

Mongolian Gerbil의 뇌허혈 유발에 따른 뇌조직 손상에 있어서 사향 함유 우황청심원액과 영묘향 함유 우황청심원액의 조직학적 효능 비교

최은욱 · 이장헌¹ · 신상덕² · 마응천*

서울대학교 천연물과학연구소, ¹서울대학교 수의과대학, ²광동제약 주식회사

The comparison of histological effects of musk containing and civet containing WooHwangChungSimWon on the cerebral ischemia

Eun Wook CHOI, Jang Heon LEE¹, Sang Duk SHIN² and Woongchon MAR*

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

¹College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744,

²Kwang Dong Pharmaceutical Co., LTD, Seoul 152-050, Korea

(Received September 8, 2000; accepted September 22, 2000)

Abstract – WooHwangChungSimWon is a traditional prescription for treating with hypertension, arteriosclerosis, coma, and stroke in China, Korea, and Japan. In the new prescription of WooHwangChungSimWon, the civet is substituted for the musk, the major component of WooHwangChungSimwon, because of the prohibition law about the musk. We have made a comparative study of the effects on the ischemic damage between the musk containing and civet containing WooHwangChungSimWon. In order to investigate the effects of WooHwangChungSimWon on the ischemic damage, each samples were administrated for 12 days, ischemia was induced for 10 minutes at 7th day, and immunohistochemistry was performed in the region of hippocampus of mongolian gerbils. According to the result of immunohistochemistry, the survival rates of neuroal cells in the hippocampal CA1 region are 37.8% in the high dose of musk containing WooHwangChungSimWon (HM-WHCSW) administrated group, 27.8% in low dose of civet containing WooHwangChungSimWon (LC-WHCSW), and 35.5% in high dose of civet containing WooHwangChungSimWon (HC-WHCSW) administrated group. These survival rates were significantly different from the survival rate of sham control group (14.4%). The results suggest that all the samples except the low dose of musk containing WooHwangChungSimWon (LM-WHCSW) have protective or preventive effects on cerebral ischemia.

Key words □ WooHwangChungSimWon, Cerebral ischemia, Mongolian gerbil, immunohistochemistry, Civet

우황청심원은 동양에서 전통적으로 사용해왔던 한방약물로서 태평हे민화제국방, 동의보감 등에 처방이 기재되어있으며 방약합편, 동의처방대전 등에 따르면 고혈압, 동맥경화 등의 심혈관계 질환 및 자율신경실조, 정신불안 등의 중추신경계 조절, 뇌졸중 등에 사용되어져 왔다. 사향은 우황청심원의 주성분으로 사용되며, 약리작용으로는 항염증작용, 혈소판응집억제작용, 중추흥분작용, 항히스타민작용 및 항암작용 등이 알려져 있으며, 또한 순환계에도 작용하여 호흡중추 및 심장을 흥분시켜 심장의 기능을 항진하는 작용과 혈압 하강 등의 효능이 보고되어 있다 (Kimura 등, 1966; Kimura, 1980; Mishra 등, 1937; Taneja 등, 1973) 그러나, 국제적으로 멸종위기에 처한 야생희귀 동식물 보

호회 (CITES, 또는 워싱턴 조약)에서 보호되어야 한다고 판단, 사향노루의 거래를 방지코자하는 방책으로 국제거래에 관한 협약 중 거래가 거의 불가능한 부속서 I에 분류 포함 함으로써 96년 6월 이후 사향 原料의 원활한 수입 확보가 어렵게 되어 사향대체물질의 개발과 그 물질에 대한 비교 약리 연구가 필요하게 되었다. 사향의 주성분인 muscone보다 먼저 연구되어진 civetone은 영묘향의 주성분이며, 이 영묘향은 고가인 사향에 비해 저렴하면서도 사향과 유사한 향기를 지니고 있기 때문에 향료 공업에 있어서 사향의 대체물로 사용되어지고 있다. 사향 대체 물질로서 가능성을 가진 “영묘향”은 사향고양이과 사향고양이 (*Viverra Zibetha Linnaeus* 대영묘, *Viverra indica Desmarest* 소영묘)의 수컷과 암컷의 음부와 항문 사이에 위치한 향선낭에 있는 특이한 향기를 풍기는 분비물이고, 이 향선낭에

*To whom correspondence should be addressed.

들어오는 액상의 분비물이 영묘향으로 오랜 옛날부터 약재로 사용되었으며, 본초강목에서는 그 약효에 대해 '비시(인사불성, 가사상태), 고주(폐결핵), 신복졸통, 광사귀신(간질), 학(말라리아), 역기(유행병), 몽매사염(정신분열증), 심을 진정시키고 신을 편안케 한다'라고 언급되어져왔다. 이와 같은 약효는 일부 사향의 약효와도 일치하는 점이 있으며, 따라서 사향의 대체물로서의 가능성을 보인다. 영묘향에는 civetone (9-cis-cycloheptadecen-1-one)이 약 2~3% 정도 함유되어있으며 그 구조는 Fig. 1과 같다.

