

白鼠의 局部 腦硬塞에 대한 鈞鈞藤의 神經保護 效果

권형수, 오용성, 장우석, 이소연, 박지상, 박창국

경산대학교 한의과대학 심계내과학교실

The Neuroprotective Effects of Uncariae Ramulus et Uncus on focal cerebral ischemia in rats brains

Hyung-Su Kwon, Yong-Seong Oh, Woo-Seok Jang, So-Yeon Lee, Chi-Sang Park, Chang-Gook Park

Department of Circulatory Internal medicine, College of Oriental Medicine, Kyungsan University

The goal of this study is to investigate whether Uncariae Ramulus et Uncus can protect nerve cells against ischemic neuronal damage is caused by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats' brains and to investigate whether the neuroprotective effect of Uncariae Ramulus et Uncus is concerned with IEGs (immediate early genes) expression. Uncariae Ramulus et Uncus (100mg/kg) was administered immediately after 2 hours of MCAO and maintained for 7 days. On 7th days after 2 hours of MCAO, the brains of rats were sliced through the hippocampus. c-Fos immunohistochemistry stain and Cresyl violet stain were done for microscopic examination. Each number of viable neurons and c-Fos immunoreactive cells in CA1 was counted. The density of neurons and c-Fos immunoreactive cells were significantly decreased in MCAO-operated ischemic rats compared to that sham-operated rats. Administration of Uncariae Ramulus et Uncus group significantly elevated MCAO-induced decrease in density of neurons, and elevated MCAO-induced decrease in c-Fos immunoreactive cells. These results suggest that the neuroprotective effect of Uncariae Ramulus et Uncus against focal cerebral ischemia. Also, we hypothesized that neuroprotective mechanism of Uncariae Ramulus et Uncus is related to IEGs expression.

Key Words: Uncariae Ramulus et Uncus, cerebral ischemia, neuroprotective effect

1. 緒 論

腦卒中이란 뇌혈관의 파열이나 폐쇄로 급박한 의식장애나 운동장애, 감각장애 등과 같은 신경계통의 증상을 일으키는 질환으로 일단 발병하면 적극적인 치료에도 불구하고 불량한 예후를 나타내어, 우리나라의 경우 사회경제적 조건이 향상된 1990년대에도

여전히 사망원인 1위를 차지하고 있다¹⁻⁵.

韓醫學에서 腦卒中은 中風에 해당하며 火·氣·濕痰·虛 등이 主要原因이 되므로, 清熱滌痰, 化痰通氣, 活血通絡, 平肝熄風, 益氣養血 등의 治法을 주로 사용하게 되는데, 鈞鈞藤은 清熱·熄風·鎮靜 등의 效能이 있어 예로부터 다용해 왔으며, 근래 실험을 통한 鈞鈞藤의 成分 및 效能이 속속 밝혀지면서 鈞鈞藤에 대한 관심이 고조되고 있다⁶⁻¹⁰.

鈞鈞藤(Uncariae Ramulus et Uncus)은 性味가 甘·微寒·無毒하여 中風癱瘓, 口眼喎斜, 筋脈拘攣, 癲癇, 小兒驚啼, 客忤胎風, 高熱, 精神不安, 易怒 등의

·접수 : 2003년 1월 21일 ·채택 : 2003년 3월 10일
·교신저자 : 장우석, 대구광역시 수성구 상동 165번지 경산대학교 한의과대학 심계내과학교실
(Tel. 053-770-2178, Fax. 053-770-2169. E-mail: pfitf@hanmail.net)

諸症狀에 사용되었으며, 근래에는 실험을 통해 鈎鈎藤의 成分 중 rhynchophyline이 呼吸中樞를 興奮시키 血管의 運動中樞를 抑制하고, 주위의 血管을 擴張하여 降壓하는 作用을 하는 것으로 알려져 있다^{11,21}.

조기유전자(IEGs)에 속하는 c-Fos는 腦虛血이후 24시간 이내에 예외없이 發現과 傳寫가 증가되어 여러 뇌허혈 및 저산소뇌증 동물모델에서 뇌세포손상의 표식자로 사용되어 왔다²⁵. 하지만 그 역할이 대뇌의 지연신경세포에 대한 보호작용인지 아니면 세포독성으로 작용하는지는 명확히 밝혀진 바 없다²⁶.

이에 著者는 鈎鈎藤이 腦虛血 발생시 신경전달물질에 영향을 주어 뇌신경세포를 보호하고 치료하는 효과를 실험적으로 증명하고 아울러 c-Fos의 작용을 유추하기 위해, 인위적으로 뇌허혈을 유발시킨 백서에게 鈎鈎藤을 경구투여한 뒤 TTC염색, Cresyl violet 염색 및 c-Fos 면역조직화학법을 이용하여 뇌신경세포수를 측정함으로써 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 動物

實驗動物은 體重 250-300g 內외의 Sprague-Dawley 系 雄性 백서(삼육실험동물연구소)를 사용하였다. 물과 사료(제일사료 Co.)를 자유롭게 먹도록 하였고, 사육실내의 온도는 21~24℃, 습도는 40~50%로 유지하였으며, 낮과 밤의 주기는 각각 12時間으로 하여 實驗室 環境에 1주간 적응시킨 후 사용하였다. 실험 전에 白鼠들은 개개의 무리에 따로 두었으며 밤사에 금식을 시켰으나 물을 먹는 것은 자유롭게 하였다.

