-induced convulsion test. NWCH and WCH increased the respiration rate, but decreased the respiration depth in rats. Furthermore, NWCH and WCH showed anti-stress effect. Our findings suggest that the pharmacological profiles of NWCH on cerebral ischemia and central nervous system are similar to that of WCH.

Keywords □ New Woohwangchungsimwon Pill, Woohwangchungsimwon Pill, cerebral ischemia, central nervous system.

고래로부터 현재까지 수백년동안 사용되어 온 우황청심원은 1107년경 태평혜민화제국방에 최초로 수재되었던 처방¹⁾으로 제풍, 환종불수, 언어건삽, 심중건망, 황홀거래, 두목현모, 흉중번울, 담연응색, 정신혼쾌, 심기부족, 신지부족, 경공파포, 비우참위, 허번소수, 회로부시, 흑발광전, 정신혼란 등을 치료 한다고 하였으며, 허²⁾는 줄중풍의 구급약으로, 이³⁾는 통관, 투기골지제로

제풍완중, 전광, 소아경간 등에, 황⁴⁾은 척심열, 몽정, 노학, 은진, 소아조민, 항배강직 등에 응용된다고 하였으며, 염⁵⁾은 고혈압, 동맥경화증, 자율신경실조증, 정신불안증, 히스테리, 불면 등에 효과가 있다고 하였다.

우황청심원의 주약으로 사용되어 온 사향은 사향사슴(*Moschus moschiferus* L.) 또는 그 밖의 근연동물(우제목(*Artiodactyla*) 사슴과(*Cervidae*))의 수컷의 사향선분비물로서 강심, 흥분, 개규, 통경, 진정, 진경, 배농, 해독, 구어혈 작용이 있어 중풍, 소아경간, 신혼섬, 심복강통, 심장쇠약, 신경쇠약, 월경관란, 혈전, 질타손상 등

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0331-290-7701 (팩스) 0331-292-8800

의 치료에 사용되어 오고 있다.⁶⁾

상기의 효능효과를 발현하는 사항은 hexobarbitone에 의한 수면시간을 감소시킴으로써 중추 흥분 효과⁷⁾가 있는 반면, 자발 운동량을 감소시키는 것으로 보아 진정작용⁸⁾ 등이 있다고 보고하였다. 그밖의 약리 작용으로는 남성호르몬양 작용,^{9, 10)} 항염증작용^{11, 12)} 등이 보고되어 있다.

그러나, 다양한 약리작용을 발현하고 있는 중요한 고가의 생약재인 사항은 전량 외국으로 부터수입에 의존하고 있으며 최근들어 "멸종 위기에 처한 야생 동식물의 국제 거래에 관한 협약(CITES 협약)"이 발효됨에 따라 사항의 수입이 더욱 어려움에 처해 있는 실정에서 사항의 대체약물의 개발이 절실히 요구되어 최근에 사항의 대체약물인 *l*-muscone을 개발하기에 이르렀다.

l-Muscone의 효능효과에 대하여 조 등¹³⁾은 뇌허혈 및 중추신경계에 대하여 *l*-muscone은 사항과 유사한 뇌허혈에 대한 개선작용, 중추신경계에 대해 진정작용, 호흡 흥분작용 및 항스트레스작용 등을 관찰하여 *l*-muscone이 사항의 대체약물이 될 수 있음을 확인하였다.

이러한 결과를 근거로 하여 조선무약(자) 생명과학연구소에서는 *l*-muscone을 사용하여 각종 성인병(예를들면, 중풍성질환인 뇌졸중등 심순환계 질환인 고혈압, 심계항진, 호흡곤란, 뇌질환인 급·만성경풍등, 스트레스에서 유발되는 각종 질환, 신경성질환인 정신불안, 자율신경불안증 등)의 제증상을 치료 내지 개선의 목적으로 *l*-muscone을 함유하는 새로운 제제인 신우황청심원 [1환(3.75g)중 원료약품의 조성 : 감초 202mg, 계피 70mg, 작약 60mg, 황금 60mg, 방풍 60mg, 백출 60mg, 길경 50mg, 복령 50mg, 우황 14mg, 산약 282mg, 인삼 97mg, 포황 100mg, 신곡 100mg, 대두황권 70mg, 아교 70mg, 맥문동 60mg, 백령 30mg, 당귀 60mg, 시호 50mg, 행인 50mg, 천궁 50mg, 용뇌 41mg, 영양각 35mg, 건강 30mg 및 *l*-muscone 1.5% 과립 5mg(*l*-muscone으로써 75µg)]을 개발하게 되었다.

본 연구는 신우황청심원과 시판품인 우황청심원의 뇌허혈과 중추신경계에 미치는 영향 등에 대하여 비교 효력시험을 실시한 것이다.

실험방법

실험동물

수컷 Mongolian gerbil은 미국의 Harlan사(Har-

lan Co., U.S.A.)에서 체중 60g내외를 구입하였고, 생쥐는 체중 20~30g의 ICR계 수컷을, 흰쥐는 체중 200~350g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 제일상사로부터 공급받아 동물실 환경에서 1주이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물실의 온도는 22~25°C로, 습도는 50±15%로 유지되었고, 명암은 12시간 간격으로 자동조절시켰으며, 실험동물에게는 삼양사(주)의 사료를 급식하였고, 상수를 자유로이 섭취토록 하였다.

시료

신우황청심원 및 우황청심원은 조선무약(자)으로부터 제공받아 0.5% sod. carboxymethyl cellulose-saline(CMC-Na) 액에 현탁시켜 사용하였으며, 체중 kg당 10 ml가 투여 되도록 제조하여 경구투여 하였다.

시약

Lactic dehydrogenase(from rabbit muscle), NAD, NADP, Tris-HCl, glycine, hydrazin, hexokinase(Bakers yeast), glucose-6-phosphate dehydrogenase(Bakers yeast), glucose, thiobarbituric acid, chlorpromazine · HCl, *l*-ascorbic acid 등의 시약은 Sigma Chem. Co.(U.S.A.)에서 구입하였고, doxapram · HCl은 도프람주사(명문제약), 이외에 *n*-butanol, HClO₄ 등은 국내 특급시약을 사용하였다.

뇌허혈에 미치는 작용

뇌허혈 유발 - Gerbil을 ether 마취하에 수술판에 고정시키고 목의 중앙선을 절개한 후 좌측 경동맥을 미주신경으로부터 분리하여 동맥 clamp로 결찰시켰다. 허혈 20분 후 clamp를 빼내어 30분간 재관류시키고 단두치사하여 재빨리 평량하여 뇌시료를 얻었으며, 이를 균질화하여 측정항목을 측정하였다. 이때 약물은 뇌허혈 유발 30분전에 경구투여하였다. 신경학적 검사는 허혈 20분후 clamp를 빼내고 절개부위를 봉합하여 24시간동안 재관류시켰다. 24시간 후 gerbil의 신경손상 정도에 따라 4등급으로 나누고 조직검사를 위하여 단두치사하여 뇌를 10% formalin neutral buffer 용액(Sigma Chem Co., U.S.A.)에 10일간 담가둔 후 실험에 이용하였다.

