

원 저

## 白鼠의 局部 腦硬塞에 대한 當歸의 神經保護 效果

정정욱, 장우석, 오용성, 이소연, 박치상, 박창국  
경산대학교 한의과대학 심계내과학교실

### The Neuroprotective Effects of *Angelicae gigantis Radix* on Focal Cerebral Ischemia in the Rat

Jeong-Ook Jeong, Woo-Seok Jang, Yong-Seong Oh, So-Yeon Lee, Chi-Sang Park, Chang-Gook Park

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

Current therapy for acute ischemic stroke is highly focused on neuroprotective agents, and many herbal medicines have been challenged for experimental models. The aim of this study is to investigate whether *Angelicae gigantis Radix* can protect nerve cells against ischemic neural damage of middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats' brains. Rats were treated with *Angelicae gigantis Radix* immediately after 2 hours of MCAO for 7 days. On the 7th day, the brains of the rats were sliced through the hippocampus and dyed by c-Fos immunohistochemistry stain and cresyl violet stain for microscopic examination. The number of viable neurons and c-Fos immunoreactive cells in CA1 regions was counted. MCAO caused significant decrease in density of neurons and c-Fos immunoreactive cells compared to those of sham-operated rats. Administration of *Angelicae gigantis Radix* significantly elevated MCAO-induced decrease in density of neurons and c-Fos immunoreactive cells. These results suggest that the neuroprotective effect of *Angelicae gigantis Radix* against focal cerebral ischemia is related to c-Fos gene expression. Thus, these findings indicate that *Angelicae gigantis Radix* can be used for treatment and prevention of cerebral ischemia. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(2):204-212)

**Key Words:** *Angelicae gigantis Radix*, cerebral ischemia, neuroprotective effect

## 서론

뇌경색이란 뇌혈관에 생기는 구조적인 변화에 기인하여 생기는 가장 흔한 중추신경계 질환 중의 하나로서 뇌경색이 발생하면 신경세포는 제한된 시간 동안만 생존할 수 있고, 허혈상태가 지속되면 생화학

적으로 非可逆의인 상태가 되므로 혈액을 신속히 再貫流시키기 위한 시도들이 중요하다<sup>1)</sup>. 그러나 현재 급성기 치료제로 사용되는 혈전용해제나 항혈액응고제는 뇌출혈 등의 위험한 부작용을 동반할 수 있으므로 급성기에 효과적으로 신경세포의 손상을 줄일 수 있는 신경세포 보호제의 개발을 위하여 많은 연구가 되어왔다<sup>2-5)</sup>.

뇌허혈 발생시 신경세포 손상의 기전은 아직 확실하지는 않지만 현재까지 여러 가지 가설들이 제시되고 있으며, 그중 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 과도하게 증가되어 N-methyl-D- aspartate(NMDA)수

· 접수 : 2003년 3월 27일 · 논문심사 : 2003년 4월 11일  
· 채택 : 2003년 5월 9일  
· 교신저자 : 장우석, 대구광역시 수성구 상동 165번지 경산대학교 한의과대학 심계내과학교실  
(Tel. 053-770-2178, Fax. 053-770-2169, E-mail: pftft@hanmail.net)

용체-칼슘복합체가 흥분하게 되며, 그에 따라 칼슘의 존성 효소인 protein kinase C(PKC), phospholipase, nitric oxide 등의 활성이 증가되어 세포막의 단백질분해와 투과성의 상승, 염색질 등의 분해가 일어나 뇌세포의 손상이 유발되는 것으로 알려져 있고, 또한 유전자 발현에 의한 자연세포손상에 대한 연구도 진행되고 있다.<sup>9,10)</sup>

c-fos는 뇌허혈에 의한 에너지 부족상태에서 대부분 대뇌유전자들이 발현과 전사(transcription)가 감소되는 것과는 다르게 발현이 증가하는 것으로 알려진 조기유전자(immediate early genes; IEGs) 중의 한 성분으로, 뇌허혈 이후 24시간 이내에 예외없이 증가하므로 뇌손상의 표식자로 지금까지 사용되었을 뿐, 그 기능에 대해서는 아직 정확히 알려진 바가 없다.<sup>11,12)</sup>

當歸(*Angelicae gigantis Radix*)는 神農本草經의 中品에 기록된 이래 임상에서 一切 血에 관련된 病證에 널리 사용되고 있는 약물로서, 지금까지 當歸의 면역증강효과, 造血, 抗炎, 血栓溶解作用 등에 대한 실험적 보고가 있었다.<sup>13,14-19)</sup> 그리고 뇌경색과 관련해서 신경보호효과나 신경전달물질에 대해서는 天麻, 六味地黃元, 八味丸, 八物湯, 十全大補湯, 牛黃清心元과 星香正氣散 등의 보고는 있었으나 아직 當歸에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 當歸가 뇌허혈 유발시 손상된 뇌조직 세포에 대한 신경보호작용을 실험적으로 입증하고, c-fos가 대뇌에서 어떤 작용을 하는 지를 확인하기 위해서, 백서에 인위적으로 뇌허혈을 유발시킨 뒤 當歸를 경구투여하여 TTC 염색법, c-Fos 면역조직화학 염색법 및 Cresyl violet 염색법을 통한 측정으로 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 동물 및 재료

