

원 저

釣鉤藤이 뇌허혈을 유발시킨 백서에서의 뇌신경보호효과

강상렬, 강승준, 금현수, 전연이, 이은주, 박치상, 박창국, 허진화¹⁾, 양재하¹⁾, 조정숙²⁾, 김영호³⁾

경산대학교 한의과대학 심계내과학교실, 경산대학교 한의과 대학 생리학교실¹⁾,
동국대학교 의과대학 약리학교실²⁾, 충남대학교 약학대학³⁾

The Protective Effect of *Uncariae Ramulus Et Uncus* Extract on Middle Cerebral Artery Occlusion(MCAO)

Sang-Yeol Gang, Seoung-Jun Kang, Hyeon-Su Keum, Yeon-Yi Jeon, Eun-Ju Lee, Chi-Sang Park, Chang-Gook Park, Jin-Hwa Heo¹⁾, Chae-Ha Yang¹⁾, Jung-Sook Cho²⁾, Young-Ho Kim³⁾

Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyungsan University, Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyungsan University¹⁾, Department of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University²⁾, Colledge of Pharmacy, Chungnam National University³⁾

Objectives: *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract is clinically used in Korea to treat ischemic cerebral damage. The present study was undertaken to study the neuroprotective effect of *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract in middle cerebral artery occlusion (MCAO) rats.

Methods: Changes of extracellular levels of dopamine, DOPAC, HVA, and HIAA in striatum were collected at 20 minutes interval by in vivo microdialysis and then analyzed by HPLC (high performance liquid chromatography) in rats subjected to permanent focal cerebral ischemia induced by 2 hours of MCAO. *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract was orally administrated before MCAO. Different animals were used for measurement of cerebral infarction volume induced by 24 hours of MCAO with TTC staining and image analysis.

Results: Extracellular levels of dopamine decreased after treatment with *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract, while extracellular levels of DOPAC and HVA significantly increased. Cerebral infarction volume also significantly decreased after treatment with *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract.

Conclusions: These results provided evidence that *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract can produce a neuroprotective effect on cerebral ischemia by regulating extracellular excitatory neurotransmitters. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(1):1-10)

Key Words: *Uncariae Ramulus Et Uncus*, cerebral ischemia, monoamine, neurotransmitter

서 론

뇌졸중은 혈관파열에 의한 출혈성 뇌졸중과 폐색로 인한 허혈성 뇌졸중으로 구분하고, 과거에는 출혈성 뇌졸중이 많은 예를 보였지만 최근에는 점차 허혈성 뇌졸중이 증가하는 추세이다^{1,2)}.

허혈성 뇌질환에서 뇌손상에 관여하는 신경전달물

·접수 : 2001년 9월 7일 ·채택 : 11월 11일
·교신저자 : 강승준, 대구시 수성구 상동 165 경산대학교 한의과대학 심계내과학교실
(Tel. 053-770-2082, E-mail: speedwing@hanmail.net)

질중 가장 대표적인 것은 amino acid계의 흥분성 신경전달물질이다. 뇌허혈 발생시 산소를 공급받지 못한 신경세포는 흥분성 신경전달물질인 glutamate, aspartate 등을 방출하게 되고, 이로 인해 세포내로 Ca²⁺이 과다유입되고 과다유입된 Ca²⁺이 신경독성으로 작용하고, 또한 세포내 효소들이 과도하게 활성화되어 세포괴사를 일으켜 뇌신경세포는 비가역성 손상을 입게 된다^{3,4)}. 그리고 glutamate와 함께 뇌손상에 관여한다고 알려진 mono amine계 신경전달물질인 dopamine과 serotonin은 glutamate의 NMDA receptor에 전달을 강화시킴으로써 glutamate의 세포독성작용을 조절한다고 알려져 있다^{5,6)}.

釣鉤藤(Uncariae Ramulus et Uncus)은 茜草科에 속한 落葉藤木인 鉤藤(Uncaria rhynchophylla (MIQ) JACKS)의 鉤棘를 부착한 莖枝를 乾燥한 藥物로⁷⁾ 《名醫別錄》에 최초로 수록되어 있으며 性은 微寒無毒하고, 味는 甘하다⁸⁻¹⁴⁾. 肝, 心包 二經으로 歸經하고, 淸肝熱과 平肝熄風의 효능이 있어 印상에서 高血壓과 中풍에 상용하는 약물이다⁸⁾.

釣鉤藤에 관한 실험적 연구로는 金¹⁵⁾이 降壓效能을, 金¹⁶⁾이 항경련 효과를, 申¹⁷⁾의 釣鉤藤 水鍼이 진통, 항경련 및 진정효과가 있음을, 文¹⁸⁾이 家兔의 전정안구반사에 미치는 영향을 보고하였다.

그러나 아직 釣鉤藤이 뇌허혈 유발시에 dopamine과 관련된 뇌신경세포보호에 미치는 영향에 관한 연구는 없었다.

이에 저자는 釣鉤藤이 뇌허혈시 신경전달물질에 미치는 영향을 조사하여 뇌신경세포 괴사의 감소에 대한 효과를 알아보하고자 白鼠에게 釣鉤藤을 경구투여하고, 인위적으로 중대뇌동맥 폐색술을 시행하여 뇌허혈을 유발시킨 후, 미세투석법 및 HPLC를 이용하여 신경전달물질인 monoamine계열의 함량변화 및 뇌경색부위 면적과 용적을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 동물 및 재료

1) 동물

동물은 체중 240~260g의 Sprague-Dawley계 雄性 흰쥐(대한실험동물센터)를 사용하였고, 물과 고형사료(제일사료 Co., 대전)를 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실내의 온도는 22±1℃, 습도는 50%로 유지하였고, 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다.