신경학적검사 및 병리조직검사 - 신경학적 검사는 수술후 24시간이 경과한 다음 Bederson 등의 방법¹⁴⁾에 따라 그 결손정도를 4등급으로 점수화 하였다. 병리조

직검사는 조직을 충분히 formalin으로 고정시킨 후 4 mm 두께의 coronal brain slice를 만든 후 조직내에 남아있는 고정액은 흐르는 수도물에 충분히 수세하였다. 각 군의 조직을 Autotechnicon(Citadel 2000, Shandon, USA)을 사용하여 투명(clearing) 및 침투과정을 실시하였다. 일정모양의 paraffin block을 만들기 위해 embedding center를 사용하였다. Paraffin 침투과정이 끝난 조직을 paraffin warming chamber에 넣고 base mold에 paraffin을 채운 후 조직을 base mold에 안착시키고 cyto-plate에 올려놓고 굳은 후 base mold를 떼어놓았다. Paraffin block을 microtome에서 2 μ m 두께로 자른 후 슬라이드 글라스위에 올려 60°C hot plate에서 건조부착시켰다. 절편이 부착된 슬라이드 글라스를 60°C의 oven에 넣어 조직 이외의 paraffin을 녹이고 xylene에서 10분씩 3회 처리한 후 100%, 95%, 80% 및 70% ethanol 순으로 2회씩 2분간 처리하여 흡수시켰다. H & E(hematoxylin 및 eosin)염색은 흡수과정 후 탈이온수에서 10분간 처리한 후 Harris's hematoxylin으로 염색하였다. 현미경 검경은 카메라가 부착된 현미경(Nikon Diaphot 300, Japan)에서 40배율 및 200배율로 하였다.

뇌시료의 추출 - 뇌시료를 평량한 후 0.25% EDTA가 들어있는 0.1M HClO₄를 가하여 homogenizer로 30초간 균질화 시킨 후 10분간 고정시켜 단백질을 제거한 후 4°C에서 10,000×g로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 ATP, lactate, malondialdehyde(MDA) 정량용 시료로 사용하였다.

ATP함량 측정 - ATP의 측정은 Lamprecht와 Trautschold의 방법¹⁵에 따라 hexokinase와 glucose 6-phosphate dehydrogenase에 의해 생성되는 NADPH를 spectrophotometer를 사용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 물질의 양은 흡광도의 차 값에 회석배율을 곱하여 NADPH의 분자흡광계수로 나눈 것으로 그 값을 μ mole/g brain tissue로 표시하였다.

Lactate함량 측정 - Lactate의 측정은 Gutmann과 Wahlefeld의 방법¹⁶에 따라 lactate dehydrogenase와 NAD에 의해 생성된 NADH를 ATP 측정항에서와 동일하게 340 nm에서 그의 흡광도를 측정하였으며 그 값을 μ mole/g brain tissue로 나타내었다.

Lipid peroxidation 측정 - 지질과산화는 Masugi와 Nagamura의 방법¹⁷에 준하여 thiobarbituric acid (TBA) assay를 사용하여 535 nm에서 흡광도를 측정

하였으며, 표준액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하였다.

Protein 함량은 Bradford 법¹⁸에 따라 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하여 정량하였다.

중추신경계에 미치는 작용

Hexobarbital 유도 수면시간에 대한 작용 - 음성 생쥐에 hexobarbital · Na 50 mg/kg을 복강주사한 후, 정향반사가 상실되기 시작한 시각과 회복될 때까지의 시간을 측정하였다. 10마리를 1군으로하여 검체는 hexobarbital · Na 투여 30분 전에 경구투여 하였으며, 대조약물은 chlorpromazine · HCl을 사용하였다.

최대 전기 자극에 대한 작용 - 최대 전기 자극은 Woodbury 등의 방법¹⁹을 참고로 하여 실시하였다. 생쥐 10마리를 1군으로 하여, 양눈에 50 mA의 전류를 0.1초간 통전하였다. 이에 따른 각직성 경련에 의한 생쥐의 사망수를 계수하고, 생존하는 생쥐는 경련 발현 후, 정상으로 회복될 때까지의 시간을 측정하였다. 검체는 전기 자극을 가하기 30분 전에 경구로 투여하였고, 대조약물로는 phenobarbital · Na을 사용하였다.

Pentetrazol 유발 경련에 대한 작용 - Swinyard 등의 방법²⁰에 준하여 실시하였다. 즉, pentetrazol 85 mg/kg을 생쥐에 피하주사하고, 간대성 경련이 유발될 때까지의 시간을 측정하였다. 검체는 경련 유발 30분 전에 경구투여 하였고, 대조약물로는 phenobarbital · Na을 사용하였으며, 10마리를 1군으로 사용하였다.

Rotarod 시험 - Dunham 등의 방법²¹을 응용하여 직경 3 cm, 8 rpm으로 회전하는 회전봉에 3분이상 건디는 생쥐 12마리를 1군으로 선별하여, 2회 반복 훈련시키고, 1시간후에 본 실험을 실시하여 3분내 떨어지는 생쥐를 계수하였다. 검체는 30분전 경구투여 하였으며, 양성대조약물은 chlorpromazine · HCl을 사용하였다.

자발운동능에 대한 시험 - 생쥐의 운동에 따라 활동 횟수가 기록되는 activity cage를 이용하여 Nahorski의 방법²²에 준하여 실시하였다. 체중 23~30 g 음성 생쥐 8마리를 1군으로 하여 2마리씩 한 cage에 넣어 30분간 적응시키고 검체를 경구투여하여 45분후 15분 동안의 자발운동능을 측정하였다. 양성대조약물은 chlorpromazine · HCl을 사용하였다.

호흡곤란에 미치는 작용

Matsubara의 방법²³을 참고로 하여, urethane으로

마취하여 호흡을 억제한 상태에서 검체의 호흡에 미치는 영향을 검토하였다. Urethane 2.0 g/kg을 피하주사하여 마취시킨 흰쥐를 고정판 위에 고정하고 pneumatic pulse transducer를 횡경막 부근의 복부에 두른 다음 physiograph의 universal coupler에 연결하여 호흡을 측정하였다. 꼬리부는 실험중 계속 37°C로 일정하게 유지되는 온도조절판 위에 위치하도록 하였고, 항온 항습 상태에서 호흡이 안정되고 난 후 검체를 꼬리정맥내에 주사하였다. 검체 투여전, 투여후 3분 및 10분후의 매분당 호흡수와 호흡심도를 측정하여 투여전의 측정치에 대한 투여 후의 측정치의 증감 변화율을 %로서 환산하여, 0.5% CMC-Na saline 투여군과 검체투여군에서의 차이를 비교하였다.

