

加味通栓化痰湯이 血栓症과 腦虛血症 및 腦損傷에 미치는 影響에 대한 實驗的 研究

安澤源 · 金炳卓*

Abstract

Study on the Effect of KamiTongJonHaaATang Extracts on Thrombosis, Brain Ischemia and Brain damage

Ahn, Taek Won · Kim, Byeong Tak
Dept. of Oriental Medicine
Graduate School of Taejon University

The effect of KamiTongJonHaaATang extracts on hypercholesterolemia, platelet aggregation, pulmonary thrombosis, KCN-induced coma, focal brain ischemia, cytotoxicity of PC12 cells induced by amyloid β protein(25-35), and NO production in RAW cells stimulated lipopolysaccharide were investigated, respectively.

The results were summarized as follows:

1. KTJHAT extracts showed a significant decrease of serum total cholesterol, triglyceride, phospholipid, LDL-cholesterol, and VLDL-cholesterol in hypercholesterolemia induced by 2% cholesterol diet in NZW rabbit.
2. KTJHAT extracts induced a significant inhibition of human platelet aggregation induced by thrombin and ADP but did not affect human platelet aggregation induced by collagen.
3. KTJHAT extracts showed a protective effect on pulmonary thrombosis induced by collagen and epinephrine.
4. KTJHAT extracts prolonged the duration of KCN-induced coma.
5. KTJHAT extracts showed a significant decrease of brain ischemic area and edema in MCA occlusion. Also, KTJHAT extracts showed a decrease of neurologic grade in hind limb but did not affect neurologic grade in fore limb.
6. KTJHAT extracts showed a protective effect on cytotoxicity of PC12 cells induced by amyloid β protein(25-35) in a dose dependent manner.
7. KTJHAT extracts showed a significant decrease of NO production

* 大田大學校 韓醫科大學 心系內科學教室

in RAW cells induced by lipopolysaccharide.

These results suggested that KTJHAT extracts might be usefully applied for prevention and treatment of thrombosis and brain damage

I. 緒 論

腦卒中은 우리 나라 死亡原因중 가장 많은 頻度를 차지하는 疾患¹⁾으로 最近 産業化와 經濟成長에 따른 生活方式 및 食生活의 變化로 腦出血 보다 腦硬塞의 發生比率이 漸次 增加하는 傾向^{2,3)}을 보이고 있다. 腦硬塞의 가장 重要한 原因中의 하나가 動脈硬化^{4~8)}이며, 이러한 動脈硬化는 高脂血症과 깊은 關聯을 가지고 있다^{8~16)}.

中風의 原因說로는 風^{17~19)}, 火²⁰⁾, 氣虛²¹⁾, 濕痰說²²⁾ 등이 主流를 이루었으나 王 등^{23~24)}에 의해 瘀血說이 擡頭되면서 中風의 治療에 있어 瘀血에 대한 많은 研究^{25~29)}가 있었다.

瘀血은 《黃帝內經》¹⁷⁾에 '惡血', '死血', '血脈凝泣' 등으로 記述되어오다 《金匱要略》³⁰⁾에서 最初로 그 名稱이 記載된 것으로, 生理的 機能을 喪失한 血液이 凝聚하여 形成된 一種의 病理的인 產物인 同時에 致病 因子를 말한다^{11,31~34)}. 西洋醫學의 으로는 血液循環 障礙, 血流速度 減少, 血液成分 變化 등의 病理 狀態를 包括하며 血栓症, 高脂血症, 高粘度血症, 心腦血管 疾患, 腦損傷 등에서 흔히 發顯한다^{11,32~35)}. 이러한 瘀血症의 治療에 活血化瘀의 效能을 가진 方劑나 藥物을 利用한 實驗的 研究^{36~41)}와 臨床的 研究^{42~45)}가 活潑히 이루어지고 있다.

加味通栓化瘀湯은 頭痛과 胸痛 등의 頭·胸部의 瘀血 病證 뿐만 아니라 急躁, 脊悶, 心跳心忙, 不眠 등의 神志異常 病證에 活用된 王²³⁾의 血府逐瘀湯을 基礎로 하여 化瘀 作用이 實驗的으로 證明된 丹蔘^{46~47)}을 加한 通栓化瘀湯²⁶⁾에 抗血栓 作用이 있는 蚯蚓^{48~49)}을 追加한 處方으로 날로 增加하고 있는 中風과 腦損傷에 의한 腦機能 低下를 改善할 수 있는 對策과 方劑를 開發하기 위해 加味通栓化瘀湯의 臨床的 效果를 實驗的으로 立證하는 것이 本 研究의 意義라 할 수 있다.

이에 著者는 加味通栓化瘀湯에 대하여 高 cholesterol食으로 誘發한 家兔의 高脂血症모델에서 total cholesterol, triglyceride, phospholipid, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol를 測定하여 抗脂血效果를 살펴보았으며, *in vitro* 血小板 凝集 抑制能과 *in vivo* 肺血栓 誘發 IC-R系 mouse의 抗血栓 作用을 aspirin과 比較하여 살펴 보았고, potassium cyanide(KCN)을 利用한 ICR系 mouse의 全腦虛血모델에서 昏睡 時間의 短縮 效果를, 中大腦動脈의 血流을 遮斷한 白鼠의 局所 腦虛血모델에서 死亡 또는 神經學的 缺損 程度와 局所의 虛血面積과 浮腫率을 觀察하여 腦循環代謝 改善效果를 살펴보았다. 또한 amyloid β protein (25-35)으로 誘導된 PC12 細胞의 細胞毒性 保護 效果 및 lipopolysaccharide로 誘發한 RAW 細胞의 NO production에 대한 抑制效果를 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 動物 및 材料

1) 動物

本 實驗을 위하여 使用된 白鼠는 體重 180~220g의 Sprague-Dawley系(한국화학연구소) 雌性 白鼠를 使用하며 實驗當日까지 固形飼料(조단백질 22.1%以上, 조지방 8.0%以下, 조섬유 5.0%以下, 조회분 8.0%以下, 칼슘 0.6%以上, 인 0.4%以上 삼양사 配合 飼料 Co.)와 물을 충분히 供給하고 室溫 22±2℃를 계속 維持하고 2週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 MCA 實驗에 使用하였다. 또한 20~25g의 ICR(International Cancer Research)系 mouse를 한국화학연구소(대전, 한국)에서 供給받아 KCN 誘發 全腦虛血과 pulmonary thrombosis 實驗에 사용하였다. 家兔는 대한실험동물센터에서 rabbit(New Zealand White) 體重 1.5~1.8Kg을 구

입하여 사용하였으며, 實驗當日까지 加功한 粉末 飼料(조단백질 20.0%以上, 조지방 2.5%以下, 조섬유 15.0%以下, 조회분 11.0%以下, 칼슘 0.6%以上, 인 0.4%以上 삼양사 배합 사료 Co.) 와 물을 충분히 供給하고 室溫 22±2℃를 維持하여 2週日間 實驗室 環境에 適應시킨 후 實驗에 사용하였다. 動物室 環境은 溫度 23±2℃, 相對濕度 50±10%, 照明時間 12時間(07:00~19:00), 照度 150~300Lux로 設定하여 2週日間 實驗室 環境에 適應시켜 體重變化가 一定하고 健康한 動物만을 選別하여 實驗에 사용하였다.

2) 材料

本 實驗에 使用한 加味通桂化癆湯(KTJHAT)의 1貼의 內容과 用量은 醫林改錯²³⁾에 準하였으며 그 構成은 다음과 같다.

Table I. The Compositions of KamiTongJonHaaATang(KTJHAT) Extracts

韓藥名	生藥名	用量(g)
丹 蔘	Salviae Radix	8.0
地 龍	Lumbricus	8.0
紅 花	Carthami Flos	6.0
赤芍藥	Paeoniae Radix	6.0
川 芎	Cnidii Rhizoma	6.0
當 歸	Angelicae Radix	6.0
生地黃	Rehmanniae Rhizoma	6.0
桔 梗	Platycodi Radix	6.0
牛 膝	Achyranthis Radix	4.0
柴 胡	Bupleuri Radix	4.0
枳 殼	Ponciri Fructus	4.0
甘 草	Glycyrrhizae Radix	4.0
Total amount		68.0

3) 檢液의 調製

KTJHAT 10貼 分量 680g을 깨끗이 씻어 3,000 ml round flask에 넣고 蒸溜水 2,000ml을 넣었다. 3時間 加熱流出하고 沈澱物을 3回 濾別(3M filter paper)한 後, 이 濾過液을 rotary vaccum evaporator에서 減壓 濃縮하였다. 이 round flask를 -84℃ deep freezer에서 1時間 동안 放置하고 freeze dryer로 凍結乾燥하여 乾燥抽出物 206g을

얻어 實驗에 必要한 濃度로 生理食鹽水에 稀釋하여 使用하였다.

4) 試藥 및 機器

實驗에 使用한 試藥은 cholesterol(Sigma Co., U.S.A.), KCN(Sigma Co., U.S.A.), RPMI 1640 (HyClone Inc., U.S.A.), 10% fetal bovine serum (F-B-S; Sigma Co., U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A; Sigma Co., U.S.A.), 5% horse serum(Gibco-BRL, U.S.A.), antibiotics (Sigma Co., U.S.A.), amyloid β protein(Peptro n, Korea), trypsin-EDTA(Gibco-BRL, U.S.A.), sulfamonomethoxime-B(SRB; Sigma Co., U.S.A.), penicillin-streptomycin(Sigma Co., U.S.A.), normal saline(중외제약, Korea), 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride(Sigma Co., U.S.A.), 1% sulfanilamide(Sigma Co., U.S.A.), phosphoric acid(Sigma Co., U.S.A.), collagen(Sigma Co., U.S.A.), ADP(Sigma Co., U.S.A.), thrombin (Sigma Co., U.S.A.), lipopolysaccharide(Sigma Co., U.S.A.), DMEM(Gibco, U.S.A.), aspirin(Sigma Co., U.S.A.), NGF(Gibco-BRL, U.S.A.), h-human platelet(적십자사, 한국), hank's balanced salt solution(HBSS; Gibco-BRL, U.S.A.) 등을 使用하였다.

機器는 Express 550(Ciba-corning Co., U.S.A.), serum separator(녹십자, Korea), Minos-ST(Cobas Co., France), CO₂ incubator(Vision scientific Co., Model VS-9108 MS), clean bench(Vision scientific Co., KMC-14001), centrifuge(Beckman Co., U.S.A.), inverted microscope(Nikon Co, Japan), bright microscope(UFX-DX, Nikon), ELISA-reader(Emax, U.S.A), rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Swiss), deep freezer(Sanyo Co. Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), autoclave(Hirayama, Japan), micropipet (Gilson, France), autostill WG25(Y-amata, Japan), titer plate shaker (Labline Inst., U.S.A), culture flask(Falcon 302 4, U.S.A.), multiwell plate(96-well, Falcon, U.S.A.), conical tube(Falcon, U.S.A.), disposable pipette(5ml, 10ml, 25ml, Falcon, U.S.A.), whole blood 1

umi-aggregometer Chrono-Log Co. Ltd., U.S.A) 및 syringe filter(0.45 μ m, 0.22 μ m, Falcon, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 方法

1) 高 cholesterol食에 의한 高脂血症 誘發 實驗

(1) 高脂血症 誘發 方法

高脂血症모델은 Naito 등^{50,51)}의 方法을 修正하여 만들었다. 즉 3% cholesterol을 包含한 高脂肪食性 飼料를 實驗動物(New Zealand White)에게 2週日間 자유롭게 攝取하도록 하였다.

實驗動物은 2週日間 食餌한 후 耳靜脈에서 採血하여 3000rpm에서 15分間 遠心分離하였으며 total cholesterol을 測程하여 300mg/dl 이상의 家兔만 實驗에 使用하였다.

(2) 投與方法 및 投與量

實驗群에서 檢液 2.06g/1.5kg/day을 生理食鹽水 3ml에 溶解시켜 1日 1回 14日間 經口投與하였다.

正常群은 高脂肪食性 飼料가 包含되지 않은 一般飼料로 飼育되었으며, 檢液대신 生理食鹽水가 經口投與 되었고, 對照群은 高脂肪食性(2% cholesterol) 飼料로 飼育되었으며 檢液 대신 同量의 生理食鹽水를 經口投與 하였다.