영묘향의 약리작용에 대해 보고된 것으로는 각성실험에서 수면시간의 단축, Pentobarbital sodium의 독성 저해, 항경련작용 등이 있으며, 약제로서 여러유형의 통증에 이용되며, 그 중에서 중약 (손발이 차지고, 의식장애, 현기, 개구장해, 실신 등의 증상이 나타나는 것)에도 이용되고 있다. 기존의 약제 중에는 이와 같은 영묘향의 효능을 인정하여 영묘향 성분 중 Civetone을 환제로 배합하여 사향을 대체한 우황청심환이 상품화되어 있는 정도이다.

뇌조직으로의 혈액공급이 차단되는 뇌허혈이 유발된 경우, 대부분의 신경세포는 팽창 및 사멸하게 되며 이에 따른 세포내 진행과정은 뇌허혈 양상에 따라 조금씩 다른 것으로 보고되어 있다 (Ito 등, 1975; Charriaut-Marlangue 등, 1996; Du 등, 1996; Kindy 등, 1992). 뇌허혈 유발에 따른 세포의 사멸과 함께 세포질 내 단백질들도 붕괴되며,

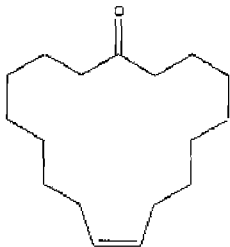


Fig. 1. The structure of civetone (9-Cycloheptadecen-1-one, C₁₇H₃₀O).

이에 따라 DNA 또는 세포질 내 단백질 등이 신경세포의 손상 또는 사멸을 연구하는 데에 있어서 지표로 사용되며, 포유류 뇌 세포에 다량 분포하는 microtubule associated protein 2 (MAP2)도 여기에 속한다 (Martin 등, 1995; Weaver 등, 1996).

따라서 본 연구에서는 뇌허혈을 유발한 Mongolian gerbil의 해마체 내 CA1 영역에서의 MAP2 면역조직화학 염색 양상을 지표로 하여 사향이 함유된 우황청심환 대신 천연물로서는 가장 유사생약으로 분류하고 있는 영묘향으로 대체시킨 우황청심환, 즉 각각 2종씩의 영묘향 함유 우황청심환액 및 사향 함유우황청심환액의 뇌졸중에 대한 효과를 비교·검사하였다.

실험 방법

1) 실험재료 및 검액의 조제

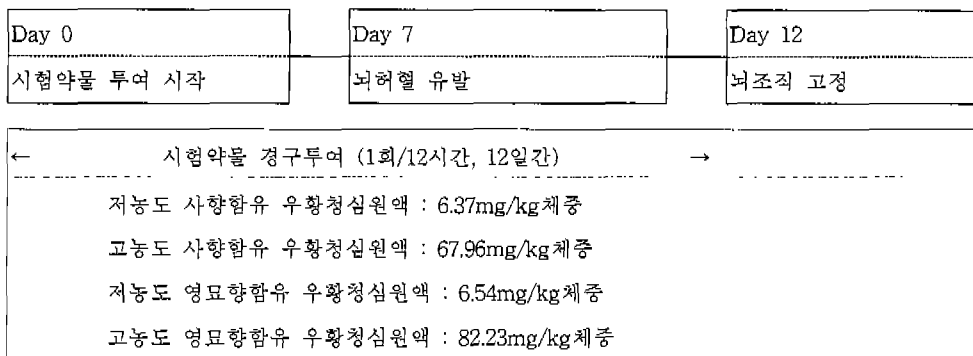
본 실험에 사용된 시험물질은 광동제약 주식회사에서 공급받은 영묘향 함유 처방현탁액과 사향 함유처방액으로서 조성은 표 1과 같다. 제공받은 시험약물은 현탁액 상태에서 본 실험에서는 경구투여시 현탁액을 그대로 사용하였다.

2) 실험동물 및 사육조건

본 실험에 사용된 실험동물은 Mongolian Gerbil (체중 140~180 g)이며 각각의 실험동물들은 약 1주일간 순화 적응시킨후 건강한 동물을 선택하여 온도 23 ± 3°C, 상대습도 50 ± 10%, 배기 10-12회, 형광등 명암 12hr cycle, 조도 150-160 Lux의 환경에서 사육하였다.

3) 실험동물의 처치

Scheme에서 보는 바와 같이 실험동물에 시험약물을 하루에 두 번씩 12시간 간격으로 경구투여하였으며, 투여량은 Table I에서 나타낸 것과 같이 사람에게 대한 처방량을 기준으로 하여 저농도 사향함유 우황청심환액 (LM-WHCSW)은 6.37 mg/kg체중, 고농도 사향함유 우황청심환



Scheme 1. Schedule for the treatment of cerebral ischemia-induced Mongolian gerbil

Table 1. The composition of civet containing and musk containing WooHwangChungSimWon.