2) 재료

약제는 鉤藤의 鉤棘를 부착한 莖枝로 경산대학교 부속대구한방병원 약재과에서 구입한 것을 염선해서 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

釣鉤藤 400.0g을 round flask에 넣고 70% MeOH를 가하여 24시간동안 방치하여 추출한 다음 여과하여 감압농축하여 MeOH를 날려보낸 다음 동결건조하여 18.6g의 추출물을 얻었다.

2) 검액투여

동물 8마리를 1개군으로 하여 대조군(control group), 실험군 A(sample A group), 실험군 B(sample B group)등의 3개군으로 나누었다. 검액의 투여는 실험군 A에는 釣鉤藤 검액을 체중 kg당 500mg씩, 실험군 B에는 釣鉤藤 검액을 체중 kg당 100mg씩 경구투여하였으며 대조군에는 0.9% 생리식염수를 체중 kg당 10ml씩 경구투여하였다.

3) 미세투석법^{19,20)}

白鼠에 sodium pentobarbital(50mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 stereotaxic 수술대에 고정시켜 두피를 절개하였다. 현미경을 이용하여 lambda와 bregma를 기준으로 striatum의 coordinate AP +0.5, L 3.5, DV -4.5의 위치에 microdialysis probe 설치를 위한 guide cannula를 설치하였다. Stereotaxic 방법으로 수술을 마친 실험군은 일주일동안의 회복기를 지낸 후, guide cannula를 통하여 미세투석법을 위한 microdialysis probe(CMA/11, shaft length : 14mm,

dimension : 0.24 × 3mm, Sweden)를 삽입하고, microdialysis system에 연결시켰다. Microdialysis injection pump(CMA/100, Sweden)를 이용하여 1.5 μl/min의 유속으로 인공뇌척수액을 probe에 관류하였다. 인공뇌척수액(CSF)은 NaCl 8.66g, KCl 0.224g, CaCl₂ · 2H₂O 0.206g, MgCl₂ · 6H₂O 0.163g의 500ml 용액과 Na₂HPO₄ · H₂O 0.214g, NaH₂PO₄ · H₂O 0.0054g의 500ml 용액을 혼합하여 만들었다. Bowl cage속의 白鼠가 자유로이 움직이는 상태에서 brain의 선조체내의 분석물질을 probe끝의 반투과성막의 확산원리에 의하여 세포외액을 취하였다. 뇌허혈 유발전에 20분 간격으로 3회 미세투석액을 취하여 그 평균치를 baseline으로 하였으며, 뇌허혈 유발후 역시 20분 간격으로 6회 미세투석액을 취하여 중대뇌동맥 폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 전과 후의 미세투석액을 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 분석하였다.

4) 중대뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO)에 의한 白鼠의 뇌허혈 유발^{20,21)}

정상군을 제외한 白鼠를 N₂O(70%)/O₂(30%)와 혼합된 3% isoflurane으로 흡입 마취시킨 후, 경부를 절개하여 우측 총경동맥과 외경동맥을 절찰하였다. 15분동안 동물을 안정시킨 후, 외경동맥을 조금 자르고 0.25mm 직경의 nylon monofilament를 내경동맥쪽으로 약 17mm정도 밀어 넣어 중대뇌동맥을 폐색하였다. 절개된 부위를 봉합한 후 마취에서 회복시켰는데, 수술 및 마취 회복기간동안 온도조절장치를 이용하여 직장내 온도를 37℃로 유지시켰으며, 뇌허혈이 유발된 白鼠를 곧바로 microdialysis system에 연결시켰다.

5) HPLC를 이용한 생화학적 분석

(1) monoamine 정량법^{22,23)}

분석하고자 하는 mono amine계의 dopamine, DOPAC(dihydroxy-phenylacetic acid), HVA(homovanillic acid), HIAA(hydroxy indole acetic acid)의 standard를 만들기 위해 각각의 시약(Sigma Co., U.S.A.)을 PCA에 용해시켜서 혼합한 후, 최종 50nM의 외부 표준용액

을 만들었다. 정량하기 위한 mono amine 10 μl를 HPLC(Model 5200A, Guard cell:+400mV, Electrode:-100mV, Electrode:+320mV)를 이용하여 분석하였다. Mobile phase의 조성은 75mM sodium dihydrogen phosphate, 1.7mM OSA, 25 μM EDTA, 10% acetonitrile, 0.001% triethylamine, pH 3.0으로 맞추었다. HR-80 column(80 × 4.6mm, 3 μm)을 이용하여 이동상을 1.0 ml/min의 유속으로 흘렸다.

6) 조직검사

(1) Probe 위치확인을 위한 조직검사²⁴⁾

Microdialysis 분석을 마친 白鼠를 sodium pentobarbital 80mg/kg으로 복강마취한 후, 수술대에 고정하여 흉곽을 열고 descending aorta를 절찰하였다. 심첨부위에 천자하여 먼저 0.9% saline 100ml를 흘려서 혈액을 씻어내고 800ml의 고정액을 충분히 관류한 후, 두개골로부터 뇌를 분리하여 다시 고정액에 17시간동안 저장하여 postfixation하였다. 고정액은 H₂O 1800ml, 37% formalin 200ml, KH₂PO₄ 8g, Na₂HPO₄ 20g을 혼합하여 만들었으며, 0.9% saline은 NaCl 9g을 H₂O 1000ml에 용해시켜 준비하였다.

