

신원방우황청심원의 뇌허혈 및 중추신경계에 미치는 영향

조태순[#] · 이선미 · 이은방* · 조성익* · 김용기** · 신대회** · 박대규**
성균관대학교 약대학, *서울대학교 천연물과학연구소, **조선무약(자) 생명과학연구소
(Received February 11, 1999)

Pharmacological Action of New Wonbang 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, Kyunggi 440-746
*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460
**Institute of Life Science Research, Cho Seon Pharmaceutical & Trading Co.,
Ansan, Kyunggi 425-120, Korea

Abstract—In order to investigate pharmacological properties of New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill (NSCH) and Wonbang Woohwangchungsimwon Pill (SCH), the effects of NSCH and SCH 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 effects of NSCH and SCH treatments with ischemia-induced brain damage. The ATP in brain tissue was decreased in vehicle-treated ischemic gerbils. This decrease was prevented by SCH treatment. In contrast to what was seen with ATP, lipid peroxide were elevated in vehicle-treated ischemic gerbils. This elevation was inhibited by NSCH and SCH treatments. While NSCH and SCH had no effects on the hexobarbital-induced sleeping time, they prevented the seizures induced by electric shock and strychnine. NSCH and SCH showed sedative effect in rotarod and spontaneous activity test. Furthermore, NSCH and SCH showed anti-stress effect. Our findings suggest that the pharmacological profiles of NSCH on cerebral ischemia and central nervous system are similar to those of SCH.

Keywords □ New wonbang woohwangchungsimwon pill, wonbang woohwangchungsimwon pill, cerebral ischemia, central nervous system.

우황청심원은 1107년경 태평혜민화제국방¹⁾에 최초로 수제되었으며, 동의보감,²⁾ 의학입문,³⁾ 방약합편⁴⁾ 등의 기성한의서에 수제되어 있으며, 사향, 우황 등 25종의 생약으로 구성된 처방으로 줄중풍 등의 구급약으로 현재까지 널리 사용되어 오고 있다. 현재 유통되는 처방은 크게 나누어 동의보감의 처방을 그대로 따르는 원방우황청심원과 각 구성생약의 구성비율을 조금씩 변화를 준 변방우황청심원 두 종류로 나누어지며, 또 제형에 따라 환제

와 액제로 나누어져 4 종류가 유통되고 있다.

우황청심원의 주약으로 사용되어 온 사향은 사향사슴(*Moschus moschiferus* L.) 또는 그 밖의 근연동물(우제목(Artiodactyla) 사슴과(Cervidae))의 수컷의 사향 선분비물로서 강심, 흥분, 개규, 통경, 진정, 진경, 배농, 해독, 구어혈 작용이 있어 중풍, 소아경간, 신훈섬, 심복강통, 심장쇠약, 신경쇠약, 월경곤란, 혈전, 질타손상 등의 치료에 사용된다.⁵⁾ 또한 사향은 hexobarbital에 의한 수면시간을 감소시킴으로써 중추 흥분효과⁶⁾가 있는 반면, 자발 운동량을 감소시키는 것으로 보아 진정작용⁷⁾ 등이 있다고 보고되었다. 그밖의 약리작

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0331-290-7701 (팩스) 0331-292-8800

용으로는 남성호르몬양 작용,^{8,9)} 항염증작용^{10,11)} 등이 보고되어 있다.

그러나, 사향은 전량 외국으로부터 수입에 의존하고 있으며 최근들어 "멸종 위기에 처한 야생 동식물의 국제 거래에 관한 협약(CITES 협약)"이 발효됨에 따라 사향의 공급이 더욱 어려움에 처해 있는 실정에서 사향의 대체약물의 개발이 절실히 요구되어 최근에 사향의 대체약물인 *l*-muscone을 개발하기에 이르렀다.

l-Muscone의 효능효과에 대하여 조 등¹²⁾은 뇌허혈 및 중추신경계에 대하여 *l*-muscone은 사향과 유사한 뇌허혈에 대한 개선작용, 중추신경계에 대해 진정작용, 호흡흥분작용 및 항스트레스작용 등을 관찰하여 *l*-muscone이 사향의 대체약물이 될 수 있음을 확인하였다. 또한, 사향 대체약물로 *l*-muscone을 사용하여 제조한 신우황청심원과 기존의 우황청심원에 대한 약효 약리를 검토한 결과 뇌허혈, 중추신경계 및 심혈관계에 대하여 서로 유사한 작용이 인정되어 사향 대체약물이 될 수 있음을 재확인하였다.¹³⁻¹⁶⁾

본 연구는 사향 대체약물로 *l*-muscone을 사용하여 제조한 신원방우황청심원과 기존의 원방우황청심원의 뇌허혈 및 중추신경계에 미치는 약리작용을 비교연구하여 약효의 유사성을 입증하고자 하였다.