원료명	영묘향 함유 우황청심원액		사향 함유 우황청심원액	
	LC-WHCSW (30 ml/60 kg human body)	HC-WHCSW (50 ml/60 kg human body)	LM-WHCSW (30 ml/60 kg human body)	HM-WHCSW (50 ml/60 kg human body)
산약	282 mg	263 mg	282 mg	263 mg
감초	202 mg	188 mg	202 mg	188 mg
백삼	97 mg	94 mg	97 mg	94 mg
포황	100 mg	94 mg	100 mg	94 mg
신곡	100 mg	94 mg	100 mg	94 mg
대두황련	70 mg	66 mg	70 mg	66 mg
계피	70 mg	66 mg	70 mg	66 mg
작약	60 mg	56 mg	60 mg	56 mg
맥문동	60 mg	56 mg	60 mg	56 mg
황금	60 mg	56 mg	60 mg	56 mg
당귀	60 mg	56 mg	60 mg	56 mg
방풍	60 mg	56 mg	60 mg	56 mg
백출	60 mg	56 mg	60 mg	56 mg
시호	50 mg	47 mg	50 mg	47 mg
길경	50 mg	47 mg	50 mg	47 mg
행인	50 mg	47 mg	50 mg	47 mg
복령	50 mg	47 mg	50 mg	47 mg
천궁	50 mg	47 mg	50 mg	47 mg
우황	14 mg	45 mg	14 mg	45 mg
아교	70 mg	66 mg	70 mg	66 mg
영양각	35 mg	38 mg	35 mg	38 mg
사향	-	-	5 mg	38 mg
영묘향	15 mg	114 mg	-	-
용뇌	41 mg	38 mg	41 mg	38 mg
백련	30 mg	28 mg	30 mg	28 mg
건강	30 mg	28 mg	30 mg	28 mg
꿀				
안식향산나트륨	6 mg	10 mg	6 mg	10 mg
파라옥시안식향산프로필	9 mg	15 mg	9 mg	15 mg
파라옥시안식향산메틸	15 mg	25 mg	15 mg	25 mg
정제수				
냉동건조분말량	392.25 mg	485.38 mg	382.25 mg	409.38 mg
용량	30 ml	50 ml	30 ml	50 ml

¹LC-WHCSW: 영묘향함유(저용량) (30 ml/60 kg human body)

²HC-WHCSW: 영묘향함유(고용량) (50 ml/60 kg human body)

³LM-WHCSW: 사향함유(저용량) (30 ml/60 kg human body)

⁴HM-WHCSW: 사향함유(고용량) (50 ml/60 kg human body)

액 (HM-WHCSW)은 67.96 mg/kg체중, 저농도 영묘향함유 우황청심원액 (LC-WHCSW)은 6.54 mg/kg체중, 고농도 영묘향함유 우황청심원액 (HC-WHCSW)은 82.23 mg/kg체중으로 설정하였다. 정상대조군 및 sham 대조군의 약물대신에 동량의 생리식염수를 투여하였으며, 오전투여를 하기 전에 대조군 및 투여군의 체중을 측정하였다. 투여를 시작하고 7일째 되는 날 오전투여를 마친 후 4시간 후에

뇌허혈을 유도하기 위한 수술을 실시하였고, 수술이 끝난 동물은 약 12시간이 경과한 후 약물의 투여를 재개하였다. 수술 후 5일이 경과한 후 오전투여를 마치고 약 3~4시간 후에 희생시켜 심장을 통해 고정액을 주입하여 뇌를 고정하였다 (Scheme 1).

4) 허혈 유발

Mongolian gerbil을 사용하여 경동맥 절찰법으로 대뇌 허혈을 유발시켰다. 3% isoflurane을 이용하여 실험동물을 도임마취시킨 후 농도를 1% 또는 2%로 낮추어 수술 전과 정에서 마취를 유지시켰다. 목 부위의 피부를 절개하고 근육을 둔성분리한 후, 경동맥을 미주신경과 주위조직으로부터 분리하고 microaneurysm clip을 사용하여 양측 경동맥을 10분간 폐쇄하였다. 경동맥 폐쇄로 인한 뇌로의 혈액공급 차단효과를 확인하기 위해, 경동맥 폐쇄후 ophthalmoscope를 사용하여 middle cerebral artery의 한 분지인 ophthalmic artery의 굵기가 감소하는지 확인하였다. 대뇌 허혈유발 전 과정에 걸쳐 rectal probe를 사용하여 체온을 측정하고, rectal probe에 연결되어 있는 heating pad를 이용하여 체온을 37°C 이상 유지시켰다. sham 대조군은 동일한 방법으로 마취 후 경동맥 절찰에 의한 뇌허혈을 유발시켰으며, 정상대조군에는 마취 및 경동맥 분리를 수행하였으나 경동맥 폐쇄는 하지 않았다. 수술 후 마취가 깨어나면 격리시켜 먹이와 물을 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