Vibratome(Campden Instruments 752M vibroslice tissue cutter, England)을 이용하여 100 μm씩, bregma 1mm부터 bregma -0.5mm까지 coronal section하여 腦切片을 만들었다. 염색을 위해 xylene, 100% ethanol, 95% ethanol, 70% ethanol, 25% ethanol, 증류수, differentiation solution(mixture of 70% ethanol 225ml, ether 25ml, glacial acetic acid 2drops), cresyl violet stain solution(mixture of cresyl violet 2g, 1M acetic acid 185ml, 1M sodium acetate 15ml, H₂O 600ml)을 준비하였다. 건조된 뇌조직을 염색하기 이전에 탈지, 탈수를 위하여 xylene(1hr), 100% ethanol(10mins), 95% ethanol(10mins), 70% ethanol(10mins), 증류수(1dip)의 순서로 과정을 거쳤다. 염색을 위하여 cresyl violet stain solution(25mins), 증류수 (10dips), 25% ethanol(10mins), differentiation solution(12mins), 95% ethanol(10mins), 100% ethanol(10mins), xylene (10mins)을 순서대로 거친 후, permount를 이용하여

slide glass를 완성하고 Probe 위치를 Paxinos의 atlas와 비교확인하여 얻었다.

(2) 뇌경색 면적 및 용적 측정

중풍 유발 24시간 후 대조군과 실험군의 대뇌를 2mm간격으로 잘라 200ml의 saline에 TTC(2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride) 4g을 녹여 미리 제조해 둔 2% TTC용액에 담겨 37°C water bath에서 30분간 염색한다. 염색된 절편은 4% formaline용액으로 조직을 고정시켰다. 고정된 조직의 뇌경색 부위 면적 및 용적은 image analyzer system (OPTIMAS, Edmonds, WA, USA)을 이용하여 측정하였다.

3. 통계처리

실험결과의 통계적 유의성은 Student's t-test²⁵⁾를 이용하여 검증하였으며, p<0.05 수준인 것을 유의하다고 인정하였다.

MCAO전의 dopamine, DOPAC, HVA, HIAA의 기준함량을 1.00으로 하여 상대적 비교값을 산출표현하였다.

실험성적

1. Monoamine계열의 함량변화

1) MCAO 白鼠의 dopamine의 함량변화

대조군에서 MCAO전 dopamine의 함량은 39.65±30.47(1)nM이었는데, MCAO후 20분, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에 각각 1016.25±450.87(77.09±53.78), 1075.76±283.49(81.21±42.86), 1052.47±340.21, (77.39±43.56), 673.65±144.62(61.62±40.71), 401.86±90.53(48.84±39.01), 268.62±90.47(42.15±34.41)이었다.

실험군 A에서 MCAO전 dopamine의 함량은 43.85±9.85(1)nM이었는데, MCAO후 20분, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에는 979.88±47.10(27.62±8.16), 678.49±109.53(18.17±5.39), 563.54±273.74(13.50±5.96), 647.18±351.37(14.94±7.94), 694.42±377.71(16.02±8.54), 634.10±346.17(14.55±7.87)로

대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다.

실험군 B에서 MCAO전 dopamine의 함량은 46.80±17.49(1)nM이었는데, MCAO후 20분, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에는 867.79±245.16(19.48±3.74), 720.81±311.23(17.52±5.70), 588.75±276.88(13.53±5.29), 466.25±246.51(9.38±4.61), 365.20±202.67(8.28±4.91), 195.71±130.46(4.79±3.47)로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 1).

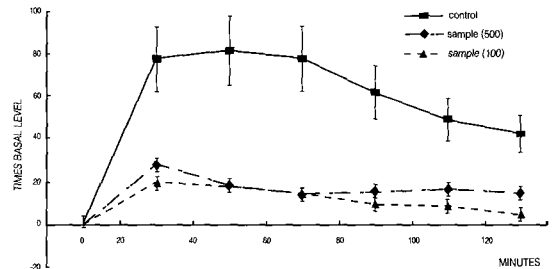


Fig. 1. Effect of *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract on levels of dopamine in microdialysates from right striatum of eight rats subjected to MCAO expressed as times basal level. Microdialysates were collected in three 20 min fractions(basal level) before and six after MCAO and analyzed by HPLC. *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract(100mg/kg, 500mg/kg, P.O. respectively) were administered before MCAO. *P<0.05 compared with control group administered with saline.

2) MCAO 白鼠의 DOPAC의 함량변화

대조군에서 MCAO전 DOPAC의 함량은 752.18±275.97(1)nM이었는데, MCAO후 20분, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에 각각 539.75±220.12(0.68±0.04), 515.96±225.37(0.68±0.94), 547.54±186.07(0.86±0.22), 663.26±179.84(1.02±0.19), 485.11±137.11(0.79±0.22), 459.69±147.09(0.66±0.09)이었다.

실험군 A에서 MCAO전 DOPAC의 함량은 625.73±187.42(1)nM이었는데, MCAO후 20분, 40분에는 510.50±145.59(0.91±0.17), 461.26±141.77(0.73±

0.03)로 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 60분, 80분, 100분, 120분에는 $503.56 \pm 193.97(0.69 \pm 0.16)$, $425.95 \pm 107.34(0.83 \pm 0.18)$, $412.27 \pm 121.06(0.73 \pm 0.14)$, $377.40 \pm 130.07(0.57 \pm 0.09)$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다.