스트레스에 미치는 작용

스트레스부과 - 스트레스 부과 24시간 전에 절식시킨 웅성 흰쥐를 metal tube restrainer(Natume, Japan)에 구속시켜, 20±2°C가 유지되는 water bath 내에 수침시켜 24시간 동안 수침 구속스트레스를 부과하였다. 약물은 스트레스 부과 2시간전, 부과 4, 19시간 후에 각각 투여하였다. 스트레스 부과 24시간 후 ether 마취하여 회복하여 장기를 적출하여 실험에 사용하였다.

장기무게의 측정 - 흰쥐의 복부를 절개하여 비장을 적출하고 장기 주위를 둘러싸고 있는 지방조직을 제거한 후 무게를 측정하였다. 부신도 적출한 후 피막을 완전히 제거하였으며 양쪽 부신을 합하여 무게를 측정하였다.

부신내 ascorbic acid 함량 측정 - 무게가 측정된 부신을 5% trichloroacetic acid(TCA)용액 1 ml에 넣고 약 30초간 균질화 시킨 다음, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 취하였다. 정량반응을 위하여 5% TCA 용액에 상등액 0.5 ml를 혼합하고 0.1 ml H₃PO₄(85%), 0.8 ml dipirydyl(1 w/v%), 0.1 ml ferric chloride(3 w/v%)를 차례로 첨가하였다. 시약을 완전히 섞고 상온에서 15분간 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 부신중의 ascorbic acid 함량을 측정하였다.²⁴⁾

통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 사용하여 나타내었고, 각 군간의 비교는 Student's *t*-test 및 χ^2 -test를 사용하였으며, 대조군과 비교하여 P 값이 5% 미만일

때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과

뇌허혈에 미치는 영향

병리조직검사 - Table I 및 Fig. 1에서 보는 바와 같이 뇌허혈 및 재관류 대조군은 신경세포괴사와 세포부종 및 충혈이 극심하였으며, 신우황청심원 투여군은 용량의존적으로 신경세포괴사, 부종 및 충혈 정도를 경감시키는 효과가 있었으며, 우황청심원 투여군 역시 용량의존적으로 뇌허혈에 대한 보호작용을 나타내었다.

신경학적검사 - Table II에서 보는 바와 같이 허혈 후 24시간이 지난 다음 신경 결손정도는 신우황청심원 및 우황청심원군 모두에서 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

ATP 함량 - Table III에서 보는 바와 같이 정상 gerbil brain에서의 ATP 함량은 0.90 μ mole/g brain tissue였으나, 허혈 20분 후 재관류 30분에 0.22 μ mole/g brain tissue 까지 급격히 감소하였다. 신우황청심원군은 1,000 mg/kg과 2,000 mg/kg 용량에서 뇌조직내 ATP함량이 대조군에 비해 유의성있게 증가하였으며, 우황청심원군은 1,000 mg/kg과 4,000 mg/kg 용량에서 대조군에 비해 유의성있게 증가하였으나, 정상군에 비해서는 낮은 ATP 함량을 나타내었다.

Lactate 함량 - Table III에서 보는 바와 같이 정상 gerbil brain에서의 lactate 함량은 6.33 μ mole/g brain tissue였으나, 허혈 및 재관류를 실행한 대조군

Table I—Histological evidences for neuroprotective effects of NWCH and WCH from ischemia-induced brain damage

Treatment	n	Dose (mg/kg, p.o.)	Neuronal necrosis	Edema	Hemorrhage
Control	5	-	+++	+++	+++
NWCH	5	500	++	++	++
	5	1,000	+	+	++
	5	2,000	+	+	++
	5	4,000	+	-	+
	5	500	++	++	+
WCH	5	1,000	+	+	+
	5	2,000	+	-	+
	5	4,000	+	-	+
	5	4,000	+	-	+

-: none, +: mild, ++: moderate, +++: severe

n=number of animals in each group.

NWCH: New Woohwangchungsimwon Pill

WCH: Woohwangchungsimwon Pill

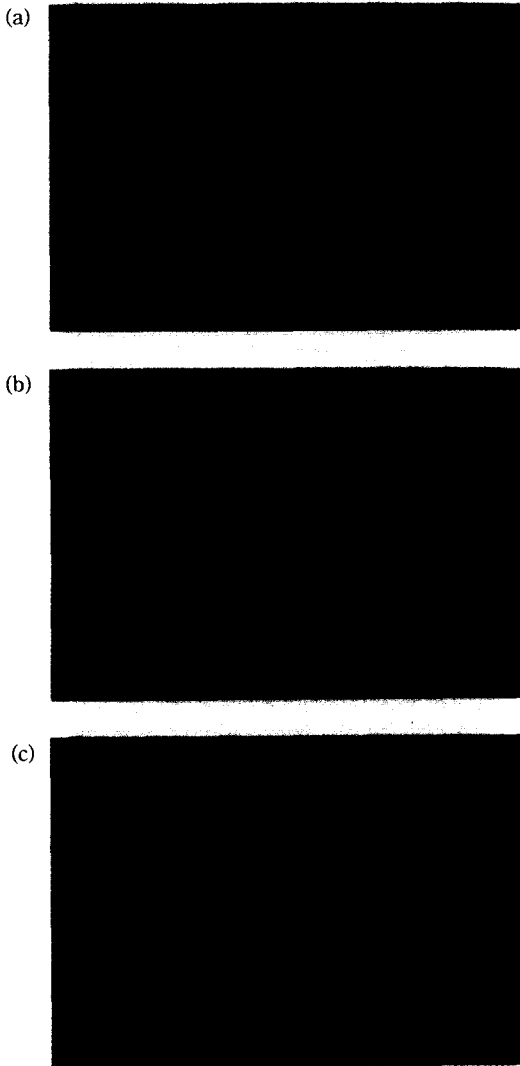


Fig. 1 — Representative photomicrographs of neuronal preservation in 2µm H & E-stained sections from vehicle-treated (A), 2,000 mg/kg NWCH-treated (B) and 2,000 mg/kg WCH-treated (C) gerbil brain 24 hrs after 20 min unilateral carotid artery occlusion(x40). This photo also shows hippocampal field.

에서는 9.72 µmole/g brain tissue로 유의성 있게 증가하였다. 신우황청심원 2,000 mg/kg 투여군과 우황청심원은 1,000 mg/kg 및 2,000 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의성있게 lactate 생성을 억제하였으며, 이들 모두는 정상군의 lactate 함량과 비슷하였다.

Lipid peroxidation 측정 - Table III에서 보는 바와 같이 정상 gerbil brain에서 lipid peroxidation의 지

Table II — Effects of NWCH and WCH on neurological change after ischemia in gerbils

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Neurological grade
Control		1.38±0.26
NWCH	500	1.80±0.49
	1,000	1.40±0.40
	2,000	1.40±0.40
	4,000	1.60±0.40
WCH	500	1.40±0.40
	1,000	1.00±0.00
	2,000	1.00±0.00
	4,000	1.40±0.40

Values are means±S.E. for 5 to 8 gerbils per group.
 NWCH: New Woohwangchungsimwon Pill
 WCH: Woohwangchungsimwon Pill

표인 MDA는 2.69 nmole/mg protein이었으나, 허혈 및 재관류 후 4.32 nmole/mg protein으로 유의성있게 증가하였다. 신우황청심원은 500 mg/kg, 2,000 mg/kg 및 4,000 mg/kg 투여군에서 유의성있게 MDA 생성을 억제하였으며, 그 정도는 거의 정상 수준으로 회복시켰다. 우황청심원군 역시 500 mg/kg, 2,000 mg/kg 및 4,000 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의성있게 MDA 생성을 억제하였으며 이는 정상군의 MDA치와 비슷하였다.

