

아동발달 및 성장에 대한 녹용의 효과

신준식 박사 / 자생한방병원장

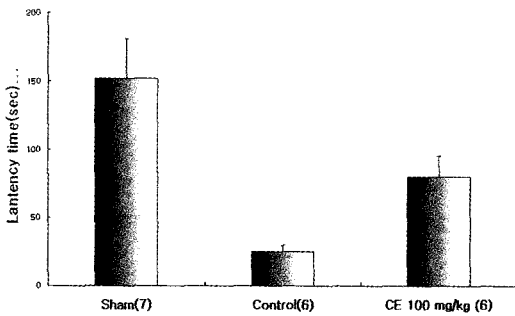


Figure 1. Effect of CE on Morris water maze performance deficied induced 4-VO(n=5-7). Oral administration of CE (500mg/kg) for 14 days. Mean daily latencies of escaping from the start point onto the hidden platform. Each rat was subjected to two trials per day for 6 consecutive days.

2. 수동회피반응

동물의 인지능력을 확인하기 위한 방법으로 수동회피(Passive avoidance test)를 관찰하는데, 실험기구인 완복 상자는 GEMINI avoidance System을 사용하였다.

이 실험의 장치는 중간에 guillotine door가 있는 칸막이가 있으며 바닥에는 전기 전도성 스테인레스 망(stainless grid)이 깔려져 있다. 상자는 칸막이 문을 사용하여 방을 2개로 만들었다 각 방에는 소음이 60dB이하이고 조명을 어둡게 한

방(A)에서 실험을 실시하였다. 칸막이로 나누어진 방 2개중 한쪽에 백서를 넣고 1mA로 전기 충격을 주면서 소음과 빛을 주며 칸막이를 열어 주었다. 그러면, 백서는 방안을 여기저기 살피다가 전기적 충격이 없고, 빛이 없으며 소음이 없는 건너편 방(B)으로 들어가게 되면 자동적으로 칸막이가 닫히도록 하였다. 칸막이가 열릴 때부터 칸막이가 닫힐 때까지의 시간을 측정함으로써 도달시간(latency time)을 측정하는데 인식시행(acquisition trial)이 끝난 후 스콜폴아민(scolamine 1mg/kg)을 복강내로 투여하고 다시 30분 후에 녹용을 백서 체중당 300mg의 농도로 경구투여 한 후 다음날 다시 이 백서를 방 A에 넣어주고 전기적 자극과 빛과 소리를 주었을 때 방B로 넘어가기 까지의 시간을 측정하였다. 이런 과정은 하루에 한번 실시하였으며 이때의 도달 시간을 1주일간 정상군, 대조군과 녹용 투여군으로 나누어 비교하였다. 스콜폴라민 투여로 인한 신경세포의 세포사는 기억감퇴를 유도한다. Fig.2에서 백서에 녹용(300mg/kg)을 경구 투여한 결과 스콜폴라민(1mg/kg) 투여에 의해 감퇴된 기억력을 유의성 있게 증진시켜 주는 효과가 있음을 확인하였다.

스콜폴라민 투여로 인한 신경세포의 세포사는 기억감퇴를 유도한다. Fig.2에

서 백서에 녹용(300mg/kg)을 경구 투여한 결과 스크폴라민(1mg/kg) 투여에 의해 감퇴된 기억력을 유의성 있게 증진시켜 주는 효과가 있음을 확인하였다.

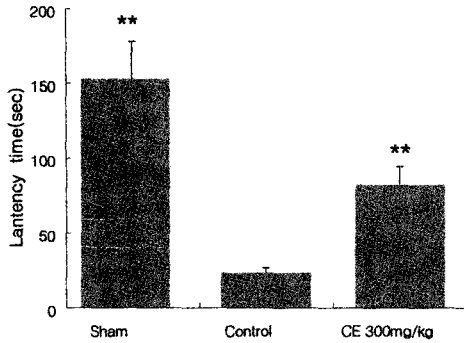


Figure 2. The retention latency of passive avoidance response. The retention test was performed 24h after training session. Sham; groups of rats without any treatment(n=7), Control; groups of rat with scopolamine treatment, CE; groups of rats administrated with 300mg/kg of *Cervus elaphus*.