#### 1) 動物

동물은 체중 250-300g내외의 Sprague-Dawley계 雄性 백서(삼육실험동물연구소)를 사용하였다. 물과 사료(제일사료 Co.)를 자유롭게 먹도록 하였고, 사육

실내의 온도는 21~24℃, 습도는 40~50%로 유지하였으며, 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하여 실험실 환경에 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 실험전에 백서들은 개개의 우리에 따로 두었으며 밤사이에 금식을 시켰으나 물을 먹는 것은 자유롭게 하였다.

#### 2) 材料

재료는 경산대학교 부속한방병원 약재과에서 구입한 참당귀(*Angelicae gigas NAKAI*)의 뿌리를 精選하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 檢液의 調劑

當歸 200g을 round flask에 넣고 70% MeOH를 加하여 24시간동안 放置하여 抽出한 다음 濾過하여 減壓濃縮한 後 MeOH를 蒸發시키고 凍結乾燥하여 抽出物 40g을 얻었다.

#### 2) 中大腦動脈 閉塞에 의한 白鼠의 腦虛血 誘發

정상군을 제외한 백서는 3% isoflurane으로 吸入誘導麻醉 및 維持麻醉 후 경부를 절개하여 우측 총경동맥과 외경동맥을 노출시키고 우측 총경동맥과 외경동맥을 3-0 suture로 결찰하였다. 결찰후 15분동안 백서를 안정시킨 후 甲狀舌骨筋 筋을 주행하는 외경동맥을 노출시켜 polysiloxane(Xanthrone<sup>®</sup>)을 입힌 4-0 nylon(Dafilon, USA) 봉입사(occluder)를 넣어서 내경동맥을 따라 저항이 느껴질 때까지 18-19mm를 진행하여 중대뇌동맥의 기시부를 폐쇄하였다. 절개부위를 봉합하고 마취를 중지한 후에 동물은 곧 회복되었으며, 중대뇌동맥의 再還流를 위해 봉입사를 함입한 2시간 후에 재마취하고 봉입사를 약 5mm 정도 退出하였다. 수술 및 마취 회복기간동안 백서의 직장에 체온측정용 탐침(probe)을 삽입하고, 체온유지 패드를 이용하여 백서의 체온을 37~38℃로 유지시켰다.

#### 3) 神經症狀을 통한 中大腦動脈 閉塞 確認法

신경증상은 Bederson 등의 방법에 따라 (1) 꼬리를 중심으로 들었을 때 몸의 불균형, (2) 앞발의 좌우 모양, (3) 왼쪽으로 선회 등으로 확인하였다.<sup>20)</sup>

#### 4) 檢液의 投與

실험동물 6마리를 1군으로 하여, triphenyltetrazolium hydrochloride (TTC) 염색법에서는 대조군(control group)과 실험군(sample group) 2군으로 나누었고, Cresyl violet 염색법, c-Fos 면역조직화학 염색법에는 정상군(normal group), 실험군, 대조군 3군으로 나누었다.

TTC 염색법에서는 동물이 마취에서 회복되고 신경증상을 확인한 후에 대조군에는 0.9% 생리식염수를, 실험군에는 0.9% 생리식염수에 녹인 검액 100mg/kg을 하루동안 1회 경구투여하였다.

Cresyl violet 염색법과 c-Fos 면역조직화학 염색법에서는 동물이 마취에서 회복하여 신경증상이 확인된 후에 정상군과 대조군에는 0.9% 생리식염수를, 실험군에는 0.9% 생리식염수에 녹인 검액을 100mg/kg/day씩 7일간 경구투여하였다.

#### 5) 虛血性 腦損傷 部位의 容積 및 細胞數 測定

##### (1) Triphenyltetrazolium hydrochloride(TTC) 染色法

腦虛血을 誘發시킨 24시간 후 3% isoflurane으로 마취하고 頭部를 자른 다음 頭蓋骨을 切開하고 중대 뇌동맥 부위에서 봉입사를 확인한 후 rat brain blocker를 이용해 2mm간격으로 절단하였다. 절단한 腦切片을 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium hydrochloride (TTC) 용액에 30분동안 염색하고 10% phosphate-buffered formalin에 고정한다 다음 11개의 brain section 중 앞쪽에서 4번째, 6번째 부위를 디지털 카메라로 촬영하였다.