중추신경계에 미치는 영향

Hexobarbital 유도 수면시간에 대한 작용 - 신우황청심원 및 우황청심원의 수면시간에 미치는 작용을 Table IV에 표시하였다. Chlorpromazine 4 mg/kg을 투여시에 수면 도달시간을 211.8초에서 129.5초로 유의성있게 단축시켰으며, 수면시간은 420.6초에서 864.1초로 105.4% 연장시키는 작용이 있었다. 신우황청심원 및 우황청심원 투여군에서는 수면도달 및 수면지속시간이 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았으나, 두 검체 모두 4,000 mg/kg 투여군에서는 수면시간을 약 20% 단축시켰다.

최대 전기 자극에 대한 작용 - 신우황청심원 및 우황청심원의 전기자극 경련에 대한 길항성에 대하여 실험한 결과를 Table V에 표시하였다. 대조군에서 70%의 사망율을 나타내었는데, phenobarbital 50 mg/kg의 용량 투여로 사망이 완전히 길항되었다. 신우황청심원은 2,000 mg/kg 및 4,000 mg/kg의 용량으로 투여하였을 때 사망율을 각각 40% 및 50%로 억제하였고, 경련 지속시간은 대조군의 경우 133초 였으나 2,000 mg/kg 투여군에서는 98초로, 4,000 mg/kg투여군에서는 73초

Table III—Effects of NWCH and WCH on levels of ATP, lactate and lipid peroxide in gerbil brain following ischemia and reperfusion

Group	Dose (mg/kg)	ATP (μmole/g)	Lactate (μmole/g)	MDA (nmole/mg protein)
Normal		0.90±0.16	6.33±0.16	2.69±0.13
Control		0.22±0.03 [#]	9.72±1.35 [#]	4.32±0.30 [#]
NWCH	500	0.17±0.03 [#]	7.00±0.31	2.87±0.11 ^{**}
	1,000	0.33±0.05 [#]	6.52±0.39	3.84±0.18 [#]
	2,000	0.33±0.05 [#]	6.26±0.38 [*]	2.62±0.09 ^{**}
	4,000	0.30±0.04 [#]	6.96±0.27	2.92±0.15 ^{**}
WCH	500	0.30±0.05 [#]	6.50±0.61	3.13±0.17 ^{**}
	1,000	0.35±0.05 [#]	6.26±0.11 [*]	3.72±0.08 [#]
	2,000	0.30±0.05 [#]	6.04±0.21 [*]	2.83±0.19 ^{**}
	4,000	0.39±0.07 [#]	9.72±0.41 [#]	2.77±0.07 ^{**}

Values are means ± S.E. for 5 to 10 gerbils per group.

Significantly different from the control group (*p<0.05, **p<0.01 in Student's *t*-test).

Significantly different from the normal group ([#]p<0.05, [#]#p<0.01 in Student's *t*-test).

NWCH: New Woohwangchungsimwon Pill

WCH: Woohwangchungsimwon Pill

Table IV—Effects of NWCH and WCH on hexobarbital-induced sleeping time

Treatment	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	No. of mice	Onset of sleeping (sec)	Sleeping time (sec)	Increment (%)
Control		10	211.8±13.1	420.6±32.2	—
NWCH	1,000	10	218.3±15.4	424.9±56.1	1.0
	2,000	10	220.1±15.2	401.7±45.4	-4.5
	4,000	10	197.4±16.6	343.1±26.9	-18.4
	4,000	10	181.7±19.3	430.2±46.8	2.3
WCH	1,000	10	180.8±12.4	379.1±51.5	-9.9
	2,000	10	168.2±16.3	340.3±34.3	-19.1
	4,000	10	129.5±9.5 [*]	864.1±83.1 [*]	105.4
Chlorpromazine · HCl	4	10			

Significantly different from the control group (*p<0.01 in Student's *t*-test).

NWCH: New Woohwangchungsimwon Pill

WCH: Woohwangchungsimwon Pill

Table V—Effects of NWCH and WCH on maximal electric shock-induced seizures

Treatment	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	No. of tested mice	No. of survived mice	Death rate (%)	Convulsion time (sec)	Death time (sec)
Control		10	3	70	133.0±12.7	28.9±3.4
NWCH	2,000	10	6	40	98.0±8.4	34.3±4.0
	4,000	10	5	50	73.0±16.8 [*]	35.0±5.0
WCH	2,000	10	7	30	66.6±7.4 ^{**}	38.0±10.4
	4,000	10	6	40	77.7±8.9 ^{**}	24.3±3.7
Phenobarbital · Na	50	10	10 [#]	0	14.6±1.5 ^{**}	—

Significantly different from the control group ([#]p<0.05 in χ^2 -test, *p<0.05, **p<0.01 in Student's *t*-test).

NWCH: New Woohwangchungsimwon Pill

WCH: Woohwangchungsimwon Pill

로 단축시키는 작용이 있어 항경련작용이 인정되었다. 우황청심원의 경우도 2,000 mg/kg 및 4,000 mg/kg의 용량에서 사망율을 각각 30 및 40%로 저하시켰으며, 경련지속시간을 각각 66.6초 및 77.7초로 단축시키는 작용이 있어 항경련작용이 있음을 알 수 있었다.

Pentetrazol 유발 경련에 대한 작용 - 신우황청심원

과 우황청심원 투여에 따른 pentetrazol 유발 경련에 대한 영향을 Table VI에 표시하였다. Phenobarbital 100 mg/kg 투여시에 생쥐 10마리가 모두 경련이 억제되었다. 신우황청심원 2,000 mg/kg 및 4,000 mg/kg 을 투여한 경우 사망율에는 영향이 없었으나, 경련도달 시간을 각각 32.6% 및 50.0% 지연시켰다. 우황청심원

Table VI— Effects of NWCH and WCH on pentetrazol-induced seizures

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of used mice	No. of convulsed mice	Onset of convulsion (sec)	Increment (%)
Control		10	10	153.9±10.2	—
NWCH	2,000	10	10	204.1±22.6	32.6
	4,000	10	10	230.8±41.2	50.0
WCH	2,000	10	10	166.1±23.7	7.9
	4,000	10	10	175.7±32.3	14.2
Phenobarbital · Na	100	10	0*	—	—

Significantly different from the control group (*p<0.01 in χ^2 -test).