(3) 採血 및 血清分離方法

採血은 最終 檢液 投與後 家兔를 ether로 麻酔하고 心臟穿刺를 實施하여 6~8ml의 血液을 1回用 注射器 23gauge로 取하였다. 採血한 血液을 3,000rpm에서 15分間 遠心分離하여 血清을 分離하였다.

(4) 血清成分의 測定

分離한 血清을 아래 方法으로 total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol의 含量을 測定하여 比較하였다. 血清中 total cholesterol, triglyceride, phospholipid, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol의 測定은 自動生化學分析機, Express 550 Cib-a-corning Co., U.S.A.)를 使用하여 測定하였다.

LDL-cholesterol = total cholesterol - (HDL-cholesterol + triglyceride/5), VLDL-cholesterol = total cholesterol - (HDL-cholesterol + LDL-cholesterol)

ste-rol)의 計算式에 따라 計算하였다⁵²⁾.

2) 血小板 凝集 및 血栓 誘發 實驗

(1) *In vitro* 血小板凝集抑制에 대한 實驗

血小板 凝集 抑制能은 platelet aggregometer를 利用한 Born⁵³⁾의 濁度 測定法으로 測定하였다. 血小板濃縮液(Rh+ O type)은 대전 적십자 혈액원에서 供給받아 使用하였다. 血小板濃縮液을 冷蔵 遠心分離器(Beck-mann co., U.S.A.)에서 1000rpm, 10分間 遠心分離하여 赤血球를 沈降시키고 上層液을 취해 自動 血球計算機, Minos-ST(COBAS co. France)를 利用하여 3×10^8 cells/ml 血小板數를 맞추어 PRP(platelet rich plasma)로 使用하였고, 上層液의 一部를 다시 2500rpm, 20分間 遠心分離하여 上層液을 PPP(platelet poor plasma)로 使用하였다.

血小板 凝集效果는 Whole Blood Lumi-Aggregometer(Chrono-Log Co. Ltd., U.S.A)를 使用하여 platelet aggregation을 測定하였다. Cuvette에 PRP 400 μ l, agonist(thrombin 0.4U/ml, collagen 50 μ g/ml, ADP 20 μ M/ml) 50 μ l, sample 50 μ l를 조심스럽게 넣고 collagen과 ADP에 대해서는 2mg/ml, thrombin에 대해서는 4mg/ml의 濃度에서 抗血栓作用을 評價하였다.

(2) *In vivo* 肺塞栓(Pulmonary thrombosis)에 대한 實驗

實驗的 血栓의 誘導는 Kimura⁵⁴⁾의 實驗方法에 準하여 實施하였다. 實驗 動物은 몸무게 약 20g-23g정도의 수컷 ICR系 mouse를 사용했고 血栓의 誘發은 血小板 凝集試藥(11.3 μ g의 collagen과 1.32 μ g의 epinephrine)이 Hank's balanced salt solution(HBSS) 200 μ l에 함유되도록 粗製하고 ICR系 mouse의 몸무게 20g당 200 μ l의 容量으로 꼬리정맥에 注射했다. 抗血栓效果를 알아보기 위하여 實驗動物을 24時間 絶食시킨 후 血小板 凝集試藥의 靜脈注射 2時間 前에 KTJHAT을 ICR系 mouse에 經口投與하였으며, 對照群으로는 aspirin 100mg/kg을 經口投與하였다. 抗血栓效果는 血小板 凝集試藥의 投與로 인하여 發生하는 mouse 뒷다리의 痲痺나 죽음으로 부터 保護된 實驗動物의 숫자의 百分率로 계산하며, 여기서 痲痺는 15分以

上 뒷다리의 機能을 喪失하거나 떨림상태가 持續될 때를 基準으로 한다.

3) 腦虛血 誘發 實驗

(1) 全腦虛血 誘發 實驗

① 方法 및 測定

全腦虛血모델은 Schubert⁵⁵⁾의 方法에 準하여 만 들었다.

KCN 誘發 昏睡時間 測定 方法은 經口投與 30分 後에 非致死量인 1.4mg/kg KCN을 ICR系 mouse 尾靜脈注射하고 正向反射를 消失한 後부터 正向反射를 回復할 때 까지의 時間을 測定하였다.

② 投與方法 및 投與量

實驗群에서 檢液은 27mg/20g을 生理食鹽水 3ml에 溶解시켜 oral zonde를 利用하여 1회 經口投與하였다. 對照群에는 檢液을 녹일 때 使用한 同量의 生理食鹽水를 經口投與 하였다.

(2) 局所 腦虛血 誘發 實驗(MCA occlusion)

① 實驗群 設定 및 檢液投與

白鼠 3마리를 1群으로 하여 對照群과 4마리를 1群 KTJHAT 投與群으로 區分하였다. 中大腦動脈閉鎖 2時間 前에 實驗 白鼠의 體重을 測定하고 KTJHAT 206mg/250g/day을 經口 投與하고 神經學的 檢査를 하였다. 局所 腦虛血 誘發 24時間 後 sacrifice하고 腦切片 8개를 만들어 浮腫率과 虛血面積을 計算하였다.

② 프로브 제작

4-0 규격의 나일론 봉합사(Deknatel Inc.)를 適當한 길이로 잘라 熱을 가해 한 쪽 끝에 매듭을 만들었다. 總 길이를 18mm로 만든 후 硬化劑를 섞은 실리콘을 약 0.3mm 두께로 매듭 반대편에 얇게 5mm 덧의위 프로브를 만들었다.

③ 局所 腦虛血 誘發

白鼠를 手術臺에 固定시키고 enflurane으로 Royal Multi-Plus(Royal Medical Co, Korea)를 사용하여 窒素와 酸素의 比率를 7:3으로 조정하여 吸入麻酔하였다. Nagasawa⁵⁶⁾의 方法에 따라 목中央을 切開하고 迷走神經에 損傷을 주지 않도록 주의하면서 右側 總頸動脈, 內頸動脈 및 外頸動脈을 分離한 뒤 總頸動脈과 外頸動脈을 結紮하고 곧바로 外頸動脈과 內頸動脈의 分枝에 매듭을 제의

한 프로브 전체를 插入한 뒤 插入部位 바로 위쪽을 結紮함으로써 同側 中大腦動脈을 閉鎖하였다. 總 手術 時間은 30분 以內로 하였으며, 直腸溫度計를 使用하여 體溫 下降을 判定하였고 赤外線을 비추면서 保溫하였으며, 中大腦動脈을 閉鎖하고 60分 동안 N₂O와 O₂를 90%와 10% 比率로 하여 低酸素狀態를 誘發하였으며 閉鎖 120分 後에 프로브를 0.5cm정도 당겨 再灌流를 行하였다.

④ 神經學的 檢査

中大腦動脈 閉鎖 後, 低酸素症 誘發 後 및 再灌流 後에 대한 각각의 神經學的 檢査를 實行하여 中大腦動脈 閉鎖에 따른 神經學的 缺損程度를 測定하였다. 神經學的 缺損程度는 Bederson⁵⁷⁾의 方法에 의하여 그 程度를 4等級으로 나누어 點數化하였으며 症狀에 따른 等級 分類는 Table II과 같다.

Table II. The Neurologic Examination Grading System

Forelimb	0	No deficit
	1	Forelimb flexation when suspended by the tail
	2	Reduced forepaw resistance to lateral push
	3	Circulating behaviour during suspension (body twisting)
Hindlimb	0	Immediate placement of the behind back on to the table (normal)
	1	No limb placement / movement

⑤ 虛血面積 및 浮腫率 測定

手術 24時間 後에 白鼠에서 腦를 꺼내어 brain matrix(ASI Instrumen -ts, Warren, MI., U.S.A)를 이용하여 2mm두께의 coronal brain slice를 얻은 後 이 中 8 slice만을 選擇하여 2% triphenyltetrazolium chloride (TTC) 溶液을 가하고 37℃에서 50分間 培養하였다. TTC에 의해 正常 組織은 짙은 빨강색으로 染色되나, 虛血이 일어난 組織은 染色되지 않음으로써 正常 組織과의 區分이 可能하였다. 培養 終了 後 染色된 組織을 10% formalin neutral buffer 溶液으로 固定시키

고, 2-3日內에 칼라 사진용 필름으로 寫眞을 찍어 현상한 뒤 coronal slice에서의 虛血面積을 測定하였다. 虛血面積 및 浮腫率은 아래의 식에 의해 算出하였다⁵⁸⁾.

$$\text{허혈 면적(\%)} = \frac{C}{A+B} \times 100$$

$$\text{부종율(\%)} = \frac{A-B}{2 \times B} \times 100$$

A : 각 coronal slice에서의 허혈이 유발된 대뇌 반구 면적(mm²)

B : 각 coronal slice에서의 대측 대뇌 반구 면적(mm²)

C : 각 coronal slice에서의 허혈 면적(mm²)

4) 腦損傷 誘發 實驗

(1) Amyloid β protein(25-35)으로 誘導된 PC12 細胞의 細胞毒性에 對한 保護 效果

① 細胞 및 細胞培養

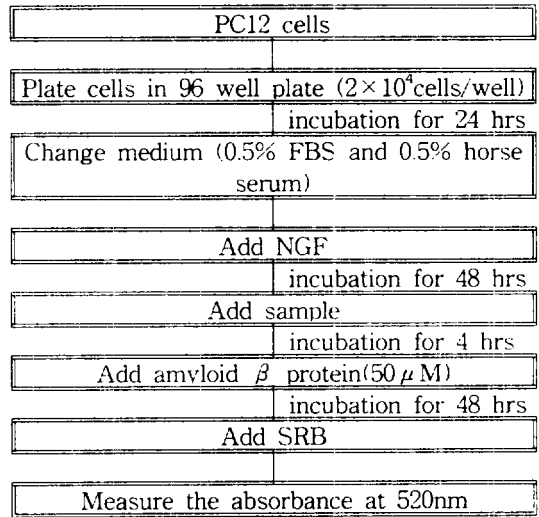
PC12 cell(ATCC CRL 1721)은 rat의 adrenal pheochromocytoma⁵⁹⁾에서 由來된 細胞며 최근 Alzheimer's disease의 實驗에 사용되는 細胞로서 한국인삼연초연구원에서 分讓받았다. 培地로는 RPMI 1640 培地에 10% fetal bovine serum, 5% horse serum과 antibiotic 10ml(100,000 units penicillin, 100mg streptomycin, 250μg amphotericin)을 添加한 培養液으로 37℃, 5% CO₂ 狀態의 培養器에서 培養하였다.

② 細胞毒性 評價分析

痴呆를 誘發하는 蛋白質인 amyloid β protein(25-35)은 Peptron(대전, 한국)에서 주문 구입하였으며, PC12 cell에 대한 amyloid β protein(25-35)의 細胞毒性은 SRB assay⁶⁰⁾를 實施하였다. 즉, PC12 cell을 1회용 滅菌 注射器(26gauge, Boin Medica Co., Korea)를 利用하여 單一細胞(single cell) 狀態의 細胞 懸濁液을 만들어 96 well plate의 각 well에 100μl(2×10⁴ cells/well)씩 加한 뒤 24時間 培養 後 NGF(nerve growth factor, 50ng/ml)를 넣고 48時間 培養하였다. 檢液은 細胞毒性을 나타내지 않는 250μg/ml, 500μg/ml 및 1000μg/ml 濃度로 稀釋한 뒤, 96 well plate의 각 well plate

에 10μl씩 넣었다. 4時間 後에 다시 각 well plate에 50μM의 amyloid β protein(25-35)를 加한 다음 48時間 培養한 後 SRB法에 의하여 細胞毒性을 觀察하였다(Fig. 1).

Fig. 1. The experimental scheme for protective effect of KTJHAT extracts on the cytotoxicity induced by amyloid β protein(25-35).