치료제로 AchE 저해제로써 개발되고 있다. 본 실험에서의 녹용의 AchE 저해율은 500µg/ml의 농도에서 79%의 효과를 나타내었다.

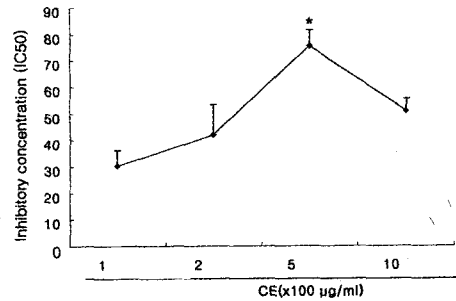


Figure 3. Inhibitory concentration (IC50) of human Acetylcholinesterase activity by CE. Concentration of CE to inhibit human AchE activity by 50%. All results are the means±SEM from five experimental tests. These values significantly different from control are indicated (p<0.05, student's t-test)

3. 아세틸콜린에스터라제 (Acetylcholinesterase) 분석

치매 환자의 뇌는 neuron의 손실이 나타나며 특히 기억과 인지에 필수적인 곳의 신경세포의 손실이 심한 것을 볼 수 있다. 대뇌 피질에서 신경조직 다발과 뇌척이 나타나며 치매환자는 정상환자의 50%정도의 아세틸콜린의 손실이 나타난다. Acetylcholinesterase는 중추 및 말초신경계에서 신경전달 물질이며 기억력과 학습 활동에서 중요한 역할을 하는 acetylcholine을 분해하여 choline과 acetic acid를 생성하는 효소로써 치매의

4. 전뇌허혈 모델에 대한 녹용의 효과

4.1 조직학적 소견

흰쥐에 10분간 4-VO에 의한 전뇌 허혈 유발 후 2-3일로부터 세포의 사멸이 시작되며 7일째에는 거의 완전히 사멸된 상태이므로 7일째에 흰쥐 뇌의 양측 해마의 조직절편을 nissle염색을 하여 광학 현미경에서 관찰하였다. 수술방법은 같으나 유발하지 않은 가수술군에서는 해마의 추체 신경세포들이 정상적인 피라미드 모양을 하고 있으며 세포 수술군에서는 해마의 추체 신경 세포들이 정

상적인 피라미드 모양을 하고 있으며 세포질에 대한 염색도 진하게 나타난 것을 알 수 있다. 대조군에서는 정상적인 추체세포들이 적으며 작은 접 모양의 응축된 신경세포의 수가 증가하였다. 이는 신경세포의 자가 사멸시 일어나는 현상으로 세포가 손상을 받아 핵내에서 DNA laddering이 일어나면서 염색질의 농축 및 핵막의 파괴등으로 인한 것이다. 이에 비해 鹿茸 투여군에서는 이러한 응축된 세포수가 대조군에 비해 적게 감소하였고 추체세포가 거의 대부분 남아있었다. 즉 응축된 세포들이 있다는 것은 뇌허혈로 인한 손상 받음을 보여준 것이며 추체세포가 많은 것은 뇌허혈로 인한 손상으로부터 신경세포방어 효과를 나타낸 것이다.

4.2 鹿茸의 신경세포 보호작용

鹿茸 투여군에선 우선 뇌허혈을 유발하고 재관류한 다음 시료들을 투여하면서 6시간까지 직장온도를 관찰하였으나 유의성있는 체온의 하강은 일어나지 않았다.(Fig.4)