NWCH: New Woohwangchungsimwon Pill

WCH: Woohwangchungsimwon Pill

2,000 mg/kg 및 4,000 mg/kg 투여한 경우 역시 사망율에는 영향이 없었으나, 경련도달시간을 각각 7.9% 및 14.2% 지연시켰다.

Rotarod 시험 - Table VII에서 보는 바와 같이 rotarod시험에서는 정상군은 낙하생쥐가 한 마리도 없는 반면, 양성대조물질인 chlorpromazine을 투여한 경우 10마리가 낙하하였다. 신우황청심원의 경우 2,000 mg/kg 및 4,000 mg/kg 투여군에서 낙하생쥐가 각각 4마리로 유의성있는 진정작용을 나타내었으며, 우황청심원의 경우 1,000 mg/kg 및 2,000 mg/kg 투여군에서는 낙하생쥐수가 각각 6마리, 4마리로 유의성있는 진정작용을 나타내었다.

자발운동능에 대한 작용 - Table VIII에서 보는 바와 같이 정상군의 자발운동능은 1087.8 이었으나, 양성대조물질인 chlorpromazine을 투여한 경우 312.8로 감소되었다. 신우황청심원을 투여한 경우는 모든 투여용량에서 유의성있는 자발운동능 변화를 관찰할 수 없

었으며, 우황청심원의 경우도 큰 변화를 관찰할 수는 없었으나 2,000 mg/kg 투여군에서 자발운동능을 847.5로 감소시켰다.

호흡곤란에 미치는 영향

정상 흰쥐에 urethane 마취후, 검체투여 직전의 호흡수는 91.0±18.4이었다. 호흡심도는 기록되는 호흡심도가, physiograph의 기록지상에 적절한 크기의 폭이되도록 calibration하여 그 증감변화율을 상대치(%)로 계산하였다. Urethane투여로 인하여 억제된 호흡에 미치는 신우황청심원 및 우황청심원의 영향을 Table IX에 나타내었다. 신우황청심원은 20 및 50 mg/kg을 정맥내 투여시, 대조군인 0.5% CMC-Na saline투여군에서의 미약한 변화율(약 -2.5~0.2%)과 비교하였을 때, 분당 호흡수를 용량의존적이고 유의성 있게 증가(약 9~41%)시켰으나, 호흡심도는 유의성 있게 감소(약 10~24%)시켰다. 이러한 작용은 20~30분

Table VII— Effects of NWCH and WCH on rotarod test in mice

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of tested mice	No. of fallen mice
Control		12	0
NWCH	500	12	2
	1,000	12	2
	2,000	12	4*
	4,000	12	4*
WCH	500	12	2
	1,000	12	6**
	2,000	12	4*
	4,000	12	2
Chlorpromazine HCl	10	12	10**

Significantly different from the control group (*p<0.05, **p<0.01 in χ^2 -test).

NWCH: New Woohwangchungsimwon Pill

WCH: Woohwangchungsimwon Pill

Table VIII— Effects of NWCH and WCH on spontaneous activities in mice

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of mice	Spontaneous activity
Control	—	8	1087.8±38.8
NWCH	500	8	1006.0±91.1
	1,000	8	1188.0±109.2
	2,000	8	1140.5±71.4
	4,000	8	1234.8±75.9
WCH	500	8	898.5±74.8
	1,000	8	1147.3±22.6
	2,000	8	847.5±39.0*
	4,000	8	1033.8±118.2
Chlorpromazine · HCl	5	10	312.8±78.9*

Significantly different from the control group (*p<0.01 in Student's *t*-test).

NWCH: New Woohwangchungsimwon Pill

WCH: Woohwangchungsimwon Pill

Table IX— Effects of NWCH and WCH on the respiration suppressed by urethane in rats

Treatment	Dose (mg/kg. i.v.)	No. of rats	Respiration rate (% change)		Respiration depth (% change)	
			3 min ¹	10 min	3 min	10 min
Control	—	7	-1.8±0.4	-2.5±1.3	0.2±0.9	-1.2±2.1
NWCH	10	5	11.8±7.1*	7.5±6.2	1.4±2.5	-1.1±2.4
	20	5	10.8±7.2	8.5±3.8*	-9.8±2.5**	-11.2±3.3*
	50	3	41.4±14.7**	31.1±3.8**	-23.8±3.1**	-15.3±1.2**
WCH	10	5	0.9±2.7	0.0±3.7	-0.9±3.7	-6.4±3.1
	20	4	15.8±3.4**	15.7±5.1**	-6.9±3.3*	-12.8±4.5*
	50	5	31.3±10.0**	37.0±12.7**	-17.0±10.1	-25.2±9.3*
Doxapram · HCl	20	4	36.3±13.9**	-2.2±10.7	69.2±24.0**	44.0±17.5**

Significantly different from the control group (*p<0.05, **p<0.01 in Student's *t*-test).

¹ time after drug dose.

NWCH: New Woohwangchungsimwon Pill

WCH: Woohwangchungsimwon Pill

경과후 투여전 상태로 회복되었다(결과는 미표시). 우황청심원 역시 20 및 50 mg/kg을 정맥내 투여했을 때 분당 호흡수를 용량의존적이고 유의성있게 증가(약 16~37%)시켰으며, 호흡심도는 유의성있게 감소(약 7~25%) 시켰다. 이러한 작용 역시 투여 20~30분 경과후 투여전 상태로 회복되었다(결과는 미표시). 양성 대조군으로 사용된 연수홍분성 호흡촉진제인 doxapram · HCl은 호흡수의 단기적인 급증(약 36%)과, 호흡심도의 지속적이고 현저한 증가(약 44~69%)를 나타냈다.

KCN으로 유발된 혼수시간에 영향을 Table X에 나타내었다. 신우황청심원 투여군 및 우황청심원 투여군은 KCN으로 유발된 혼수시간에 있어서 대조군에 대하여 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 혼수시간을 약 20% 정도 단축시켰다.

Table X— Effects of NWCH and WCH on the respiration suppressed by KCN in mice

Treatment	Dose (mg/kg. p.o.)	No. of mice	Duration of coma (sec.)	Increment (%)
Control	—	10	114.5±14.2	—
NWCH	2,000	10	87.2±6.1	-23.8
	4,000	10	88.5±7.7	-22.7
WCH	2,000	10	100.7±14.1	-12.1
	4,000	10	89.0±4.8	-22.3

NWCH: New Woohwangchungsimwon Pill

WCH: Woohwangchungsimwon Pill

스트레스에 미치는 영향

신우황청심원과 우황청심원의 효과를 살펴보면 Table XI에서 보는 바와 같이 스트레스 24시간 부과시 부신은 16.5 mg/100 g b.wt.에서 20.8 mg/100 g b.wt.로 현저하게 비대되었고, 신우황청심원 500 mg/

Table XI— Effects of NWCH and WCH on adrenal weight, spleen weight and adrenal ascorbate in restraint stress-induced rats