(2) Lipopolysaccharide로 誘發한 RAW 細胞의 NO production에 對한 抑制 效果

① 細胞 및 細胞培養

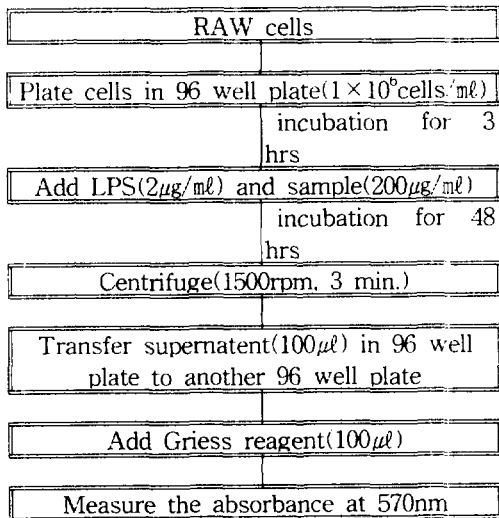
RAW cell(ATCC TIB 71)은 Abelson leukemia virus를 白鼠에 injection하여 intraperitoneal에 생긴 tumor cell이며 최근 腦卒中的 實驗에 사용되는 細胞로서 ATCC(American type culture collection)에서 分讓받았다. 培地로는 DMEM 培地에 10% fetal bovine serum을 添加한 培養液으로 37℃, 5% CO₂ 狀態의 培養器에서 培養하였다.

② NO assay⁶¹⁾

Macrophage를 活性化시키는 物質인 lipopolysaccharide는 Sigma Co. (U.S.A.)에서 주문 求入하였다. 細胞毒性을 보이지 않는 濃度인 200μg/ml의 KTJHAT 抽出物로 NO assay를 實施하였다. 즉, RAW cell을 1회용 滅菌 注射器(26gauge, Boin Medica Co., Korea)를 利用하여 單一細胞(single cell) 狀態의 細胞 懸濁液을 만들어

어 96 well plate의 각 well에 1×10^6 cells/ml의 細胞懸濁液 100 μ l씩 가한 뒤 3時間 培養하였다. 檢液은 0.20mg/ml 濃度로 稀釋한 뒤에 96 well plate의 각 well plate에 20 μ l씩 넣었고 同時에 각 well plate에 2 μ g/ml의 lipopolysaccharide를 가하였으며, 48時間 培養한 後 1500rpm에서 3分동안 遠心分離하여 細胞 浮遊物만을 100 μ l 取한 다음 새로운 96 well plate에 옮겨 놓고 Griess reagent를 100 μ l씩 添加하였다. 10分 後 ELISA reader를 통하여 570 nm에서 吸光度를 測定하였다(Fig. 2).

Fig. 2. The experimental scheme for effect of KTJHAT extracts on NO production in RAWcells stimulated by lipopolysaccharide.



5) 統計 處理

實驗 結果는 unpaired student's T-test를 사용 하여 統計處理하였으며 P<0.05, P<0.01 또는 P<0.001 水準에서 有意性을 檢定하였다.

III. 成 績

1. 高脂血症과 血栓症에 대한 效果

1) 高脂血症에 대한 效果

(1) 血清 total cholesterol에 미치는 效果

高cholesterol食으로 誘發된 高脂血症 rabbit에서 total cholesterol의 含量은 正常群이 98.87 \pm 2.49mg/dl인데 比較 對照群은 909.50 \pm 52.80mg/dl로 增加

하였다.

對照群에 比較 實驗群은 448.33 \pm 63.27mg/dl로 나타나 有意性(p<0.01) 있는 增加 抑制 效果가 나타났다(Table III).

Table III. The Effect of KTJHAT Extracts on the Serum Total Cholestsrol Levels in Rats with Hypercholesterolemia induced by Cholesterol Diet

Group	No. of Animals	Cholesterol(mg/dl)
Normal	3	98.87 \pm 2.49 ^{a)}
Control	3	909.50 \pm 52.80
Sample	3	448.33 \pm 63.27 ^{**}

a): Mean \pm Standard error.

Normal: Non-treated group.

Control: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 3ml normal saline once a day for 14 days.

Sample: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 2.06g/1.5kg of KTJHAT extracts solved in 3ml normal saline once a day for 14 days.

*: Statistically significant value compared with control data

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

(2) 血清 triglyceride에 미치는 效果

Triglyceride 含量은 正常群이 167.03 \pm 11.35mg/dl인데 比較 對照群은 203.42 \pm 9.73mg/dl로 增加하였다.

對照群에 比較 實驗群은 165.32 \pm 10.54mg/dl로 나타나 有意性(p<0.05)있는 增加 抑制 效果가 나타났다(Table IV).

Table IV. The Effect of KTJHAT Extracts on the Serum Triglyceride Levels in Rabbits with Hypercholesterolemia induced by Cholesterol Diet

Group	No. of Animals	Triglyceride(mg/dl)
Normal	3	167.03 \pm 11.35 ^{a)}
Control	3	203.42 \pm 9.73
Sample	3	165.32 \pm 10.54 [*]

a): Mean \pm Standard error.

Normal: Non-treated group.

Control: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 3ml normal saline once a day for 14 days.

Sample: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 2.06g/1.5kg of KTJHAT extracts solved in 3ml normal saline once a day for 14 days.

*: Statistically significant value compared with control data

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

(3) 血清 phospholipid에 미치는 效果

Phospholipid 含量은 正常群이 169.33±0.88mg/dl인데 비해 對照群은 317.84±10.37mg/dl로 增加하였다.

對照群에 비해 實驗群은 236.67±20.53mg/dl로 나타나 有意性(p<0.05)있는 增加 抑制 效果가 나타났다(Table V).

Table V. The Effect of KTJHAT Extracts on the Serum Phospholipid Levels in Rabbits with Hypercholesterolemia Induced by Cholesterol Diet

Group	No. of Animals	Phospholipid(mg/dl)
Normal	3	169.33 ± 0.88 ^{a)}
Control	3	317.84 ± 10.37
Sample	3	236.67 ± 20.53*

a): Mean ± Standard error.

Normal: Non-treated group.

Control: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 3ml normal saline once a day for 14 days.

Sample: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 2.06g/1.5 kg of KTJHAT extracts solved in 3ml normal saline once a day for 14 days.

*: Statistically significant value compared with control data

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

(4) 血清 HDL-cholesterol에 미치는 效果

HDL-cholesterol 含量은 正常群이 28.40±0.75 mg/dl인데 비해 對照群은 26.05±2.43mg/dl로 變化하였다. 對照群에 비해 實驗群은 27.67±2.16mg/dl로 나타나 增加 作用은 나타났으나 有意性은 없었다(Table VI).

Table VI. The Effect of KTJHAT Extracts on the Serum HDL-Cholesterol Levels in Rabbits with Hypercholesterolemia Induced by Cholesterol Diet

Group	No. of Animals	HDL(mg/dl)
Normal	3	28.40 ± 0.75 ^{a)}
Control	3	26.05 ± 2.43
Sample	3	27.67 ± 2.16

a): Mean ± Standard error.

Normal: Non-treated group.

Control: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 3ml normal saline once a day for 14 days.

Sample: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 2.06g/1.5 kg of KTJHAT extracts solved in 3ml normal saline once a day for 14 days.

(5) 血清 LDL-cholesterol에 미치는 效果

LDL-cholesterol 含量은 正常群이 37.06±4.25mg/dl인데 비해 對照群은 842.76±47.23mg/dl로 增加하였다.

對照群에 비해 實驗群은 387.59±36.73mg/dl로 나타나 有意性(p<0.001)있는 增加 抑制 效果가 나타났다(Table VII)

Table VII. The Effect of KTJHAT Extracts on the Serum LDL-Cholesterol Levels in Rabbits with Hypercholesterolemia Induced by Cholesterol Diet

Group	No. of Animals	LDL(mg/dl)
Normal	3	37.06 ± 4.25 ^{a)}
Control	3	842.76 ± 47.23
Sample	3	387.59 ± 36.73***

a): Mean ± Standard error.

Normal: Non-treated group.

Control: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 3ml normal saline once a day for 14 days.

Sample: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 2.06g/1.5kg of KTJHAT extracts solved in 3ml normal saline once a day for 14 days.

*: Statistically significant value compared with control data

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001)

(6) 血清 VLDL-cholesterol에 미치는 效果

VLDL-cholesterol 含量은 正常群이 33.41±2.27 mg/dl인데 비해 對照群은 40.69±3.28mg/dl로 增加하였다. 對照群에 비해 實驗群은 33.07±4.34mg/dl로 나타나 增加 抑制 作用은 나타났으나 有意性은 없었다(Table VIII).

Table VIII. The Effect of KTJHAT Extracts on the Serum VLDL-Cholesterol Levels in Rabbits with Hypercholesterolemia Induced by Cholesterol Diet

Group	No. of Animals	VLDL(mg/dl)
Normal	3	33.41±2.27 ^{a)}
Control	3	40.69±3.28
Sample	3	33.07±4.34

a): Mean ± Standard error.

Normal: Non-treated group.

Control: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 3ml normal saline once a day for 14 days.

Sample: Group fed with 2% cholesterol diet for 14 days and was treated with 2.06g/1.5 kg of KTJHAT extracts solved in 3ml normal saline once a day for 14 days.

2) 血栓症에 대한 效果

(1) *In vitro* 血小板凝集抑制에 대한 實驗

ADP(20 μM/ml)에 의한 血小板凝集反應 阻害 效果에서는 47.05%, thrombin (0.5U/ml)에 의한 血小板凝集反應 阻害 效果에서는 57.06%의 강한 阻害 效果를 나타냈으며, collagen(50μg/ml)에 의한 血小板凝集反應 阻害 效果에서는 2.60%의 微弱한 阻害 作用을 보였다(Table IX, Fig. 9).

Table IX. Inhibitory Effects of KTJHAT on Human Platelet Aggregation

Aggregation agent	% of Inhibition
Collagen(50μg/ml)	2.60
Thrombin(0.5U/ml)	57.06
ADP(20 μM/ml)	47.05

* Sample concentration ; collagen, ADP : 2mg/ml, thrombin : 4mg/ml

(2) 肺塞栓(Pulmonary embolism)에 대한 效果

對照群은 collagen과 epinephrine에 의해서 肺塞栓이 誘導되어 8마리중 8마리가 죽거나 15分間 以

上 麻痺가 持續이 되었는데, 比較 物質로 사용한 aspirin은 8마리중 3마리만이 죽거나 15分 以上 麻痺가 持續이 되었다. 實驗群은 8마리중 6마리가 죽거나 15分 以上 麻痺가 持續되어 25.0%의 抑制 效果를 나타내었다(Table X).

Table X. Effect of KTJHAT on Pulmonary Embolism in Mice.

Dose(mg/20g)	No. of killed or paralyzed / No. tested	% of Protection
Control HBSS*	8/8	
Aspirin 2	3/8	62.5
Sample 27	6/8	25.0

HBSS* : Hanks' balanced salt solution.

Control : Collagen(11.3μg) and epinephrine(1.32μg) treated group.

Aspirin : Collagen(11.3μg) and epinephrine(1.32μg) treated group and aspirin(2mg/20g) treated group.

Sample : Collagen(11.3μg) and epinephrine(1.32μg) treated group and KTJHAT extracts(27mg/20g) treated group.

2. 腦虛血에 대한 效果

1) 全腦虛血에 대한 效果

(1) KCN 誘發 昏睡時間에 미치는 效果

非致死量의 KCN(1.4mg/kg/20g i.v.)에 의해 誘發 시킨 ICR系 mouse의 昏睡時間은 對照群이 128.53±28.39sec로 나타났다.

對照群에 비해 實驗群은 108.76±19.34sec로 나타나 미약한 昏睡時間 短縮效果(15.4%)가 認定되었으나 有意性은 없었다(Table XI, Fig. 11).

Table XI. The Duration of KCN-induced(1.4mg/kg i.v.) Coma after Oral Administration of KTJHAT Extracts in ICR Mice

Group	No. of Animals	Duration of coma(sec)
Control	10	128.53±28.39 ^{a)}
Sample	10	108.76±19.34

a): Mean ± Standard error.

Control: 1.4mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of normal saline.

Sample: 1.4mg/kg KCN i.v. injected group after

oral administration of 27mg/20g of KTJHAT extracts.

2) 局所 腦虛血에 대한 效果

(1) 中大腦動脈 閉鎖에 따른 神經學的 缺損 程度의 變化에 미치는 效果

Fore limb의 神經學的 缺損程度는 對照群의 경우 operation, hypoxia, recirculation後의 等級은 각각 2.78 ± 0.15 , 2.89 ± 0.11 과 2.57 ± 0.20 이었는데 比하여 KTJHAT 投與群의 경우는 각각 2.33 ± 0.33 , 2.67 ± 0.33 과 2.67 ± 0.33 으로 等級의 變化가 거의 없었다(Table XII). 또한 Hind limb의 神經學的 缺損程度는 對照群의 경우 operation, hypoxia, recirculation後의 等級은 각각 0.44 ± 0.18 , 0.11 ± 0.11 , 0.14 ± 0.14 이었는데 比하여, KTJHAT 投與群의 경우는 모두 0.0 ± 0.0 으로 好轉되었다(Table X III.).

