

황련해독탕(黃連解毒湯)의 4-VO로 유발한 흰쥐뇌허혈에 대한 신경보호효과

이민정, 김영옥, 이강진, 유영범, 김선여, 김성수¹⁾, 김호철

경희대학교 동서의학대학원 한약리학교실, 경희대학교 한의과대학 한방재활의학과¹⁾

Neuroprotective Effect of *Hwangryunhaedok-tang* on the Brain Ischemia Induced by Four-Vessel Occlusion in Rats

Min-Jung Lee, Young-Ock Kim, Kang-Jin Lee, Young-Beob Yu, Sun-Yeou Kim,
Sung-Soo Kim¹⁾, Ho-cheol Kim

Grand. school of East-West Medical Science, Dep. of Herbal Pharmacology Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea,
Dept. of Oriental Rehabilitation, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University¹⁾, Seoul 130-701, Korea

Objectives: *Hwangryunhaedok-tang* (Huang-lian-jie-du-tang, HRHDT, 黃連解毒湯) is a traditional Korean herbal medicine that is formulated with *Coptidis Rhizoma*, *Phellodendri Cortex*, *Scutellariae Radix* and *Gardeniae Fructus*. HRHDT is cold (寒) and bitter (苦) in nature and has general properties of clearing heat and detoxifying (清熱解毒), strengthening the stomach and settling the liver (健胃平肝), and reducing inflammation, fever and swelling. This formula can prevent and treat arteriosclerosis, hyperplasia of the endothelium, cerebral fluid circulation, cerebral vascular deterioration through aging, impairment of neurotransmitters, or disruption of the functioning of the cerebral cortex following infection or trauma. The purpose of the study reported here was to determine the neuroprotective effect of HRHDT on global ischemia induced by 4-vessel occlusion in Wistar rats.

Methods: HRHDT extract was lyophilized after extraction with 85% methanol and 100% water. Rats were induced to 10 minutes of forebrain ischemia by 4-vessel occlusion (4-VO) and reperused again. HRHDT was administered with a dose of 100 mg/kg, and 500 mg/kg of 85% methanol extracts and 100 mg/kg of 100% water extracts, respectively, at 0 min and 90 min after 4-VO. Rats were killed at 7 days after ischemia and the number of CA1 pyramidal neurons was counted in hippocampal sections stained with cresyl violet.

Results: Body temperature of animals showed no significant difference between saline-treated groups and HRHDT extracts-treated groups until 5 hours of reperfusion. This result indicated that neuroprotective effects of HRHDT extracts were not due to hypothermic effects. The administration of HRHDT showed a significant neuroprotective effect on hippocampal CA1 neurons at 7 days after ischemia compared to the saline-treated group ($P < 0.001$). HRHDT methanol extracts of 100 mg/kg, 500 mg/kg and HRHDT water extracts of 100 mg/kg showed 88.5%, 98.3% and 95.1% neuroprotection, respectively.

Conclusions: The results of this study demonstrate that administration of HRHDT is highly effective in reducing neuronal damage in response to transient global cerebral ischemia. HRHDT may involve many mechanisms that might account for its high degree of efficacy. A number of factors including free radicals, glutamate, calcium overload, NO, and various cytokines have been proposed to have an important role in causing neuronal death after short periods of global ischemia. Further studies are needed to know the neuroprotective mechanisms of HRHDT. (*J Korean Oriental Med 2002;23(4):161-168*)

Key Words: *Hwangryunhaedok-tang* (Huang-lian-jie-du-tang), 4-vessel occlusion (4-VO), brain ischemia, neuroprotection, hippocampus

· 접수 : 2002년 9월 4일 · 채택 : 2002년 10월 28일
· 교신저자 : 김호철, 경희대학교 동서의학대학원 한약리학교실,
(Tel. 02-961-0419, Fax : 02-964-0325, E-mail : hckim@khu.ac.kr)
* 보건복지부 한방치료기술연구개발사업 (HMP-00-CO-04-0004)