Treatment	Dose (mg/kg. p.o.)	Adrenal wt. (mg/100 g b.wt.)	Spleen wt. (mg/100 g b.wt.)	Adrenal ascorbate (mg/100 g ad.wt.)
Control	—	16.5±0.3	342.4±22.2	698.3±39.2
Normal	—	20.8±0.8 [#]	178.9±15.1 [#]	443.8±45.0 [#]
NWCH	500	18.2±0.8*	225.4±12.7 ^{**#}	433.2±21.3 [#]
	1,000	20.5±0.8 [#]	191.4±9.9 [#]	353.0±20.8 [#]
	2,000	17.4±0.8*	213.3±19.9 [#]	417.1±33.0 [#]
	4,000	17.8±0.6*	192.6±11.9 [#]	355.9±22.1 [#]
WCH	500	17.9±0.9*	204.1±13.7 [#]	469.6±50.0 [#]
	1,000	17.8±1.0*	205.6±17.7 [#]	579.8±52.4
	2,000	17.7±1.6	255.8±24.3 [#]	840.2±17.1 ^{**#}
	4,000	17.2±1.4*	222.9±25.1 [#]	744.0±16.2 ^{**}

Values are means±S.E.M. for 7 rats per group.

Significantly different from the control group (*p<0.05, **p<0.01 in Student's *t*-test).

Significantly different from the normal group ([#]p<0.05, [#]#p<0.01 in Student's *t*-test).

kg, 2.000 mg/kg 및 4.000 mg/kg 및 우황청심원 500 mg/kg, 1.000 mg/kg 및 4.000 mg/kg 투여군에서 유의성있게 억제되었다. 비장의 무게는 스트레스 부과에 의해 342.4 mg/100g b.wt.에서 178.9 mg/100g b.wt.로 현저한 감소를 보였으며, 신우황청심원 500 mg/kg 투여군과 우황청심원 2.000 mg/kg 투여군에서 유의성있게 억제되었다. 부신내 ascorbic acid함량은 24시간 스트레스 유도에 의해 698.3 mg/100g ad.wt.에서 443.8 mg/100g ad.wt.로 현저히 감소되었으며, 신우황청심원은 모든 투여용량에서 별 영향이 없었으나, 우황청심원은 2.000, 4.000 mg/kg 투여군에서 유의성있게 증가시켰다.

고 찰

뇌출혈, 뇌경색, 동맥경화증 등 뇌혈관 장애로 뇌로의 혈액공급이 불충분하면 뇌에서는 부분적인 순환장애가 일어나 갑작스러운 신경장애가 나타난다. 뇌혈관 장애의 80%는 동맥혈관의 폐쇄가 원인으로 지적되고 있다. 순수한 저산소증과는 달리 허혈성 질환은 근본적인 순환계 장애로 특히 뇌허혈은 뇌조직이 그 기능을 유지할 수 없을 정도로 뇌혈류량이 감소된 상태라고 정의된다.

뇌허혈이 초래된 후 나타나는 신경변성은 해마, 대뇌 피질, 선조체 및 소뇌 등의 지역에 선택적으로 일어난다.^{25, 26)} 특히 해마의 CA1 부위 피라미드형 세포는 허혈에 매우 민감하여 허혈성 신경 변성의 기전 연구에 중요한 대상이 되고 있다.²⁷⁻³⁰⁾

이와같이 최근 허혈성 장애에 대한 병태생리학적 기전연구가 진전됨에 따라 허혈성 뇌손상의 약리학적 예방 및 치료제 개발이 활발해지고 있다. 따라서 이들의 약효를 검색하기 위해서는 무엇보다 적절한 동물모델 확립이 필수적이며 이제까지의 허혈성 뇌장애의 실험적 검토에는 흰쥐나 gerbil이 주로 이용되어져 왔다. 즉, global brain ischemia의 경우 개와 같은 대동물 또는 Mongolian gerbil(*Meriones unguiculatus*)을 이용한 모델이 재현성 있고 유용한 동물모델로 확립되어 있으나,^{31, 32)} focal brain ischemia 동물모델에 대해서는 여전히 많은 논란이 있다.^{33, 34)} 또한, 최근에는 분자생물학적 수법이 진보됨에 따라 유전자 변이 마우스가 뇌허혈 병태 해명에 응용되나 이 역시 아직도 선택적 뇌신경세포괴사가 불분명하여 이에 대한 연구가 더 진행되어야 한다.³⁵⁾

따라서 본 연구에서는 gerbil의 총경동맥결찰에 의해 뇌허혈을 유발하는 방법을 이용하였다. 20분 간 허혈을 유발한 후 24시간 뒤 조직병리검사를 실시한 결과 신경세포괴사, 부종 및 총혈 등의 뇌신경세포손상이 일어났으며, 신우황청심원 및 우황청심원 투여에 의해 이러한 손상이 용량의존적으로 억제되는 것으로 보아 허혈에 의한 신경세포 손상을 억제할 수 있음을 확인하였다.

뇌허혈에 의한 세포손상 기전은 아직 정확하게 알려지지 않는으나, Mies 등³⁶⁾은 허혈성 뇌에서 에너지대사 관련물질(ATP와 그의 대사체)을 측정하여 glucose 이용률의 저하를 보고하였으며, Sokoloff 등³⁷⁾도 같은 결과를 보여 주었으나, 이와는 달리 Munekata와 Hossmann³⁸⁾은 허혈후 재관류 초기의 영양분의 공급감소와 저산소가 에너지 대사의 손상을 야기시키지는 않는다고 한다. 과혈당(hyperglycemia)은 일시적인 뇌허혈에 의해 야기되는 뇌손상을 증가시킨다.³⁹⁾ 이와 같은 현상에 대해 정확한 작용기전은 알 수 없으나, 뇌허혈중 과혈당이 뇌내 lactate증가⁴⁰⁾와 산증(acidosis)이 가속화되므로⁴¹⁾ 많은 연구자들은 이 두가지 현상이 뇌허혈 손상의 잠재적인 매개체라 여기고 있다. 실제로 Combs 등⁴²⁾의 연구에 따르면 해당작용(glycolysis)을 차단하면 과혈당으로 인한 뇌허혈 사망율을 줄일 수 있다고 한다.

본 연구에서는 허혈에 의한 에너지대사 장애에 대한 신우황청심원 및 우황청심원의 효과를 살펴보기 위하여 ATP 및 lactate 함량을 측정하였다. 허혈 및 재관류 후 뇌조직내의 ATP 함량은 현저하게 감소되었으나, 신우황청심원 및 우황청심원 투여에 의해 유의성있게 회복되었으며, lactate는 허혈 및 재관류 후 현저하게 축적되었으나, 신우황청심원 및 우황청심원 투여에 의해 유의성있게 회복되었다. 이러한 결과는 허혈에 의한 에너지대사 장애를 호전시켜줄 수 있음을 시사한다.