실험방법

실험동물

수컷 Mongolian gerbil은 미국의 Harlan사에서 체중 60 g 내외를 구입하였고, 생쥐는 체중 20~30 g의 ICR계 수컷을, 흰쥐는 체중 200~350 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 제일상사 및 대한실험동물센터(주)로부터 공급받아 동물실 환경에서 1주 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물실의 온도는 22~25°C로, 습도는 50±5%로 유지되었고, 명암은 12시간 간격으로 자동조절 하였으며, 실험동물에게는 삼양사(주)의 사료를 급식하였고, 상수를 자유로이 섭취하도록 하였다.

시료

신원방우황청심원 및 원방우황청심원은 조선무약(자)으로부터 제공받아 0.5% sodium carboxymethyl cellulose(CMC-Na) saline액에 현탁시켜 사용하였으며, 체중 kg당 10 ml가 투여 되도록 제조하여

경구투여하였으며, 대조약물 또한 0.5% CMC-Na saline에 녹여 경구투여하였다. 본 연구에 사용된 신원방우황청심원(1환(3.75 g))은 감초 188 mg, 계피 66 mg, 작약 56 mg, 황금 56 mg, 방풍 56 mg, 백출 56 mg, 길경 47 mg, 복령 47 mg, 우황 45 mg, 산약 263 mg, 인삼 94 mg, 포황 94 mg, 신곡 94 mg, 대두황권 66 mg, 아교 66 mg, 맥문동 56 mg, 백련 28 mg, 당귀 56 mg, 시호 47 mg, 행인 47 mg, 천궁 47 mg, 용뇌 38 mg, 영양각 38 mg, 건강 28 mg 및 *l*-muscone 1.5% 과립 38 mg(*l*-muscone으로써 570 µg)으로 구성되어 있으며, 원방우황청심원은 *l*-muscone 1.5% 과립 38 mg 대신 사향 38 mg이 처방되어 있다.

시약

ATP assay kit(No. 366), lactate dehydrogenase(from rabbit muscle), nicotinamide adenine dinucleotide(NAD), Tris-HCl, glycine, hydrazin, glucose, thiobarbituric acid, pentetrazol, strychnine nitrate, phenobarbital·Na, chlorpromazine·HCl, l-ascorbic acid 등의 시약은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였고, 기타 시험에 필요한 시약은 국내특급시약을 사용하였다.

뇌허혈에 미치는 작용

뇌허혈 유발

Gerbil을 ether 마취하에 수술판에 고정시키고 목의 중앙선을 절개한 후 좌측 경동맥을 미주신경으로부터 분리하여 동맥 clamp로 결찰하였다. 허혈 20분후 clamp를 빼내어 30분간 재관류시키고 단두치사하여 재빨리 뇌를 적출한 다음 무게를 달아 뇌시료를 얻었으며, 이를 균질화하여 각 측정항목을 측정하였다. 신경학적 검사는 허혈 20분후 clamp를 빼내고 절개부위를 봉합하여 24시간동안 재관류시켰다. 24시간 후 gerbil의 신경손상정도에 따라 4등급으로 나누고 조직검사를 위하여 단두치사하여 뇌를 10% formalin neutral buffer 용액(Sigma Chemical Co., USA)에 10일간 담가둔 후 실험에 이용하였다. 약물은 수술 30분 전에 1회 경구투여하였다.

신경학적검사 및 병리조직검사 - 신경학적 검사는 수술 후 24시간이 경과한 다음 Bederson 등의 방법¹⁷⁾에 따라 그 결손정도를 4등급으로 점수화 하였다. 병리조직검사는 조직을 충분히 formalin으로 고정시킨 후

4 mm 두께의 coronal brain slice를 만든 후 조직내에 남아있는 고정액은 흐르는 수돗물에 충분히 수세하였다. 각 군의 조직을 Autotechnicon(Citadel 2000, Shandon, USA)을 사용하여 투명(clearing) 및 침투 과정을 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 조직이 외의 paraffin을 녹이고 xylene에서 10분씩 3회 처리한 후 100%, 95%, 80% 및 70% ethanol 순으로 2회씩 2분간 처리하여 함수시켰다. Hematoxylin-Eosin (H&E) 염색은 함수과정후 탈이온수에서 10분간 처리한 후 Harris's hematoxylin으로 염색하였다. 현미경 검경은 카메라가 부착된 현미경(Nikon Diaphot 300, Japan)으로 하였다.

뇌시료의 추출 - 뇌시료를 평량한 후 0.25% EDTA가 들어있는 0.1M HClO₄를 가하여 homogenizer로 30초간 균질화 시킨 다음 10분간 고정시켜 단백질을 변성시킨 후 4°C에서 10000 g로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 ATP, lactate, malondialdehyde(MDA) 정량용 시료로 사용하였다.

ATP함량 측정 - ATP의 측정은 ATP assay kit를 사용하였으며, 그 값을 μ mole/g brain tissue로 나타내었다.

Lactate함량 측정 - Lactate의 측정은 Gutmann과 Wahlefeld의 방법¹⁸⁾에 따라 lactate dehydrogenase와 NAD에 의해 생성된 NADH를 340 nm에서 그의 흡광도를 측정하였으며, 그 값을 μ mole/g brain tissue로 나타내었다.

지질과산화 측정 - 지질과산화는 Masugi와 Nagamura의 방법¹⁹⁾에 준하여 thiobarbituric acid(TBA) assay를 사용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하였다.