서 론

黃連解毒湯은 葛의 肘後備急方에 처음으로 수록 되었으며¹⁾ 약성은 苦寒하여 淸熱解毒, 健胃平肝 등의 효능이 있어, 일체의 實熱火毒이 三焦에 가득 차서 나타나는 大熱煩燥, 口燥咽乾, 錯語不眠 등의 증상과 또는 熱病으로 인한 吐血, 衄血, 심한 熱로 인한 發斑, 身熱下痢, 濕熱黃疸, 小便黃赤, 舌紅苔黃, 脈數有力 등의 증상에 사용되어 왔다²⁾. 주요 약리작용으로는 혈압강화작용³⁾, 항산화 작용⁴⁾, 위 장관 질환과⁵⁾ 급성 간 질환에⁶⁾ 대한 보호 효과, 소염작용^{7,8)}, 진정작용⁹⁾, 혈관 이완 작용¹⁰⁾ 및 심혈관계질환에 대한 보호 효과¹¹⁾ 등이 보고되어 있다. 黃連解毒湯을 구성하는 약제는 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子로 黃芩은 항산화작용¹²⁾, 혈압강화작용, 고지혈증 개선작용, 진경작용 등의 약리작용이 연구되어 있고, 黃連은 강심, 항부정맥 작용, 혈압강화 작용, 혈소판응집 억제, 혈당강화 작용 등의 약리작용이 알려져 있으며, 黃柏은 혈압강화 작용, 항부정맥 작용 등이 연구되어 있다. 그리고 梔子は 혈압강화 작용, 심근수축억제 작용 등이 알려져 있다¹³⁾. 이들 黃連解毒湯을 구성하는 약제들의 심혈관계통에 대한 작용이 중풍에서의 신경세포 손상에 대한 방어효과와 관련이 있을 것으로 생각하여 신경세포 손상의 모델로서 흰쥐의 4-Vessel Occlusion (4-VO) 를 이용한 전뇌허혈모델을 사용하여 중풍에 대한 치료효과와 치료기전을 약리학적으로 관찰하였다.

본 연구에서 이용한 4-VO 모델은 1979년 Pulsinelli 가 개발한 것으로써¹⁴⁾, 전뇌 부위의 세포의 glutamate 와 K⁺의 농도 및 세포내 Ca²⁺을 증가시키고, 뇌의 neocortex, striatum, hippocampal CA1 부위, 그리고 cerebellum에 선택적으로 신경세포의 손실을 가져오므로 뇌의 허혈성으로 발생하는 신경세포손상을 관찰할 수 있다. 따라서 이에 대한 黃連解毒湯의 효능을 연구하기 위하여 黃連解毒湯 85% 메탄올추출물과 100% 물추출물을 시료로 하였고, 이 시료를 뇌 허혈 유발 후에 투여하여 신경세포 손상이 가장 크게 나타나는 일주일 후에 hippocampus의 CA1부분의 신

경세포수를 관찰하므로써 황련해독탕의 신경방어작용을 연구하였다.

실 험

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 황련해독탕의 처방 구성 내용은 황금 *Scutellaria baicalensis* GEORGI, 황련 *Coptis japonica* MAKINO, 황백 *Phellodendron amurense* RUPRECHT, 치자 *Gardenia jasminoides* ELLIS 이다. 이들 약재는 경동시장에서 구입한 것으로, 경희대학교 동서의학대학원 한약리학교실 김호철 교수의 검증을 받아 실험에 사용하였다. 약재는 각 750g씩 정선하여 모두 합한 후, 85% 메탄올과 100% 물 1,200 ml에 각각 1시간씩 3회 초음파 추출하여 여과한 다음 감압농축 하였다. 이를 각각 동결 건조하여 정제된 메탄올추출물 318 g (수율 10.6%, 이하 황련해독탕 메탄올추출물) 과 물추출물 93.9 g (수율 3.13% 이하 황련해독탕 물추출물) 을 얻어 시료로 사용하였다.

2) 동물

본 실험에 사용한 동물은 Wistar 계 체중 180-200 g 의 수컷 흰쥐로, (주)중앙실험동물로부터 구입하였다. 동물은 고행사료 [삼양유지사료(주)] 와 물을 충분히 공급하면서 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2. 방법