##### (2) Cresyl violet 染色法

뇌허혈을 유발시킨 7일 후에 TTC 염색시와 동일한 방법으로 절단한 뇌절편을 인산완충액(PBST)으로 세척한 후 슬라이드 글라스에 부착하고 0.3% Cresyl violet으로 염색했다. 염색된 뇌절편을 gelatine이 도포된 슬라이드에 붙이고 약한 氣流를 이용하여 말린 다음 커버-글라스로 덮고 현미경에서 400배율로 관찰하였으며, 이 때 2×2cm격자 내에 보이는 Cresyl violet이 염색된 세포수를 檢量하였다.

##### (3) c-Fos 免疫組織化學 染色法

뇌허혈을 유발시킨 7일 후 Cresyl violet 염색을 위

해 취한 해마부위의 인접 해마부위조직을 TTC 염색시와 동일한 방법으로 절단하여 인산완충액으로 수회 세척한 다음 0.3% triton-x100, 2% rabbit-serum 및 0.001%의 kehole limpit hemocyanin을 함유한 인산완충액(PBST)에 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 정상 rabbit-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, 對照染色할 때에는 primary 항체를 사용하지 않았으며 rabbit anti-sheep serum 대신 비면역성 sheep serum을 사용하였다. 염색된 뇌절편을 gelatine이 도포된 슬라이드에 붙이고 약한 氣流를 이용하여 말린 다음 커버-글라스로 덮은 후 현미경에서 400배율로 관찰하였으며, 이 때에 2×2cm 격자 내에 보이는 항c-Fos 면역양성반응인 세포수를 檢量하였다.

#### 3. 통계처리

24시간 후의 허혈부위 측정은 TTC 염색법으로 하여 육안으로 관찰하여 비교하였으며, 유발 7일 후에 Cresyl violet 염색법으로 염색한 해마체의 CA1 부위의 세포수는 각군에서 4부위씩을 무작위로 선정하여 400배에서 2×2cm 크기 내에서 보이는 세포수를 세었다. c-Fos 면역조직화학 염색법으로 염색한 항c-Fos 면역 양성반응 세포수는 위와 동일한 방법으로 12군대를 무작위로 선정하여 검량하였으며, 각 신경세포의 성적은 one-way ANOVA로 검정하고, Bonferroni 방법을 이용하여 개별집단간 차이를 비교 검정하였다.

## 실험결과

### 1. TTC 染色結果

TTC 염색시 뇌의 정상조직은 미토콘드리아 내의 dehydrogenase와 반응하여 짙은 붉은 색으로 염색되었으며, 경색을 받은 조직은 dehydrogenase가 소실되어 염색되지 않았다. 대조군은 오른쪽 前腦部位가 허혈성 뇌손상이 나타났으며 주로 半腦의 피질부위와 기저핵, 해마에 걸쳐 고르게 나타났으나, 결찰하지 않은 對側은 모든 절편에서 뇌손상이 나타나지 않았다. 當歸를 투여한 실험군에서 前腦虛血로 인한 뇌손상이 상당히 억제된 것이 肉眼으로 관찰되었다(Fig. 1).

### 2. Cresyl violet 染色結果

뇌허혈 유발 7일 후 대조군의 해마조직조건에서 CA1부위에서의 현저한 신경손상이 관찰되었으나, CA3, dentate gyrus부위에서는 신경손상이 나타나지 않았다. 해마체의 CA1의 4부위의 pyramidal cell을 400배의 2×2cm로 개수를 관찰한 결과에서 대조군은 정상군에 비해 세포수가 상당히 감소하였으며, 실험군에서는 해마체의 CA1부위에서 허혈성 뇌손상에 대한 세포보호효과가 현저하였다. 정상군에서 해마내 CA1의 세포수(M±SEM)는 38.0±1.5개, 대조군에서는 4.0±1.5개, 실험군에서는 42.0±0.9개로 나타

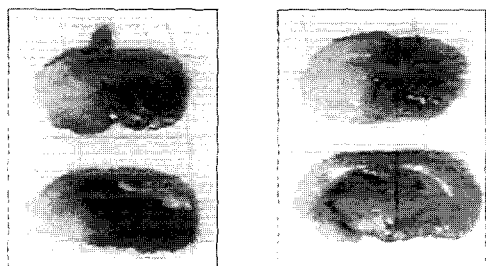


Fig. 1. Photographs of rats' brains showing focal cerebral ischemia is caused by middle cerebral artery occlusion on sections 8 and 12mm from the frontal pole, respectively, as stained by TTC stain. The colorless areas represent infarcted tissue. Control and *Angelicae gigantis Radix* administrated rat,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

났으며, 이를 one-way ANOVA 통계법으로 검정한 결과, 대조군의 신경손상효과와 실험군의 약물투여 효과는 통계적으로 유의하였다( $F=253.2, P<0.001$ ). 또한 각 동물군간의 차이에 대한 통계적 유의성을 평가하기 위한 post-hoc검정에서 정상군과 대조군간 신경세포수에서 현저한 차이가 나타났고( $P<0.001$ ), 실험군의 신경세포수는 대조군에 비하여 현저히 증가하였다( $P<0.001$ )(Table 1, Fig. 2).