단백질 함량은 Bradford의 방법²⁰⁾에 따라 bovine serum albumin(BSA)을 표준용액으로 사용하여 정량하였다.

중추신경계에 미치는 작용

Hexobarbital 유도 수면시간에 대한 작용 - 수컷 생쥐에 hexobarbital · Na 50 mg/kg을 복강주사한 후, 정향반사가 상실되기 시작한 시각과 회복될 때까지의 시간을 측정하였다. 10마리를 1군으로 하였으며, 약물은 hexobarbital · Na 투여 30분전에 경구로 투여하였고, 대조약물은 chlorpromazine · HCl을 사용하였다.

최대전기자극에 대한작용 - 최대전기자극은 Woodbury와 Davenport의 방법²¹⁾에 준하여 실시하였다. 수컷 생쥐 13마리를 1군으로 하여 양눈에 50 mA의 전류를 0.1초 동안 통하였다. 이에 따른 강직성 경련에 의한 사망수를 계수하고, 생존하는 생쥐는 경련 발현 후 정상으로 회복될 때까지의 시간을 측정하였다. 약물은 전기자극을 하기 30분전에 경구로 투여하였고 대조약물은 phenobarbital · Na을 사용하였다.

Strychnine 유발경련 치사에 대한 작용 - Araki와 Ueki의 방법²²⁾에 준하여 실시하였다. 수컷 생쥐 15마리를 1군으로 하여 strychnine nitrate 1.5 mg/kg을 피하주사하고 강직성경련 및 사망에 걸리는 시간을 측정하였다. 약물은 strychnine nitrate를 투여하기 30분전에 경구로 투여하였고 대조약물은 phenobarbital · Na을 사용하였다.

Pentetrazol 유발경련에 대한 작용 - Swinyard 등의 방법²³⁾에 준하여 실시하였다. 수컷 생쥐 15마리를 1군으로 하여 pentetrazol 85 mg/kg을 생쥐에 피하주사하고 간대성경련이 일어날 때까지의 시간을 측정하였다. 약물은 pentetrazol을 투여하기 30분전에 경구로 투여하였고 대조약물은 phenobarbital · Na을 사용하였다.

Rotarod 시험 - Dunham 등의 방법²⁴⁾을 응용하여 직경 3 cm, 8 rpm으로 회전하는 회전봉에 3분 이상 걸리는 생쥐 12마리를 1군으로 선별하여, 2회 반복 훈련시키고, 1시간 후에 본 실험을 실시하여 3분내 떨어지는 생쥐를 계수하였다. 약물은 30분전 경구로 투여하였으며, 대조약물은 chlorpromazine · HCl을 사용하였다.

자발운동능에 대한 시험 - 생쥐의 운동에 따라 활동 횟수가 기록되는 activity cage를 이용하여 Nahorski의 방법²⁵⁾에 준하여 실시하였다. 체중 23~30 g 수컷 생쥐 8마리를 1군으로 하여, 2마리씩 한 cage에 넣어 30분간 적응시키고 약물을 경구로 투여하여 45분 후 15분 동안의 자발운동성을 측정하였다. 대조약물은 chlorpromazine · HCl을 사용하였다.

KCN으로 유도된 혼수시간에 미치는 영향

Goto 등의 방법²⁶⁾에 따라 수컷 생쥐 10 마리를 1군으로 하여 생리식염수에 녹여 차광하에서 보관한 KCN을 2.0 mg/kg의 용량으로 체중 10 g당 0.1 ml씩 꼬리정맥내에 투여한 후, 정향반사가 소실되기 시작한 시점으로부터 회복될 때까지 지속된 혼수시간을 측정하였다.

스트레스에 미치는 작용

스트레스부과 - 스트레스 부과 24시간 전에 절식시킨 수컷 흰쥐를 metal tube restrainer(Natume, Japan)에 구속시켜, 20±2°C가 유지되는 수욕내에 수침시켜 24시간 동안 수침 구속스트레스를 부과하였다. 약물은 스트레스 부과 2시간 전, 부과 4, 19시간 후에 각각 투여하였다. 스트레스 부과 24시간 후 ether 마취하에 개복하여 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, 10,000 g에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 취하였다. 정량반응을 위하여 5% TCA 용액에 상등액 0.5 ml를 혼합하고 0.1 ml H₃PO₄(85%), 0.8 ml dipryridyl(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.²⁷⁾

통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 사용하여 나타내었고, 각 군간의 비교는 Student's *t*-test 및 χ^2 -test를 사용하였으며, 대조군과 비교하여 P 값이 0.05 미만 일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과

뇌허혈에 미치는 영향

병리조직검사 - Table I에서 보는 바와 같이 뇌허혈 및 재관류 대조군은 뇌신경세포괴사와 세포부종 및 충

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

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

- : none, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe
n = number of animals in each group.

NSCH: New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill, SCH: Wonbang Woohwangchungsimwon Pill.