1) 4-Vessel Occlusion (4-VO) 에 의한 전뇌허혈 유발

4-VO 모델은 Pulsinelli(1979)의 방법¹⁴⁾을 개량하여 사용하였다¹⁵⁾. 흰쥐를 질소와 산소의 혼합가스 (질소 70%, 산소 30%)에 포함된 5% isoflurane으로 전마취시킨 후 1.5% isoflurane으로 마취를 유지시키면서 수술을 진행하였다. 먼저 인후부위를 절개한 후, 총경동맥에 실리콘 튜브로 고리를 만들어 허혈 유발 후 재관류 할 수 있도록 장치하였다. 그리고 허혈 유발시 미세혈관의 순환을 봉쇄하기 위하여 뒤쪽으로는 trachea, esophagus, external jugular vein, common

carotid arteries들이 위치하고 앞쪽으로는 cervical, paravertebral muscle들이 지나가도록 실로 꿰뚫은 다음 수술용 클립으로 상처를 봉합하였다. 그 다음 후두부를 수술하기 위하여 stereotaxic apparatus에 머리를 고정시킨 후, 수평면에서 머리를 기준으로 하여 꼬리를 30° 경사지게 밑으로 고정시켰다. 후두골을 절개 후, 후두골 하단의 1번 경추에 위치한 alar foramina 쪽으로 근육이 다치지 않게 접근하여 1 mm 이하의 미세한 전기 소작침을 alar foramina로 집어넣고 간헐적인 전류를 통전 시켜 밑으로 통과하는 척추동맥을 소작하였다. 척추동맥이 완전히 소작되어서 폐쇄되었다는 것을 확인한 다음 수술용 클립으로 봉합하였다. 24시간 뒤 수술용 클립을 제거한 후, 총경동맥에 미리 장치한 실리콘 튜브의 고리를 이용하여 10분 동안 조여서 허혈을 유발하였다. 만약 1분 이내에 대광 반사가 소실되지 않으면 경부 봉합을 단단하게 하였고, 이 때 대광 반사가 소실되지 않은 흰쥐들은 완전한 양측 평행적인 CA1 신경손상이 유발되지 않은 것이므로 이 실험에서 제외시켰다. 10분 후 총경동맥의 조임을 풀어 재관류 시키고 그 후, 20분 동안의 의식 소실 여부를 관찰한 다음 의식 소실 시간이 20 ± 5 분인 흰쥐들만을 실험에 사용하였다. 체온은 허혈 유발 후 2시간까지는 30분 간격으로 측정하고 이후 3시간동안은 1시간 간격으로 측정하면서 온도 조절 전열기를 이용하여 회복기 동안 체온을 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지시켰다. 체온측정은 직장 속으로 최소한 6cm 들어가게 probe를 삽입하므로써 뇌 온도를 반영하는 체온을 측정하였다^{16,17}.

2) 시료의 투여와 실험군의 설정

흰쥐의 전뇌허혈에 대한 황련해독탕의 효능을 측정하기 위하여 메탄올추출물과 물추출물을 각각 용량별로 나누어 약물의 흡수가 빠르고 경구투여시보다 생체 내 이용률이 높은 복강 내 투여를 하였다. 약물의 투여시간은 허혈 유발 후 0분 및 90분으로 하였다. 황련해독탕 메탄올추출물과 물추출물을 0.89%의 생리식염수에 녹여 $0.45 \mu\text{m}$ microfilter (Sartorius, Germany)로 여과한 후 사용 하였는데, 메탄올추출물은 각 100 mg/kg 및 500 mg/kg의 용량을 복강 내 주사

하였고 물추출물은 100 mg/kg의 용량을 복강 내 주사하였다. 이때 주입량은 모두 0.2 ml/kg으로 일정하게 하기 위하여 각각 다른 농도의 용액으로 만들어 사용하였다. 실험 동물은 무작위로 5개군으로 나누어 실험하였다. 제1군은 정상대조군으로 수술과정은 같게 하였지만 허혈 유발은 일으키지 않았다. 제2군은 대조군으로 허혈을 유발시킨 후 시료투여와 같은 시간간격으로 0.89% 생리식염수 0.2 ml/kg을 복강 내 주사하였다. 제 3, 4군은 각각 황련해독탕 메탄올추출물 100 mg/kg과 500 mg/kg의 농도를 허혈 유발 후 0분 및 90분에 복강 내 투여하였고, 제 5군은 황련해독탕 물추출물 100 mg/kg의 농도를 같은 시간간격으로 복강 내 투여하였다.