5) 조직의 처리

허혈 유발 후 5일이 경과한 실험동물을 Isoflurane(5%)으로 심마취시킨 후 흉강을 열고 대동맥을 통해 고정액을 관류시켜 뇌를 고정하였다. 고정액을 주입하기 전 calcium free tyrode 용액 50 ml을 주입하여 조직으로부터 혈액을 완전히 제거한 후 4% paraformaldehyde 및 0.2% picric acid를 포함한 0.4M phosphate buffer(Lana's fixative)를 관류시켜 뇌를 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 동일한 고정액에서 4시간 동안 처리하여 후고정하고, 4°C에서 20%, 30% sucrose를 포함한 TPBS 용액에 차례로 침전시켜 동결 시 조직이 손상되지 않도록 처리했다. Sucrose 처리가 끝난 조직은 조직동결처리기를 사용하여 -65°C 이하의 dry ice로 신속히 얼리고 cryostat microtome로 두께 40 μ m의 절편을 10장씩 제작하였다.

6) MAP2의 면역조직화학적 검정

준비된 조직은 endogenous peroxidase의 활성도를 떨어뜨리기 위하여 3%의 H₂O₂가 들어있는 TPBS에서 30분간 반응시킨 후 1%의 normal rabbit serum과 0.3%의 Triton-X가 들어있는 TPBS에서 1시간 동안 처리하였다. mouse에서 생산된 MAP2(microtubule associated protein2) 항혈청(Sigma, 1:8000)을 이용하여 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 일차항체와 반응이 끝난 조직은 이차항체인 rabbit anti-mouse IgG(vector, 1:200)로 실온에서 1시간 처리하고, 이어서 avidin-biotin complex(Elite kit, Vector, 1:250)와 실온에서 30분간 반응시켰다. 처리가 끝난 조직은 다시 Biotinylated tyramine 1 μ l/ml PBS+0.005% H₂O₂과 20분 동안 실온에서 반응시킨 후 avidin-biotin complex

(1:250)를 이용하여 실온에서 1시간 동안 반응을 유도하였다. 각 단계가 끝난 조직은 TPBS를 사용하여 5분간 6번씩 잔류 항체를 제거한 후 다음 단계로 진행하였으며, ABC와 반응이 끝난 조직은 DAB반응으로 실온에서 발색시켰다. 발색이 끝난 조직은 slide glass 위에서 완전히 건조시킨 다음, alcohol의 농도를 높이면서 탈수시킨 후 xylene을 거치고 cover glass를 씌워 봉입하였다.

7) 조직의 관찰 및 통계처리.

Image analyser (Metamorph, universal imaging Co.)를 이용하여 면역염색을 한 10장의 조직에서 해마부위를 50배의 배율로 허혈로 손상을 입은 면적을 측정하였다. Sham control과 비교하여 염색성이 현저히 떨어지는 부위를 허혈로 인한 손상을 받은 영역(ischemic area)으로 간주하여 그 면적과 이 부위중 MAP2염색성을 나타내는 부위(area of stained fiber)의 총면적을 함께 측정하여 그 비율을 계산하였다. Sham 대조군에서 관찰되는 신경섬유의 평균 염색밀도(mean density of stained fiber)는 허혈을 유도한 투여군에서 관찰되는 평균영역을 측정 한 후, 그 평균영역내에서 염색성을 나타내는 신경섬유들의 면적의 비율을 계산하였다. Sham 대조군의 평균 염색밀도와 비교하여 허혈유도 투여군에서 관찰되는 허혈로 인한 손상을 받은 영역에 대한 MAP2염색이 인정되는 영역의 비율을 sham control의 평균 염색밀도에 대한 백분율로 계산하여, 대조군과 투여군간의 상대적인 차에 대해 t-Test로 유의성을 검증하였다.

$$\frac{(\text{stained area} / \text{ischemic area}) \times 100}{\text{mean density of stained fiber}} \times 100$$

투여 기간중에 나타나는 실험동물의 체중변화를 알아보기 위해서, 7일째의 수술하기 전 체중과 12일째의 체중을 투여 시작일의 체중에 대한 백분율로 계산하여 대조군과 투여군간의 차이를 t-Test로 분석하였다.

실험결과

1) 체중의 변화

투여시작 후 7일(허혈 유발일) 째에 나타나는 체중변화는 각 실험군간에 있어 유의성있는 차이를 나타내지 않았으나, 12일(허혈유발후 5일) 후에 관찰한 실험동물의 체중은 sham 대조군과 저농도 사향 함유 우황청심원액(LM-WHCSW, 6.54 mg/kg) 투여군의 경우, 초기체중에 대해 각각 18.4%, 17.6%의 체중감소를 보였다(P<0.05). 그러나 고농도 사향 함유 우황청심원액(HM-WHCSW, 82.23 mg/kg), 저농도 영묘향 함유 우황청심원액(LC-WHCSW, 6.37 mg/kg) 및 고농도 영묘향 함유 우황청심원

액 (HC-WHCSW, 67.96 mg/kg) 투여군에서는 초기체중에 대해 체중 감소율은 각각 7.6%, 7.4%, 6.1%로서 유의성 있는 감소를 나타내지 않았다 ($P<0.05$) (Fig. 2). 이러한 체중감소로 볼 때 고농도 사향 함유 우황청심원액, 저농도 및 고농도 영묘향 함유 우황청심원액 투여군은 허혈 유발로 인해 일어나는 체중의 감소를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 사향 함유 우황청심원액 투여군에서는 허혈로 인한 체중감소를 억제하지 못한 것으로 관찰되었다.