Table II—Effects of NSCH and SCH on neurological change after ischemia in gerbils

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	Neurological grade
Control		1.38±0.26
	500	1.20±0.20
	1,000	1.20±0.20
	2,000	1.00±0.00
NSCH	4,000	1.20±0.20
	500	1.20±0.20
	1,000	1.20±0.20
	2,000	1.00±0.00
SCH	4,000	1.20±0.20

Values are means±S.E. for 5 to 8 gerbils per group.
NSCH: New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill, SCH: Wonbang Woohwangchungsimwon Pill.

혈이 극심하였으며, 신원방우황청심원 투여군에서는 허혈에 따른 신경세포괴사, 부종 및 충혈 정도가 억제되었으며, 원방우황청심원 또한 모든 투여군에서 뇌허혈에 대한 보호작용이 확인되었다.

신경학적검사 - Table II에서 보는 바와 같이 허혈 후 24시간이 지난 다음 신경 결손정도는 신원방우황청심원군 및 원방우황청심원군 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 20분후 재관류 30분에 0.22 μ mole/g brain tissue 까지 급격히 감소하였다. 신원방우황청심원군에서는 대조군과 차이를 나타내지 않았

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

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	ATP (μmole/g brain)	Lactate (μmole/g brain)	MDA (nmole/mg protein)
Normal		0.90±0.11	6.33±0.16	2.69±0.13
Control		0.22±0.02 ^{##}	9.72±1.35 [#]	4.32±0.30 [#]
NSCH	500	0.27±0.02 [#]	7.02±0.66	2.83±0.13 ^{**}
	1,000	0.28±0.02 [#]	7.63±0.64 [#]	2.91±0.13 ^{**}
	2,000	0.26±0.01 [#]	7.12±0.36 [#]	2.44±0.10 ^{**}
	4,000	0.27±0.02 [#]	7.13±0.30 [#]	3.12±0.06 ^{##}
SCH	500	0.38±0.01 ^{####}	7.48±0.82	2.65±0.13 ^{**}
	1,000	0.39±0.02 ^{####}	6.93±0.26	2.64±0.28 ^{**}
	2,000	0.30±0.01 ^{###}	7.04±0.40	2.52±0.14 ^{**}
	4,000	0.33±0.01 ^{####}	7.49±0.25 ^{##}	2.86±0.19 ^{**}

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). NSCH: New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill, SCH: Wonbang Woohwangchungsimwon Pill.

Table IV— Effects of NSCH and SCH on hexobarbital-induced sleeping time

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of mice	Onset of sleeping (sec)	Sleeping time (sec)	Increment (%)
Control		10	151±7	452±59	-
NSCH	2,000	10	157±7	444±106	-1.8
	4,000	10	147±16	452±46	-0.1
SCH	2,000	10	169±12	402±28	-11
	4,000	10	145±6	402±45	-11
Chlorpromazine · HCl	4	10	101±11*	915±84*	102

Significantly different from the control group (* p<0.05 in Student's *t*-test). NSCH: New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill, SCH: Wonbang Woohwangchungsimwon Pill.

으나, 원방우황청심원은 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의성있는 ATP 증가를 나타내었다.

Lactate 함량 - Table III에서 보는 바와 같이 정상 gerbil brain에서의 lactate 함량은 6.33 μmole/g brain tissue였으나, 허혈 및 재관류를 실행한 대조군에서는 9.72 μmole/g brain tissue로 유의성 있게 증가하였다. 신원방우황청심원과 원방우황청심원 모든 투여군에서 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

지질과산화 측정 - Table III에서 보는 바와 같이 정상 gerbil brain에서 지질과산화의 지표인 MDA는 2.69 nmole/mg protein 이었으나, 허혈 및 재관류 후 4.32 nmole/mg protein으로 유의성있게 증가하였다. 신원방우황청심원은 모든 투여군에서 대조군에 비해 MDA량이 유의성있게 감소시켰으며, 원방우황청심원 또한 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.

중추신경계에 미치는 영향

Hexobarbital 유도 수면시간에 대한 작용 - 신원방우황청심원 및 원방우황청심원의 수면시간에 미치는 작용을 Table IV에 표시하였다. Chlorpromazine · HCl 4 mg/kg을 투여시에 생쥐의 수면에 도달하는 시간이 151초에서 101초로 유의성있게 단축시켰으며, 수면지속시간은 452초에서 915초로 102% 연장시켰다. 신원방우황청심원 및 원방우황청심원 투여군에서는 수면도달 및 수면지속시간이 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

최대전기자극에 대한작용 - 최대전기자극 경련에 대한 작용을 Table V에 나타내었다. 생쥐의 양측눈에 50 mA의 전류를 통하였을 때 대조군에서는 경련지속시간이 110초였으며, 사망률은 54%였다. 신원방우황청심원을 2,000 및 4,000 mg/kg의 용량으로 투여하였을 경우에 경련시간을 각각 74.0과 68.1초로 유의성있게 단축시켜, 32와 38%의 경련억제율을 보였으며, 사망률

Table V— Effects of NSCH and SCH on maximal electric shock-induced seizures

Treatment	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	No. of tested mice	No. of survived mice	Convulsion time (sec)	Inhibition (%)
Control	—	13	6	110±11	—
NSCH	2,000	13	8	74.0±8.7*	32
	4,000	13	7	68.1±9.7*	38
SCH	2,000	13	6	83.3±17.8	24
	4,000	13	8	72.8±8.5*	34
Phenobarbital · Na	50	13	13 [†]	19.7±5.7**	82

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

NSCH: New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill, SCH: Wonbang Woohwangchungsimwon Pill.