3) 조직표본제작

조직학적인 평가를 위하여 허혈 유발 1주일 후에 흰쥐를 chloral hydrate (Junsei Chemical Co., Japan, 35.0 mg/kg, i.p.)로 마취시켜 개흉한 다음, 우십이를 절개하고 needle(No.18)을 좌심실에 주입한 후 헤파린 처리된 5% sodium nitrite (Sigma, U.S.A.) 생리식염수를 심장에 관류시키고, 이어서 pH 7.4의 0.1 M phosphate buffer 에 녹인 4.0% paraformaldehyde (PFA, Sigma, U.S.A.) 고정액으로 관류시켰다. 그 후 흰쥐의 뇌 부분을 떼어내어 2시간 동안 4°C에서 4% PFA 고정액에 고정시킨 후 0.1 M phosphate buffer에 두 차례 헹구어 준 다음, 30% sucrose (Sigma, U.S.A.)에 담가 4°C에서 하룻밤 동안 놓아두었다. 고정된 뇌에서 Bregma -2.5 mm와 -4.0 mm사이의 dorsal hippocampus 부위에 있는 coronal block을 준비하였다. 이 block을 동결한 후 sliding microtome (HM440E, Zeiss, Germany)을 사용하여 해마를 포함하는 조직절편을 만들었다. 표본제작을 위한 조직절편은 매 30 μm 씩 수집하였다.

4) 손상된 신경 세포 수 관찰

Dorsal hippocampus를 포함하는 절편을 cresyl violet에 염색하여 고정한 다음 dorsal hippocampal CA1 중 가장 delayed neuronal death에 손상받기 쉬운 부분인¹⁸⁾ middle zone의 1 mm길이에서 신경세포 수를 관찰하였다. 세포수의 관찰은 고배율($\times 400$)에서 정

상적인 형태를 보이는 pyramidal cell의 수를 3인의 관찰자가 한 개의 뇌 조직에서 3개의 다른 조직절편의 좌우양측 2개, 총 6부위에서 관찰하여 평균하였다. 관찰자에게는 관찰 시 실험군에 대한 정보를 모르게 하고 세포수를 관찰하도록 하였다.

5) 통계방법

약물의 효과를 판정하기 위하여 각 실험군을 Student's t-test를 사용하여 대조군과 비교하였다.

결 과

1. 약물의 투여 농도에 대한 체온의 변화

뇌 허혈을 유발하고 재관류한 다음 각 농도의 시료들을 투여하면서 5시간까지 체온을 관찰하였다. 체온 측정의 결과에서 황련해독탕 매탄올추출물 100 mg/kg 및 500 mg/kg 와 물추출물 100 mg/kg에서 모두 유의한 체온하강은 보이지 않았다 (Fig. 1).

2. 신경세포 손상 관찰

허혈을 유발하지 않은 정상대조군에서는 490 μm길이의 striatum pyramidal에서 정상의 hippocampal neuron들이 관찰되었다 (Fig. 2: A, b). 그리고 허혈 유

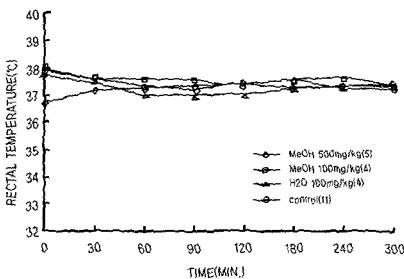


Fig. 1. HRHDT did not cause any significant change in rectal temperature change following cerebral ischemia. Rectal temperatures were measured in rats subjected to global cerebral ischemia for 10 min. Each sample was administered 0.89% physiological saline (0.2 ml/kg, i.p.; control), HRHDT methanol extracts of 100mg/kg (n=4), 500mg/kg (n=5) and HRHDT water extracts of 100mg/kg (n=4) at 0 and 90 minutes following ischemia, respectively. Number in parenthesis represents the number of animals.

발 후 생리식염수를 투여한 대조군에서는 신경세포의 apoptosis가 일어남을 형태학적인 변화를 통해 관찰할 수 있었다 (Fig. 2: C, d). Fig. 2의 d의 경우는 b와는 다르게 조직이 이완되면서 세포들이 주변세포로부터 분리되어 유리되는 현상을 볼 수 있었으며 cell body 역시 본래의 pyramidal 형태를 잃고 응축되어 단일세포의 형태로 되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 핵 염색질의 농축과 핵막의 붕괴 등으로 점차 apoptosis 과정이 이루어짐을 확인할 수 있었다.