2) 뇌허혈 유발에 의해 손상을 받은 CA1 지역내에서의 MAP2 염색성 변화

Table II는 뇌허혈유발에 따른 Gerbil의 hippocampus에서의 면역염색 결과로서, 허혈이 일어난 부위의 평균면적과 MAP2 immunohistochemistry에 의해 염색된 부위의

평균면적, 그리고 허혈 부위의 면적에 대한 염색 부위의 면적의 비율을 나타낸 것이다. 면역염색의 양상은 Fig. 3에서 보는 바와 같으며, MAP2면역염색성은 섬유모양으로 관찰되었다 (Fig. 3, arrowheads). 뇌허혈로 인한 MAP2의 염색성의 변화는 주로 해마의 CA1 부위에서 현저히 나타났으며, 따라서, 뇌허혈 유발에 따라 손상된 뇌조직 중 생존한 신경섬유의 면적 비율은 해마체의 CA1 지역을 대상으로 측정하였다.

정상대조군의 경우, 측정된 CA1 지역의 면적에 대해 생존한 신경섬유가 차지하는 면적의 비율은 86.3% 인데 반하여, 경동맥 결찰이 수행되었던 Sham 대조군의 경우, 생존 신경섬유가 차지하는 면적의 비율이 14.4%로서 뇌허혈 유발 수술에 따라 해마체의 CA1 지역 내에 분포하는 대부분의 신경섬유가 소실되는 것으로 나타났다 (Table II, Fig. 4). 시험약물의 투여는 뇌허혈 유발을 위한 경동맥 결찰 수술 7일 전부터 수술 후 5일까지 12일 동안 매 12시간마다 1회씩 경구투여로 수행되었으며, 그 결과, 뇌허혈 유발에 따라 손상된 해마체 CA1 영역 내에서 생존한 신경섬유가 차지하는 비율은 각각 저농도 사향 함유 우황청심원액 투여군의 경우 17.3%, 고농도 사향 함유 우황청심원액 투여군은 37.8%, 저농도 영묘향 함유 우황청심원액 투여군은 27.8%, 고농도 영묘향 함유 우황청심원액 투여군은 35.5%로 나타났다. Sham 대조군에서 나타나는 생존 신경섬유가 차지하는 면적과 통계학적인 비교 결과, 저농도 사향 함유 우황청심원액을 제외한 시험약물 투여군, 즉 고농도 사향 함유 우황청심원액 투여군 ($P<0.01$), 저농도 및 고농도 영묘향 함유 우황청심원액 투여군 ($P<0.05$) 모두 유의한 신경세포 생존율을 보였다.

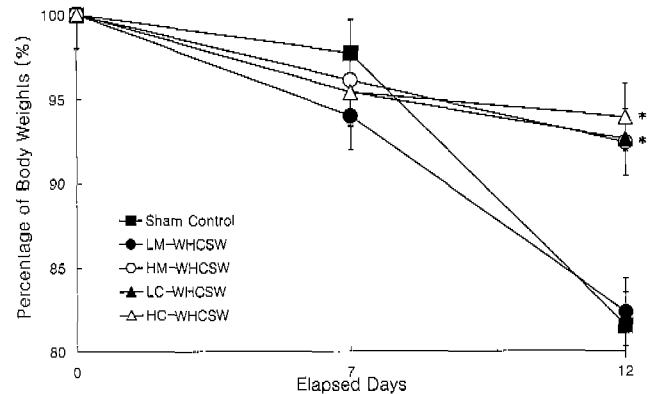


Fig. 2. Change of body weights during the administration period. LC-WHCSW: low dose of civet containing WooHwangChungSimWon, HC-WHCSW: high dose of civet containing WooHwangChungSimWon, LM-WHCSW: low dose of musk containing WooHwangChungSimWon, HM-WHCSW: high dose of musk containing WooHwangChungSimWon. *: significantly different with $p<0.05$

고찰

우황청심원은 동양에서 전통적으로 사용해왔던 한방약물

Table II. Area of hippocampus affected by bilateral carotid artery occlusions in each group.