Table XII. Effect of KTJHAT on Variation of Neurologic Grades in MCA Occluded SD Rats(Fore limb)

	Operation	Hypoxia	Recirculation
Control	2.78 ± 0.15^{a1}	2.89 ± 0.11	2.57 ± 0.20
Sample	2.33 ± 0.33	2.67 ± 0.33	2.67 ± 0.33

a): Mean \pm Standard error.

Control: Normal saline treated group.

Sample: 206mg/250g/day KTJHAT treated group.

Table XIII. Effect of KTJHAT on Variation of Neurologic Grades in MCA Occluded SD Rats(Hind limb)

	Operation	Hypoxia	Recirculation
Control	0.44 ± 0.18^{a1}	0.11 ± 0.11	0.14 ± 0.14
Sample	$0.0 \pm 0.00^*$	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00

a): Mean \pm Standard error.

Control: Normal saline treated group.

Sample: 206mg/250g/day KTJHAT treated group.

*: Statistically significant value compared with control data

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

(2) 中大腦動脈 閉鎖에 따른 虛血 面積 및 浮腫 率에 미치는 效果

中大腦動脈 閉鎖에 따른 虛血 面積率과 浮腫 率은 對照群에 比하여 KTJHAT 投與群이 有意性 있게 減少하였다(Table XIV ~ XV, Fig. 14~16).

3. 腦損傷에 대한 效果

1) Amyloid β protein (25-35)으로 誘導된 PC12 細胞의 細胞毒性에 對한 保護 效果

(1) PC12 細胞에 對한 細胞毒性

PC12 細胞에 對한 KTJHAT의 細胞毒性을 觀察한 結果, 實驗에 使用한 $250 \mu\text{g/ml}$, $500 \mu\text{g/ml}$ 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 濃度에서 전혀 細胞毒性을 보이지 않았다(Table XVI).

Table XIV. Effect of KTJHAT on Ischemic Ratio in MCA Occluded SD Rats

No. of slices control (n=3)	The mean area of infarction (%)	No. of slices KTJHAT (n=4)	The mean area of infarction (%)
1	9.30 ± 3.36^{a1}	1	ND*
2	25.70 ± 3.04	2	ND***
3	28.04 ± 2.31	3	$4.25 \pm 0.46^{***}$
4	22.25 ± 7.26	4	$5.91 \pm 0.28^*$
5	16.00 ± 7.08	5	ND*
6	4.41 ± 2.91	6	ND
7	0.80 ± 0.80	7	ND
8	ND	8	ND

a): Mean \pm Standard error.

Control: Normal saline treated group.

Sample: 206mg/250g/day KTJHAT treated group.

ND: Not detectable.

*: Statistically significant value compared with control data

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

Table XV. Effect of KTJHAT on Edema in MCA Occluded SD Rats

No. of slices control (n=3)	The mean extent of edema(%)	No. of slices KTJHAT(n=4)	The mean extent of edema(%)
1	14.30±3.78	1	6.77±6.36
2	12.99±1.32	2	5.14±0.68**
3	10.58±1.74	3	2.12±0.75**
4	10.02±0.06	4	2.27±0.25***
5	8.61±1.68	5	2.14±0.64**
6	3.66±0.23	6	1.46±0.37**
7	2.56±0.64	7	0.43±0.04*
8	2.26±2.26	8	2.23±1.54

Control: Normal saline treated group.

Sample: 206mg/250g/day KTJHAT treated group.

The values are Mean±standard error.

ND: Not detectable.

*: Statistically significant value compared with control data

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

Table XVI . The Cytotoxicity of KTJHAT Extracts Against PC12 Cell Line

Concentration	Viability(% of Control)
Control	100.00±9.37 ^{a)}
Sample A	104.21±7.34
Sample B	107.32±6.46
Sample C	109.21±11.3

a): Mean ± Standard error.

Copontrol: PC12 cell(2×10⁴cells/well).

Sample A: PC12 cell(2×10⁴cells/well) and KTJHAT treated group(250μg/ml).

Sample B: PC12 cell(2×10⁴cells/well) and KTJHAT treated group(500μg/ml).

Sample C: PC12 cell(2×10⁴cells/well) and KTJHAT treated group(1000μg/ml).

(2) 細胞毒性에 對한 保護 效果

Amyloid β protein(25-35)에 의해 誘導된 PC12 細胞의 細胞毒性(47.05±1.96%)에 對하여 250μg/ml 500μg/ml 및 1000μg/ml KTJHAT 抽出物을 前處置한 後 細胞毒性 保護 效果를 觀察한 結果, 각각 47.14±2.29, 56.24±3.30과 68.12±4.78%로 250μg/ml의 濃度에서는 保護 作用을 보이지 않았으나, 500μg/ml의 濃度에서는 19%의 有意性(P<0.05)있는 保護 效果를 나타냈으며, 1000μg/ml의 濃度에서 45%의 有意性(P<0.01)있는 減少 效果를 나타내었다(Table XVII)

2) Lipopolysaccharide로 誘發한 RAW 細胞의 NO production에 對한 抑制 效果

Lipopolysaccharide로 誘發한 RAW 細胞의 NO production은 對照群에서는 正常群에 比하여 有意性(P<0.001)있게 增加되었으며, 實驗群에서는 對照群에 比하여 有意性(P<0.001)있는 減少(87%)를 보았다(Table XVIII).

Table XVIII . The Effect of KTJHAT Extracts on NO Production in RAW Cells Stimulated by Lipopolysaccharide

Group	NO production(μ M/L)
Normal	17.01±2.03 ^{a)}
Control	55.13±4.05***
Sample	20.02±3.04***

a): Mean ± Standard error.

Normal: Non-treated group.

Control: Group was treated with 2μg/ml of lipopolysaccharide.

Sample: Group was treated with 2μg/ml of lipopolysaccharide and 0.2mg/ml of KTJHAT extracts.

*: Statistically significant value compared with control data

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

Table XVII . The Protective Effect of KTJHAT Extracts on Cytotoxicity of PC12 Cells Induced Amyloid β Protein(25-35)

Control(%)	β -amyloid	Sample A	Sample B	Sample C
100.00 \pm 4.90	47.05 \pm 1.96 ^{a)}	47.14 \pm 2.29	56.24 \pm 3.30*	68.12 \pm 4.78**

a): Mean \pm Standard error.

β -amyloid: PC12 cells(4×10^4 cells/well)+A β (25-35)(50 μ M).

Sample A: PC12 cells(4×10^4 cells/well)+A β (25-35)(50 μ M)+KTJHAT extracts 250 μ g/ml.

Sample B: PC12 cells(4×10^4 cells/well)+A β (25-35)(50 μ M)+KTJHAT extracts 500 μ g/ml.

Sample C: PC12 cells(4×10^4 cells/well)+A β (25-35)(50 μ M)+KTJHAT extracts 1000 μ g/ml.

*: Statistically significant value compared with β -amyloid protein data

(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

IV. 考 察

中風은 卒中, 偏枯, 偏風이라고도 하며 代表的인 症狀은 昏倒, 人事不省, 半身不遂, 口眼歪斜, 言語不利 등으로 西洋醫學에서는 腦血管 疾患으로 因하여 發生하는 急激한 機能 障碍와 運動 障碍를 主로하는 腦神經症候群을 말한다^{4,5,62)}

腦卒中은 最近 産業化와 經濟成長에 따른 生活方式와 食生活의 變化로 점차 增加하는 傾向³⁾을 보이고 있어 우리 나라의 경우 나⁶²⁾는 閉鎖性이 약 50%로 報告 하였으며, 尹⁶³⁾은 閉鎖性이 85%, 出血性이 15%로 報告하였다.

中風에 關하여 《黃帝內經》¹⁷⁾에 ‘僕擊’, ‘偏枯’, ‘偏風’ 등의 記錄이 나타나는데 唐宋 以前까지는 中風을 外風으로 認識하여 人體 氣血 虛損으로 脈絡 空虛하고 外衛不固할 때 風邪가 侵犯하여 發病한다고 생각하였으나 金元 時代 以後 부터 外因보다 火, 氣, 濕熱, 瘀血 等の 內因에서 그 病因을 찾으려는 시도가 多樣하게 發展 되었으며 治法에서도 變化를 가져오게 되었다⁶⁵⁾. 특히 劉完素, 李東垣, 朱丹溪 三家의 學說은 現在까지 中風 理論의 根幹을 이루고 있으며^{2,65)}, 王⁶⁶⁾에 이르러 “人有卒暴僵仆 或偏枯 或四肢不舉 或不知人 或死 或不死 世以中風呼之”라 하여 中風의 定意에 대하여 明瞭하게 要約하였다.

中風의 原因說로는 風¹⁷⁻¹⁹⁾, 火²⁰⁾, 氣虛²¹⁾, 濕痰說²²⁾ 등이 主流를 이루었으나 王²³⁾에 의해 瘀血說이 새롭게 擡頭되었다.

中風의 治療에 대해서는 《黃帝內經》¹⁷⁾ 以後 外感 風邪에 대하여 發汗, 祛風, 理氣血하는 治法을 主로 使用하였으나, 金元 時代 以後 治法에도 變化가 생겨 劉²⁰⁾는 清熱通裏를, 朱²²⁾는 治痰을 主로 先으로 次養血行血하는 方法을, 李²¹⁾는 培補元氣를 主張하였다. 清代에 이르러 中風의 治療에 있어 王²³⁾이 補氣 活血祛瘀를 主張한 以後로 唐²⁴⁾의 “離經之血 雖清血 鮮血 亦是瘀血” 概念을 利用하여 活血化瘀를 爲主로한 中風의 治療에 대한 많은 研究²⁵⁻²⁹⁾가 있었다.

瘀血은 生理的 機能을 喪失한 血液이 凝聚하여 形成된 一種의 病理的인 產物인 同時에 致病 因子가 되는 것으로 血液循環 障碍, 血流 速度 減少 및 血液 成分 變化의 病理 狀態를 包括하며^{11,31-32)}, 近者에 이르러 崔³³⁾는 體內 一定 部位에 血液이 瘀滯되어 있는 狀態라 하였고, 金³¹⁾은 生理的 機能을 喪失한 停滯된 血을, 金⁶⁷⁾은 血液의 運行이 不暢하여 局部의 脈管이나 臟腑 中에 血液이 瘀滯되거나, 脈管을 벗어난 離經의 血液을, 有³²⁾는 全血 粘度가 充進된 狀態를, 金 堉³⁶⁻⁴¹⁾은 血液의 粘度, 濃度, 凝固性 및 赤血球 凝集이 增加된 狀態로 보아 瘀血의 概念을 擴大하였다.

이러한 瘀血에 대한 研究를 綜合해 보면 오늘날 血液循環 障碍, 血液 流變性 異常, 血液 粘度 異常으로 인한 組織의 水腫 變成, 炎症 增殖, 潰瘍, 壞疽, 萎縮, 血栓 形成, 血管 狹窄 혹은 閉塞 등의 一連의 病理 變化 狀態 등이 이에 該當된다고 볼 수 있으며, 西洋醫學的으로는 血栓症, 高脂血症, 高粘度血症, 虛血性 腦血管疾患, 腦損傷 등과 類似한 概念으로 認識되어져 이에 대한 實驗的 研究³⁾

6~41)와 臨床的 研究^{25~29,42~44)}가 활발히 이루어지고 있다.

加味通栓化癆湯은 王²³⁾의 血府逐癆湯을 基礎로 丹蔘을 가하여 中風의 應急期에 臨床的으로 活用한 通栓化癆湯²⁶⁾에 蚯蚓을 添加한 處方이다. 加味藥物중 蚯蚓^{68~70)}은 通絡止痛, 熄風止癢, 清血平肝하여 半身不遂, 驚風, 抽搐, 風濕痺痛 등의 治療에 活用되며 最近 尹 등^{40,46~47)}이 抗血栓 效果를 實驗的으로 立證하였고, 丹蔘^{68~70)}은 活血祛癆, 涼血消癰, 安神寧心, 排膿, 止痛하여 癆血腹痛, 驚悸不眠, 惡瘡腫毒, 冠狀動脈 硬化性 心臟疾患, 高血壓, 血栓閉鎖性 脈管炎 등을 治療하는 效能이 있으며, 毛 등^{48~49)}은 癆血 病態에 대한 效果를 實驗的으로 立證하였다.