2) 藥材

鈎鈎藤(Uncariae Ramulus et Uncus)은 慶山大學校 附屬韓方病院 藥材料에서 구입한 것을 精選하여 사용하였다.

2. 方法

1) 檢液의 調劑

鈎鈎藤 400g을 round flask에 넣고 70% MeOH를

加하여 24時間동안 방치하여 추출한 다음 여과하여 감압농축한 후 MeOH를 증발시키고 동결건조하여 18.6g의 추출물을 얻었다. 이것을 9% 생리식염수에 녹여 1% 농도의 검액을 조제하였다.

2) 中大腦動脈 폐색에 의한 백서의 뇌허혈 유발

정상군을 제외한 백서를 3% isoflurane으로 흡입 유도마취 및 유지마취 후 경부를 절개하여 우측 총경동맥과 외경동맥을 3-0 suture로 결찰하였다. 결찰 후 15分 동안 백서를 안정시킨 후 감압설골근 옆을 주행하는 외경동맥을 노출시켜 polysiloxane(Xanthrone[®])을 입힌 4-0 nylon(Dafilon, USA) 봉입사(occluder)를 내경동맥을 따라 18-19 mm정도 삽입 진행하여 중대뇌동맥의 기시부를 폐쇄하였다. 절개부위를 봉합하고 마취를 중지한 후 백서는 곧 회복되었고, 중대뇌동맥의 재환류를 위해, 봉입사를 함입한 지 2시간 후 재마취를 하고 봉입사를 약 5mm 정도 퇴출하였다. 수술 및 마취 회복 기간동안 백서의 직장에 체온측정용 탐침(probe)을 삽입하고, 체온유지 패드를 이용해 백서의 체온을 37-38℃로 유지시켰다.

3) 神經症狀을 통한 中大腦動脈 폐색 확인법

神經症狀은 Bederson²⁷ 등의 방법에 따라 백서의 꼬리를 중심으로 들었을 때의 몸의 불균형, 앞발의 좌우 모양, 왼쪽으로 선회 등 세 가지로 확인하였다.

4) 檢液의 投與

實驗白鼠 6마리를 1개군으로 하여, TTC 염색법에서는 대조군(control group)과 실험군(sample group)의 2개군으로 나누었고, Cresyl violet 염색, c-Fos 면역조직화학 염색에서는 정상군(normal group), 실험군, 대조군의 3개군으로 나누었다.

TTC염색법에서는 백서가 마취에서 회복되고 신경증상을 확인한 후에, 대조군에는 0.9% 생리식염수를, 실험군에는 앞에서 조제한 검액을 각각 100mg/kg씩 1일 1회 경구투여하였다.

Cresyl violet 염색과 c-Fos 免疫組織化學 염색에서는 백서가 마취에서 회복되고 신경증상을 확인한 후에, 정상군과 대조군에는 0.9% 생리식염수를, 실험군에는 조제한 검액을 1일 1회 100mg/kg씩 7일간 경구투여하였다.

5) 虛血性 腦損傷 부위의 면적 및 용적 측정

(1) Triphenyltetrazolium hydrochloride(TTC) 염색

腦虛血 유발 24시간 후 3% isoflurane으로 마취하고 두부를 자른 다음 두개골을 절개하고, 中大腦動脈 부위의 봉입사를 확인한 후, rat brain blocker를 이용해 2mm간격으로 절단하였다. 절단한 뇌절편을 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium hydrochloride(TTC) 용액에 30분동안 염색하고, 10% phosphate-buffered formalin에 고정된 다음 11개의 brain section 중 앞쪽에서 4번째, 6번째 부위를 디지털 카메라로 촬영하였다.

(2) Cresyl violet 염색

腦虛血 유발 7일 후 TTC 염색시와 동일한 방법으로 절단한 뇌절편 중 해마 부위의 뇌조직을 인산완충액(PBST)으로 세척한 후 슬라이드-글라스에 부착하고 0.3% Cresyl violet으로 염색했다. 염색된 뇌절편을 gelatine이 도포된 슬라이드에 붙이고 약한 기류를 이용하여 말린 다음 커버-글라스로 덮고 현미경에서 400배율로 관찰하였으며, 이 때 2cm×2cm 격자 내에 보이는 Cresyl violet이 염색된 세포수를 검량하였다.