실험군 B에서 MCAO전 DOPAC의 함량은 $767.25 \pm 133.51(1)nM$ 이었는데, MCAO후 20분, 40분, 120분에는 $616.89 \pm 154.60(0.77 \pm 0.08)$, $538.88 \pm 134.80(0.69 \pm 0.09)$, $613.32 \pm 142.42(0.78 \pm 0.07)$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 120분에서만 유의성($p < 0.05$)이 나타났다. 60분, 80분, 100분에는 $597.85 \pm 156.44(0.76 \pm 0.11)$, $574.82 \pm 170.87(0.71 \pm 0.11)$, $613.35 \pm 155.07(0.77 \pm 0.09)$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 2).

3) MCAO 白鼠의 HVA의 함량변화

대조군에서 MCAO전 HVA의 함량은 $1818.51 \pm 203.06(1)nM$ 이었는데, MCAO후 20분, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에 각각 $1337.74 \pm 405.07(0.73 \pm 0.17)$, $1126.50 \pm 299.02(0.62 \pm 0.14)$, $906.84 \pm$

$98.23(0.52 \pm 0.11)$, $1207.54 \pm 381.51(0.65 \pm 0.16)$, $1195.82 \pm 340.01(0.64 \pm 0.12)$, $1064.14 \pm 412.59(0.56 \pm 0.17)$ 이었다.

실험군 A에서 MCAO전 HVA의 함량은 $1694.94 \pm 150.29(1)nM$ 이었는데, MCAO후 20분에는 $1171.07 \pm 55.83(0.71 \pm 0.07)$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성이 나타나지 않았고, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에는 $1132.19 \pm 194.77(0.66 \pm 0.06)$, $1050.44 \pm 70.66(0.62 \pm 0.04)$, $1118.08 \pm 142.88(0.66 \pm 0.06)$, $1215.85 \pm 134.72(0.72 \pm 0.05)$, $1288.11 \pm 143.60(0.76 \pm 0.04)$ 로 대조군에 비해 증가하였으나, 60분에서만 유의성($p < 0.05$)이 나타났다.

실험군 B에서 MCAO전 HVA의 함량은 $2316.88 \pm 186.75(1)nM$ 이었는데, MCAO후 20분, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에는 $1789.44 \pm 78.98(0.79 \pm 0.09)$, $1620.38 \pm 121.90(0.72 \pm 0.10)$, $1712.23 \pm 195.79(0.77 \pm 0.14)$, $1673.42 \pm 253.99(0.76 \pm 0.16)$, $1819.16 \pm 218.96(0.81 \pm 0.15)$, $1902.41 \pm 183.03(0.85 \pm 0.14)$ 로 대조군에 비해 증가하였으며, 20분, 60분, 100분, 120분에서 유의성($p < 0.05$)이 나타났다(Fig. 3).

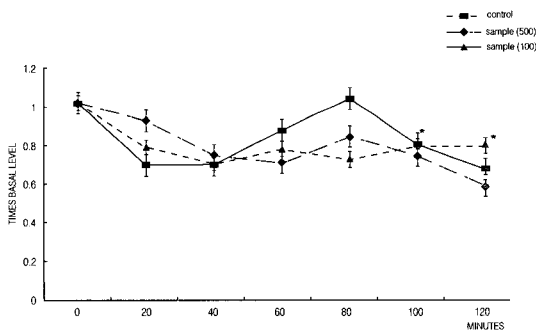


Fig. 2. Effect of *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract on levels of DOPAC in microdialysates from right striatum of eight rats subjected to MCAO expressed as times basal level. Microdialysates were collected in three 20 min fractions(basal level) before and six after MCAO and analyzed by HPLC. *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract(100mg/kg, 500mg/kg, P.O. respectively) were administered before MCAO. * $P < 0.05$ compared with control group administered with saline.

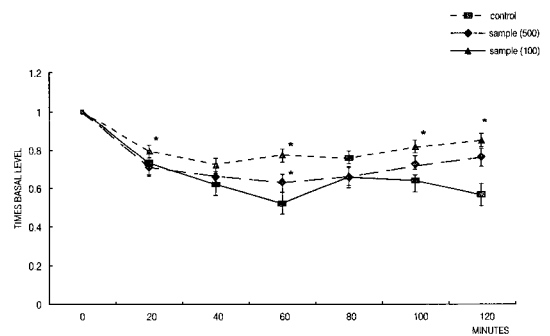


Fig. 3. Effect of *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract on levels of HVA in microdialysates from right striatum of eight rats subjected to MCAO expressed as times basal level. Microdialysates were collected in three 20 min fractions(basal level) before and six after MCAO and analyzed by HPLC. *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract(100mg /kg , 500mg /kg , P.O. respectively) were administered before MCAO. * $P < 0.05$ compared with control group administered with saline.

4) MCAO 白鼠의 HIAA의 함량변화

대조군에서 MCAO전 HIAA의 함량은 1950.00±960.06(1)nM이었는데, MCAO후 20분, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에 각각 1462.06±596.10(1.11±0.40), 980.07±228.99(0.98±0.45), 904.27±130.79(1.49±1.05), 1190.56±266.83(1.47±0.93), 827.34±84.62(1.07±0.61), 1010.67±359.55(1.08±0.65)이었다.