加味通栓化癆湯의 原流인 血府逐癆湯²³⁾은 頭痛과 胸痛등의 頭·胸部의 癆血 病證 뿐만 아니라 急躁, 瞋悶, 心跳心忙, 不眠 등의 神志異常 病證에도 活用하였는데 最近 崔⁷¹⁾는 血栓症과 皮下血腫에 미치는 影響을, 余⁷²⁾는 高脂血症 患者의 脂質 降下作用에 대해, 陳⁷³⁾은 動脈硬化性 精神 障礙에 대한 臨床研究를 報告하였고, 丹蔘을 加한 通栓化癆湯에 대해서는 楊²⁶⁾이 急性期 中風에 臨床的으로 活用한 報告가 있었으나 血府逐癆湯에 丹蔘과 蚯蚓을 加한 處方에 대해서는 아직 實驗的 研究가 없었다.

이에 著者는 加味通栓化癆湯을 高 cholesterol食으로 誘發한 家兔의 高脂血症모델에서 total cholesterol, triglyceride, phospholipid, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol를 測定하여 抗脂血效果를 살펴보았으며, *in vitro* 血小板凝集 抑制能과 肺血栓 誘發 ICR系 mouse의 抗血栓作用을 aspirin과 比較 살펴보았고, KCN을 利用한 ICR系 mouse의 全腦虛血모델에서 昏睡 時間의 短縮效果를, 中大腦動脈의 血流을 遮斷한 白鼠의 局所 腦虛血모델에서 死亡 또는 神經學的 缺損程度와 局所의 虛血面積과 浮腫率을 觀察하여 腦循環代謝 改善 效果를 살펴보았다. 또한 amyloid β protein(25-35)으로 誘導된 PC12 細胞의 細胞毒性 保護效果 및 lipopolysaccharide로 誘發한 RAW 細胞의 NO production에 대한 抑制 效果를

觀察하여 實驗을 실시하여 그 效能을 比較 檢討하였다.

高脂血症이 動脈硬化의 主要한 原因이며, 動脈硬化가 腦卒中의 主要한 原因이므로 高脂血症은 腦卒中和 關係가 깊은 것으로 豫測할 수 있듯이 많은 研究에서 脂質 代謝 異常과 腦卒中이 關係가 있다는 報告^{14~16)}들과 같이 結局 高脂血症의 治療는 動脈硬化症을 豫防케 하며, 따라서 腦血管疾患의 發生을 防止하는데도 도움이 될 것이다⁷⁴⁾.

脂質은 사람이 利用하는 에너지의 主要 供給源이며, 몸의 重要한 構成成分이기도 하다⁷⁵⁾. 血中 脂蛋白은 比重에 따라 乳糜脂粒(chylomicron, CM), 超底比重脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL), 底比重脂蛋白(low density lipoprotein, LDL), 高比重脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)으로 分類할 수 있는데 含有하고 있는 中性脂肪(triglyceride, TG)의 含量이 적을수록 또는 蛋白質의 含量이 높을수록 比重은 增加한다^{8~10)}.

血中 cholesterol 濃度는 주로 肝 및 小腸에서 cholesterol의 生成과 吸收, 異化作用에 의해 調節되며, 그 測定은 體內 脂質 代謝 異常의 指標로서 重要한 것인데⁷⁶⁾, 本 實驗에서 高 cholesterol食으로 誘發된 高脂血症 家兔에서 total cholesterol의 含量은 實驗群에서 有意性($p < 0.01$)있는 增加 抑制 效果가 나타났다(Table III)

血中 triglyceride의 測定은 cholesterol 測定과 함께 脂質 代謝 異常의 解明에 매우 重要한 指標가 되는데⁷⁶⁾, cholesterol 負荷로 誘發된 高脂血症 家兔의 triglyceride 含量은 實驗群에서 有意性($p < 0.05$)있는 增加 抑制 效果가 認定되었다(Table IV).

血清 phospholipid는 各種 脂質代謝 異常에 의해 增減되지만 cholesterol과 平行하여 變動하는 境遇가 많으며, 脂質의 安定화와 代謝에 重要한 役割을 하고 있는데⁷⁶⁾, 本 實驗에서 cholesterol 負荷로 誘發된 高脂血症 家兔의 phospholipid 含量은 對照群에 비해 實驗群은 有意性($p < 0.05$)있는 增加 抑制 效果가 나타났다(Table V).

HDL-cholesterol은 細胞內 蓄積된 cholesterol의 除去 作用에 關與하며, 또 一部는 LDL-cholesterol

1 受容體와 競合적으로 結合하여 LDL-cholesterol의 受容을 抑制한다⁷⁵⁾.

最近에는 HDL-cholesterol이 冠狀動脈 硬化症의 危險 豫防 因子이며 그 血中 濃度는 動脈硬化性 疾患의 發症 豫告에 有用한 指標가 되고 그 數値의 減少는 高血壓, 糖尿病, 虛血性 心臟 疾患, 心筋 梗塞, 腦卒中의 危險 因子로 作用한다는 것이 밝혀졌다⁷⁷⁻⁷⁹⁾.

Cholesterol 負荷로 誘發된 高脂血症 家兎의 HDL-cholesterol 含量은 對照群에 比해 實驗群은 增加되었으나 有意性은 없었다(Table VI).

LDL-cholesterol은 粥狀硬化證의 危險 要因이며 血中cholesterol의 主要 構成成分으로 PL이 正常인 경우에 total cholesterol의 增加는 바로 LDL-cholesterol의 增加를 반영한다⁷⁸⁾. Cholesterol 負荷로 誘發된 高脂血症 家兎의 LDL-cholesterol 含量은 對照群에 比해 實驗群에서 有意性($p < 0.001$)있는 增加 抑制 效果가 나타났다(Table VII)

VLDL-cholesterol 含量은 對照群에 比해 實驗群에서 增加 抑制가 나타났으나 有意性은 없었다(Table VIII).

본 實驗의 경우 高 Cholesterol食으로 誘發된 高脂血症 家兎에서 對照群에 比해 實驗群은 total cholesterol 含量, triglyceride 含量, phospholipid 含量, LDL-cholesterol 含量, VLDL-cholesterol 含量이 각각 有意性 있는 增加 抑制 效果가 나타났으며, HDL-cholesterol 含量은 增加된 것으로 나타나 高 cholesterol食으로 誘發된 高脂血症에 實驗群은 血中脂質 및 脂蛋白質 增加 抑制 效果가 認定되었으나, 向後 檢液의 投與期間, 投與量 및 投與方法에 대한 研究가 더 필요할 것으로 생각된다.

血栓症은 活動中인 心血管系에서 血液이 凝固塊를 形成한 것으로 心臟 등에서는 狹心症, 血栓 및 動脈硬化를 發生시키며, 腦에서는 腦血栓 등의 腦血管 疾患을 誘發하는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹⁰⁾.

損傷에 의한 生理的인 反應으로 形成된 止血 塞栓과 病的인 血栓 사이의 차이는 거의 없으며 血栓은 잘못된 場所나 잘못된 時間에 發生하는 凝固로 表現할 수 있다. 즉 血栓症은 正常 止血 機轉

의 病理的 現象이라 할 수 있으므로 人體의 血液 凝固 機轉에 대한 病理·生理學的인 認知는 血栓으로 인한 組織의 虛血性 病變의 治療劑 開發에 必要하다고 할 수 있다⁸⁾.

效果的인 原發性 止血은 血小板 附着, 顆粒 分泌와 血小板 凝集 過程을 말한다. 이 過程은 損傷後 數秒 內에 일어나며 毛細血管, 小動脈, 靜脈 등으로부터 失血을 막아준다. 續發性 止血은 纖維素(fibrin) 形成을 일으키는 血漿 凝固系의 反應으로 이 過程은 纖維素 融解系와 同時에 發生하며 原發性 止血 栓塞을 強化시킨다. 비록 이 過程은 區分되어 說明되어지지만 原發性과 續發性 止血은 密接하게 連結되어 있다. 예를 들어 活性化 血小板은 血漿 凝固를 促進하며 thrombin과 같은 血漿 凝固 反應의 產物들은 血小板 凝集을 刺戟한다⁸⁻¹⁰⁾.

血管의 損傷이 發生하면 血小板은 特殊 膠原質 收容體인 糖蛋白質 I a / II a(glycoprotein I a/II a, 이하 GP I a/II a)를 통하여 血管 內皮의 膠原質 原纖維(collagen fibril)에 有着되고 이때 von Willebrand Factor(vWF)가 膠原質(collagen)과 血小板의 特殊 膠原質 收容體인 GP I b/IX을 連結하는 役割을 擔當하여 血管壁에 血小板을 有着된 狀態로 維持시킨다. 血小板의 接着이 일어남과 同時에 collagen, thrombin, epinephrin 등의 收容體 作用 物質들의 結合은 血小板 磷脂質들로부터 arachidonic acid의 分泌를 觸媒한다. 이 arachidonic acid는 酵素 cyclooxygenase에 의해 thromboxane A₂(Tx A₂)로 轉換되어 血小板 內의 여러 가지 分泌를 促進하게 되는데 cyclooxygenase는 aspirin등에 의해 抑制되어 antithrombotic drug과 같은 作用을 하게 된다⁸⁰⁻⁸²⁾.

活性化된 血小板은 血漿에 顆粒性 內容物을 分泌하게 되는데, 緻密 顆粒(dense granule)에서는 貯藏되어 있던 calcium, serotonin, adenosine diphosphate(ADP)등을 分泌하고, alpha顆粒(α -granule)에서는 vWF, fibronectin, thrombospondin, heparin neutralizing protein(platelet factor IV), platelet derived growth factor(PDGF) 등을 포함한 여러 蛋白質들을 分泌한다^{20-22,138)}. 이들 分泌物중 serot

omin, ADP는 purinergic 收容體와 結合하여 活性化될 때 血小板의 GPⅡa/Ⅲa가 露出되어 纖維素元이 붙어 血小板사이를 連結시켜 줌으로써 血小板 凝集이 일어나게 된다⁸⁻¹⁰.

血小板은 續發性 止血인 二次 止血에도 影響을 미치게 되는데 이는 thr-omboplastin(platelet factor Ⅲ)의 分泌와 accelerin(platelet factor X) 그리고 prothrombin(platelet factor Ⅱ)을 活性化시키는 磷脂質 表面의 提供을 통해서이다. 그러므로 血小板은 가장 重要한 凝固 要因으로 認識되고 있다^{9,84}.

續發性 止血은 內因子系와 外因子系에 의해 accelerin이 活性化되 以後 共通經路를 통해 prothrombin(platelet factor Ⅱ)을 活性化하여 thrombin을 形成해 fibrinogen(platelet factor I)을 活性化하여 纖維素凝塊(fibrin-clit)를 形成하는 過程이다⁸⁻¹⁰.

纖維素 溶解系는 纖維素 凝塊가 생기면 곧 바로 作用하기 시작하는데 纖維素 凝塊에 있는 plasminogen은 內皮細胞에서 放出되는 urokinase type activater(u-PA)와 tissue type activater(t-PA)에 의해 活性化되어 plasmin을 形成하고, 이 plasmin은 纖維素가닥을 分離하고, 纖維素元을 分解하여 凝塊를 融解한다⁸⁻¹⁰.

血液 凝固를 調節하는 機轉은 血液의 流動性을 維持하는 重要한 因子로 內皮細胞와 內皮細胞에서 分泌되는 血小板 附着 抑制 因子인 prosta-cyclin, 亢血栓因子들인 antithrombin, thrombomodulin 등이 있고, 血漿 蛋白質인 protein C와 補助 因子인 protein S 등이 있다^{8-10,84}.

內皮細胞는 血小板에서 分泌하는 強力한 血小板 凝集 因子인 ADP를 adenine nucleotide platelet inhibitor(ANPI)로 轉換시키며 強力한 血小板 凝集 因子인 prostacyclin을 分泌하게되며, 또한 血塊나 血栓과 反應하여 plasminogen activator(PA)를 合成하여 血管內의 纖維素 融解를 增加시킨다⁸⁻¹⁰.