### 3. c-Fos 免疫化學組織染色結果

대조군에서 뇌허혈 유발 7일 후의 c-Fos 양성반응도는 CA1부위에서 현저히 감소되었고 CA3, dentate gyrus부위에서는 신경손상이 나타나지 않았다. 400배의 2×2cm의 해마체의 CA1에서 c-Fos 양성반응을 나타낸 신경세포(M±SEM)는 대조군에서 정상군에 비해 상당히 감소하였으며(정상군: 19.8±1.1개, 대조군: 6.3±1.9개), 실험군에서 해마체의 CA1부위의 허혈성 뇌손상에 대한 신경세포 보호효과가 현저하였

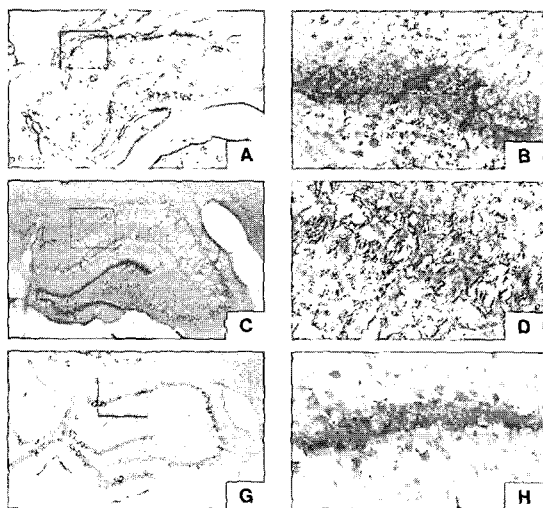


Fig. 2. Frontal sections of dorsal hippocampus after 7 days survival post-ischemia (A, C and E: ×40, Cresyl violet stain). Photomicrographs of pyramidal cells in rat hippocampal CA1 regions (B, D and F: ×400, Cresyl violet stain). A, B: Sham-operated rat, C, D: MCAO-operated ischemic rat, E, F: MCAO-operated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

**Table 1.** Neuronal Cell Density of Rat Hippocampal CA1 Area (by Cresyl Violet Stain)

Experimental Group	No.	Neuronal Cell Density(No./4cm <sup>2</sup> )
Normal	6	38.0±1.5 <sup>①</sup>
Control	6	4.0±1.5 <sup>***</sup>
Sample	6	42.0±0.9 <sup>##</sup>

<sup>①</sup>: 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 *Angelicae gigantis Radix*(100mg/kg/day)-administrated group

\* : Statistically significant as compared with normal group(\*\*\*: P<0.001)

# : Statistically significant as compared with control group(##: P<0.001)

**Table 2.** Neuronal Cell Density of Rat Hippocampal CA1 Area(by c-Fos Immunohistochemistry Stain)

Experimental Group	No.	Neuronal Cell Density(No./4cm <sup>2</sup> )
Normal	6	19.8±1.1 <sup>①</sup>
Control	6	6.3±1.9 <sup>***</sup>
Sample	6	15.0±1.2 <sup>##</sup>

<sup>①</sup>: Mean ± Standard Error

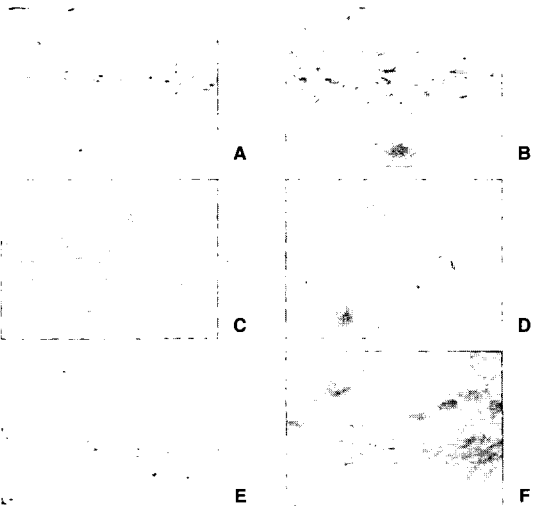
Normal : Sham-operated and physiological saline(100mg/kg/day)-administrated group

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

Sample : MCAO-operated and *Angelicae gigantis Radix*(100mg/kg/day)-administrated group

\* : Statistically significant as compared with normal group(\*\*\*: P<0.001)

# : Statistically significant as compared with control group(##: P<0.01)



**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 *Angelicae gigantis Radix* administrated rat (100mg/kg, PO).

다(15.0±1.2개). 이를 one-way ANOVA 통계법으로 검정한 결과, 대조군의 신경손상효과와 실험군의 약물투여 효과는 통계적으로 유의하였다(F=21.8, P<0.001). 또한 각 동물군간의 차이에 대한 통계적 유의성을 평가하기 위한 post-hoc검정에서, 정상군과 대조군간 신경세포수에서 현저한 차이가 나타났고(P<0.001), 실험군의 신경세포수는 대조군에 비하여 현저히 증가하였다(P<0.01)(Table 2, Fig. 3).