실험군 A에서 MCAO전 HIAA의 함량은 745.98±133.02(1)nM이었는데, MCAO후 20분, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에는 650.16±136.08(0.87±0.08), 471.07±100.77(0.63±0.06), 479.34±79.91(0.66±0.07), 487.26±97.79(0.64±0.04), 432.92±71.42(0.58±0.01), 435.94±67.73(0.59±0.03)로 대조군에 비해

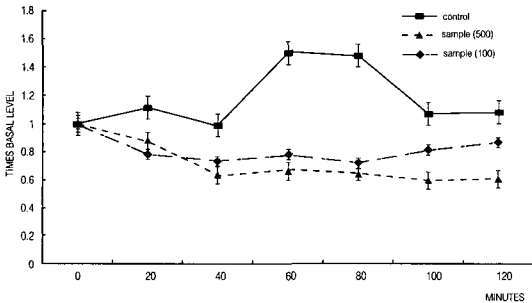


Fig. 4. Effect of *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract on levels of HIAA in microdialysates from right striatum of eight rats subjected to MCAO expressed as times basal level. Microdialysates were collected in three 20 min fractions(basal level) before and six after MCAO and analyzed by HPLC. *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract(100mg /kg, 500mg /kg, P.O. respectively) were administered before MCAO. *P<0.05 compared with control group administered with saline.

감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다.

실험군 B에서 MCAO전 HIAA의 함량은 1011.64±302.35(1)nM이었는데, MCAO후 20분, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에는 773.81±262.74(0.77±0.15), 713.37±205.31(0.72±0.14), 851.36±347.89(0.77±0.12), 871.62±467.64(0.71±0.18), 989.77±528.81(0.80±0.19), 1047.40±518.43(0.86±0.18)로 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 4).

2. 허혈성 뇌경색 부위의 면적 및 용적 측정

대조군에서 뇌경색 면적은 45.83±3.36mm²이었고, 뇌경색 용적은 91.66±6.70mm³이었다.

실험군 A에서 뇌경색 면적은 35.58±7.93mm², 뇌경색 용적은 77.16±15.86mm³로 대조군에 비해 유의성(P<0.05)있는 감소를 보였다.

실험군 B에서 뇌경색 면적은 26.43±5.70mm², 뇌경색 용적은 52.86±11.40mm³로 대조군에 비해 유의성(P<0.05)있는 감소를 보였다(Table 1).

고찰

중풍은 突然昏倒, 不省人事, 半身不遂, 口眼喎斜, 言語不利 등의 증후를 일컬으며, 이는 증상의 유사성으로 볼 때 뇌의 신경손상에 의한 의식장애, 운동장애, 언어장애, 감각장애 등을 나타내는 뇌혈관장애와 유사하다²⁶⁾.

중풍의 병인에 대하여 內經 이후 隨唐 및 宋代까지는 內虛邪中の 外感을 病因으로 보았고, 金元時代에는 劉²⁷⁾는 心火暴盛의 因火說, 李²⁸⁾는 正氣自虛說, 朱²⁹⁾는 因濕痰說, 李³⁰⁾는 因瘀血說을 主張하였으며, 그

Table 1. Effect of *Uncariae Ramulus Et Uncus* Extract on the Infarcted Dimension in Rat Brains after MCAO

Experimental Group	The infarcted area(mm ²)	The infarcted volume(mm ³)
Control	45.83±3.36 ²⁾	91.66±6.70
<i>Uncariae Ramulus Et Uncus</i> (500mg/kg)	35.58±7.93*	77.16±15.86*
<i>Uncariae Ramulus Et Uncus</i> (100mg/kg)	26.43±5.70*	52.86±11.40*

Infarction dimensions were measured on TTC-stained sections in rats subjected to 24hours of MCAO and orally administered with *Uncariae Ramulus Et Uncus* extract

a): Values are the mean ± SEM of 5rats for each group
* ; P<0.05, compared with control group

후 清代 葉³¹⁾은 肝風內動, 王³²⁾은 氣虛瘀血을 病因이라 하였다. 근대에 張³³⁾은 歷代病因說을 종합하여 情志鬱結, 飲食不節, 勞思過度, 氣候變化 등으로 인하여 內風動越, 五志化火, 痰阻脈絡, 氣機失調, 血液瘀滯 등을 中풍의 病因으로 여긴다.

중풍의 治法도 歷代醫家들은 病因에 따라 唐宋代 이전에는 疏風祛邪·扶助正氣를 따랐으며, 金元時代 이후로는 平肝熄風, 滋陰潛陽, 通腑化痰, 活血通絡, 清熱除痰, 健脾利濕, 益氣養血 등의 治療原則을 활용하였는데, 張³³⁾은 특히 “中風은 대부분 內因으로 因하는데, 治療에 있어서는 반드시 潛陽鎮攝시켜 內動하는 風陽을 가라앉혀야 한다.”라고 하며 중풍치료의 원칙에 있어 平肝熄風을 중요시하였다. 平肝熄風의 治法은 發病初期에도 清熱滌痰, 化痰通腑, 活血通絡 등과 함께 사용된다²⁶⁾.

鈎鈎藤은 茜草科에 屬한 落葉藤木인 鈎藤의 鈎棘를 부작한 莖枝를 乾燥한 藥物로⁷⁾ 《名醫別錄》에 최초로 수록되어 있으며, 性은 微寒無毒하고, 味는 甘하다⁸⁻¹²⁾. 肝, 心包 二經으로 歸經하고, 熄風鎮痙藥類에 屬하며 清肝熱과 平肝熄風의 效능으로 임상에서 흔히 平肝潛陽의 목적으로 상용하는 藥物로⁸⁾ 品性이 中和不燥하여 心包를 肝木에 通하여 息風靜火의 要藥이 되며 肝風相火 諸疾을 治한다⁷⁾.