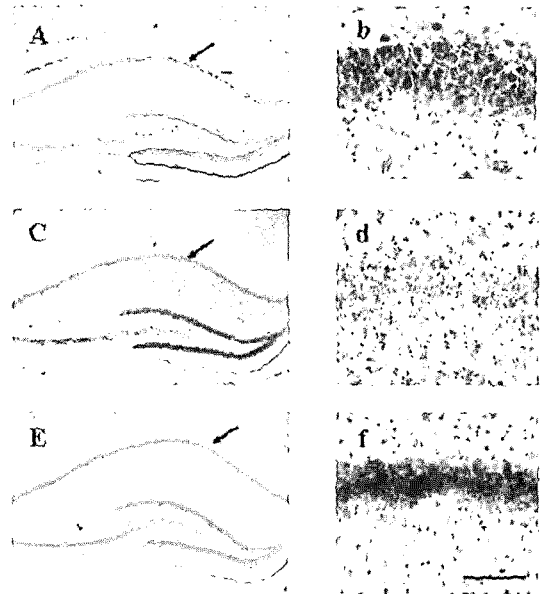


Fig. 2. Typical photomicrographs of the rat right hippocampus at 7 days after 10 minute ischemia in the sham, control and HRHDT treated groups. Cresyl-violet staining of coronal brain sections at the dorsal hippocampus showed selective, and delayed neuronal cell loss in the hippocampal CA1 induced by global ischemia. In the sham-operated rats, arrow showed the tracks of the CA1 pyramidal neurons(A) and the majority of pyramidal cells in the CA1 subfield present unaltered staining properties(b). In control rats, arrow showed a reduced staining intensity of the pyramidal cell layer and neuronal changes were restricted to the CA1 subfield (C). The damage could be characterized by coagulative cell change of pyramidal neurons and pronounced gliosis (d). HRHDT MeOH extracts (100 mg/kg) treated group (E,f) showed a marked reduction in the number of irreversible damaged pyramidal cells in the CA1 subfield each. Scale bar is 100.0 μm.

반면 황련해독탕 추출물을 투여한 군의 hippocampus CA1부위에서는 정상대조군의 조직과 유사한 세포의 형태를 관찰할 수 있었다(Fig. 2: E, f). Fig. 2의 f에서는 hippocampus 부위를 중심으로 아래위에 걸쳐 유리된 세포들이 관찰되었으며 cell body 역시 본래의 형태와는 다르게 응축된 것도 발견할 수 있었는데 이는 apoptosis 과정이 일어날 만큼 세포들이 손상을 받았다는 간접적인 증거이다^{19,20}.

3. 황련해독탕 추출물의 신경세포손상 방어효과

뇌 허혈 유발 1주일 후에 신경세포손상을 관찰한 결과, 정상대조군에서는 315.5 ± 6.6 cells/mm (n=16)으로 나타났으나 생리식염수를 투여한 대조군에서는 27.3 ± 3.8 cells/mm (n=11)로 정상대조군에 비하여 세포가 손상되었음을 알 수 있었다. 이러한 정상대조군과 생리식염수를 투여한 대조군에 비교한 황련해독탕 추출물의 효과(Fig. 3)는 메탄올추출물 100 mg/kg과 500 mg/kg을 투여한 실험군에서 각각 282 ± 14.8 cells/mm (n=4)과 310 ± 5.8 cells/mm (n=5)로 유의한 방

어효과가 나타났고 (P<0.001), 물추출물 100 mg/kg을 투여한 실험군에서도 301 ± 4.8 cells/mm (n=4)로 유의한 효과가 나타났다(P<0.001). 방어효과를 나타낸 황련해독탕 메탄올추출물 100 mg/kg, 500 mg/kg과 물추출물 100 mg/kg의 용량에서 대조군의 세포소실에 대하여 세포소실을 방어한 정도는 각각 88.5%, 98.3%, 95.1%로 나타났다 (Fig. 3).

고찰 및 결론

黃連解毒湯을 구성하는 약재들의 주요 성분들 중 黃芩의 baicalein, biacalin, wogonin, wogonoside에는 과산화지질 생성에 대한 억제 작용으로 인한 항산화 작용¹²과 collagen에 의한 혈소판응집 억제작용이 있고, 黃蓮, 黃栢의 berberine은 아드레날린성 α수용체를 경쟁적으로 차단하여 심박동률과 말초혈관의 저항력을 낮추어 혈압강하 작용을 한다. 또한, 梔子 전탕액과 알코올 추출물을 경구투여 하거나 복강주사 하면 마취한 실험동물이나 정상적으로 깨어있는 동물의 혈압을 지속적으로 낮추는 작용이 있다¹³. 이러한 각 약재 성분들의 약리작용으로 미루어 黃連解毒湯이 뇌신경 및 심혈관계 질환을 보호하는 작용이 있다고 생각되어 진다. 따라서 뇌신경세포 손상에 대한 방어효과가 있을 것으로 생각되어 본 연구를 진행하였다.