Administrated sample	The number of animals	The area of CA1 region (mm ²)	The area of stained fibers (mm ²)	Ratio (%)
Normal	5	76.8 ± 8.2	66.3 ± 4.1	86.3 ± 3.9
Sham control	6	72.1 ± 7.0	10.3 ± 2.0	14.4 ± 2.9
LM-WHCSW	5	80.4 ± 5.2	11.8 ± 3.6	17.3 ± 5.0
HM-WHCSW	5	66.4 ± 5.9	24.8 ± 3.3	37.8 ± 4.7**
LC-WHCSW	5	77.0 ± 3.5	21.1 ± 2.8	27.8 ± 4.3*##
HC-WHCSW	6	74.2 ± 9.4	27.1 ± 5.8	35.5 ± 4.4*

ratio=(stained area / ischemic area) × 100 (%) * statistical significance compared with sham control group ($p<0.05$) ** statistical significance compared with sham control group ($p<0.01$) # statistical significance between the musk containing and civet containing WooHwangChungSimWon ($p<0.05$) ## statistical significance between the musk containing and civet containing WooHwangChungSimWon ($p<0.01$) LM-WHCSW: low dose of musk containing WooHwangChungSimWon (6.37mg/kg body weight); HM-WHCSW: high dose of musk containing WooHwangChungSimWon (67.96mg/kg body weight); LC-WHCSW: low dose of civet containing WooHwangChungSimWon (6.54 mg/kg body weight); HC-WHCSW: high dose of civet containing WooHwangChungSimWon (82.23 mg/kg body weight)

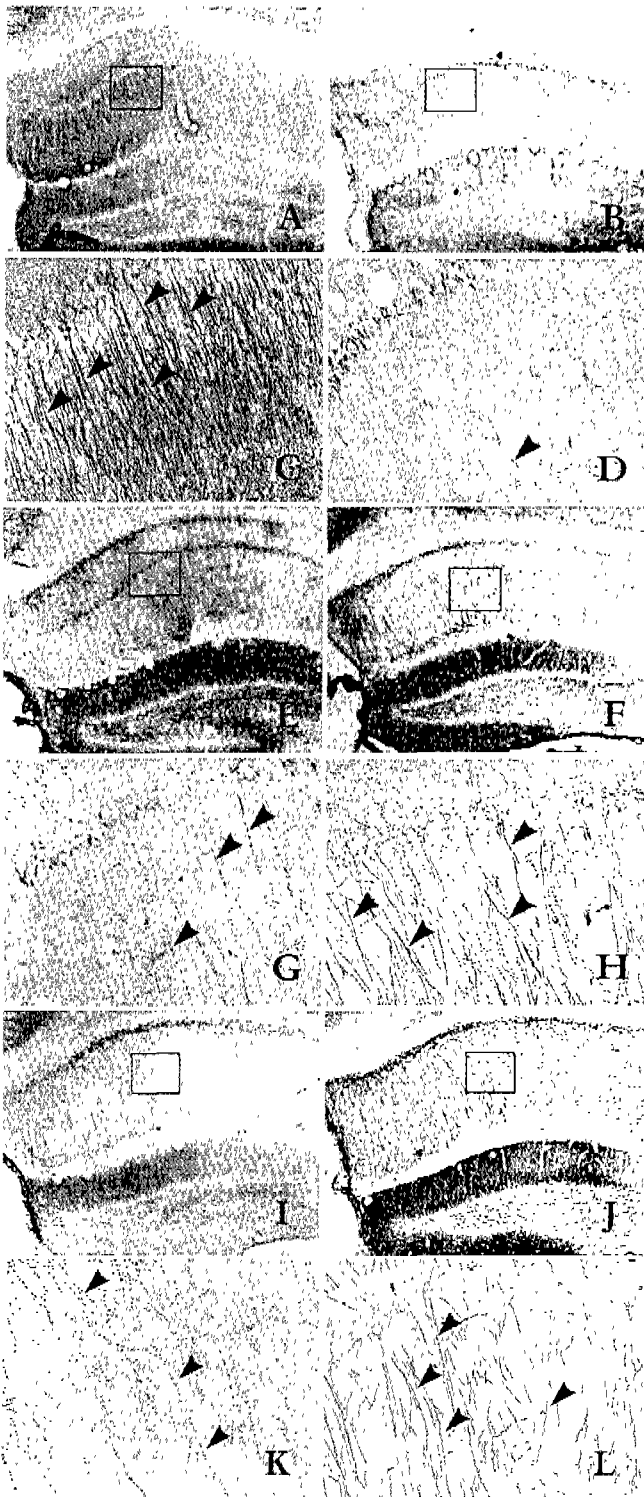


Fig. 3. MAP2 immunohistochemistry in each group. A,C= Normal, B,D=sham control, E,G=low dose of Civet containing WooHwangChungSimWon, F,H=high dose of Civet containing WooHwangChungSimWon, I,K=low dose of musk containing WooHwangChungSimWon, J,L=high dose of musk containing WooHwangChungSimWon, arrows=nerve fibers stained by MAP2 immunohistochemistry.