(3) c-Fos 免疫組織化學 염색

腦虛血을 유발시킨 7일 후 Cresyl violet 염색을 위해 취한 해마부위의 인접 해마부위의 뇌조직을 TTC 염색시와 동일한 방법으로 절단한 다음 PBST로 수회 세척하고, 0.3% Triton-X100, 2% rabbit anti-sheep serum 및 0.001%의 kehole limpit hemocyanin을 함유한 PBST에 2,000배 희석한 c-Fos항체(Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE, OA-11-823) 용액에 12시간 담근 다음, 4℃에서 primary antiserum과 72시간 반응시켰다. 뇌절편을 PBST로 세척하고 rabbit anti-sheep serum을 2% 함유한 PBST에 200배 희석한 biotinyl화된 rabbit anti-sheep serum(Vector Laboratories, Burlingame, CA)과 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 뇌절편을 PBST로 3회 세척하고, Vectastain Elite ABC reagent(Vector)와 실온에서 2시간 반응시키고, PBST로 세척한 후, 니켈을 함유한 용액에서 diaminobenzidine으로 발색시켰다. 단, 대조 염색할 때에는 primary 항체를 사용하지 않았으며, rabbit anti-sheep serum 대신 비면역성 sheep serum을

사용하였다. 염색된 뇌절편을 gelatine이 도포된 슬라이드에 붙이고 약한 기류를 이용하여 말린 다음 커버-글라스로 덮은 후 현미경에서 400배율로 관찰하였으며, 이 때에 2cm×2cm 격자 내에 보이는 抗c-Fos 면역 양성반응인 세포수를 검량하였다.

3. 統計處理

腦虛血 24시간 후의 허혈부위 측정은 TTC 염색법을 이용하여 육안으로 관찰 비교하였고, 유발 7일 후에 Cresyl violet 염색법으로 염색한 해마체 내 CA1 부위의 세포수는 각군에서 4부위씩을 무작위로 선정하고, 현미경을 이용하여 400배율로 2cm×2cm 크기 내에서 보이는 세포수를 검량하였다. c-Fos 면역조직화학 염색법으로 염색한 抗c-Fos 면역 양성반응 세포수도 각 군에서 4부위씩을 무작위로 선정하여 위와 동일한 방법으로 검량하였으며, 각 신경세포의 성적은 one-way ANOVA로 검정하였고, Bonferroni방법을 이용하여 각군간 차이를 비교 검정하였다.

III. 實驗 成績

1. TTC 染色 결과

腦組織을 TTC염색처리하면 정상조직은 짙은 붉은 색으로 염색되나 허혈성 손상조직은 염색되지 않는 데, 실험 결과 2개군 중 대조군에서 우측 전뇌부위에 허혈성 뇌손상이 나타났으며, 주로 반뇌의 피질부위와 기저핵, 해마에 걸쳐 고르게 나타났으나, 결찰하지 않은 대측은 모든 절편에서 뇌손상이 나타나지 않았다. 대조군과 실험군을 육안으로 관찰시 전뇌허혈로 인한 뇌손상이 실험군에서 상당히 억제되었다(Fig. 1).

2. Cresyl violet 染色 結果

前腦虛血 유발 7일 후의 대조군 해마조직소견에서 CA1부위에서는 현저한 신경손상이 관찰되었으나, CA3, dentate gyrus 부위에서는 신경손상이 나타나지 않았다. 해마체 CA1부위 중 4부위의 pyramidal cell의 개수를 현미경으로 관찰한 결과, 뇌경색을 일으킨 대조군은 정상군에 비해 세포수가 상당히 감소하였으

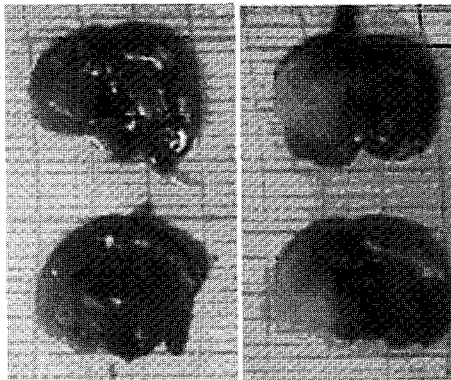


Fig. 1. Photographs of rats' brains showing focal cerebral ischemia is caused by middle cerebral artery occlusion on sections 8 and 12 mm from the frontal pole, respectively, as stained by TTC-stain. The colorless areas represent infarcted tissue. Control and Uncariae Ramulus et Uncus-administrated rat, respectively, from left.

Table 1. Neural cell density of rat hippocampal CA1 areas (by Cresyl violet stain)

Experimental Group	No.	Neural Cell Density (No./4cm ²)
Normal	6	38.0±1.5*
Control	6	4.0±1.5†
Sample	6	29.0±0.9*

* : Mean ± Standard Error

Normal : Sham-operated and physiological saline(100mg/kg/day)-administrated group

Control : MCAO-operated and physiological saline(100mg/kg/day)-administrated group

Sample : MCAO-operated and Uncariae Ramulus et Uncus (100mg/kg/day)-administrated group

† : P<0.001 compared with normal group.