흰쥐에 뇌허혈을 유발하고 재관류하였을 때 hippocampus의 CA1 pyramidal neuron들은 허혈에 가장 손상받기 쉬우며 이들 CA1부위의 신경세포들은 재관류후 72시간이 지나면 죽기 시작한다¹⁶. 우리는 hippocampus의 CA1부위에서 지연성 세포괴사를 관찰하기 위하여 신경세포의 손상이 거의 완전히 일어난 시점인 재관류 후 1주일에 흰쥐를 처치하여 양측의 hippocampus의 조직절편을 광학현미경으로 관찰하였다. 여기서 CA1을 중심으로 한 주변 부위의 necrotic neuron들은 증식하는 microglia와 구별하기가 매우 어려워 단지 CA1부위의 생존한 pyramidal neuron들을 계수하여 관찰하였다. 이 결과, 흰쥐에 10분간 뇌 허혈 유발 후에 투여한 黃連解毒湯 메탄올

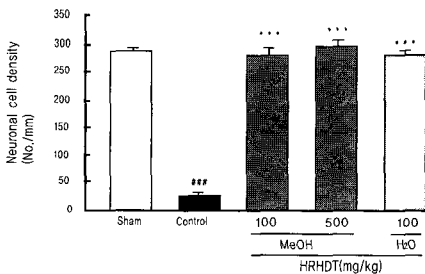


Fig. 3. Protective effects of HRHDT at 7 days after 10-minute ischemia. HRHDT was given MeOH extracts 100mg/kg (n=4), 500mg/kg (n=5) and H₂O extracts 100mg/kg (n=4) and 0.89% physiological saline 0.2mg/kg (i.p.; control) at 0 and 90 min. of ischemia. Results represented average normal-appearing CA1 pyramidal neuronal counts over a 1 mm length of both left and right hemispheres of three sections. Numbers in parenthesis are numbers of animals. Values are means±SEM. Data obtained for group were analyzed by Student's t-test compared between control and each sample group (***) P<0.001).

추출물 100 mg/kg 및 500 mg/kg과 물추출물 100 mg/kg 농도에서 모두 유의한 신경방어효과를 나타내었다. 그리고 메탄올추출물 100 mg/kg과 물추출물 100 mg/kg의 효과에 유의한 차이는 없었다. 또한 4-VO 유발에 의해 apoptosis 과정이 일어날 만큼 신경세포들이 손상을 받았음에도 불구하고 황련해독탕 추출물을 투여한 군의 hippocampus CA1부위에서는 정상대조군의 조직과 유사한 세포 형태가 관찰되었다. 이로써 많은 수의 세포들이 apoptosis로부터 방어되어 정상적인 pyramidal 형태를 이루었으며 주변세포들과의 연결이 계속 유지되었을 확인할 수 있었다. 이는 황련해독탕의 메탄올추출물과 물추출물이 4-VO로 유발된 뇌의 hippocampal CA1부위의 신경세포의 손상을 방어하였음을 보여주는 것이다. 비록 apoptosis가 진행되는 과정의 어느 단계에서 cell survival을 일으켰는지는 확인할 수 없지만 apoptosis로부터 유의성 있는 방어효과가 있음이 확인되었다. 허혈이 유발되는 동안의 체온저하가 hippocampus의 신경세포 손상을 방지하므로 신경방어효과가 나타난다는 사실²¹⁾을 근거로 하여 허혈 유발 후 5시간 동안 체온을 측정할 결과, 유의한 체온하강은 일어나지 않았으므로 체온저하에 따른 신경방어효과는 나타나지 않은 것으로 보여진다.