## 고찰

뇌졸중이란 급격하게 발생하고 의식장애를 동반하며, 운동마비를 포함한 신경학적 증후군에 대한 임상적 개념으로, 넓은 의미에서 뇌졸중은 腦出血, 腦血栓證, 一過性 腦虛血, 蜘蛛膜下出血, 急性 腦浮腫, 急性 腦充血, 動靜脈奇形 등 여러 질환이 포함되는 뇌혈관계 질환 및 중추신경계 질환을 말한다<sup>21)</sup>.

과거 우리 나라는 뇌경색보다 뇌출혈이 많았지만, 최근 생활습관과 식생활의 서구화로 인하여 뇌경색으로 대표되는 허혈성 뇌혈관질환의 발생률이 점차 증가하는 경향을 보이고 있다<sup>22)</sup>. 뇌경색에 있어서 전통적으로 허혈에 의한 뇌손상은 뇌조직의 괴사(necrosis)에 의한 것으로 설명되어졌으나, 최근에는 국소허혈이 발생하고 일정한 시간이 지난 후에 뇌경색이 발생하는 지연성 신경 세포사(delayed neuronal death, DND)는 괴사보다는 조기유전자 발현과 관련된 프로그램성 세포사(apoptosis)로 설명하는 실험 보고들이 있다<sup>23,24)</sup>.

조기유전자는 前腦虛血이나 全腦虛血로 대뇌조직의 생화학적 변화가 유발되었을 때 나타나는 유전자들 중에서 가장 빠르게 반응하는 성분을 지칭하는 용어로서, 허혈 발생 수분내에 유전자의 발현이 증가되는 것을 감지할 수가 있다. 세포들은 단백질합성 억제자가 있는 상황에서도 m-RNA를 전사(transcription)할 수가 있어서 그들의 합성에 필요한 단백

질의 비축이 유지될 수가 있다<sup>25</sup>). 몇몇의 조기유전자는 자기의 전사를 억제하는 것에 대하여 음성피드백(negative feedback)작용을 하므로, 실제로는 합성의 저해가 조기유전자 발현을 증가시킨다. 이런 유전자 발현의 변화는 대뇌허혈후에 회복의 과정에서 중요한 역할을 하는 것 같으나, 반면 허혈에 의해 촉발된 프로그램성 세포사망(apoptotic cell death)에 관련된 조기유전자의 유도는 더 심한 조직의 손상을 가져올 수가 있다<sup>26</sup>).

조기유전자가 유도되는 과정을 살펴보면 몇가지 단계로 이루어져 있다. Glutamate와 같은 신경전달물질의 자극이 일차 전달자로서 작용하여, 그것에 이어서 상승된 세포내 칼슘수치나 cAMP와 같은 세포질의 생화학적인 변화가 이차 전달자로서 protein kinase를 활성화시킨다. 이런 protein kinase는 혈청반응요소(serum response element : SRE) 또는 칼슘/cAMP 반응요소(calcium/cAMP response element : Ca/CRE)와 같은 DNA binding protein을 인산화하며, 이러한 DNA binding protein은 반응요소(response element)라고 불리는 조기유전자 DNA의 특별한 결합 위치를 인지하여 결합하며, 반응요소는 유전자 촉진부위(promoter region)에 존재하여서 조기유전자의 전사를 조절한다<sup>25,27</sup>).

이런 조기유전자 산물이 목표유전자(target genes)를 조절하는데, 원형(prototype)의 조기유전자인 c-fos나 jun-B, jun-D, c-jun, fos-B와 같은 것은 leucine zipper라는 특이한 구조를 가지고 있어서 다른 조기유전자의 leucine zipper와 2분자체(dimer)를 형성할 수 있으며, 이 2분자체는 AP-1이라는 특별한 유전자 자리에 결합하여서 많은 만기 작동체 유전자(late effector genes)의 발현을 조절한다. 이런 2분자체의 세부 구성요소가 만기 작동체 유전자가 작동할 것인지 아닌지를 결정한다. 만기 작동체 유전자들은 공동작업을 위해서 협력할 수 있으며, 허혈의 상황에서는 회복 또는 세포사로 나타날 수가 있다<sup>25</sup>).

프로그램성 세포사가 일어나기 위해서는 프로그램성 세포사를 촉진하는 유전자의 유도와 억압하는 유전자의 억제가 협조적으로 되는 것이 필요하며, 이런

협조적 조절효과는 목표유전자의 AP-1위치에 leucine zipper 구조를 가진 조기유전자 2분자체의 세부구조에 의해서 결정되어진다<sup>28</sup>).