며, 조구등을 일주일간 투여한 실험군에서는 허혈성 뇌손상에 대한 세포보호 효과가 현저하였다. 정상군에서 해마내 CA1의 세포수(M±SEM)는 38.0±1.5개/4cm², 대조군에서는 4.0±1.5개/4cm², 실험군에서는 29.0±0.9개/4cm²로 나타났으며, 이를 one-way ANOVA 통계법으로 검정한 결과, 대조군의 신경손상에 대한 실험군의 藥物 투여효과는 통계적으로 유의하였다(F=180.2, P<0.001). 또한, 각 동물군간의 차이에 대한 통계적 유의성을 평가하기 위한 post-hoc 검정에서 정상군과 대조군간 신경세포수에서 현저한 차이가 나타났고(P<0.001), 실험군의 신경세포수는

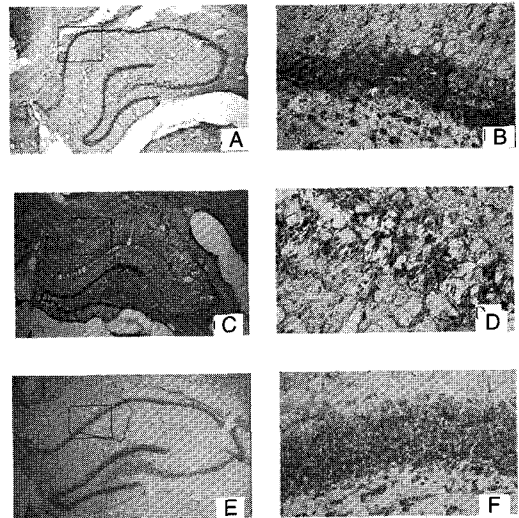


Fig. 2. Frontal sections of dorsal hippocampus after 7 days survival post-ischemia (A, C and E: ×40, Cresyl violet stain). Photomicrographs of pyramidal cells in rat hippocampal CA1 regions (B, D, and F: ×400, Cresyl violet stain). A, B: Sham-operated rat, C, D: MCAO-operated ischemic rat, E, F: MCAO-operated and Uncariae Ramulus et Uncus administrated rat (100mg/kg, p.o.).

대조군에 비하여 유의하게(P<0.001) 증가하였다 (Table 1, Fig. 2).

3. c-Fos 免疫組織化學 염색 결과

前腦虛血 유발 7日 후의 抗c-Fos 면역 양성반응도는 CA1부위에서 현저히 감소되었고, CA3, dentate gyrus 부위에서는 신경손상이 나타나지 않았다. 400배의 2cm×2cm의 해마체 CA1에서 抗c-Fos 면역 양성 반응을 나타낸 신경세포(M±SEM)는 대조군에서 정상군에 비해 상당히 감소하였으며(正常群:19.8±1.1개/4cm², 對照群:6.3±1.9개/4cm²), 조구등을 일주일간 투여한 실험군에서 해마체의 CA1부위의 허혈성 뇌손상에 대한 신경세포 보호효과가 현저하였다(12.8±2.2개/4cm²).

이를 one-way ANOVA 통계법으로 검정한 결과, 대조군의 신경세포손상에 대한 실험군의 약물투여효과는 통계적으로 유의하였다(F=14.1, P<0.01). 또한,

Table 2. Neural cell density of rat hippocampal CA1 areas (by c-Fos immunohistochemistry stain)

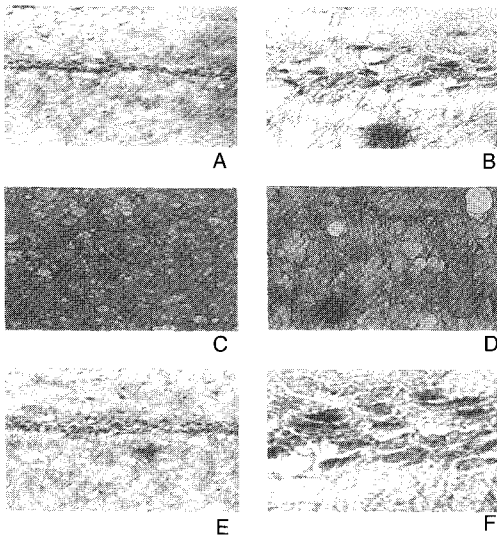
Experimental Group	No.	Neural Cell Density (No./4cm ²)
Normal	6	19.8 ± 1.1*
Control	6	6.3 ± 1.9 [†]
Sample	6	12.8 ± 2.2

* : Mean ± Standard Error

Normal : Sham-operated and physiological saline(100mg/kg/day)-administrated group

Control : MCAO-operated and physiological saline(100mg/kg/day)-administrated group

Sample : MCAO-operated and Uncariae Ramulus et Uncus (100mg/kg/day)-administrated group

[†] : P<0.01 compared with normal group.**Fig. 3.** Photomicrographs showing c-Fos immunoreactivity in hippocampal CA1 of rat after 7 days survival post-ischemia (A, C and E: ×100 and B, D, and F: ×400). A, B: Sham-operated rat, C, D: MCAO-operated ischemic rat, E, F: MCAO-operated and Uncariae Ramulus et Uncus administrated rat (100mg/kg, p.o.).

각 동물군간의 차이에 대한 통계적 유의성을 평가하기 위한 post-hoc 검정에서, 정상군과 대조군간 신경세포수에서 현저한 차이가 나타났고(P<0.01), 실험군의 신경세포수는 대조군에 비하여 증가하였지만, 통계적 유의성은 인정되지 않았다 (Table 2, Fig. 3).