4-VO를 이용한 전뇌허혈 모델에서 신경방어효과를 나타내는 약물들에 대한 연구는 대개 glutamate로 인한 excitotoxicity 억제²²⁾, caspase-3 억제²³⁾, 항산화작용²⁴⁾, 소염작용²⁵⁾, NO 생성 억제²⁶⁾, 칼슘이온통로 저해²⁷⁾, γ -aminobutyric 활성²⁸⁾ 등의 기전연구에 의해 이루어지고 있다. 이미 黃連解毒湯은 생쥐의 전뇌허혈 모델에서 CuZn-SOD를 활성화 시키는 작용과 자유기 소거작용으로 뇌세포의 산화적 손상을 감소시키는 항산화작용⁴⁾, COX-2를 억제하여 leukotriene B4 (LTB4) 및 prostaglandin E2 (PGE2)를 감소시키는 소염작용^{7,8)}, 생쥐에서 benzodiazepine 유사작용으로 GABA 신경기능을 증가시키는 작용³⁰⁾에 대한 연구가 알려져 있다. 또한 黃連解毒湯을 구성하는 약재들 중 黃芩의 주요성분인 baicalein, bicalin, wogonin, wogonoside의 항산화작용¹²⁾에 대한 연구가 보고 되

어 있고, 黃蓮과 黃栢의 주요 성분인 berberine의 칼슘이온 조절작용³⁰⁾ 연구가 알려져 있으며, 梔子의 성분인 geniposide의 소염작용³²⁾과 crocin의 caspase-3 억제³²⁾와 glutamate 저해³³⁾, 항산화 작용³⁴⁾ 등의 연구가 보고 되어 있다. 이러한 각 약재들에 있는 주요성분들의 효능이 黃連解毒湯의 신경보호효과에 많은 영향을 주었을 것으로 보여진다. 이에 대해 黃連解毒湯의 신경보호 작용기전 연구와 각 개별 약재의 신경보호효과에 대한 연구가 필요 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 대한한의학회. 대한한의학회지. 서울:정담. 1985;5:686-693.
2. 김동찬, 노승현, 이상인, 이영중, 주영승. 방제학. 서울:영림사. 1990;111-113, 263-264.
3. Kawashima K, Haruo N, Kogure K. Effect of Oren-gedoku-to on cerebral vascular accident. *Pharma Medica*. 1988;6:33-36.
4. Fushitani S, Tsuchiya K, Minakuchi K, Takasugi M, Murakami K. Studies on attenuation of post-ischemic brain injury by kampo medicines-inhibitory effects of free radical production. *Yakugaku Zasshi*. 1994;114(6):388-94.
5. Takase H, Inoue O, Saito Y, Yumioka E, Suzuki A. Roles of sulfhydryl compounds in the gastric mucosal protection of the herb drugs composing oren-gedoku-to (a traditional herbal medicine). *Japanese Journal of Pharmacology*. 1991a;56:433-439.
6. Ohta Y, Sasaki E, Nishida K, Hayashi T, Nagata M, Ishiguro I. Preventive effect of Oren-gedoku-to (Huang-lian-jie-do-tang) extract on progression of carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *American Journal of Chinese Medicine*. 1997;25:57-68.
7. Mizukawa H, Yoshida K, Honmura A, Uchiyama Y, Kaku, H, Nakajima S, Haruki E. The effect of orengekodoku to on experimentally-inflamed rats. *American Journal of Chinese Medicine*. 1993;21:71-78.
8. Zhou H, Mineshita S. The effect of Oren-gedoku-to on