로서 태평혜민화제국방, 동의보감 등에 처방이 기재되어있으며 방약합편, 동의처방대전 등에 따르면 고혈압, 동맥경화 등의 심혈관계 질환 및 자율신경실조, 정신불안 등의 중추신경계 조절, 뇌졸중 등에 사용되어져 왔으며, 혈압강하 작용과 심수축력 억제 효과, 평활근에 대한 작용, 순환기계에 미치는 영향 등에 대해 보고된 바 있다 (남상경 등, 1990; 이원철 등, 1990; 홍남두 등, 1990; Cho 등 1997).

본 연구는 뇌허혈 유발에 따른 뇌조직 손상에 있어서 기존의 처방인 사향 함유 우황청심원액과 사향을 영묘향으로 대체한 영묘향 함유 우황청심원액의 뇌조직 보호 효과를 비교 검사한 것이다. 뇌의 전두엽 부분은 뇌허혈 손상에 상당히 민감하여, Mongolian Gerbil의 뇌조직 중 striatum, cerebral cortex, hippocampus의 CA1 region 등이 여기에 속한다고 보고되어 있으며 (Urban 등, 1989, Araki 등, 1990, Kato 등, 1989), 생화학적으로 허혈에 의한 뇌조직 손상에 따라 산소와 glucose의 공급량이 줄어들고 결과적으로 adenosine triphosphate (ATP) 형성을 감소시킨다고 보고된 바 있다 (Fukuchi 등, 1998; Siegel 등, 1996). ATP는 세포막에 존재하는 이온 펌프의 활성화와 재흡수 과정에 관여하며, 따라서 허혈 손상에 따른 ATP의 감소는 결과적으로 주요 신경 대사물 또는 이온의 항상성을 파괴시키고 그 결과 일부 신경세포의 손상이 일어나며, 허혈 손상 이후 혈액의 재관류 또는 재관류 이후의 기간 동안 각종 이온 펌프와 재흡수 채널이 재활성화됨과 함께 부가적인 신경 손상까지 유발하게 되는 것으로 보고되어있다 (Araki 등, 1989; Crain 등, 1988; Pulsinelli 등, 1982). Microtubule associated protein 2 (MAP2)는 포유류의 뇌 세포 내에 다량 분포하고, 신경돌기의 성장 등에 관여하며, 신경세포의 손상 또는 사멸에 따라 이들 단백질도 소실된다 (Olmsted 등, 1986; Wiche, 1989; Sheetz 등, 1998; Wolf 등, 1998).

본 연구에서는 대뇌 허혈시 나타나는 신경세포의 손상에 대한 영묘향 함유 처방액, 사향 함유처방액의 영향을 평가하기 위하여 뇌허혈을 유발시킨 mongolian gerbil을 이용하여, 해마체 중 CA1 영역 내 신경세포에 분포하는 MAP2에 대한 면역조직화학법을 수행함으로써 뇌허혈에 따른 신경세포의 구조적 손상을 관찰하고, 뇌허혈에 의해 손상된 조직의 면적에 대해 생존세포가 차지하는 면적의 비율을 비교하였다. 그 결과, 뇌허혈 유발에 따른 조직 손상에 대한 생존 세포의 비율은 저농도 사향 함유 우황청심원액 투여군의 경우 17.3%, 고농도 사향 함유 우황청심원액 투여군은 37.8%, 저농도 영묘향 함유 우황청심원액 투여군은 27.8%, 고농도 영묘향 함유 우황청심원액 투여군은 35.5% 등으로 나타났으며, Sham 대조군과 t-Test 방법을 이용한 통계학적 비교 결과, 저농도 사향 함유 우황청심원액을 제외한 시험약물 투여군, 즉 고농도 사향 함유 우황

청심원액 투여군 ($P < 0.01$), 저농도 및 고농도 영묘향 함유 우황청심원액 투여군 ($P < 0.05$) 모두 유의한 신경섬유 생존율을 보였다. 따라서, 이들 약물은 뇌허혈 유발에 따른 mongolian gerbil의 뇌조직 손상에 대하여 신경세포를 예방 또는 보호하는 효과를 가진다고 할 수 있다. 또한, 시험약물 투여 시작일, 시험약물 투여 7일째인 뇌허혈 유발 수술 직전 및 시험약물 투여 12일째인 실험기간 종료 후에 측정된 체중의 변화를 비교한 결과, 고농도 사향 함유 우황청심원액과 저농도 및 고농도 영묘향 함유 우황청심원액 투여군은 허혈 유발로 인해 일어나는 체중의 감소를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 저농도 사향 함유 우황청심원액 투여군에서는 허혈로 인한 체중감소를 억제하지 못한 것으로 관찰되었다. 따라서, 저농도 사향 함유 우황청심원액을 제외한 모든 시험약물, 즉 고농도 사향 함유 우황청심원액과 저농도 및 고농도 영묘향 함유 우황청심원액은 mongolian gerbil에 대한 뇌허혈 손상을 보호 또는 예방하는 효과를 가진 것으로 나타났다.