Table VI— Effects of NSCH and SCH on strychnine-induced seizures

Treatment	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	No. of tested mice	No. of dead mice	Onset of convulsion (sec)	Death Time (sec)
Control	—	15	15	232.1±6.5	256.9±6.7
NSCH	2,000	15	15	242.3±8.1	274.4±10.3
	4,000	15	15	260.6±8.4*	298.9±11.0**
SCH	2,000	15	15	241.3±5.8	280.9±12.2
	4,000	15	15	242.6±6.1	291.7±8.6**
Phenobarbital · Na	100	15	2 [‡]	373.6±34.4**	688.0±32.0**

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

NSCH: New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill, SCH: Wonbang Woohwangchungsimwon Pill.

Table VII— Effects of NSCH and SCH on pentetrazol-induced seizures

Treatment	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	No. of tested mice	No. of convulsed mice	Onset of convulsion (sec)	Increment (%)
Control	—	15	15	514±29	—
NSCH	2,000	15	14	567±46	10
	4,000	15	13	590±68	15
SCH	2,000	15	13	537±27	4.5
	4,000	15	12	603±45	17
Phenobarbital · Na	100	15	0 [‡]	—	—

Significantly different from the control group ([†] $p < 0.01$ in χ^2 -test)

NSCH: New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill, SCH: Wonbang Woohwangchungsimwon pill.

또한 39%와 46%로 감소시키는 경향을 보였다. 원방우황청심원 또한 2,000 및 4,000 mg/kg의 용량 투여에 의해 경련시간을 각각 83.3과 72.8초로 유의성있게 단축시켜 24%와 34%의 경련억제율을 보였으며, 사망률은 4,000 mg/kg 투여군에서 39% 감소시키는 경향을 보였다. 양성대조군인 phenobarbital은 사망률을 100% 억제하였으며, 경련지속시간 또한 19.7초로 단축시켜 82%의 경련억제율을 나타내었다.

Strychnine 유발경련 치사에 대한 작용 - Strych-

nine 유발 경련에 대한 작용을 Table VI에 나타내었다. 대조군에서 strychnine 투여에 의해 강직성경련이 유발되는 시간은 232초였으며 사망에 도달하는 시간은 257초였다. 신원방우황청심원 4,000 mg/kg 투여에 의해 경련유발시간은 261초로 12% 연장되었고, 사망시간 또한 299초로 16% 연장되었으나, 사망율에는 별영향이 없었다. 원방우황청심원은 경련도달시간 및 사망율에는 영향이 없었으나, 4000 mg/kg 투여군에서는 사망도달시간은 292초로 유의성있게 연장시키는 결과

를 보였다. 양성대조군인 phenobarbital은 사망률을 13%로 유의성있게 감소시켰고, 경련 및 사망도달시간을 각각 374, 688초로 유의성있게 연장시켰다.

Pentetrazol 유발 경련에 대한 작용 - Pentetrazol 유발 경련에 대한 신원방우황청심원의 작용을 Table VII에 나타내었다. 대조군에서 pentetrazol 투여에 의해 대성경련이 유발되는 시간은 514초였다. 신원방우황청심원은 2,000 mg/kg 투여군에서 경련도달시간을 10%, 4,000 mg/kg 투여군에서 15% 지연시키는 경향이 있었으나 통계적 유의성은 없었다. 원방우황청심원 또한 2,000, 4,000 mg/kg 투여군에서 경련도달시간을 각각 4.5%, 17% 지연시키는 경향이 있었으나 통계적 유의성은 없었다. 반면에 양성대조군인 phenobarbital은 pentetrazol에 의한 경련유발을 100% 억제하였다.

Rotarod 시험 - Table VIII에서 보는바와 같이 rotarod 시험에서는 정상군은 낙하 생쥐가 한 마리도 없는 반면, 양성 대조군인 chlorpromazine · HCl을 투여한 경우 10마리가 낙하하였다. 신원방우황청심원의 경우도 500, 2000 및 4000 mg/kg 투여군에서 낙하 생쥐가 각각 4마리로 유의성있는 진정작용을 나타내었으며, 원방우황청심원 500, 1000, 2000 및 4000 mg/kg 투여군에서 낙하 생쥐수가 각각 4, 4, 4, 6마리로 유의성있는 진정작용을 나타내었다.

자발운동능에 대한 작용 - Table IX에서 보는바와 같이 정상군의 자발운동능은 1090이였으나, 양성대조

Table VIII—Effects of NSCH and SCH on rotarod test in mice

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of tested mice	No. of fallen mice
Control	-	12	0
NSCH	500	12	4*
	1,000	12	3
	2,000	12	4*
	4,000	12	4*
SCH	500	12	4*
	1,000	12	4*
	2,000	12	4*
	4,000	12	6**
Chlorpromazine · HCl	10	12	10**

Significantly different from the control group (* p<0.05, ** p<0.01 in χ^2 -test).
NSCH: New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill, SCH: Wonbang Woohwangchungsimwon Pill.