IV. 考 察

中風은 우리나라에서 심장질환, 악성종양과 아울러 성인 삼대 사망원인의 하나로 평균수명의 연장, 식생활과 생활환경의 복잡화, 각종 사회적 스트레스의 증가로 그 발병빈도가 증가추세에 있으며, 발병 후 적극적인 치료에도 불구하고 사지의 운동장애를 비롯하여 정서장애, 감각장애 등 후유증의 회복이 어려워 사회적으로 문제가 되고 있다.²⁸⁻³⁰

中風의 원인에 대해 <內經> 및 隋唐, 宋代까지의 文獻에서는 正虛邪中을 主要原因으로 보았고, 金元時代에 들어와서 劉은 主火說을, 朱는 因濕痰說을, 李는 氣虛說을 主張하였으며, 靑代 葉은 肝風內動, 王은 氣虛瘀血을 原因이라 하였다. 近代에 와서는 歷代原因說을 綜合하여 情志鬱結, 飲食不節, 勞使過度, 氣候變化 등으로 인해 肝風內動, 五志化火, 痰阻脈絡, 氣機失調, 氣滯血瘀함을 中風의 原因 및 病理로 說明하고 있다.^{9-11,31-40}

中風의 治法도 歷代醫家들에 따라 다양하게 응용되었으나, 대개 中風의 初期 및 急性期에는 疏風祛邪, 順氣豁痰, 清熱瀉火, 通利開竅하고, 急性期 以後에는 活血通絡, 益氣補血의 治法을 주로 사용하였다.^{31,38-40} 藥物로는 平肝息風藥에 속하는 鈞藤, 夏枯草, 天麻, 白蠟蠶 등이 中樞神經 興奮 抑制作用, 抗血栓作用, 熄風清熱作用이 있어 中風治療에 多用된다.⁴¹⁻³

鈞藤(Uncariae Ramulus et Uncus)은 꼭두서니과(Rubiaceae)의 常綠木質인 鈞藤(Uncaria rhynchophylla (MIQ.) JACKS.) 혹은 華鈞藤(Uncaria sinensis (OLIV.) HAVIL.)의 가시를 포함한 줄기를 햇볕에 말리거나 썬서 乾燥한 것으로 <本草原始>에 最初로 記載되었으며, 氣味는 甘, 微寒하고 歸經은 肝·心包 2經에 속한다.^{38-9,44-7} 文獻에 나타난 鈞藤의 效能을 綜合하면 清熱解毒, 清肝熄風, 鎮驚하는 作用이 뛰어나 熱極生風, 抽搐, 肝經有熱, 肝陽上亢 등으로 因한 眩暈, 頭痛, 目赤, 驚癇, 小兒驚啼, 癱瘓熱壅, 客忤胎風, 大人頭旋目眩 등에 效能이 있다고 記錄되어 있다.^{11,39-43}

근래 행해진 鈞藤에 대한 實驗에서 밝혀진 成分

을 살펴보면, alkaloid-rhyncohyline 및 isorhyncohyline을 함유하고 있으며, 특히, rhyncohyline은 呼吸中樞를 흥분시켜 血管의 운동중추를 억제하고, 주위의 혈관을 확장하여 강압하는 작용을 나타낸다¹⁶ 21,42. 이 밖에도 心臟搏動을 완만하게 하며 우수한 진정효과가 있으면서도 최면작용이 없는 중추억제작용약이다^{41,2}. 또한, 동물실험에서 경련이 유발된 백서에 대한 항경련효과, 운동마비 치유효과, 중추흥분 억제 작용을 나타내었다. 이처럼 鈞鈞藤은 진정작용, 항경련작용, 항혈전작용, 항산화작용, 혈압강하작용이 있어 임상에서 中風, 高血壓, 小兒驚氣 등에 널리 사용되고 있다^{16,21}.

腦虛血 發生時 神經細胞 損傷의 機轉은 아직 확실하지는 않지만, 興奮性 神經傳達物質인 glutamate가 과도하게 증가되어 N-methyl-D -aspartate(NMDA)수용체-칼슘복합체가 興奮하게 되고, 그에 따라 칼슘의 존성 효소인 protein kinase C (PKC), phospholipase, Nitric oxide 등의 活性이 증가됨으로 細胞膜의 단백질 분해와 투과성의 상승, 염색질 등의 분해로 말미암아 뇌세포의 손상이 유발되는 것으로 알려져 있다^{22,3}. 특히 기억과 학습 등과 밀접히 관련된 전뇌의 해마부위의 신경세포들이 허혈에 민감하게 반응하는 데, 해마내 CA1부위의 신경세포들은 전뇌허혈에 취약하여 쉽게 손상을 받는 것으로 알려져 있다⁴.