일과성 전뇌허혈의 유발시에 기억과 학습 등과 밀접히 관련된 前腦의 해마부위의 신경세포들이 허혈에 민감하게 반응하는데 특히 해마내 CA1부위의 신경세포들은 前腦虛血에 취약하여 쉽게 손상을 받는 것으로 알려져 있다<sup>29</sup>).

신경세포에서 行動學的 또는 藥物學的 刺戟이 충분히 주어지면 腫瘍原性 遺傳子(proto-oncogenes)들이 활성화되며, 이들 遺傳子中 immediate early 유전자(IEGs)에 속하는 c-fos는 痲疾과 運動 및 感覺性 皮質刺戟과 같은 여러 다양한 자극들에 반응하여 중추신경계에서 발현이 된다<sup>30,34</sup>. 前腦虛血 후에도 몇몇 immediate early 유전자(IEGs)가 강력히 발현되며, 특히 중추신경계 내 前腦虛血에 민감한 해마에서 여러 조기유전자중 c-fos가 발현됨이 알려져 왔다<sup>26,35</sup>).

當歸는 우리나라에서는 참당귀(Angelicae gigas NAKAI)의 건조한 뿌리를 이용하고, 中國에서는 當歸(A. sinensis(Oliv.) DIELS)를 正品으로 응용하며 日本에서는 大和當歸(A. acutiloba KITAG.)를 이용하고 있다. 그 氣는 溫하고, 味는 甘辛하고 無毒하며 心, 肝, 脾經으로 歸經하여, 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸의 효능으로 月經不調, 經閉腹痛, 癥瘕結聚, 崩漏, 血虛頭痛, 眩暈, 痿痺, 腸燥便難, 癰疽瘡瘍, 跌打損傷을 治療한다고 하였다<sup>36</sup>.

구성성분으로는 정유 및 coumarin계 유도체인 decursin, decusinol, nodakenetin,  $\beta$ -sitosterol, 그리고 umbelliferan nodakenin 등이 주요성분이며 vitamin B12와 vitamin A류 물질 등도 포함되어 있는 것으로 알려져 있다<sup>37,38</sup>).

藥理學的으로 참당귀(Angelicae gigas NAKAI)는 性腺에 대한 자극작용, 진정작용, 중추신경계의 진정효과가 있으며, 當歸(A. sinensis (Oliv.) DIELS)는 보혈작용, 항 비타민E결핍작용, 자궁의 수축과 억제작용, 대뇌활동 진정효과, 혈압에 대한 효과, 심박동에 대한 효과, 항균작용, 간의 보호작용과 글리코젠 저하방지작용이 있는 것으로 밝혀졌다<sup>39</sup>).

當歸에 관한 실험적인 연구로서 뭇가 當歸의 免疫增強效果에 관한 연구를, 韓이 當歸類의 decursin 함량 및 빈혈가토의 조절작용에 미치는 영향을, Bradley 등이 신부전환자에서 혈구생성항상, Liao 등이 GABA에 의한 신경이완효과, Hu 등이 실험동물에서 항염효과, 成<sup>20</sup>이 當歸尾 약침이 혈전증에 미치는 影響을 報告하였다<sup>49</sup>.

중풍의 원인중에 하나인 瘀血은 현대의학에서 말하는 뇌경색에서 뇌조직에 혈액의 공급이 되지 않는 소견과 유사한 개념으로 설명되어질 수 있으며, 이러한 어혈에 미치는 當歸의 우수성을 고려해 볼 때, 當歸가 뇌경색에 의해서 일어난 뇌조직의 虛血을 補血하고, 活血로서 뇌조직의 미세혈관순환을 촉진하여서 뇌신경보호효과가 있을 것으로 생각된다. 따라서 前腦虛血에 의한 백서의 뇌손상 모델에서 Cresyl violet 염색법과 c-Fos 면역조직화학 염색법을 이용하여 뇌신경보호효과를 규명하기 위해 當歸를 使用하게 되었다.

예비 실험에서 4-0 nylon에 polysiloxane을 입힌 봉합사를 이용했을 때 시술 2시간 후 중풍증상에 관계되는 운동장애(선회, 앞발 굽힘, 몸의 불균형 등)가 모두 관찰되었으며 TTC 염색시 前腦部位에 국한된 뇌경색이 유발되었다.

수술한지 20분 후에 생리식염수와 當歸를 각각 투여한 다음 24시간 후의 TTC 염색결과를 육안으로 확인하였을 때 대조군과 실험군은 右側 前腦部位가 허혈성 뇌손상이 나타났으며 對側은 뇌손상이 없었다. 실험군에서는 대조군에 비하여 뇌경색 부위가 훨씬 작게 관찰되었다. 이는 當歸가 초기 급성기에 신경보호효과가 있는 것을 시사하였다(Fig. 1).