뇌졸중은 원인이 되는 병태에 따라 혈관파열에 의한 출혈성 뇌졸중과 폐색으로 인한 허혈성 뇌졸중으로 구분하고, 과거에는 출혈성 뇌졸중이 많은 예를 보였지만 최근에는 점차 허혈성 뇌졸중이 증가하는 추세이다¹²⁾.

뇌경색의 병태생리학적 과정은 혈관폐쇄로 인하여 산소와 혈당의 공급이 소실되고, 세포막 붕괴 및 에너지 생산과정의 왜해로 세포대사의 변화를 초래하는 것이다³⁾.

뇌경색이 되면 조직의 피사가 나타나게 되는데, 경색후 12시간에 허혈성 신경세포의 변화와 부종이 현저하게 나타나며, 48시간에는 경색부의 조직이 창백하고 연해지며 종창되고, 단핵구와 활성화된 소구가 나타나기 시작하여 이후 2-3주 동안에 병변국소의 주요 침윤 세포를 형성한다. 경색후 2-10일간에는 뇌

조직의 액화와 탐식작용이 진행되어 교질성으로 변하므로 경색부가 정상조직과 분명히 구분된다. 경색후 1주일이면 병변의 가장자리에서 정상교가 점차 커지고 분열하며, 10일에서 3주후에는 조직이 액화되어 제거되어지는데, 정상교가 소실된 뇌조직의 가장자리를 따라 증식하여 많은 세섬유를 가진 교반흔을 만들게 된다³²⁾.

뇌에는 현재까지 알려진 바로는 약 60가지 이상의 신경전달물질이 존재하고, 이들은 amino acid계, amine계 및 peptide계의 3종류로 나뉘어진다³²⁾.

그 중 허혈성 뇌질환이나 대사성 뇌질환에서 뇌손상에 관여하는 물질은 여러 가지가 있으나, 그 중 대표적인 것은 amino acid계의 흥분성 신경전달물질이다²⁹⁾. 이들에 의한 신경세포 피사의 기전으로는 1974년 Olney 등에 의해 glutamate의 과흥분성으로 인한 신경세포장애가 밝혀졌으며, 또한 glutamate는 뇌허혈시 뇌손상을 일으키며 동시에 신경퇴화를 가져오는 흥분성 독작용의 가설로서 calcium overload 설이 처음 제시되었다^{33,34)}. 뇌허혈시 산소를 공급받지 못한 신경세포는 흥분성 전달물질인 glutamate 등을 방출하게 되어 방출된 glutamate는 NMDA receptor를 매개해서 Ca²⁺의 세포내 유입을 증가시키며, 과잉으로 유입된 Ca²⁺에 의해 intracellular protease와 lipase와 같은 세포내 효소들이 활성화되어 세포피사를 일으키게 된다³⁴⁾.

Glutamate와 함께 뇌손상에 관여한다고 알려진 monoamine계 신경전달물질인 dopamine과 serotonin은 뇌에 있는 여러 뉴런집단에서 만들어지는 신경전달물질로서 특정 뇌기능의 활동을 증가시키거나 감소시키는 조절자 역할을 한다⁶⁾.

Dopamine은 amino acid인 L-tyrosine에서 만들어지며, 이는 효소 tyrosine hydroxylase에 의해 가수분해되어 L-DOPA이 되고, L-DOPA가 Dopa decarboxylase에 의해 dopamine으로 decarboxylation된다. Dopamine은 glutamate의 NMDA receptor에 대한 작용에 관계하여 glutamate의 세포독성작용을 조절한다고 알려져 있으며⁹⁾, 이러한 증거로 microdialysis방법을 이용한 global 및 focal ischemia 동물모델에서

세포외액의 dopamine 및 serotonin의 함량이 크게 증가하였다. 이러한 증가는 exocytosis 증가, 재흡수 결핍 및 산화대사의 변화로 야기된다³⁵. 뇌경색의 정도는 가역적 손상기간과 밀접한 상관관계가 있으며, 세포외액의 glutamate 및 serotonin의 함량도 뇌경색 정도에 비례하여 증가한다³⁵. Dopamine의 경우도 뇌경색 정도에 비례하여 증가하나 증가속도는 glutamate 및 serotonin에 비하여 빠르다³⁶. 이러한 dopamine의 급격한 증가는 MCAO 동물모델에서 조직학적인 손상 정도와도 밀접한 관계가 있으며³⁶, 특히 허혈성 뇌손상시 dopamine은 직·간접적으로 매우 큰 신경독 작용을 가지고 있다. 또한 조직학적 독작용뿐만 아니라, adenylate kinase나 creative kinase같은 대사효소에 독작용을 보인다³⁷.

Serotonin도 유사한 독작용을 보인다고 알려져 있으며, 이외에도 serotonin은 혈관수축에도 관여하여 허혈에 의해 serotonin이 방출되면 혈류가 저하되고, 신경세포장해를 더 악화시키는 인자로 작용할 가능성이 있다³⁸. 그러한 독작용의 증거로 동물에 tyrosine hydroxylase 억제제를 처치하면, dopamine의 생성을 억제하며, 허혈성 손상을 줄이는 뇌신경보호효과를 보여 준다³⁸. Serotonin의 경우도 tryptophan hydroxylase 억제제를 투여하였을 때 유사한 효과를 나타내었다. MCAO 동물모델에서 dopamine의 증가에 의한 흥분성세포독작용에 대한 기전은 주로 glutamate의 NMDA receptor 결합을 통한 transduction을 증가시킴으로써 나타낸다고 하였다³⁹. 이런 결론은 뇌허혈동물모델에 NMDA 및 dopamine receptor 차단제를 같이 쓰면 놀랄만한 뇌신경보호효과가 나타나며, 또 뇌허혈손상시 선조체내에서 dopamine성 nigrostriatal pathway와 glutamate성 corticostriatal pathway가 같이 존재하는 부위에 주로 발생하는 결과로 더욱 입증된다⁴⁰. 본 실험에서 뇌허혈이 유발된 후 대조군에서는 dopamine의 함량은 60분까지 증가하고, 그 이후는 감소하였다. 이 결과는 다른 보고와도 일치하였다⁴⁰. 鈞鈞藤을 투여한 실험군 A, 실험군 B에서는 dopamine의 함량은 크게 감소되는 것으로 나타났으나 유의성은 없었다. 하지만 dopamine의 함