Table IX—Effects of NSCH and SCH on spontaneous activities in mice

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of mice	Spontaneous activity
Control	-	8	1090±39
NSCH	500	8	1080±120
	1,000	8	906±187
	2,000	8	703±102*
	4,000	8	722±81**
SCH	500	8	893±152
	1,000	8	850±85*
	2,000	8	1094±147
	4,000	8	728±135*
Chlorpromazine · HCl	5	10	313±79**

Significantly different from the control group (* p<0.05, ** p<0.01 in Student's *t*-test).
NSCH: New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill, SCH: Wonbang Woohwangchungsimwon Pill.

물질인 chlorpromazine · HCl을 투여한 경우 313로 감소되었다. 신원방우황청심원은 2,000과 4,000 mg/kg 투여군에서 각각 703, 722로 유의성있는 자발운동능의 감소를 보였으며, 원방우황청심원 1,000, 4,000 mg/kg 투여군에서 각각 850, 728로 감소시켰다.

KCN으로 유도된 혼수시간에 미치는 영향

KCN으로 유발된 혼수시간에 미치는 영향을 Table X에 나타내었다. 신원방우황청심원과 원방우황청심원 투여군은 KCN으로 유발된 혼수시간에 있어서 용량의 존적인 차이를 보이지 않았으며, 두 제제간에도 작용상의 차이를 거의 나타내지 않았다.

스트레스에 미치는 영향

신원방우황청심원과 원방우황청심원의 효과를 살펴

Table X—Effects of NSCH and SCH 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±26	-
NSCH	2,000	10	100±13	-12
	4,000	10	105±15	-7.8
SCH	2,000	10	85.5±5.3	-25
	4,000	10	98.0±12.4	-14

NSCH: New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill, SCH: Wonbang Woohwangchungsimwon Pill.

Table XI—Effects of NSCH and SCH 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.)
Normal		16.5±0.3	342±22	698±39
Control		20.8±0.8 ^{**}	179±15 ^{**}	444±45 ^{**}
NSCH	500	18.4±1.4	164±10 ^{**}	433±77 ^{**}
	1,000	17.9±1.1	225±28 ^{**}	461±72 [*]
	2,000	19.8±1.4 [*]	232±15 ^{**}	480±61 [*]
	4,000	18.8±0.8 [*]	216±22 ^{**}	594±32 [*]
SCH	500	20.4±1.5 [*]	168±7 ^{**}	647±84 [*]
	1,000	21.9±2.6 [*]	197±13 ^{**}	619±61 [*]
	2,000	17.8±1.3	211±17 ^{**}	637±64 [*]
	4,000	20.9±1.2 ^{**}	190±10 ^{**}	592±50

Values are means±S.E.M. for 6 to 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).

NSCH: New Wonbang Woohwangchungsimwon Pill, SCH: Wonbang Woohwangchungsimwon Pill.

보면, 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 비대되었으나, 신원방우황청심원 및 원방우황청심원 투여에 의해 억제되지 않았다. 비장의 중량은 스트레스 부과에 의해 342 mg/100 g b.wt.에서 179 mg/100 g b.wt.로 현저한 감소를 보였으며, 이러한 감소는 신원방우황청심원 2,000 mg/kg 투여군에서만 유의적으로 억제되었다. 부신내 ascorbic acid 함량은 24시간 스트레스 유도에 의해 698 mg/100 g ad.wt.에서 444 mg/100 g ad.wt.로 현저히 감소되었고 이러한 감소는 신원방우황청심원 4,000 mg/kg 및 원방우황청심원 500, 1,000, 2,000 mg/kg 투여군에서 유의성있게 억제되었다.

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.^{28,29)} 특히 해마의 CA1 부위 피라미드형 세포는 허혈에 매우 민감하다.³⁰⁻³³⁾

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 본 실험에 이용한 mongolian gerbil(*Meriones unguiculatus*)이 재현성 있고 유용한 동물모델로 확립되어 있으나,^{34,35)} focal brain ischemia 동물모델에 대해서는 여전히 많은 논란이 있다.^{36,37)}

또한, 최근에는 분자생물학적 수법이 진보됨에 따라 유전자 변이 생쥐가 뇌허혈 병태 해명에 응용되나 이 역시 아직도 선택적 뇌신경세포괴사가 불분명하여 이에 대한 연구가 더 진행되어야 한다.³⁸⁾

따라서 본 연구에서는 gerbil의 총경동맥 결찰에 의한 뇌허혈을 유발하는 방법을 이용하였다. 총경동맥을 20분간 결찰하여 허혈을 유발한 후 재관류하여 24시간 뒤에 조직병리검사를 실시한 결과 뇌신경세포괴사, 부종 및 출혈이 일어났으며, 신원방우황청심원과 원방우황청심원 투여에 의해 이러한 뇌신경세포손상이 억제되는 것으로 보아, 허혈에 의한 신경세포손상을 억제할 수 있음을 확인하였다.