前腦虛血 유발 7일 후에 Cresyl violet 염색법을 사용하여 해마조직을 염색한 결과 대조군의 CA1부위 평균세포수가  $4.0 \pm 1.5$ 개로서 신경세포의 현저한 소실이 관찰되었으며 이들 부위가 前腦虛血에 매우 취약한 부위임을 보여주고 있었다. 상대적으로 CA3나 DG부위는 前腦虛血로 인한 신경손상에 비교적 영향을 받지 않았으며, 이는 이전연구의 보고결과와 일치하고 있음을 알 수 있었다<sup>20</sup>. 當歸를 처치하였을 때

실험군 해마체 CA1 부위의 pyramidal cell 평균수는  $42.0 \pm 0.9$ 개로서 정상군의 pyramidal cell의 평균수인  $38.0 \pm 1.5$ 개와 유사하였으며, 이는 통계적으로 유의성을 보였다. 즉, 해마체의 CA1부위에서는 當歸를 투여하였을 때 허혈성 뇌손상에 대한 세포보호 효과가 현저하게 나타난 것을 볼 수 있었다(Table 1, Fig. 2).

위와 같은 當歸의 신경손상보호효과를 조기유전자 발현으로 살펴보기 위하여 신경세포의 活性指標로 이용되는 immediate early 유전자(IEGs)에 속하는 c-fos의 발현을 면역조직화학 염색법을 사용하여 살펴 보았다. 現在까지 신경 손상후에 나타나는 c-fos를 포함한 IEGs의 발현의 변화가 Fos단백질에 의해 매개되는 것인지 또는 다른 기전에 의한 것인지 알려져 있지 않다. 前腦虛血 후 이들 유전자의 발현은 신경보호나 신경괴사를 지연시키는데 필요하나, 약물치로 인한 세포생존과 遺傳子 發顯의 變化 樣相이 어떤 관련이 있는지 분명하지 않다. 더우기 前腦虛血에 의한 유전자들의 발현이 신경을 보호하는지 또는 뇌에 손상을 주는지도 아직 뚜렷하지 않다<sup>30,40</sup>.

본 실험에서 c-Fos 면역조직화학 염색법의 결과 前腦虛血 유발 7일후의 대조군의 c-Fos 양성도는 CA1 부위에서 감소하고 CA3 및 DG에서는 신경손상이 나타나지 않아서 Cresyl violet 염색결과와 유사하였으며, CA1에서의 평균세포수도 정상군은  $19.8 \pm 1.1$ 개이나 대조군에는  $6.3 \pm 1.9$ 개로 현저하게 소실하여서 해마체의 CA1에서 c-Fos 양성반응을 보인 신경세포는 대조군이 정상군에 비해 상당히 감소하였으며, 실험군에서는  $15.0 \pm 1.2$ 개로서 해마체 CA1부위의 c-Fos 양성세포수가 유의성이 있는 현저한 증가를 하였다(Table 2, Fig. 3).

前腦虛血後 해마에서 c-fos 발현이 증가됨은 몇몇 연구들에서 報告된 바 있으며 본 研究結果에서도 뇌 허혈 후 이들 유전자의 발현과 신경세포의 생존이 밀접히 關聯되어 있음을 證明할 수 있었다. 이에 의하면 前腦虛血 후 해마내에서는 지연성 신경세포사가 발생하며, 前腦虛血에 의한 신경세포손상에 대해 當歸를 투여하여 나타난 c-fos의 발현증가는 신경회복을 반영하고 있음을 보여주고 있다. 따라서 前腦虛

血에 의한 c-fos의 발현은 약물에 의한 보호효과의 신뢰할 수 있는 지표로 간주될 수 있음을 시사한다.

그러나 신경보호효과의 지표로서 의미는 있으나, 프로그램성 세포괴사(apoptosis)의 기능발휘는 leucine zipper구조를 가진 두 개의 조기유전자의 구성요소에 의해서 결정되기 때문에 c-fos의 발현증가 하나만으로 當歸의 대뇌보호기전을 설명하기는 부족하므로, 이후에 다른 조기유전자의 분석을 병행하여서 이들이 어떻게 결합하여 apoptosis의 기전에 영향을 미치는 지에 대하여 자세한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

## 결론

當歸가 뇌허혈성 신경손상에 미치는 영향을 실험적으로 입증하기 위해서 白鼠에 인위적으로 뇌허혈을 유발시킨 후 當歸를 경구투여하여 TTC 염색법, Cresyl violet 염색법 및 c-Fos 면역조직화학 염색법을 통한 측정으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 당귀투여군은 뇌허혈 유발 24시간 후에 TTC 염색법으로 관찰하였을 때, 대조군에 비하여 뇌손상이 유의하게 억제되었다.
2. 당귀투여군은 뇌허혈 유발 7일 후에 Cresyl violet 염색법으로 해마부위를 관찰하였을 때, 대조군에 비해 세포손상이 유의하게 억제되었다.
3. 당귀투여군은 c-Fos 면역조직화학 염색법으로 관찰하였을 때, c-Fos 양성반응 신경세포가 유의하게 증가하였다.