뇌허혈이 지속되는 시간이 길고 그 정도가 심하다면 뇌허혈만으로도 뇌손상을 초래할 수 있다. 그러나, 대부분의 뇌허혈은 일시적이며 뇌허혈 당시보다는 재관류시에 산소가 조직으로 다시 공급될 때 조직손상이 일어난다.⁴³⁾ 재관류 손상 기전 중에서 활성산소(free radical)의 역할에 많은 관심이 모아지고 있다. 뇌허혈 기간동안 칼슘이 증가된 상태에서 산소가 재공급 되면 xanthine oxidase나 NADPH에 의해 산소분자는 superoxide anion(O₂⁻)으로 변화된다. 이렇게 생성된

O_2^- 는 정상상태에서는 항산화효소에 의해 물과 산소분자로 변화되거나 무독화되어지나 뇌허혈 상태에서는 이들 효소가 감소되고 O_2^- 및 과산화수소와 같은 산소 대사물 생성이 오히려 많아지므로 O_2^- 와 과산화수소는 세포막을 통과하여 비교적 항산화 방어기전이 적게 작용하는 세포외 공간으로 이동하게 된다. 또한 이들은 Fe^{2+} 의 존재하에서 독성이 매우 강한 hydroxyl radical로 쉽게 전환되어 여러 효소의 기능을 변동시키거나 지질 과산화(lipid peroxidation)를 일으켜 막의 유동성과 막을 통한 이온의 농도차(ionic gradient)를 변동시켜 세포손상을 일으킨다.⁴⁰⁾

본 연구에서 허혈 및 재관류 후 생성된 활성산소에 의한 세포손상을 알아보기 위하여 지질과산화의 지표인 MDA 함량을 측정하였다. MDA는 허혈 및 재관류 후 현저하게 증가하였으나, 신우황청심원 및 우황청심원 투여에 의해 억제되어 거의 정상치로 회복되었다. 이것은 허혈 및 재관류 후 생성된 활성산소의 작용을 억제할 수 있음을 나타내고 있다.

이상의 뇌허혈에 대한 연구를 통하여 신우황청심원은 에너지대사 장애의 개선작용 및 활성산소에 의한 지질과산화 억제 등을 방어기전으로 하여 허혈성 신경세포손상을 억제하는 작용이 있으며, 그 작용은 현재 시판 중인 우황청심원과 비슷함을 알 수 있었다.

우황청심원은 졸중풍 등의 구급약으로 사용되고 있으며,²⁾ 또한 호흡곤란, 급·만성경풍, 신경성질환인 정신불안, 자율신경불안증 및 스트레스에서 유발되는 각종 질환 등에 사용되고 있어 중추신경계에 미치는 영향이 클 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 신우황청심원과 우황청심원이 중추신경계, 호흡 및 스트레스에 미치는 영향을 비교 검토하고자 하였다.

중추신경계에 미치는 영향으로는 신우황청심원 및 우황청심원 모두 hexobarbital 유발 수면시간에 영향을 주지 않는 것으로 보아 중추에 대한 흥분작용은 인정할 수 없었다. 그러나 rotarod 시험에서 신우황청심원 2,000 mg/kg, 4,000 mg/kg 및 우황청심원 1,000 mg/kg, 2,000 mg/kg 투여군에서 정상군에 비해 유의성있는 억제작용이 관찰되었으며, 자발운동능시험에서 우황청심원 2,000 mg/kg 투여군에서 정상군에 비해 유의성있는 자발운동능 감소작용이 있었다. 경련에 대해서는 신우황청심원과 우황청심원은 전기자극경련에 의한 사망율의 감소와 경련지속시간의 단축을 보였으며, pentetrazol 유발경련에 대하여 경련도달시간을 지연

시키는 작용이 있었다. 이러한 결과를 통하여 신우황청심원과 우황청심원은 중추신경계에 대한 약한 진정작용과 항경련작용이 있음을 알 수 있었다.

호흡곤란에 미치는 영향을 알아보기 위하여 우선 신우황청심원 또는 우황청심원을 100 mg/kg 내지 1,000 mg/kg을 복강내 주사하여 실험하였으나, 별다른 변화를 관찰할 수 없었고, 개복하여 부검한 결과 투여한 검체가 흡수불량인 채 남아 있었다. 따라서 본 연구에서는 투여경로를 정맥내 투여로 실시하였다. 정맥내 투여는 실제로 이 약물을 복용하는 투여경로와는 상이하나 호흡변화를 보는 실험방법상 정맥내로 투여하였으며, 또 약물이 혈중에 고농도로 존재할 경우의 반응을 알아보고자 정맥내 투여를 선택하였다. Urethane 투여로 인하여 억제된 호흡에 미치는 영향을 검색한 결과 신우황청심원 및 우황청심원은 용량의존적인 호흡촉진작용이 관찰되었다. 한편, KCN으로 유발된 혼수상태에서의 호흡부전에 대하여 영향을 검토한 결과 두 검체 모두 유의성있는 작용은 아니었으나 혼수시간을 약 20% 단축시키는 작용이 있었다.

구속스트레스가 흰쥐에 부과되었을 때 부신의 비대 및 부신의 ascorbic acid의 함량 감소, 비장의 위축 등을 평가지표로 하여 신우황청심원 및 우황청심원의 항스트레스 효과를 살펴본 결과 신우황청심원은 비장 위축 및 부신내 ascorbic acid 함량에는 별작용이 없었으나, 부신의 비대를 억제하는 작용이 있었으며, 우황청심원은 비장 위축에만 영향이 없었을 뿐 부신비대를 현저히 억제하고, 부신내 ascorbic acid 함량을 증가시키는 작용이 있었다. 이러한 작용은 신우황청심원 및 우황청심원이 항스트레스 작용이 있음을 나타내며, 신우황청심원의 작용이 우황청심원 보다 다소 약한 것으로 판단된다.

이상의 실험을 통하여 신우황청심원은 뇌허혈에 대한 개선작용, 중추신경계에 대해 진정작용 및 항경련작용, 호흡촉진작용 및 항스트레스작용 등의 효과가 있음을 확인하였으며, 그 작용은 우황청심원과 대체적으로 비슷하였다.

감사의 말씀

이 실험은 1996년도 조선무약(자)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 본 실험을 수행하는데 도와주신 성균관대학교 약학대학원 이유범, 윤기욱, 이해리씨께 감사드립니다.