- experimental colitis in rats. *J Pharm Pharmacol.* 1999;51(9):1065-74.
9. Sasaki K, Yoshizaki F, Nagasue M, Ando T. Effect of Oren-gedoku-to on changes in hexobarbital-induced sleeping time : chlorpromazine-treated mice. *Yakugaku Zasshi.* 1994;114(6):431-4.
 10. Higasa K, hatake K, Higasa M, Hishida S. Vasorelaxant effects of Oren-gedoku-to and its four constituent herbs. *Journal of Medical and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU.* 1992;9:169-174.
 11. Fujiwara M, Iwasaki K. Toki-shakuyaku-San and Oren-Gedoku-To improve the disruption of spatial cognition induced by cerebral ischeamia and central cholinergic dysfunction in rats. *Phytotherapy Research.* 1993;7:S60-S62.
 12. Krieglstein J. Pharmacology and drug therapy of cerebral ischemia. In: Cerebral ischemia and resuscitation (Schurr A, Rigor BM, eds). *Boca Raton* : CRC. 1990;347-371.
 13. 김호철. 한약리학. 서울:집문당. 2001:125-140.
 14. Pulsinelli WA, Brierley JB. A new method of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 1979;10:267-272.
 15. Pulsinelli WA, Buchan AM. The Four-Vessel Occlusion Rat Model : Method for Complete Occlusion of Vertebral Arteries and Control of Collateral Circulation. *Stroke.* 1988;19(7):913-914.
 16. Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982;11:491-498.
 17. Miyazawa T, Hossmann KA. Methodological requirements for accurate measurement of brain and body temperature during global forebrain ischemia of rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12:817-822.
 18. Crain BJ, Westerkam WD, Harrison AH, Nadler JV. Selective neuronal death after transient ischemia in the mongolian gerbil: a silver impregnation study. *Neuroscience.* 1988;27:387-402.
 19. MacManus JP, Buchan AM, Hill IE, Rasquinha I, Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett.* 1993 ;164:89-92.23.
 20. Kihara S, Shiraishi T, Nakagawa S, Toda K, Tabuchi K. Visualization of DNA double strand breaks in the gerbil hippocampal CA1 following transient ischemia. *Neurosci Lett.* 1994;175:133-136.
 20. Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibani K, Komminami E, Uchiyama Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci.* 1995;15 :1001-1011.
 21. Welsh FA, Sims RE, Harris VA. Mild hypothermia prevents ischemic injury in gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10:557-563.
 20. Nurse S and Corbett D. Neuroprotection after several days of mild drug-induced hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:474-480.
 22. Kondo Y, Kondo F, Asanuma M, Tanaka K, Ogawa N. Protective effect of oren-gedoku-to against induction of neuronal death by transient cerebral ischemia in the C57BL/6 mouse. *Neurochem Res.* 2000 ; 25(2) : 205-9.
 23. Xu D, Bureau Y, McIntyre DC, Nicholson DW, Liston P, Zhu Y, Fong WG, Crocker SJ, Korneluk RG, Robertson GS. Attenuation of ischemia-induced cellular and behavioral deficits by X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein overexpression in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 1999;19(12):5026-33.
 24. Liu XH, Kato H, Chen T, Kato K, Itoyama Y. Bromocriptine protects against delayed neuronal death of hippocampal neurons following cerebral ischemia in the gerbil. *J Neurol Sci.* 1995;129(1):9-14.
 25. Block F, Bozdag I, Nolden-Koch M. Related Articles. Inflammation contributes to the postponed ischemic neuronal damage following treatment with a glutamate antagonist in rats. *Neurosci Lett.* 2001 Feb 2;298(2):103-6.
 26. Mori K, Togashi H, Ueno KI, Matsumoto M, Yoshioka M. Aminoguanidine prevented the impairment of learning behavior and hippocampal long-term potentiation following

- transient cerebral ischemia. *Behav Brain Res.* 2001;120(2):159-68.
27. Shen W, Zhang C, Zhang G. Related Articles. Nuclear factor kappaB activation is mediated by NMDA and non-NMDA receptor and L-type voltage-gated Ca(2+) channel following severe global ischemia in rat hippocampus. *Brain Res.* 2002;933(1):23-30.
28. Linda L. Sternau, MD, W. David Lust, Ph D, Anthony J. Ricci, BA, Robert Ratcheson, MD. Role for γ -Aminobutyric Acid in selective vulnerability in Gerbils. *Stroke.* 1989;20(2):281-287.30. Kato H, Araki T, Kogure K. Role of the excitotoxic mechanism in the development of neuronal damage following repeated brief cerebral ischemia in the gerbil: protective effects of MK-801 and pentobarbital. *Brain Res.* 1990;516(1):175-9.
29. Sasaki K, Sudo T, Kurusu T, Kiuchi T, Yoshizaki F. The mechanism of alteration of monoamine metabolism in brain regions in marble burying behavior-isolated housing mice and effect of oren-gedoku-to on this alteration. *Yakugaku Zasshi.* 2000;120(6):559-67.
30. Wu JF, Liu TP, Wang JX, Yang SJ. Effect of berberine on intracellular free CA²⁺ concentration in cultured brain cells. *Yao Xue Xue Bao.* 1997;32(1):15-8.
31. Suzuki Y, Kondo K, Ikeda Y, Umemura K. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model. *Planta Med.* 2001;67(9):807-10.
32. Soeda S, Ochiai T, Paopong L, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. *Life Sci.* 2001;69(24):2887-98.
33. Abe K, Sugiura M, Shoyama Y, Saito H. Crocin antagonizes ethanol inhibition of NMDA receptor-mediated responses in rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 1998;787(1):132-8.
34. Pham TQ, Cormier F, Farnworth E, Tong VH, Van Calsteren MR. Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen. *J Agric Food Chem.* 2000;48(5):1455-61.