신경세포에서 행동학적 또는 약물학적 자극이 충분히 주어지면 종양원성 유전자(proto-oncogenes)가 활성화되며, 이들 유전자 중 조기유전자(IEGs)에 속하는 c-Fos는 간질과 운동 및 감각성 피질 자극과 같은 여러 다양한 자극들에 반응하여 중추신경계에서 발현되는 것으로 보고되고 있으며, 특히 중추신경계 내 전뇌허혈에 민감한 해마에서 c-Fos가 가장 강력하게 발현됨이 알려져 왔다⁴⁸⁻⁵⁴. 따라서 本 研究에서는 전뇌허혈에 의한 백서의 뇌손상모델에서 c-Fos 免疫組織化學法 및 TTC염색, Cresyl violet 염색을 이용하여 鈞鈞藤의 腦神經 보호효과를 규명하고자 하였다.

縫入絲(intraluminal filament)를 사용해 中大腦動脈을 결찰하는 방법은 中風과 類似한 症狀을 誘發할 수 있다. 예비 실험에서 4-0 nylon에 polysiloxane을

입힌 봉입사를 삽입했을 때 수술 2시간 후 증풍증상에 관계되는 운동장애(선회, 앞발 굽힘, 몸의 불균형)가 모두 유발되었으며, TTC 염색시 전뇌 부위에 국한된 뇌경색소견이 확인되었다.

수술 20분 후 생리식염수와 조구등검역을 각각 투여한 뒤 24시간 후의 TTC염색 결과, 육안으로 확인시 실험군이 대조군에 비해 뇌경색 부위가 훨씬 작게 나타났다. 이는 鈞鈞藤이 認知 및 記憶을 담당하는 海馬體의 pyramidal cell의 初期 神經細胞 보호에 효과적임을 시사한다. 전뇌허혈 유발 7일 후에 Cresyl violet 염색법으로 해마조직을 관찰한 결과, 허혈로 인한 CA1부위에서 신경세포의 현저한 소실이 관찰되었으며, 이들 부위가 전뇌허혈에 매우 취약한 부위임을 보여주고 있으며, 상대적으로 CA3나 DG 부위는 전뇌허혈로 인한 신경손상에 영향을 적게 받음으로 이전의 연구보고 결과와 일치하였다². 鈞鈞藤을 처치하였을 때 해마체의 CA1 部位의 pyramidal cell 수는 정상군과 유사하였으며, 이로써 虛血性 뇌손상으로 일어나는 지연세포사에 대한 鈞鈞藤의 保護效果가 유의한 것으로 나타났다.

위와 같은 鈞鈞藤의 神經損傷 保護效果의 機轉을 살펴보기 위하여 神經細胞의 活性指標로 이용되는 早期遺傳子(IEGs)에 속하는 c-Fos의 發顯에 免疫組織化學 染色法을 사용하였다. 現在까지 神經 損傷後에 나타나는 c-Fos를 포함한 IEGs의 發顯의 變化가 Fos 蛋白質에 의해 媒介되는 것인지 또는 다른 機轉에 의한 것인지 알려져 있지 않다. 前腦虛血 후 이들 遺傳子의 發顯은 神經保護나 神經壞死를 遲延시키는 데 필요하나, 藥物處置로 인한 細胞生存과 遺傳子 發顯의 變化 樣相이 어떻게 관련되어 있는지 분명하지 않다. 더우기 前腦虛血에 의한 遺傳子들의 發顯이 神經을 保護하는지 또는 腦에 損傷을 주는지는 아직 뚜렷하지 않다⁵⁵⁻⁶. 本 研究의 實驗 結果 海馬體의 CA1에서 抗c-Fos 免疫 陽性反應을 보인 神經細胞는 對照群이 正常群에 비해 상당히 감소하였으며, 鈞鈞藤을 一週日間 投與한 實驗群에서 海馬體의 CA1部位의 c-Fos 陽性細胞의 數가 증가하였다. 이는 腦虛血後 이들 遺傳子 發顯과 神經細胞의 生存은 一定한

關聯이 있음을 보여주고 있다. 하지만, Cresyl violet染色實驗의境遇와 달리 c-Fos 免疫組織化學染色實驗의 경우前腦虛血後 海馬內에서發生한神經細胞損傷에 대하여 鈞鈞藤處置에 의한 c-Fos의發顯增加가統計적으로有意성을가지지 못하여藥物의保護效果和神經恢復를反映하는指標로서의信賴성을가지지 못하는結果로 나타났다. 이는藥物의大腦神經保護機轉이 c-Fos를包含한早期遺傳子發顯과 다소의關聯성은가지나 全的으로說明하기엔 부족함이 있어서, 확실한機轉의 糾明을 위해서는 現在提示되고 있는 다른 여러 假說모델에 대해서도 多角的인 研究가 필요하다 하겠다.