뇌허혈에 대한 정확한 발생기전은 아직 알려져 있지 않으나, Mies 등은 허혈성 뇌에서 에너지대사 관련물질(ATP와 그의 대사체)을 측정하여 glucose 이용률의 저하를 보고하였으며,³⁹⁾ Sokoloff 등도 같은 결과를 보

여 주었다.⁴⁰⁾ 또한 과혈당(hyperglycemia)은 일시적인 뇌허혈에 의해 야기되는 뇌손상을 증가시킨다.⁴¹⁾ 이와 같은 현상에 대해 정확한 작용기전은 알 수 없으나, 뇌허혈중 과혈당이 뇌내 젖산증가와 산증이 가속화되므로 많은 연구자들은 이 두가지 현상이 뇌허혈 손상의 잠재적인 매개체라 여기고 있다.^{42,43)} 실제로 Combs 등의 연구에 따르면 해당작용(glycolysis)을 차단하면 과혈당으로 인한 뇌허혈 사망률을 줄일 수 있다고 한다.⁴⁴⁾

본 연구에서는 허혈에 의한 에너지대사장애에 대한 신원방우황청심원 및 원방우황청심원의 효과를 살펴보기 위하여 ATP 및 lactate 함량을 측정하였다. 허혈 및 재관류 후 뇌조직내의 ATP 함량은 유의성있게 감소되었으며, lactate 함량은 유의성있게 증가하여 허혈에 의한 에너지대사 장애를 확인할 수 있었다. 신원방우황청심원은 ATP 및 lactate 함량변화에 별다른 영향을 주지 않았으며, 원방우황청심원은 lactate 함량에는 영향이 없었으나, ATP 함량은 약간 상승시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 허혈에 의한 에너지대사 장애에는 큰 영향을 미치지 못한다는 것을 시사한다.

한편, 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.⁴⁵⁾ 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 O₂⁻는 정상상태에서는 효소에 의해 물과 산소분자로 변화되거나 무독화되어지나 뇌허혈 상태에서는 이들 효소가 감소되고 O₂⁻ 및 과산화수소와 같은 산소대사물 생성이 오히려 많아지므로 O₂⁻와 과산화수소는 세포막을 통과하여 비교적 항산화 방어기전이 적게 작용하는 세포의 공간으로 이동하게 된다. 또한 이들은 Fe²⁺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.⁴⁶⁾

본 연구에서 허혈 및 재관류 후 생성된 활성산소에 의한 세포손상을 알아보기 위하여 지질과산화의 지표인 MDA 함량을 측정하였다. MDA는 허혈 및 재관류 후

유의성있게 증가하였으나, 신원방우황청심원 및 원방우황청심원 투여에 의해 억제되어 거의 정상치로 회복되었다. 이것은 허혈 및 재관류 후 생성된 활성산소의 유해작용 또는 직접적인 제거작용이 있음을 시사하는 것이다.

원방우황청심원은 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 신원방우황청심원과 원방우황청심원이 중추신경계, 호흡 및 스트레스에 미치는 영향을 비교 검토하고자 하였다.

중추신경계에 미치는 영향으로는 신원방우황청심원 및 원방우황청심원 모두 hexobarbital 유발 수면시간에 영향을 주지 않는 것으로 보아 중추에 대한 흥분작용은 인정할 수 없었다. 그러나 rotarod 시험에서 신원방우황청심원 500 mg/kg, 2,000 mg/kg, 4,000 mg/kg 및 원방우황청심원 모든 투여군에서 정상군에 비해 유의성있는 억제작용이 관찰되었으며, 자발운동능시험에서 신원방우황청심원 2,000 mg/kg, 4,000 mg/kg 투여군에서 정상군에 비해 유의성있는 자발운동능 감소작용이 있었으며, 원방우황청심원 1,000 mg/kg, 4,000 mg/kg 투여군에서 정상군에 비해 유의성있는 자발운동능 감소작용이 있었다. 경련에 대해서도 신원방우황청심원 및 원방우황청심원 투여군에서 전기자극경련에 의한 경련지속시간을 단축시켰으며, strychnine 투여에 의한 경련도달시간 및 사망시간을 연장시키는 작용이 있었으나, pentetrazol 유발경련에 대해서는 별다른 작용이 없었다. 이상의 결과에서 신원방우황청심원과 원방우황청심원 모두 중추신경계에 대한 약한 진정작용과 항경련작용이 있음을 알 수 있었다. 호흡곤란에 미치는 영향은 두 검체 모두 유의성있는 작용을 나타내지는 않았다.

구속스트레스가 흰쥐에 부과되었을 때 부신의 비대 및 부신의 ascorbic acid의 함량 감소, 비장의 위축 등을 평가지표로 하여 신원방우황청심원 및 원방우황청심원의 항스트레스 효과를 살펴본 결과, 신원방우황청심원은 부신 비대에는 별작용이 없었으나, 비장 위축 및 부신내 ascorbic acid 함량 감소를 약간 억제하였으며, 원방우황청심원은 부신비대 및 비장 위축에는 별영향이 없었으나, 부신내 ascorbic acid 함량을 증가시키는 작용이 있었다. 이 결과는 신원방우황청심원 및 원방우황

칭심원이 약한 항스트레스 작용이 있음을 시사하는 것이다.