량 평균값이 크게 감소했으므로 鈞鈞藤에 의한 dopamine의 감소와 관계가 있으며, 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

DOPAC과 HVA는 dopamine의 대사산물로서 세포내 dopamine 함량의 지표로 사용되는데, 뇌허혈 후 basal level을 유지하거나 감소한다고 보고되었으며³⁹, 본 실험에서 뇌허혈이 유발된 후 대조군에서의 DOPAC과 HVA의 함량은 basal level의 수준에서 약간 감소하는 결과를 보였다. 이러한 감소는 monoamine의 산화에 관여하는 효소인 MAO 활성의 감소와 관련이 있을 것으로 생각된다. 鈞鈞藤을 투여한 실험군 A에서 DOPAC의 함량은 MCAO후 20분, 40분에는 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 60분, 80분, 100분, 120분에는 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 실험군 B에서는 DOPAC의 함량은 MCAO후 20분, 40분, 120분에는 대조군에 비해 증가하였으나 120분에서만 유의성($p<0.05$)이 나타났다. 60분, 80분, 100분에는 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 鈞鈞藤을 투여한 실험군 A에서 HVA의 함량은 MCAO후 20분에는 대조군에 비해 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았고, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에는 대조군에 비해 증가하였으나 60분에서만 유의성($p<0.05$)이 나타났다. 鈞鈞藤을 투여한 실험군 B에서 HVA의 함량은 MCAO후 20분, 40분, 60분, 80분, 100분, 120분에는 대조군에 비해 증가하였으나, 20분, 60분, 100분, 120분에서 유의성($p<0.05$)이 나타났다. 이와 같이 鈞鈞藤 투여후 DOPAC 및 HVA함량은 대조군에 비하여 유의성($p<0.05$)있는 증가를 보였는데, 이것은 鈞鈞藤에 의한 dopamine의 감소와 관계가 있으며, 鈞鈞藤에 의한 MAO 활성 증가로 관련시킬 수 있으나, 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

HIAA는 serotonin의 대사산물로서 뇌허혈시 선조체에서 HIAA가 증가한다고 알려져 있고, 본 실험에서도 뇌허혈이 유발된 후 대조군에서의 HIAA의 함량이 증가하였다. 그러나 鈞鈞藤을 투여한 실험군 A, 실험군 B에서 MCAO후 20분, 40분, 60분, 80분, 100

분, 120분 모두 대조군에 비해 감소하였으나 유의성이 나타나지 않았다. 이것은 鈞鈞藤 투여에 의한 serotonin 함량의 감소때문인 것으로 생각된다.

뇌허혈로 인한 경색으로 뇌조직에 광범위한 피사가 일어나는데, 이는 생체가 생존하고 있는 한 일정한 과정을 거쳐 교질성 및 교반혼 현상으로 된다. 허혈성 신경세포 변화의 육안적 소견은 48시간이 경과하여야 되며, 현미경적 소견은 12시간이 경과하여야 허혈성 신경세포변화와 부종 현상을 볼 수 있는데³⁶⁾, microdialysis 실험이 끝난 후, 뇌를 절단하여 TTC용액으로 염색하여 조직검사를 시행하였다. Image analyzer system을 이용하여 白鼠의 뇌경색부위 면적과 용적을 측정 한 결과, 대조군에 비해 실험군에서 유의성있는 뇌조직 손상의 감소가 관찰된 것으로 보아 鈞鈞藤은 선조체에서 세포독작용을 가진 세포외 dopamine의 분비를 억제하여 뇌경색부위를 감소시킬 수 있다고 생각된다.

결론

鈞鈞藤이 뇌허혈시 신경전달물질에 미치는 영향을 실험적으로 규명하기 위하여 뇌허혈을 유발시킨 白鼠에게 鈞鈞藤을 투여하여, mono amine계 신경전달물질의 함량변화 및 뇌경색부위의 면적과 용적을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 鈞鈞藤 투여군은 대조군에 비해 dopamine의 함량이 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다.
2. 鈞鈞藤 투여군은 대조군에 비해 dopamine의 대사산물인 DOPAC과 HVA의 함량이 유의성있게 증가하였다.
3. 鈞鈞藤 투여군은 대조군에 비해 serotonin의 대사산물인 HIAA의 함량이 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다.
4. 腦虛血로 유발된 세포손상에 대한 뇌경색 면적 및 용적은 조직검사 결과, 鈞鈞藤 투여군이 대조군에 비해 유의성있게 감소하였다.