鈞鈞藤에 대한 以前의 研究에서 이미 glutamate로 인한 小腦의 顆粒細胞(granular cell) 損傷에 대한 保護效果가 優秀함이 報告되었다¹⁶. Liu 등¹⁹은 中國에서 發作, 癲癇 등에 이용되어 온 天麻와 鈞鈞藤의 合製藥은 superoxide dismutase의 生成을 증가시켜 腦에서 血液 再循環時 생기는 free radical을 除去하는 效果가 優秀하다고 하였다. Kanatani 등은 鈞鈞藤을 먹인 쥐와 기니픽에서 쥐의 腦와 기니픽의 回腸을 分離해 [H] 5-HT를 붙였을 때 受容體의 結合能力이 顯著히 떨어짐을 보였고, 5-HT agonist로 作用함이 밝혀졌으며 5-HT 代謝障碼로 인한 疾患治療에 이용될 수 있음을 提示하였다. 鈞鈞藤의 indole alkaloid는 α -adrenergic effects를 보여 血管弛緩作用이 있음이 밝혀졌다^{17,23}. 이처럼 鈞鈞藤은 腦에 保護效果가 있음이 알려졌고, 本實驗에서도 局部的 腦硬塞에 效果가 有意하게 나타났다으므로, 鈞鈞藤은 腦硬塞의 豫防과 治療에 有意한 效果가 있을 것으로 생각된다.

V. 結 論

鈞鈞藤이 腦虛血性 神經損傷에 미치는 영향을 실험적으로 입증하기 위해서 백서에 인위적으로 뇌허혈을 유발시킨 후 鈞鈞藤을 경구투여하여 TTC 염색법, Cresyl violet 염색법 및 c-Fos 면역조직화학 염색법으로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 鈞鈞藤 投與群은 腦虛血 誘發 24時間 後에 TTC

染色法으로 觀察하였을 때, 對照群에 비해 腦損傷이 有意하게 抑制되었다.

2. 鈞鈞藤 投與群은 腦虛血 誘發 7日 後에 Cresyl violet 染色法으로 海馬部位를 觀察하였을 때, 對照群에 비해 細胞損傷이 有意하게 抑制되었다.

3. 鈞鈞藤 投與群은 c-Fos 免疫組織化學 染色法으로 觀察하였을 때, c-Fos 陽性反應 神經細胞가 增加하였으나 有意성은 나타나지 않았다.

이러한 研究結果에 따라 鈞鈞藤은 腦虛血性 動物 腦損傷모델에서 神經保護效果가 有意한 것으로 나타나, 腦卒中 豫防 및 治療에 有意한 效果를 보일 것으로 생각된다.

參考文獻

1. 김영중, 홍호식, 김경미, 정혜숙, 김민수. 腦卒中의 臨床의 考察. 대한가정의학회지 1991;12(12):51-62.
2. 권도익, 고창남, 조기호, 김영석, 배형섭, 이경섭. 韓方病院 心系內科 入院患者에 대한 臨床의 考察. 慶熙醫學 1996;12(2):200-13.
3. 이학중, 위봉애, 박옥규. 우리나라 腦血管疾患의 病型別 發病要因. 순환기내과학회지 1991;21:1085-95.
4. 신문수. 최근 9년간의 腦卒中 推移變化에 대한 考察. 전주: 전북대학교출판부, 1994,p.131-2.
5. 고성규, 이경섭. 중풍환자의 반신마미 회복도에 대한 임상적 고찰. 대한한의학회지 1993;14(2):37.
6. 沈全漁 外. 中風證治. 北京: 中醫古籍出版社, 1988,p.1, 6, 8-10, 13-4.
7. 황문동. 실용중의내과학. 1. 상해: 상해과학기술출판사, 1994,p.414.
8. 구본홍, 이경섭, 배형섭, 김영석, 이원철. 동의심계내과학. 서울: 서원당, 1987,p.229-42.
9. 김동영, 최종원, 김희영, 박민수, 이정규. 鈞鈞藤 成分의 抗痙攣 效果. 생약학회지 1996;27(1):53-7.
10. 문대환. 鈞鈞藤 煎湯液이 家兔의 前頂眼球 反射에 미치는 影響. 圓光大學校大學院. 1989.
11. 辛民教. 本草維新. 서울: 慶苑文化社, 1979,p.276-7.
12. 陸昌洙. 韓藥의 藥理·成分 臨床應用. 서울: 癸丑文化社, 1982,p.829-30.
13. 김재길. 原色圖鑑 東洋傳統藥物. 서울: 영림출판사, 1995,p.160-1.