Antithrombin은 hageman factor(platelet factor XII)를 制外한 모든 凝血 因子와 複合體를 이루어 凝固를 遲延시키는 作用은 하는데, 複合體 形成의

速度는 內皮細胞에 있는 heparin과 heparin 類似物質에 의해 促進된다. 이 作用이 亢凝固劑로서의 heparin作用의 根幹이다⁸⁻¹⁰.

Protein C는 內皮細胞 蛋白質인 thrombomodulin과 結合한 後 thrombin에 의해 活性 蛋白質로 變化되고 補助 因子 protein S에 의해 強化되어 platelet factor X과 XⅢ을 非活性化시켜 凝血을 調節한다^{8-10,84}.

그러나 이처럼 서로 相反되는 되는 性質을 가진 여러 因子들이 平衡을 維持하여 非血栓性 表面을 維持하지만 內毒素(endotoxin)나 腫瘍壞死因子 같은 內皮細胞 刺戟 因子나 血液의 異常이 생기면 平衡은 血栓 形成 쪽으로 移動하여 血液 凝固나 血栓症을 誘發하게 된다. 그러나 血栓症의 發生 類型과 이로 인한 損傷은 血液의 흐름 狀態의 差異와 損傷 部位에 따라 달라진다. 血液가 느린 靜脈에서 形成된 血栓은 纖維素가 豊富하며, 赤血球가 많고, 血小板이 적어 赤色血栓이라고도 하는데, 종종 下肢 靜脈에서 發生한 不安定한 塞栓은 肺循環系의 障礙를 發生시키며, 血液의 흐름이 빠른 動脈에서 形成된 凝塊들은 主로 血小板들로 構成되고 纖維素는 거의 없어 白色血栓이라고도 하는데 쉽게 떨어져 末梢部 動脈의 血栓을 誘發하는데, 특히 腦循環系에 흔하여 腦卒中을 포함한 神經學的인 機能 障礙를 일으킨다⁸⁻¹⁰.

以上을 綜合해 보면 血栓 形成은 血管의 內皮와 內皮下 組織과 血小板 그리고 血漿에 存在하는 溶解性 凝固蛋白質들로 形成되는데, 糖尿病, 高血壓, 高脂血症, 肥滿, 內毒素 등에 의해 血管 內膜이 損傷되면 止血시키기 위해 우선 血小板이 血管 組織 損傷 部位에 粘着하고 血小板 形態의 變化가 發生하며, 血小板 凝集이 일어나는 一連의 血栓 形成 段階의 反應이 일어나 血管內 血栓을 形成한다고 할 수 있다.

Platelet aggregation은 一次的인 止血性 栓塞을 만드는 血小板의 能力을 評價하는 法⁸⁵으로 알려져 있는데, 本 實驗에서 *in vitro* 血小板 凝集抑制 能 檢査에서 血小板 磷脂質을 活性化시키는 agonist로 알려진 thrombin과 collagen과 血小板 凝集에 關與하는 ADP를 利用하여 血小板을 完全히

凝集시킨 후 加味通栓化痰湯과 並行 投與하여 血小板 凝集 阻害 效果를 觀察한 것으로 ADP(20 μ M/ml)에 의한 血小板 凝集 抑制는 47.05%, thrombin(0.5U/ml)에 의한 血小板 凝集 抑制는 57.06%로 강한 抑制 效果를 나타냈으며, collagen(50 μ g/ml)에 의한 血小板 凝集 反應 阻害는 2.60%로 微弱한 抑制 效果를 보였다(Table IX).

In vivo 檢査에서 對照群은 collagen과 epinephrine에 의해서 肺塞栓이 誘導되어 8마리 중 죽거나 15分 以上 癱痺가 持續이 되었는데, 比較 物質로 사용한 aspirin 投與群은 8마리 중 3마리만이 죽거나 15分 以上 癱痺가 持續이 되었다. 實驗群은 8마리 중 6마리가 죽거나 15分 以上 癱痺가 持續되어 25%의 抑制 效果를 나타내었다.

Thrombin은 凝固 過程에 있어 여러 機能을 가지는데 가장 主要 役割은 纖維素元을 纖維素로 轉換시키는 것이지만, 그 외에 platelet factor X, XIII을 活性化시키며 血小板 凝集, 顆粒 分泌를 刺戟하는 作用을 하므로 加味通栓化痰湯이 thrombin에 대해서는 強力한 血小板 凝集 防止 作用을 하면서 collagen에 대해서는 凝集 抑制 作用이 微弱한 것으로 보아 血小板이 損傷 部位에 接着하는 것을 防止하는 것보다 血小板의 凝集과 血小板의 分泌 抑制 및 纖維素 凝塊 形成을 妨害하는 抗血栓 作用에 效果가 있음을 알 수 있다. 또한 ADP에 대한 血小板 凝集 過程에도 抑制 能力이 있는 것으로 나타나 血小板 凝固 過程에 作用하여 血栓 形成을 抑制한다고 할 수 있으며, collagen과 epinephrin에 의해 惹起된 肺塞栓으로 白鼠의 死亡과 神經學的인 損傷을 抑制하는 檢査에서 25%의 抑制 效果를 나타내었다(Table X).

血小板 凝固 抑制 檢査結果로 보아 血液의 塞栓을 抑制하는 作用에 있어 cyclooxygenase를 抑制하여 血小板의 分泌를 抑制하는 能力에 있어 aspirin보다는 떨어지지만 thrombin이나 ADP에 의해 惹起되는 血小板 接着과 凝集에 強力한 抑制 作用하는 것으로 나타나 血小板의 凝集과 分泌를 抑制하여 血栓의 生成을 妨害하는 作用이 강한 것으로 思料된다.

虛血性 腦損傷인 腦硬塞의 病態 生理學과 이에

대한 理想的인 治療 方法을 糾明하기 위하여 低酸素症을 誘發시키거나 腦動脈을 閉塞한 非可逆的인 腦硬塞 動物實驗모델이 利用되어 왔으나⁸⁶⁻⁸⁷⁾ 臨床的으로는 腦硬塞의 경우 閉塞 部位의 再灌流가 이루어져 可逆的 腦硬塞모델에 類似하므로⁵⁸⁾ 최근 많은 研究⁸⁸⁻⁸⁹⁾에서는 腦動脈을 結紮하였다가 再開시키는 方法이 使用되고 있다.

腦細胞가 虛血 狀態에 빠지는 경우는 全腦虛血과 局所腦虛血로 나눌 수 있으며 腦細胞의 損傷 機轉은 差異點을 가지고 있다.

全腦虛血은 腦組織이 심한 低酸素症 狀態가 되고 이로 인하여 細胞內 ATP의 減少로 sodium-potassium pump에 障蔽가 오고 sodium의 細胞內 流入에 水分이 受動的으로 따라 들어가 3分 內에 細胞內 浮腫이 誘發되며 5-10分 後에는 lactate의 增加 및 glucose의 消滅이 오게 된다. 이때까지는 可逆性 病變이나, 以後에도 虛血이 계속되면 mitochondria의 損傷으로 ATP가 枯渴되고 磷脂質의 消失과 毒性 酸素라디칼(toxic oxygen radicals)등으로 인한 細胞膜 損傷 그리고 칼슘 濃度의 增加 등이 招來되어 非可逆性 病變으로 進行된다고 알려져 있다.^{8,90)}

이에 반해 局所腦虛血은 심한 虛血 狀態의 中心部와 이를 둘러싸는 不完全한 虛血狀態의 周邊部로 나누어진다. 이 周邊部에서는 側部循環이 部分的으로 腦血流을 供給하고 있어 細胞의 ion 傾斜는 維持되나 電氣的 活性度는 없는 狀態가 되고, 虛血 中心部에서는 全腦虛血과 비슷한 일이 일어난다⁹¹⁾. 그렇지만 이 周邊部에서 腦血流이 限界值 以下로 떨어지면 細胞內 Ca^{++} 이 增加하여 腦細胞의 非可逆的 損傷을 가져올 수 있으므로 金 등^{88-89,91-93)}은 위태로운 腦組織에 腦血流 再開의 重要性이 強調하였다.

本 實驗에서는 全腦虛血을 일으키는 方法으로 細胞內 mitochondria의 cytochrome oxidase의 活性를 抑制하고 電子傳達系에서의 酵素利用을 制限하여 高에너지 磷酸化合物을 枯渴시킴으로써 細胞 毒性을 發顯한다고 알려져 있는 KCN^{10,55)}를 利用하여 ICR系 mouse의 昏睡 時間을 測定하였다. 非致死量의 KCN(1.4mg/kg/20g, i.v.)에 의해 誘發시

킨 ICR系 mouse의 昏睡 時間에 대한 作用을 經時的으로 檢討한 結果 加味通桂化癆湯 投與群에서 昏睡 時間의 短縮 作用이 있었으나 有意性을 없었다.(Table XI).

局所 腦虛血을 일으키는 方法으로 本 實驗에서는 프로브를 이용한 中大腦動脈 閉鎖-再貫流모델을 選擇하였으며, 이 方法은 最近에 開發된 方法으로서 虛血後 再灌流에 의한 影響을 研究할 수 있는 長點을 가지고 있다^{58,89)}.

組織 損傷의 檢證을 위한 TTC溶液의 使用은 心筋 閉塞에 利用된 以後⁹⁴⁾, 腦硬塞 部位를 測定하는데 使用되고 있다^{58,88-90)}. 正常 腦組織에서는 mitochondria內에 存在하는 dehydrogenase와 TTC溶液이 反應하여 formazan이 形成되어 赤色으로 나타나고, 腦硬塞 發生 部位는 細胞內 mitochondria의 非可逆的 損傷으로 dehydrogenase가 消失되어 白色으로 남게 되어 病變 部位를 區分 할 수 있다⁹⁵⁾. 그러므로 時間 經過에 따른 腦硬塞의 變化에 대한 TTC溶液을 利用한 觀察은 動脈 閉鎖後 dehydrogenase의 減少 程度에 左右되며 病變의 進行에 따라 減少 速度가 比例된다고 알려져 있어, TTC溶液의 染色 樣相은 組織의 非可逆的 損傷 程度와 比例되므로 腦硬塞의 時間 變化에 따른 發生 位置 및 크기를 알 수 있다⁹⁶⁾.

腦硬塞에 隨伴되는 腦浮腫은 腦動脈을 閉鎖시킨 直後 數分부터 약 4時間까지 持續되는 cytotoxic edema과 그 후 進行되는 vasogenic edema으로 나눌 수 있다^{89,88)}. 腦動脈의 閉鎖 後 곧 發生하는 輕한 腦浮腫의 原因은 뚜렷치 않으나 blood-brain barrier가 正常인 점으로 보아 cytotoxic edema으로 생각되고 있다. 腦動脈의 閉鎖後 약 2時間부터 微細 血液 循環의 異常이 뚜렷해지고 blood-brain barrier의 破壞가 시작되어 母細血管의 透過性이 變化하며, ion exchange pump 또는 細胞膜의 透過性의 變化로 細胞外의 Na⁺ ion과 水分이 細胞內로 流入되고 細胞內 K⁻ ion이 細胞外로 流出되며 腦組織의 水分 含量이 增加된다. 腦浮腫이 심해지면 微細 血液 循環은 더욱 減退되어 腦硬塞과 腦浮腫을 더욱 惡化시키는 惡循環이 계속된다⁸⁾. 腦硬塞으로 인한 腦浮腫을 豫測하기는 不可能하나 腦動脈의

閉鎖 持續 期間 또는 組織의 壞死程度에 따라 變化를 보이며 動脈閉鎖後 3-4時間부터 始作되고 12-13時間 後에 뚜렷해지며, 3-4日에 頂點에 이르고 1週末-2週 後에 消失된다^{8,88-89)}.

金⁸⁸⁾은 腦硬塞으로 인한 神經學的 缺損에 대해 中大腦動脈 閉塞後 片側의 不全偏癱痺와 回轉 步行, 緊張性 偏位 등이 나타나는데 이것은 閉塞 部位 大腦皮質의 機能 癱痺 또는 正常側 大腦半球의 機能의 亢進되어 나타난다고 說明 할 수 있으며, 時間의 經過에 따라 急激한 回轉 運動이나 緊張性 偏位는 消失되나 反側의 不全癱痺는 계속 持續되는 것으로 報告하고 있다.