이러한 연구결과에 따라 當歸는 腦虛血性 동물 뇌손상모델에서 신경보호효과가 有意한 것으로 나타나, 뇌졸중 예방 및 치료에 유의한 효과를 보일 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 김영석. 임상중풍학. 서울:서원당. 1997:303-8.
2. Benveniste H, Jorgensen MB, Sandberg M. Ischemic damage in hippocampal CA1 is dependent on glutamate

release and intact innervation from CA3. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989;9:629-39.

3. Kwiatkowski TG, Libman RB, Frank M, et al. Effects of tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke at one year. *N Engl J Med* 1999;340(23):1781-7.
4. Timothy J. Preventing ischemic stroke: Current approach to primary and secondary prevention. *Postgraduate Medicine.* 2000;107(6):34-50.
5. Goodman and Gilman. 약물치료의 기초와 임상. 서울: 고려의학. 1990:264-5.
6. Zygmunt L, Kruk, Christopher J. 신경전달물질과 약물. 서울:하나의학사. 1996:215-6. 233, 236.
7. Meldrum B. Protection against ischemic neuronal damage by drug. *Cerebrovascular Brain Metab.* 1990; 2:27-57.
8. Siejo B. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia part I : Pathophysiology. *J Neurosurgery.* 1992;77:169-84.
9. Choi DW. NMDA receptors and AMPA/kainate 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.
10. Faden AI, Salzman S. Pharmacological strategies in CNS trauma. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;3:29-35.
11. Weissner C, Hossman KA. Clinical pharmacology of cerebral ischemia. *Ottawa Human press.* 1977:1033-5.
12. 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.
13. 徐樹楠, 牛兵占. 中醫經典通釋 神農本草經. 河北:河北科學技術出版社. 1994:68.
14. 오민철, 안규석, 김광호. 黃耆 및 當歸의 免疫 增強 效果에 關한 研究. 경희한의대논문집. 1986;9:343-54.
15. 한청광, 안덕균. 당귀류의 Decursin함량 및 빈혈가토의 조절작용에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1983;6:158-68.
16. Bradley RR, Cunniff PJ, Pereira BJ. Hemoatopoietic effect of Radix angelicase sinensis in a hemodialysis patient. *Am J Kidney Dis.* 1999;34(2):349-54.
17. 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 Council*



- Repub China B. 1995;19(3):151-8.
18. Hu H, Hang B, Wang P. Anti-inflammatory effect of radix *Angelicae sinensis*. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*. 1999;16(11):684-6, 704.
  19. 成日煥, 蔡禹錫, 玄胡素, 當歸尾水鍼이 Endotoxin으로誘發된 白鼠의 血栓症에 미치는 影響. *大韓針灸學會誌*. 1994;11(1):392-404.
  20. 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.
  21. 전국한의과대학 심계내과학교실. *심계내과학*. 서울:서원당. 1999:420-30.
  22. 보건복지부. *보건복지 통계연보*. 서울:보건복지부. 1999:51, 70-1.
  23. Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1993;24:2002-8.
  24. Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, Chopp M. Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rats. *Am J Pathol*. 1995;146:1045-51.
  25. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci*. 1991;14:421-51.
  26. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: friend or foe? *Stroke*. 1996;27:1682-7.
  27. Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. 1990;4:477-85.
  28. Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol*. 1994;127:1717-27.
  29. 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.
  30. Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a mesolimbic marker in neural pathway tracing. *J Neurosci Methods*. 1989;29:261-5.
  31. Fenelton VS, Poulain DA, Theodosios DT. Oxytocin neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience*. 1993;53:777-89.
  32. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: Metabolic mapping at the cellular level. *Science*. 1988; 240:1328-30.
  33. Nowak T, Ikeda J, Nakajima T. 70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Stroke*. 1990;21:(Suppl. 11)107-11.
  34. 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.
  35. Kogure K, Kato H. Altered gene expression in cerebral ischemia. *Stroke*. 1993;24:2121-7.
  36. 全國韓醫科大學 本草學教授. *本草學*. 서울:永林社. 1991:578-9.
  37. 李尙仁. *本草學*. 서울:壽文社. 1973:53-5.
  38. 李京淳, 安德均, 辛民教, 金昌玟. 完譯 中藥大辭典. 서울:鼎談. 1997:890.
  39. 최태섭. *韓國의 補藥*. 서울:열린책들. 1990:168-73.
  40. Neumann-Haefelin T, Wiessner C, Vogel P, Back T, Hossmann K-A. Differential expression of the immediate early genes c-fos, c-jun, jun-B, and NGFI-B in the rat brain following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14:206-16.