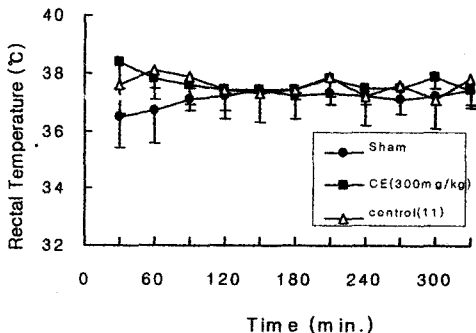
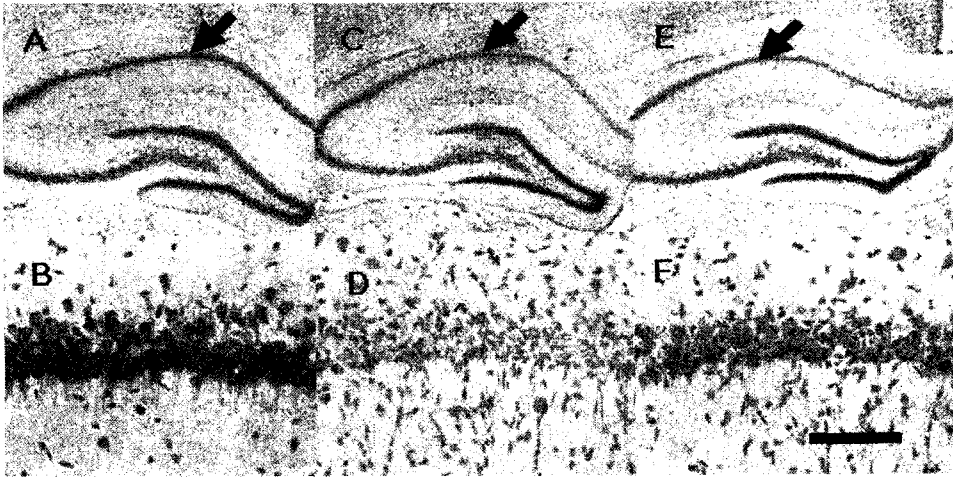


Figure 4. CE extracts did not cause any significant changes in rectal temperature

following transient global ischemia. Rectal temperatures were measured in rats until 6 hours after global ischemia-reperfusion. Animals were administered with CE extracts of 100 mg/kg at 0 and 90 min following 10-min ischemia, respectively.

정상적인 추체 세포들을 추산하여 합산한 결과, 허혈을 유발하지 않은 가수술군에서는 정상적 해마 추체 신경 세포들이 관찰되었으며 그 숫자는 $308.48 \pm 6.64 \text{ cells/mm}^2$ 으로 나타났다(Fig.5. A, B). 반면 흰쥐에 10분간 4-VO에 의한 전뇌허혈을 유발하고 생리식염수를 유발 후 0분과 90분에 투여한 대조군에서는 해마 CA1부위에서 지연형 신경세포 소실이 나타나 신경세포수가 $27.31 \pm 6.13 \text{ cells/mm}^2$ 이였으며 이는 가수술군에 비해 91.1%의 세포손상을 가져온 것이다(Fig.5. C, D). 鹿茸 물추출물 100mg/kg을 뇌허혈 유발후 0분과 90분에 복강내 투여한 뒤 일주일 후 동일 부위의 신경 세포수는 각각 $267.96 \pm 11.0 \text{ cells/mm}^2$ 로 대조군에 비해 85.6%로 유의성 있는 신경 보호효과를 나타내었다(Fig.5. E, F).

Figure 5. Typical photomicrographs of the rat right hippocampus in the sham, control and CE treated groups. In the sham operated rats, arrow showed the tracks of the CA1 pyramidal neurons(A) and the majority of pyramidal cells in the CA1 subfield present unaltered staining properties(B). In control rats, arrow showed a reduced staining intensity of the pyramidal cell layer and neuronal changes were restricted to the CA1 subfield (C).



The damage could be characterized by coagulative cell change of pyramidal neurons and pronounced gliosis (D). CE 100 mg/kg, (E, F) treated group showed a marked reduction of the number of irreversible damaged pyramidal cells in the CA1 subfield each. Scale bar is 100 μ m.