本 研究의 目的은 腦硬塞으로 인한 神經學的인 缺損, 虛血 面積 및 浮腫率을 測定하여 加味通桂化癆湯의 虛血性 腦損傷 輕減 效果를 評價하는데 있다.

本 實驗結果 神經學的 缺損 回復率에서 對照群에 비하여 hind limb의 好轉이 觀察(Table XII~XIII)되었으며, 腦虛血 面積과 浮腫率도 實驗群이 對照群에 비하여 顯著히 減少(Table XIV~XV)되어 있어 局所 血流 遮斷 後 再灌流로 惹起된 白鼠의 腦硬塞에 있어 虛血 面積의 縮小와 浮腫의 抑制로 인한 神經學的인 缺損의 回復에 效果가 있는 것으로 나타나 臨床에 있어 腦硬塞의 急性期에 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

그러나 本 實驗에서 짧은 虛血 誘發 時間과 時間의 經過에 따른 再灌流 時의 虛血 面積과 神經學的인 損傷 程度의 차이에 대한 研究가 不足하여 尙後 좀 더 많고 多樣한 實驗群을 통한 研究가 必要하리라 思料된다.

Alzheimer's disease는 老化와 더불어 나타나는 代表的인 退行性 神經 疾患으로써 東洋人 보다는 西洋人에서 많이 發生되는 疾患으로 그 發生原因은 아직까지 明確히 밝혀지지 않았다⁹⁷⁾

Alzheimer's disease는 特徵的으로 腦에 senile plaque가 지나치게 많이 축적되는데 senile plaque는 β -amyloid protein으로 構成되어 있다는 것이 밝혀졌다⁹⁸⁾. 이러한 β -amyloid protein은 amyloid precursor protein (APP)으로부터 proteolytically 分解된 代謝物으로써 이때 關與하는 酵素는 β -secr

etase, γ -secretase로 알려져 있다⁹⁹⁾. 즉, Alzheimer's disease는 APP의 비正常的인代謝로生成되는 β -amyloid protein이神經細胞에蓄積되어神經細胞를죽이기 때문에 일어나는 것으로解釋되고 있다¹⁰⁰⁾. 따라서 많은 研究室에서 *in vitro*¹⁰¹⁾와 *in vivo*¹⁰²⁾에서神經細胞에 대한 β -amyloid protein의 毒性을 보고하였다.

本 研究에서는 PC12 cell에 대한 β -amyloid protein(25-35)의 細胞 毒性과 加味通柎化癆湯을 加했을 때 어느 정도 腦細胞가 保護되는지 살펴보고 腦損傷治療劑로써 加味通柎化癆湯의 價値를 評價하고자 하였다. 加味通柎化癆湯의 細胞 毒性을 觀察한 結果, 實驗에 使用한 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml 및 250 μ g/ml의 濃度에서 전혀 細胞 毒性을 보이지 않았으며(Table 15, Fig. 17), β -amyloid protein(25-35)에 의해 誘導된 PC12 細胞의 細胞 毒性(47.05 \pm 1.96)에 對하여 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml 및 250 μ g/ml 加味通柎化癆湯 抽出物을 前處置한 後 細胞 毒性 保護 效果를 觀察한 結果 250 μ g/ml의 濃度에서는 保護 效果를 보이지 않았으나, 500 μ g/ml와 1000 μ g/ml의 濃度에서 각각 有意性(P<0.05, P<0.01)있는 保護 效果를 나타냈다(Table XVII.).

最近 腦損傷에 關聯되어 nitric oxide(NO)가 注目되고 있다.¹⁰³⁾ NO는 細胞間 또는 細胞內 messenger로서 뿐만 아니라 免役學的으로도 매우 重要하지만 superoxide와 反應하여 反應성이 가장 큰 活性酸素인 hydroxyl radical을 生成하기 때문에 brain aging에 主要한 原因으로 주목받고 있다¹⁰⁴⁾. 따라서 加味通柎化癆湯의 NO 生成에 대한 抑制 效果를 觀察하여 腦損傷 治療劑로써 價値를 評價하고자 하였다.

本 實驗에 使用된 lipopolysaccharide는 cytokine 中の 하나로서 endotoxin이라고 하는데 macrophage에 作用하면 tumor necrosis factor (TNF α)가 仲介되어 一酸化窒素(nitric oxide, NO)를 生成하는 것으로 알려져 있어 RAW cell에 lipopolysaccharide를 처리하여 加味通柎化癆湯을 加했을 때 어느 정도 NO production을 抑制하는지 살펴보고자 하였다.

本 實驗에서 lipopolysaccharide로 誘發한 RAW 細胞의 NO production은 對照群에서는 正常群에

比하여 有意性(P<0.001)있게 增加되었으며 加味通柎化癆湯 抽出物과 lipopolysaccharide를 同時에 處置한 後 NO production에 대한 抑制 效果를 觀察한 結果, 實驗群에서는 對照群에 比하여 有意性(P<0.001)있는 減少를 보였다(Table XVIII.).

이것은 NO가 neuronal cells에 作用하였을 때 free radical을 生成하여 腦損傷¹⁰⁵⁾을 일으키고, 또 free radical은 腦虛血의 再灌流時 腦組織의 損傷을 增幅⁸⁾시키며, 腦浮腫을 惹起할 수 있다¹⁰⁵⁾는 것을 考慮한다면 加味通柎化癆湯이 NO production을 抑制하는 效果가 있어 腦虛血의 豫防과 治療에 活用될 可能性이 있다고 思料된다.

V. 結 論

加味通柎化癆湯이 高脂血症, 血栓症, 全腦虛血 및 局所 腦虛血 誘發 實驗, 腦損傷모델인 amyloid β protein(25-35)으로 誘導된 細胞毒性 및 lipopolysaccharide로 誘發한 RAW 細胞의 NO production에 미치는 影響을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 高 cholesterol食에 의한 高脂血症 誘發 實驗에서 血清 total cholesterol, triglyceride, phospholipid, LDL-cholesterol의 含量은 有意性있는 增加 抑制 效果가 나타났으며, VLDL-cholesterol은 增加 抑制 作用은 나타냈지만 有意性은 없었다. 또한 HDL-cholesterol의 含量은 增加하였으나 有意性은 없었다.
2. Thrombin과 ADP에 의해 誘導된 血小板 凝集을 抑制하였으나 collagen에 의해 誘導된 血小板 凝集을 抑制하는 作用을 나타내지 않았다.
3. Collagen과 epinephrine 混合液에 의해 誘導된 pulmonary thrombosis에 對한 保護 效果 實驗에서 保護 效果를 나타내었다.
4. 全腦虛血 誘發 實驗에서 有意性 있는 KCN 誘發 昏睡時間을 短縮시켰으나 有意性은 없었다.
5. MCA occlusion 의한 局所 腦虛血 誘發 實驗에서 fore limb에 대해서는 神經學的 變化가 없었으나, hind limb에서는 好轉되었다. 또한 虛血 面

積과 浮腫率에 대해서도 有意性있는 減少를 나타내었다.

6. Amyloid β protein(25-35)에 의해 誘導된 PC12 細胞의 細胞 毒性에서 濃度 依存的으로 有意性있는 保護 效果를 나타내었다.

7. Lipopolysaccharide에 의해 誘發한 RAW 細胞의 NO production에 대한 效果 實驗에서 有意性있는 抑制 效果가 나타났다.

以上の 結果들로 미루어 보아 加味通栓化痰湯은 高脂血症으로 誘發된 動脈硬化症과 血栓症 그리고 이들 原因으로 發生한 虛血性 腦硬塞의 急性期の 腦組織 損傷과 神經學的인 缺損의 早期 回復에 臨床的으로 活用될수 있으나 그 機轉에 대해서는 앞으로 더 많은 研究가 進行되어야 할 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 統計廳: 死亡原因統計年譜, 서울, 統計廳, pp.21~22, 27~28, 1997.
2. 鄭紹周, 王新志, 李健章: 中風急症, 天津, 天津科技翻譯出版公私, pp.1~8, 163~165, 174~176, 1994.
3. 徐舜圭: 成人病·老人病學, 서울, 고려의학, pp.107~122, p.186, pp.189~193, 196~201, 1992.
4. 全國韓醫科大學 心系內科學教室 編: 東醫心系內科學, 서울, 書苑堂, (上);pp.439~447, 564~565, 566~568, (下);p.113, 163, pp.336~338, 346~353, 1995.
5. 郎頌志, 劉福喜: 腦心血管急症治療, 天津, 天津科技翻譯出版公私, pp.111 ~114, 117~120, 124~125, 1994.
6. 朱鵬飛, 婁永和, 陳通, 楊傳緒: 中風的中西醫治療及康復, 北京, 中國醫藥科技出版社, pp.1~3, 10~12, 14~18, 51~52, 1992.
7. 戴曉絕: 腦動脈硬化症 100例辨治, 雲南中醫學院雜誌, 17(4):44~45, 1996.
8. 大韓病理學會 編: 病理學, 서울, 高文社, pp.112~122, 125~129, 591~593, 1218~1220,

1994.

9. Isselbacher, K.J.: Principles of internal medicine(13th ed.), 서울, 정담, pp.341~346, 1145~1165, 1189~1119, 1944~1958, 2234~2241, 2409~2435, 1997.

10. 서울대학교 의과대학 내과학교실: 내과학, 서울, 군자출판사, pp.50~53, 176~183, p.188, pp.564~568, 1996.

11. 金聖勳: 東醫病理學, 대전, 한림원, pp.348~356, 1994.

12. 柳彦浩, 李弘揆: 국가 고지혈증 치료지침 제정의 의의, 대한내과학잡지, 39(5):577~591, 1996.

13. 金辰圭: 고지혈증과 동맥경화의 발생기전, 임상약학, 9(11):51~58, 1991.

14. Tell, G., Crouse, J.R. and Furberg, C.D.: Relation between blood lipide, lipoproteins, and cerebrovascular atherosclerosis. Stroke, 19:423~430, 1989

15. Iribarren, C., Jacobs, J.D.R., Sadler, M., Claxan, A.J. and Sindey, S.: Low total serum cholesterol and intracerebral hemorrhagic stroke. Stroke, 27:1993~1998, 1996.

16. Zenker, G., Koltringer, P., Bone, G., Niederkorn, K., Pfeiffer, K. and Jurgens, G.: Lipoprotein(a) as a strong indicator for cerebrovascular disease. Stroke, 17(5):942~945, 1986.

17. 張隱庵, 馬元臺: 黃帝內經素問靈樞合編, 臺北, 臺聯國風出版社, (素問);p.20, 66, 91, 198, 204, 218, 286, 291, 294, 408, 412, 422, 629, (靈樞);p.180, 199, 306, 388, 405, 435, 445, 468, 1972.

18. 巢元方: 諸病源候論, 北京, 人民衛生出版社, pp.19~24, 1983.

19. 孫思邈: 備急千金要方, 北京, 人民衛生出版社, pp.153~154, 1982.

20. 劉完素: 劉河間三六書, 서울, 成輔社, pp.37~41, 281~282, 341~342, 1976.

21. 李 杲: 東垣十種醫書, 臺北, 五洲出版社, pp.67~68, 1981, .