이상의 실험결과를 통하여 신원방우황칭심원이 원방우황칭심원과 비슷하게 뇌허혈 개선작용, 중추신경계에 대해 약한 진정작용과 항경련작용 및 약한 항스트레스작용 등의 효과가 있는 것으로 보아 *l*-muscone이 사향을 대체할 수 있는 물질임을 알 수 있었다.

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 : 태평혜민화제국방, 선풍출판사, p. 81 (1975).
- 2) 허 준 : 원본동의보감(신증판), 남산당, p. 692 (1987).
- 3) 이 천 : 의학입문, 대성문화사, p. 215 (1981).
- 4) 황도연 : 방약합편, 행림출판사, p. 102 (1977).
- 5) 김재길 : 원색천연약물대사전, 남산당, 2, p. 345 (1984).
- 6) Mukhopadhyay, A., Seth, S. D. S. and Bagchi, N. : Cardiac and CNS actions of musk. *Ind. J. Pharm.* 35, 169 (1973).
- 7) 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).
- 8) Sano, T. : Über die maennlich sexualhormonartige Wirkung des Moschus. *J. Pharm. Soc. Japan* 56, 913 (1936).
- 9) Sano, T. : Über die maennlich sexualhormonartige substanz des Moschus. *J. Pharm. Soc. Japan* 57, 851 (1937).
- 10) Mishra, R. K., Arora, R. B. and Seth, S. D. S. : Anti-inflammatory effect of musk. *J. Pharm. Pharmacol.* 14, 830 (1962).
- 11) 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).
- 12) 조태순, 이선미, 이은방, 조성익, 김용기, 신대회, 박대규 : *l*-Muscone의 뇌허혈 및 중추신경계에 관한 약효 연구. *응용약물학회지* 5, 306 (1997).
- 13) 조태순, 이선미, 김낙두, 허인회, 안형수, 권광일, 박석기, 심상호, 신대회, 박대규 : 신우황칭심원액의 심혈관계에 관한 약효연구. *응용약물학회지* 5, 390 (1997).
- 14) 조태순, 이선미, 김낙두, 허인회, 안형수, 권광일, 박석기, 심상호, 신대회, 박대규 : 신우황칭심원의 심혈관계에 관한 약효. *약학회지* 41, 802 (1997).
- 15) 조태순, 이선미, 이은방, 조성익, 김용기, 신대회, 박대규 : 신우황칭심원액의 뇌허혈 및 중추신경계에 관한 약효연구. *응용약물학회지* 5, 402 (1997).
- 16) 조태순, 이선미, 이은방, 조성익, 김용기, 신대회, 박대규 : 신우황칭심원의 뇌허혈 및 중추신경계에 대한 약효. *약학회지* 41, 817 (1997).
- 17) 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).
- 18) Gutmann, I. and Wahlefeld, A. W. : Determination with lactate dehydrogenase and NAD in *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie Academic Press (1974).
- 19) 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).
- 20) 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).
- 21) 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).
- 22) Araki, Y. and Ueki, S. : Changes in sensitivity to convulsion in mice with olfactory bulb ablation. *Jap. J. Pharmacol.* 22, 447 (1972).
- 23) 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).
- 24) 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).
- 25) Nahorski, S. R. : Behavioural supersensitivity to apomorphine following cerebral dopaminergic denervation by 6-hydroxydopamine. *Psychopharmacologia* **42**, 159 (1975).
- 26) Goto, K., Suekawa, M., Aburada, M. and Hosoya, E. : Pharmacological study of TJ-8007 (Tsumura-Zokumeito) (I) : Protective effects of TJ-8007 against anoxic brain damage. *Folia Pharmacol. Japan* **89**, 355 (1987).
- 27) 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).
- 28) Fagg, G. E. and Foster, A. C. : Amino acid transmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* **9**, 701 (1983).
- 29) Fonnum, F. : A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* **42**, 1 (1984).
- 30) 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).
- 31) Diemer, N. H. and Siemkowitz, E. : Regional neuron damage after cerebral ischemia in normo- and hypoglycemic rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **7**, 217 (1981).
- 32) Kirino, T. : Delayed neuronal death in gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* **239**, 57 (1982).
- 33) Pulsinelli, W. A., Brierly, J. B. and Plum, F. : Moderate hypoglycemia augments ischemic brain damage : a neuropathologic study in the rat. *Neurology* **32**, 1239 (1982).
- 34) 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).
- 35) Hofer, R. E., Christopherson, T. J., Scheithauer, B. W., Milde, T. H. and Lanier, W. L. : The effect of a platelet activating factor antagonist (BN52021) on neurologic outcome and histopathology in a canine model of complete cerebral ischemia. *Anesthesiol.* **79**, 347 (1993).
- 36) 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).
- 37) 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).
- 38) 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).
- 39) 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).
- 40) 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).
- 41) 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).
- 42) 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).
- 43) 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).
- 44) 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).
- 45) 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).
- 46) 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).