참고문헌

- Araki T, Kato H, Kogure K (1989) Selective neuronal vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: distribution and time course. *Acta Neurol Scand* **80**: 548-553
- Araki, T., H Kato, and K Kogure. (1990) Neuronal damage and calcium accumulation following repeated brief cerebral ischemia in the gerbil. *Brain Res.* **528**: 114-122.
- Charriaut-Marlangue C., Margaiil I., Represa A., Popovici T., Plotkine M. and Ben-Ari Y. (1996) Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an *in situ* DNA fragmentation analysis. *J. cerebr. Blood Flow Metab.* **16**, 186-194.
- Cho TS, Lee SM, Kim ND, Huh IH, Ann HS, Kwon KI, Park SK, Shim SH, Shin DH., and Park KD (1997) Pharmacological actions of new woohwangchungsimwon liquid on cardiovascular system. *J. Applied Pharmacol.* **5**: 390
- Crain BJ, Westerkam WD, and Harrison AH, (1988) Nadler JV Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil: a silver impregnation study. *Neuroscience* **27**: 387-402
- Du C., Hu R., Csermanky C. A., Hsu C. Y. and Choi D. W. (1996) Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J. cerebr. Blood Flow Metab.* **16**, 195-201.
- Fukuchi T, Katayama Y, Kamiya T, McKee A, Kashiwagi F, Terashi A (1998) The effect of duration of cerebral ischemia on brain pyruvate dehydrogenase activity, energy metabolites, and blood flow during reperfusion in gerbil brain. *Brain Res* **792**: 59-65
- Ito U., Spatz M., Walker J. T. and Klatzo I. (1975) Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta neuropath.* **32**, 209-233.
- Kato, H., K Kogure, and S. Nakano. (1989) Neuronal damage following repeated brief ischemia in the gerbil. *Brain Res.* **479**, 366-370.
- Kimura, M. (1980) Isoproterenol potentiation in an animal product-musk. *Trends Pharm. Sci.* **7**: 341
- Kimura, M., and Waki, I. (1966) Potentiation of β -adrenergic receptor to musk. *Jap. J. Pharmacol.* **16**:129
- Kindy M. S., Bhat A. N. and Bhat N. R. (1992) Transient ischemia stimulates glial fibrillary acid protein and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus. *Molec. Brain Res.* **13**, 199-206.
- Martin S. J. and Green D. R. (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts. *Cell* **82**, 349-352.
- Mishra, R. K., Arora, R.B. and Seth, S.D.S. (1937) Anti-inflammatory effect of musk. *J. Pharm. Pharmacol.* **14**: 830
- Olmsted, J.B., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., (1996) Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110(mark): Phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics. *J. Biol. Chem* **271**, 10834-10843.
- Pulsinelli WA, Brierley JB, and Plum F. (1982) Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* **11**: 491-498
- Sheetz, M.P., Peter, K.K., Bulinski, J.C., Cotman, C.W., (1998) Mechanisms of traking in axons and dendrites: Implications for development and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol* **55**, 577-594.
- Siegel A, Baker RR (1996) Activities of enzymes in platelet activating factor biosynthetic pathways in the gerbil model of cerebral ischemia. *Biochem Cell Biol* **74**: 347-354
- Taneja, V., Siddiqui, H. H. and Arora, R. B. (1973) Studies on the anti-inflammatory activity of *Moschus moschiferus* (Musk) and its possible mode of action. *Ind. J. Physiol. Pharmac.* **17**: 241
- Urban, L, KH Neill, ,BJ Crain, JV Nadlerm, and GG Somjen (1989) Postischemic synaptic physiology in area CA1 of the gerbil hippocampus studied *in vitro*. *J. Neurosci.* **9**: 3966-3975.
- Weaver V. M., Carson C. E., Walker P. R., Chaly N., Lach B., Raymond Y., Brown D. L. and Sikorska M. (1996) Degradation of nuclear matrix and DNA cleavage in apoptotic thymocytes. *J. Cell Sci.* **109**, 45-46.
- Wiche, G., (1989) High-Mr microtubule-associated proteins: properties and functions. *Biochem. J* **259**, 1-12.
- Wolf, N.J., Zimmerman, M.D., Johnson, G.V.W., (1999) Hippocampal microtubule-associated protein-2 alterations with contextual memory. *Brain Res* **821**, 241-249.
- 남상경, 이경섭 (1990) 우황청심원과 소합항원의 효능에 관한 연구. *경희의학* **19**: 220-237.
- 염태환 (1975) 동의처방대전, 행림서원, pp332
- 이원철, 김영석, 배형섭, 구분홍 (1990) 우황청심원의 체형별 임상에 관한 연구, 대한한의학회지 **11**: 102.
- 진사문 (1987) 태평हे민화제국방, 대북, 선풍출판사, pp81.
- 허준 (1987) 원본동의보감, 남산당, pp692.
- 홍남두, 김남재, 김규섭 (1990) 우황청심원의 순환기계제에 미치는 영향. *생약학회지.* **18**: 241.
- 황도연 (1977) 방약합편, 행림출판사, pp102.