22. 方 廣: 丹溪心法附餘, 서울, 大星文化社,

- pp.67~68, 1982.
23. 王清任: 醫林改錯, 서울, 一中社, pp.61~65, 1992.
 24. 唐容川: 血證論, 台北, 力行書局有限公司, pp.115~120, 1973.
 25. 孫立, 張家興: 瘀血證89例腦阻抗血液圖分析, 實用中西醫結合雜誌, 9(1):17, 1996.
 26. 楊官成: 通栓化癆湯治療混合性中風急性期臨床觀察, 新中醫, 12:30~31, 1994.
 27. 崔賢, 文九, 文錫哉: 中風의 “血癆”論的考察 및 活血祛癆法에 依한 治療 近況, 大韓韓醫學會誌, 11(1):145~150, 1991.
 28. 梁曉鷹: 益氣活血法治療急性腦血管病31例, 雲南中醫中藥雜誌, 17(5):10~12, 1996.
 29. 吳玉生, 張道然, 王占奎: 補陽還五湯治療早期腦梗塞60例療效評估, 遼寧中醫雜誌, 23(11):494, 1996.
 30. 李克光: 金匱要略, 人民衛生出版社, 北京, pp.456~464, 1989.
 31. 金定濟: 瘀血에 對한 考察, 東洋醫學, 8:31, 1977.
 32. 有地滋: 瘀血概念의 重要性, 東洋醫學, 26:60~65, 1983.
 33. 崔昇勳: 瘀血의 病理에 관한 文獻的 考察, 大田大論文集, 4:399~406, 1985.
 34. 康舜洙: 韓醫學에서의 瘀血에 대한 概念, 大韓韓醫學會誌, 6(2):138~140, 1980.
 35. 宋鷺冰: 中醫病因病機學, 北京, 人民衛生出版社, pp.116~121, 1987.
 36. 申大澈, 金瑩均: 紅花四物湯 및 丹蔘飲이 血栓生成抑制이 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌, 16(2):136~144, 1995.
 37. 金玼德, 宋孝貞: 血栓症 및 高粘度血症에 關한 補陽還五湯의 實驗的 研究, 東醫病理學會誌, 3:30~46, 1988.
 38. 全英秀, 金聖勳: 補陽還五湯과 加味補陽還五湯이 Endotoxin으로 誘發된 白鼠의 血栓症에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, 8:157~176, 1993.
 39. 姜順熙, 崔昇勳, 安圭錫: 清泡逐癆湯 및 蜂毒이 瘀血病態模型에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 16(1):351~366, 1995.
 40. 尹炫珉, 張慶田, 宋春浩, 安昌範: 蚯蚓水鍼이 endotoxin으로 誘發된 白鼠의 血栓症에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 14(1):478~493, 1997.
 41. 金泳兌, 韓相源: 水蛭 및 紅花藥鍼이 endotoxin으로 誘發된 血栓症에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 14(1):464~477, 1997.
 42. 陳啓俊, 張存志: 活血化癆法治療老年急性期出血性腦血管病42例報告, 中國中西醫結合雜誌, 4(2):80~85, 1991.
 43. 張文穎: 瘀血症與活血化癆, 實用中西醫結合雜誌, 9(3):131~132, 1996.
 44. 王銳鋒: 補陽還五湯治療關節性紅斑46例療效觀察, 實用中西醫結合雜誌, 9(7):432, 1996.
 45. 石志藝, 陳柏銘, 陳濤: 血癆證患者血小板 α -顆粒膜蛋白, 內皮素測定, 中醫雜誌, 37(4):239, 1996.
 46. 毛騰敏: 丹蔘當歸對老年大鼠血癆的 影響, 中國中西醫結合雜誌, 8(10): 635, 1988.
 47. 趙南仁, 崔昇勳, 安圭錫: 丹蔘飲과 그 構成藥物이 瘀血病態模型에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 12(2):66~77, 1991.
 48. 李永旭: 地龍의 充血栓作用에 대한 實驗的 研究, 大田大學校大學院 碩士學位論文, 1998.
 49. 문용준: 붉은지렁이(lumbricus rubellus)의 두가지 혈전용해효소에 관한 생화학적 연구, 연세대학교의과대학원 석사학위논문, 1994
 50. Naito, M., Yasue, M., Asai, K., Yamada, K., Hayashi, T., Kuzuya, M., Funaki, C., Yoshimine, N. and Kuzuya F.: Effects of dexamethasone on experimental atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 38(3):255~264, 1992.
 51. Panagiotopoulos, S., O'Brien, R. C., Bucala, R., Cooper, M. E. and Jerums, G.: Aminoguanidine has an anti-atherogenic effect in the cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis, 136(1):125~131, 1998.
 52. 김미정: 왕고들빼기로 부터 얻은 Triferpene Acetate의 혈청 콜레스테롤 저하 효과, J.

Pharmacogn, 28(1):21~25, 1997

53. Born, G.V.R. and Cross, M.J.: The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.*, 168:178~195, 1968

54. Kimura, Y., Tani, T. and Watanabe, K.: Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, 35(II):1144~1149, 1985.

55. Schubert, J. and Brill W.A.: Antagonism of experimental cyanide toxicity in relation to the in vivo activity of cytochrome oxidase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 162(2):352~359, 1968.

56. Nagasawa, H. and Kogure, K.: Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 20:1037~1043, 1989.

57. Benderson, J.B., Pitts, L.H., Tsuji, M., Nishimura, M.C., Davis, R.L. and Bartkowski, H.: Rat middle cerebral artery occlusion; Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17:472~476, 1986.

58. 정혜주, 김동섭, 김순선, 박인순, 이지선, 성기욱, 장영섭: 뇌허혈 동물모델을 이용한 뇌기능개선제의 효능에 관한 연구(I), 국립보건안전연구원보, 7(1):178~185, 1994

59. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., McMahon, J., Visca, D., Warren, J.T., Kennedy, S. and Boyd, M.R.: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82(13):1107~1112, 1990.

60. Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D.S.A., Monks, A. and Boyd, M.R.: Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generate with a tetrazolin assay versus a protein assay against a diverse panel of human cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82(13):1113~1118, 1990

61. 이복수: Regulation of nitric oxide synthase

gene expression by cytokines in murine macrophages, 충남대학교 생물학과 대학원석사학위논문, 1994.

62. 陳貴廷, 楊思澍: 實用中西醫結合診斷治療學(上), 서울, 一中社, pp.329~354, 1992..

63. 나영설, 윤상협, 민병일: 최근 뇌졸중에 대한 역학적 고찰, *경의의학*, 7(3):280~286, 1992.

64. 尹鎭九: 腦卒中에 關한 臨床統計의 研究, 서울, 慶熙大學校大學院, 19:15~21, 1989.

65. 金世吉: 中風의 病因의 意味糾明과 中風의 原因 및 治療에 對한 東西醫學的 比較, 대한의학학회지, 16(1):96~117, 1995.

66. 王安道: 東垣十種醫書(醫經溯洄集), 서울, 大星出版社, p.635, 1983.

67. 金完熙, 崔達永: 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp.59~62, 193~194, 371~375, 1985.

68. 辛民教: 臨床本草學, 서울, 永林出版社, pp.372-374, 662~663, 1989.

69. 康秉秀, 高雲彩, 金先熙, 盧昇鉉, 徐榮培, 宋昊竣, 辛民教, 安德均, 李尙仁, 李暎鍾, 李棟熙, 朱榮承: 本草學, 서울, 永林社, pp.419~420, 509~510, 1991,

70. 申佶求: 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp.448~450, 519~521, 1988.

71. 崔昇勳: 血府逐瘀湯이 血栓症과 皮下血腫에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士學位論文, 1986.

72. 余冬嚴, 魏康伯, 沃興德: 血府逐瘀湯對氣滯血瘀型高脂血症降脂作用的臨床觀察與實驗研究, 中西醫結合雜誌, 8(10):601~603, 1988.

73. 陳定生, 陳曉月, 高金鳳: 血府逐瘀湯化痰法治療腦動脈硬化性精神障礙40例, 東西醫結合雜誌, 9(12):753~754, 1989.

74. 金宗星: 고지혈증과 뇌혈관질환, 임상약학, 9(11):71~75, 1991

75. 서울대학교의과대학: 내분비학, 서울, 서울대학교출판부, pp.373~376, 1992.

76. 高文社編輯部: 臨床檢査法提要, 서울, 高文社, pp.311~455, 711~713, 1984.

77. 김시영, 김옥희, 김영설, 김명식, 배종화, 송

정상: 뇌졸중과 HDL subfraction에 관한 연구, 대한내과학잡지, 28(8):790~794, 1983.

78. 이귀녕, 이종순: 임상병리과일, 서울, 의학문화사, pp.107~109, 124~129, 635~637, 919~922, 931~934, 1993.

79.李建齋, 王嘉瑾, 牛慶田, 李培瑛, 王 抒, 越淑華, 正新德, 丁翠娥: 腦血管疾患患者高密度脂蛋白降低及其意義, 中華醫學雜誌, 70(5):244~247, 1990.

80. The Dutch TIA Study Group: The dutch TIA trial: Protective effects of low-dose aspirin and atenolol in patients with transient ischemic attacks or nondisabling stroke. Stroke, 19:512~517, 1988.

81. Lee, T.K., Chen, Y.C., Iien, I.N., Liu, M.C. and Huang, Z.S.: Inhibitory effect of acetylsalicylic acid on platelet function in patients with completed stroke or reversible ischemic neurologic deficit. Stroke, 19:566~570, 1988.

82. Sze, P.C., Reitman, D., Pincus, M.M., Sacks, H.S. and Chalmers, T.C.: Antiplatelet agents in the secondary prevention of stroke. Stroke, 19:436~442, 1988.

83. Turcani, P., Gotoh, F., Ishihara, N., Tanaka, K., Gomi, S., Takashima, S. and Mihara, B.: Are blood platelets involved in the pathogenesis of ischemic brain edema in gerbils?. Stroke, 19:486~489, 1988.

84. Dulli, D.A., Luzzio, C.C., Williams, E.C. and Schutta, H.S.: Cerebral venous thrombosis and activated Protein C resistance. Stroke, 27:1731~1733, 1996.

85. Gresele, P. and Zoja C.: Dipyridamole inhibits platelet aggregation in whole blood. Thrombo. Hemostasis, 50(4):852~856, 1983.

86. 康永祿: 遠志와 石菖蒲의 單獨 및 混合投與가 白鼠의 腦損傷에 미치는 影響, 大田大學校大學院 韓醫學碩士論文, 1997.

87. 李源哲: 蘇合香元の 實驗的 腦硬塞 흰쥐의 局所腦血流量 및 梗塞面積에 미치는 影響, 東國大學校大學院韓醫學碩士學位論文, 1996.

88. 金賢執: 局所 腦硬塞 急性期에서의 再灌流에 關한 實驗的 研究, 서울 大學校大學院 博士學位論文, 1990

89. 宋東植: 흰쥐의 가역적과 비가역적 허혈성뇌경색모델에서 중대뇌동맥 폐쇄후 시간경과에 따른 뇌경색의 크기, 啓明大學校 碩士學位論文, 1994.

90. 신용철, 신규만: 급성 국소 허혈성 뇌부종으로 인한 뇌조직의 생화학적 변화에 대한 실험적 연구, 대한신경외과학회지, 18(4):525~533, 1989.

91. Astrup, J., Sjesio, B.K. and Symon, L.: Thresholds in cerebral ischemia—the ischemic penumbra. Stroke, 12:723~725, 1981.

92. Chopp, M., chen, H. and Dereski, M.O.: Mild hypothermic intervention after graded ischemic stress in rats. Stroke, 22:37~43, 1991.

93. Siesjo, B.K. and Bengtsson, F.: Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression; a unifying hypothesis. J. Cereb. Blood Flow Metab., 9:127~140, 1989.

94. Fallon, J.T.: Simplified method for histochemical demonstration of experimental myocardial infarct. Circulation, 60:11~42, 1979.

95. Nachlas, M.M., Tson, K.C., Souza, E.D., Cheng, C.S. and Seligman, A.M.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J. Histochem. Cytochem., 5:420~436, 1963.

96. Fine, G., Morales, A. and Scherpella, J.: Experimental myocardial infarction, Arch Path, 82:4~8, 1966.

97. 김진수 : Alzheimer's disease의 신경 화학적 변화에 관한 고찰, 대한신경과학회지, 3(1):399~401, 1985.

98. Glenner, G.G. and Wong, C.W.: Alzheimer's disease; initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem. Biophys. Res. Commun., 120(3):885~890, 1984.

99. Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, M.N., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Mueller-Hill, B.: The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature.*, 325:733~736, 1987.

100. Selkoe, D.J.: Alzheimer's disease; a central role for amyloid. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 53(5):438~447, 1994.

101. Mattson, M.P., Tomaselli, K.J. and Rydel, R.E.: Calcium -destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic FGF. *Brain Res.*, 621:35~49, 1993.

102. Kowall, N.W., Beal, M.F. Busciglio, J., Duffy, L.K. and Yankner, B.A.: An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7247~7251, 1991.

103. Gulyaeva, N., Onufriev, M.V. and Stepanichev, M.Y.: NO synthase and free radical generation in brain regions of old rats; correlations with individual behaviour. *Neuro. Report*, 6:94~96, 1994.

104. Beckman, J. S.: Peroxynitrite versus hydroxy radical; the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 738:69~75, 1994.

105. Abe, K., Yuki, S., and Kogure, K.: Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke*, 19:480~485, 1988.