14. Haginawa J, Sakai S, Takahashi K, Taguchio M, Seo S. Studies of plants containing indole alkaloids. I. Alkaloids in *Uncaria rhynchophylla* MIQ. *Yakugaku Zasshi* 1973;93:448-52.
15. Aimi N, Yamanaka E, Fujii M, Kurita J, Sakai S, Haginawa J. Studies of plants containing indole alkaloids. IV. Minpr bases of *Uncaria rhynchophylla* MIQ. *Chem Pharm Bull* 1977;25:2067-77.
16. Itoh T, Shimada Y, Terasawa K. Efficacy of Choto-san on vascular dementia and the protective effect of the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death. *Mech Aging Dev* 1999;111(2-3):155-73.
17. Kanatani H, Kohda H, Yamasaki K. The active principles of the branchlet and hook of *Uncaria sinensis* Oliv. examined with a 5-hydroxytryptamine receptor binding assay. *J Pharm Pharmacol* 1985;37(6):401-4.
18. Liao JF, Jan YM, Huang SY, Wang HH, Yu LL, Chen CF. Evaluation with receptor binding assay on the water extracts of ten-active herbal drugs. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 1995;19(3):151-8.
19. Liu J, Mori A. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* BI. and *Uncaria rhynchophylla*(Miq.) Jacks. *Neuropharmacology* 1992;31(12): 1287-98.
20. Ozaki Y. Vasodilative effects of indole alkaloid obtained from domestic plants, *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Amsonia elliptica* Roem. et Schult. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1990;95(2): 47-54.
21. Sakakibara I, Terabayashi S, Kubo M. Effect on locomotion of indole alkaloids from the hooks of uncaria plants. *Phytomedicine* 1999;6(3): 163-8.
22. Choi DW. NMDA receptors mediate parallel injury in cerebral cortical cultures subjected to oxygen-glucose deprivation. In: K Kohure, KA Hossman and BK Siesj"o, Elsevier, Amsterdam, eds. *Neurobiology of Ischemic Brain Damage* 1993:137-43.
23. Faden AI, Salzman S. Pharmacological strategies in CNS trauma. *Trends Pharmacol Sci* 1992;3:29-35.
24. Kawasaki K, Traynelis SF, Dingledine R. Different responses of CA1 and CA3 regions to hypoxia in rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* 1990;63(3):385-94.
25. Onodera H, Kogure K, Ono Y, et al. Poto-oncogene c-Fos is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 1989;98:101-14.
26. Kim HS, Lee SH, Kim SS, Kim YK, Jeong SJ, Ma J, Han DH, Cho BK, Suh YH. Post-ischemic changes in the expression of Alzheimer's APP isoform in rat cerebral cortex. *Neuroreport* 1998;9(3):533-7.
27. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture: neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke*. 1986;17:472-6.
28. 全國韓醫科大學 心系內科學校室:心系內科學. 서울: 書苑堂, 1999,p.420-30.
29. 경제기획원 통계조사국. 사망원인 통계연보. 서울: 통계청, 1998.
30. 윤진구. 뇌졸중에 대한 임상 통계적 연구. 서울: 경희대학교, 1989.
31. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울: 東洋醫學研究院出版部, 1985,p.314-30.
32. 金世吉. 中風の病因의 意味糾明과 中風의 原因 및 治療에 대한 東西醫學的 比較. 大韓醫學學會誌 1995; 16(1):96-117.
33. 劉完素. 河間三六書. 서울: 成輔社, 1976,p.37-8.
34. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울: 大星文化社, 1982,p.67-8.
35. 李杲. 東垣十種醫書. 서울: 大星文化社, 1983,p.64-5.
36. 葉桂. 臨證指南醫案. 上海: 上海科學技術出版社, 1993,p.17-8.
37. 王清任. 醫林改錯. 서울: 一中社, 1992,p.61-5.
38. 李尙仁外. 韓藥臨床應用. 서울: 成輔社, 1986,p.481-2.
39. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京: 人民衛生出版社, 1983,p.785-90.
40. 李載熙. 藥理效能의 臨床應用. 서울: 學林社, 1985,p.379-81.
41. 郭協燾. 鈞鈞藤의 降低血壓作用. 上海中醫學院雜誌 1959;59(1):46-7.
42. 袁文學. 鈞鈞藤의 鎮靜作用和 強壓作用. 大連의학원학보 1960;1(1):25-7.
43. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 서울: 永林社, 1991,p.578.
44. 辛民教. 原色 臨床本草學. 서울: 永林出版社, 1989,p.658-9.
45. 陳存仁. 圖說 漢方醫藥大辭典 IV. 서울: 圖書出版 松嶽, 1990,p.90-3.

46. 新編中藥大辭典. 臺北: 新文豐出版公司, 1982,p.2282-4.
47. 臨床配合本草學. 서울: 永林社, 1994,p.150-1.
48. Dragunow M, Faull R. The use of c-Fos as a mesolimbic marker in neural pathway tracing. *J Neurosci Methods* 1989;29:261-5.
49. Fenelton VS, Poulain DA, Theodosios DT. Oxytocine neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience* 1993;53:777-89.
50. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-Fos protein in brain: Metabolic mapping at the cellular level. *Science* 1988;240:1328-30.
51. Nowak T, Ikeda J, Nakajima T. 70-kDa heat shock protein and c-Fos gene expression after transient ischemia. *Stroke* 1990;21(11):107-11.
52. Wessel T, Joh T, Volpe B. In situ hybridization analysis of c-Fos and c-jun expression in the rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res* 1991;567:231-40.
53. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: friend or foe?. *Stroke* 1996;27:1682-7.
54. Kogure K, Kato H. Altered gene expression in cerebral ischemia. *Stroke* 1993;24:2121-7.
55. Dragunow M, Young D, Hughes P, MacGibbon G, Lawlor P, Singleton K, Sirimanne E, Beilharz E, Gluckman P. Is c-Jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxicischemic brain injury. *Mol Brain Res* 1993;18:347-52.
56. Neumann-Haefelin T, Wiessner C, Vogel P, Back T, Hossmann K-A. Differential expression of the immediate early genes c-Fos, c-jun, junB, and NGFI-B in the rat brain following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:206-16.