문헌

- 1) 진사문 : 태평해민화제국방, 선풍출판사, p. 81 (1975).
- 2) 허준 : 원본동의보감(신증판), 남산당, p. 692 (1987).
- 3) 이천 : 의학입문, 대성문화사, p. 215 (1981).
- 4) 황도연 : 방약합편, 행림출판사, p. 102 (1977).
- 5) 염태환 : 동의처방대전, 행림서원, p. 332, 196 (1975).
- 6) 김재길 : 원색천연약물대사전, 남산당, 2, p. 345 (1984).
- 7) Mukhopadhyay, A., Seth, S. D. S. and Bagchi, N. : Cardiac and CNS actions of musk. *Ind. J. Pharm.* **35**, 169 (1973).
- 8) Tokunaga, S., Kimura, M. and Kimura, I. : Comparison of both sedative effects on mice and cardiogenic effects on guinea-pig papillary muscles by musk water extract and by sheep testis MeOH extract. *J. Med. Pharm. Soc. Wakan-Yaku* **4**, 276 (1987).
- 9) Sano, T. : Über die maennlich sexualhormonartige Wirkung des Moschus. *J. Pharm. Soc. Japan* **56**, 913 (1936).
- 10) Sano, T. : Über die maennlich sexualhormonartige substanz des Moschus. *J. Pharm. Soc. Japan* **57**, 851 (1937).
- 11) Mishra, R. K., Arora, R. B. and Seth, S. D. : Antiinflammatory effect of musk. *J. Pharm. Pharmacol.* **14**, 830 (1962).
- 12) Taneja, V., Siddiqui, H. H. and Arora, R. B. : Studies on the anti-inflammatory activity of *Moschus moschiferus*(Musk) and its possible mode of action. *Ind. J. Physiol. Pharmac.* **17**, 241 (1973).
- 13) 조태순, 이선미, 이은방, 조성익, 김용기, 신대회, 박대규 : *l*-Muscone의 뇌허혈 및 중추신경계에 관한 약효 연구. *응용약물학회지*, **5**, 306 (1997).
- 14) Bederson, J. B., Pitts, L. H., Germano, S. M., Nishimura, M. C., Davis, R. L. and Bartkowski, H. M. : Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* **17**, 1304 (1986).
- 15) Lamprecht, W. and Trautschold, I. : Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, in *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie Academic Press, (1974).
- 16) Gutmann, I. and Wahlefeld, A. W. : Determination with lactate dehydrogenase and NAD, in *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie Academic Press, (1974).
- 17) Masugi, F. and Nagamura, T. : Effect of vitamin E deficiency on the level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxide in rat liver. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **46**, 187 (1976).
- 18) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 19) Woodbury, L. A. and Davenport, V. D. : Design and use of a new electroshock seizure apparatus, and analysis of factors altering seizure threshold and pattern. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **92**, 97 (1952).
- 20) Swinyard, E. A., Brow, W. C. and Goodman, L. S. : Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **106**, 319 (1952).
- 21) Dunham, N. W., Miya, T. S. and Edwards, C. D. : Pharmacological activity of a series of basic esters mono- and dialkyl malonic acid. *J. Am. Pharm. Assoc.* **46**, 208 (1957).
- 22) Nahorski, S. R. : Behavioural supersensitivity to apomorphine following cerebral dopaminergic denervation by 6-hydroxydopamine. *Psychopharmacologia* **42**, 159 (1975).
- 23) Matsubara, T. : Pharmacological studies of civetone, a fragrant component, in civet. Comparison with actions of muscone on cardiovascular and respiratory systems-. *富山薬研年報* **17**, 42 (1990).
- 24) Zannoni, V., Lynch, M., Goldstein, S. and Sato, P. : A rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissues. *Biochem. Med.* **11**, 41 (1974).
- 25) Fagg, G. E. and Foster, A. C. : Amino acid transmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* **9**, 701 (1983).
- 26) Fonnum, F. : A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* **42**, 1 (1984).
- 27) Ito, U., Spatz, M., Walker, J. T. Jr. and Klatzo, I.

- : Experimental ischemia in mongolian gerbils I light microscopic observations. *Acta Neuropathol. (Berl)* **32**, 209 (1975).
- 28) Diemer, N. H and Siemkowicz, E. : Regional neuron damage after cerebral ischemia in normo and hypoglycemic rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **7**, 217 (1981).
- 29) Kirino, T. : Delayed neuronal death in gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* **239**, 57 (1982).
- 30) Pulsinelli, W. A., Briery, J. B. and Plum, F. : Moderate hypoglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology* **32**, 1239 (1982).
- 31) Lysko, P. G., Lysko, K. A., Yue, T., Webb, C. L., Gu, J. and Feurstein, G. : Neuroprotective effects of carvedilol, a new antihypertensive agent, in cultured rat cerebellar neurons and in gerbil global brain ischemia. *Stroke* **23**, 1630 (1992).
- 32) Hofer, R. E., Christopherson, T. J., Scheithauer, B. W., Milde, T. H. and Lanier, W. L. : The effect of a platelet activating factor antagonist (BN 52021) on neurologic outcome and histopathology in a canine model of complete cerebral ischemia. *Anesthesiol.* **79**, 347 (1993).
- 33) Agnati, L. F., Zoli, M., Kurosawa, M., Benfenati, F., Biagini, G., Zini, I., Hallstrom, A., Ungerstedt, U., Toffano, G. and Fuxe, K. : A new model of focal brain ischemia based on the intracerebral injection of endothelin-1. *Ital. J. Neurol. Sci., Suppl.* **2**, 49 (1991).
- 34) Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J. and Teasdale, G. M. : Focal cerebral ischemia in the rat: description of technique early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1**, 53 (1984).
- 35) 寺島豊秋, 上村喜彦, 名村尚彦, 菊池晴彦 : C57BL/6マウスにおける一過性前脳虚血モデル. 脳循環代謝 **7**, 157 (1995).
- 36) Mies, G., Paschen, W. and Hossmann, K. A. : Cerebral blood flow, glucose utilization, regional glucose, and ATP content during the maturation period of delayed ischemic injury in gerbil brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **10**, 638 (1990).
- 37) Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M. H. and Shinohara, M. : The [¹⁴C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization : theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* **28**, 299 (1977).
- 38) Munekata, K. and Hossmann, K. A. : Effect of 5-minute ischemia on regional pH and energy state of the gerbil brain : relationship to selective vulnerability of the hippocampus. *Stroke* **18**, 412 (1987).
- 39) Kalimo, H., Rehncrona, S., Soderfeldt, B., Olsson, Y. and Siesjo, B. K. : Brain lactic acidosis and ischemic cell damage : 2. Histopathology. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1**, 313 (1981).
- 40) Combs, D. J., Dempsey, R. J., Maley, M., Donaldson, D. and Smith, C. : Relationship between plasma glucose, brain lactate, and intracellular pH during cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* **21**, 936 (1990).
- 41) Smith, M. L., Von Hanwehr, R. and Siesjo, B. K. : Changes in extra- and intracellular pH in the brain during and following ischemia in hyperglycemic and in moderately hypoglycemic rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **6**, 574 (1986).
- 42) Combs, D. J., Reuland, D. S., Martin, D. B., Zelenock, G. B. and D'Alecy, L. G. : Glycolytic inhibition by 2-deoxyglucose reduces hyperglycemia-associated mortality and morbidity in the ischemic rat. *Stroke* **17**, 989 (1986).
- 43) Hall, E. D., Pazara, K. E. and Braughler, J. M. : 21-Aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U 74006F protects against cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* **19**, 997 (1988).
- 44) Snelling, L. K., Ackerman, A. D., Dean, J. M., North, M. C. and Traystman, R. J. : The effects of superoxide dismutase on neurological recovery (Cerebral blood flow and evoked potentials) following global cerebral ischemia (abstract). *Anesthesiology* **67**, A153 (1987).