平肝熄風 작용이 있는 鈞鈞藤은 Mono amine계열의 신경전달물질을 조절함으로써 세포손상의 양을 감소시키고, 뇌신경세포보호작용이 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 송일환. 우리나라 뇌졸중의 최근 10년간 변화양상에 대한 연구. 대한내과학회지. 1992;43(5):637-644.
2. Smirk FH. The prognosis of untreated and treated hypertension and advantage of early treatment. Am Heart J. 1972;83(6):825.
3. Kurt J. Isselbacher. HARRISON'S 내과학. 서울:정담. 1997:2384-5,2410-2.
4. 醫學教育硏修院. 藥物療法. 2. 서울:서울대학교출판부. 1989:399-403.
5. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia FASEB J. 1990;4:2587-97.
6. L. Hilliered, A. Hallstr n, S. Sigersv rd, L. Persson, and U. Ungerstedt. Dynamics of extracellular Metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in rat monitored by intracerebral microdialysis. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 1989;9:607-616.
7. 申佶求. 申氏本草學. 서울:壽文社. 1982:625-6.
8. 辛民教. 臨床本草學. 서울:永林社. 1997:625-6.
9. 陸昌洙, 金成萬, 鄭津車, 鄭明淑, 金定禾, 金勝培. 韓藥의 藥理, 成分, 臨床應用. 1. 서울:癸丑文化社. 1982:829-30.
10. 李尙仁, 安德均, 辛民教, 盧昇鉉, 李暎鍾, 金先熙. 韓藥臨床應用. 1. 서울:成輔社. 1982:481-2.
11. 李時珍. 本草綱目. 4. 서울:高文社. 1987:764-5.
12. 汪 庵. 增補本草備要. 3. 서울:高文社. 1989:37.
13. 金義泰, 崔昇勳, 安圭錫. 文濬典. 龍膽瀉肝湯 및 鈞鈞藤, 夏枯草, 車前子 加味方이 高血壓에 미치는 影響. 東醫病理學會誌. 1990;5:15-24.
14. 김동영, 최종원. 조구등 성분의 항경련 효과. 생약학회지. 1998;29(3):187-92.

- 15.申明燮. 鈞鈎藤 水鍼이 鎮痛, 抗痙攣 및 鎮靜作用에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 1995.
- 16.文大煥. 鈞鈎藤 煎湯液이 家兔의 前庭眼球反射에 미치는 影響. 東醫病理學會誌. 1990;5:25-44.
17. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed., Academic Press, New York. 1986.
18. Hillered L, Hallstrom A, Segersvard S, Persson L, Ungerstedt U. Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. J Cereb Blood Flow Metab. 1989;9:607-16.
19. Warner DS, Martin H, Ludwig P, McAllister A, Keana JFW and Weber E. In vivo models of cerebral ischemia: Effects of parenterally administered NMDA receptor glycine site antagonists. J. Cereb. Blood flow Metab. 1995;15:188-96.
20. Tossman U, Ungerstedt U. Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. Acta. Phys. Scand 1986;128:9-14.
21. Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Butcher S, Sandberg M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. J Neurochem. 1987;49:227-31.
22. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. Stroke. 1989; 20:1037-43.
23. Dinal WW. A foundation for analysis in the health science. Biostatistics. 1983;3:136-46.
24. 全國韓醫科大學心系內科學教室. 心系內科學. 1. 서울:書苑堂. 1999:420-30.
25. 劉完素. 河間三六書. 서울:成輔社. 1976:37-8.
26. 李杲. 東垣十種醫書. 서울:大星文化社. 1983:61-2.
27. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울:大星文化社. 1982:67-8.
28. 李梴. 編註醫學入門. 서울:南山堂. 1985:1369-75.
29. 葉天士. 臨證指南醫案. 上海:上海科學技術出版社. 1993:17-9.
30. 王清任. 醫林改錯. 臺北:臺聯國風出版社. 1975:40-4.
31. 張壽頤, 文錫哉, 元秦喜. 國譯中風辯證. 서울:大星文化社. 1994:33-57.
32. 金鍾大, 李漢基. 解剖藥理學. 서울:은누리出版社. 1988:240-1.
33. 서유현. 신경전달물질. 서울:민음사. 1992:267-344.
34. Olney JW. Neurotoxicity of excitatory amino acids, In: McGeer EG, Olney JW and McGeer PL(Eds), Kainic acid as a tool in neurobiology. New York; Raven Press. 1978:95-121.
35. Vulto AG, Sharp T, Ungerstedt U, Versteeg DHG. Rapid postmortem increase in extracellular dopamine in the rat brain as assessed by brain microdialysis. J Neurochem 1988;51:746-9.
36. Matsumoto K, Graf R, Rosner G, Taguchi J, Heiss W-D. Elevation of neuroactive substances in the cortex of cats during prolonged focal ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1993;13:586-94.
37. Maker HS, Weiss C, Brannan TS. Amine mediated toxicity: the effects of dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine, 6-hydroxydopamine, ascorbate, glutathione and peroxide on the in vitro activities of creatine and adenylate kinases in the brain of the rat. Neuropharmacology. 1986;25:25-32.
38. Joseph R, Tsering C, Grunfeld S, Welch KMA. Serotonin may have neurotoxic properties. Neurosci Lett. 1992;136:15-8.
39. Nemeth G, Cintra A, Herb J-M, et al. Changes in striatal dopamine neurochemistry and biochemistry after incomplete transient cerebral ischemia in the rat. Exp Brain Res. 1991;86:545-54.
40. Damsma G, Biosvert DP, Mudrick LA, Wenksterm D, Fibiger HC. Effects of transient forebrain ischemia and pargyline on extracellular concentrations of dopamine, serotonin, and their metabolites in the rat striatum as determined by in vivo microdialysis. J Neurochem. 1990;54:801-8.