4-3. 조직표본제작 및 손상 신경세포수 관찰

조직화적인 평가를 위하여 chloral hydrate(35.0mg/kg, i.p.)로 마취시키고 해파린 처리된 식염수를 심장에 관류시킨 다음, 이어서 4.0% paraformaldehyde로 관류고정시켰다. 방법은 흰쥐를 개흉한 다음, 우심이를 절개하고 주사바늘(No.18)을 좌심실로 주입한 후 해파린을 첨가한 생리식염수로 transcardic perfusion하고 pH 7.2의 4.0% paraformaldehyde로 관류시켰다. 흰쥐의 뇌부분을 떼어내어 30% sucrose에 담가 냉장고에서 하룻밤 동안 postfixation시킨 후 brain dissection guide(Harvard Instruments Large Rat

Brain Matrix, Coronal, #52-4512c)를 참조하여 hippocampus를 포함하는 coronal block를 준비하였다. 이 block은 brain dissection guide 중의 blade-guide에 의하여 절개하는 부위를 뇌의 rostral pole에서 9th와 15th 사이로 정하였다. 이 block를 포매하여 30 μ m 씩 수집 하였다. 이를 cresyl violet에 염색하여 고정한 다음 dorsal hippocampal CA1중 가장 delayed neuronal death에 손상받기 쉬운 부분인 middle zone의 1,000 μ m 길이에서 신경세포 수를 관찰하였다. 세포수의 관찰은 배율(x200)에서 정상적인 형태를 보이는 pyramidal cell(추체세포)의 수를 총 6부위에서 관찰하여 평균하였다. 관찰자에게는 관찰시 실험군에 대한 정보를 모르게 하고 세포수를 관찰하여 대조군과 비교하였다(Figure.6)

해마 신경세포 손상은 Fig.6, 7과 같다. 녹용 투여군의 신경보호효과는 통계적으로 유의하게 세포수가 증가되었다. 이는 전뇌허혈로 인한 뇌의 해마(hippocampus)의 신경세포 손실을 방어하였음을 나타내었다.

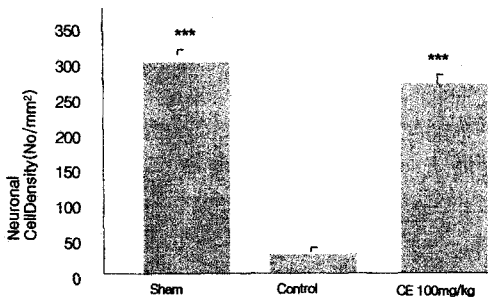


Figure 6. Protective effects of water extracts of CE on transient forebrain ischemia. CE(100 mg/kg dissolved in saline) was given at 0 and 90 min ischemia. Results represent average normal-appearing CA1 pyramidal neuronal counts over a 1 mm length of both left and right hemispheres of three sections. Values are expressed as means \pm SEM. Data were analyzed by student's t-test between control and each sample group, after ischemia. Sham operated and control group were administered with saline. (***) 0.001).

합이 신호를 전달해 주는 신경 화학물질인 아세틸콜린을 만들어내는 신경세포의 퇴화가 그 원인이라고 설명할 수 있다. 신경세포 보호효과는 전뇌허혈 유발군은 모의시술군에 비해 해마에서 신경세포의 손상을 증가시켰고 녹용이 신경세포의 손상을 보호하는 효과를 나타내었다. 이상의 결과에서 녹용은 학습과 기억손상에 대한 회복을 증진시키고 신경세포의 보호효과를 보여 전뇌허혈의 치료에 효능이 있음을 알 수 있다. <끝>

한국의학

5. 결론

본 연구에서는 학습과 기억을 담당하고 있는 해마의 신경세포를 손상시켜 유도된 전뇌허혈 모델에서 녹용의 효과를 연구해 본 결과 수중미로 학습의 획득시행에서 모의시술군에 비해 도파대에 도달하는데 소요되는 시간이 유의하게 증가하였고 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 또한 아세틸콜린에스터라제의 발현양이 증가하는 것은 아세틸콜린이 많이 존재할 것으로 추정할 수 있다. 이는 기억력 상실과 다른 인지 결