

加味鷄血藤湯이 Glutamate receptor와 Free radical 및 뇌손상 보호에 미치는 영향

안중석 · 김동희¹ · 김윤식 · 이용구³ · 박종오 · 남궁옥² · 설인찬*

대전대학교 한의과대학 순환기내과, 1:대전대학교 한의과대학 병리학교실, 2:대전대학교 한의과대학 신경생리학교실, 3:대전대학교 부속한방병원 내과

Study on the Effect of Gamigehyuldeung-tang on Gultamate Receptor, free Radical and Brain Damage in Rats

Jong suk An, Dong Hee Kim¹, Yun Sik Kim, Young Gu Lee³, Jong Ho Park, Uk Namgung², In Chan Seol*

Department of internal medicine, Collage of Oriental Medicine, 1:Department of Pathology, Collage of Oriental Medicine, 2: Department of Neurophysiology, Collage of Oriental Medicine, 3: Department of internal medicine, Collage of Oriental Medicine, Daejeon University.

This study was investigated to prove the effect of GMGHT on the gultamate receptor, free radical and brain damage in rats sujected to Brain Ischemia The results were as follows ; 1. GMGHT showed significant inhibitory effect of GMGHT on LDH release induced by NMDA, AMPA, and kinate. 2. GMGHT showed significant inhibitory effect of GMGHT on LDH release induced by BSO and Fe²⁺. 3. GMGHT decreased coma duration time in a infatal dose of KCN and showed 30% of survival rate in a fatal dose. 4. GMGHT decreased ischemic area and edema incited by the MCA blood flow block. 5. GMGHT showed improvement of forelimb and hindlimb test after MCA occlusion in neurological exemination. 6. GMGHT showed no significant change after MCA occlusion in pathological observation as normal group. These results indicate that GMGHT can be used in the brain damage sujected to Brain Ischemia. Further study will be needed about the functional mechanism and etc.

Key words : Gamigehyuldeung-tang(加味鷄血藤湯), brain damage, LDH, MCA occlusion

서 론

우리나라 사망 원인 수위를 차지하고 있는 循環器疾患¹⁾중에서 腦虛血로 인한 腦卒中은 가장 보편적인 형태이다. 뇌허혈은 고령인구에서 발생 빈도가 매우 높으며 이로 인한 뇌기능 소실로 불구가 되거나, 혼수상태에 빠질 수 있으며, 심한 경우에는 사망에 이르게 된다²⁻⁴⁾. 뇌허혈은 뇌혈관폐쇄로 인하여 뇌에 산소와 혈당 공급의 소실, 세포막 붕괴와 에너지 생산과정의 와해 등으로 인한 세포대사의 변화로 결국 세포괴사에 이르게 된다⁵⁾. 뇌허혈에 의한 뇌신경세포 손상의 정도를 결정하는 주된 결정요소는 허혈의 기간과 이 기간 중의 뇌혈류의 정도에 따라 달리하게 된다⁶⁻⁷⁾. 최근의 뇌허혈에 대한 연구결과에 따르면 뇌허혈 손상의

기전은 흥분성 아미노산의 과도한 분비, 손상된 칼슘항상성, 산소 free radical의 생성증가 등이 추정되고 있다⁸⁻¹²⁾. 허혈성 뇌혈관질환이 발생한 후에는 혈전용해제를 제외하고는 허혈에 의해 야기되는 뇌신경세포 손상을 보호해 줄 수 있는 적절한 치료제가 현재로서는 없는 실정이며, 혈류를 회복시키거나 세포내로의 칼슘유입을 막는다는 초기 중재가 신경세포를 죽음으로부터 피할 수 있는 치료적 가능성으로 제시되고 있다^{2,4-6)}. 加味鷄血藤湯은 鷄血藤, 獨活, 蒼耳子, 藿香, 山查肉, 紫蘇葉, 木香, 冬瓜子, 天南星, 大腹服, 半夏, 陳皮, 白朮, 茯苓, 厚朴, 桔梗, 川芎, 知母, 黃柏, 甘草, 白芷로 構成되어 祛風除濕, 活血行氣, 割痰 등의 효능이 있어 대전대학교부속한방병원에서 中風 초기환자 치료에 사용되어 온 처방이다. 이에 저자는 加味鷄血藤湯이 초기 중환자의 뇌신경세포손상을 보호하는 작용기전을 검증하여 신규 약물을 개발하고자 NMDA, AMPA, kainate로 유발된 뇌신경 세포손상에 대한 방어작용, BSO, Fe²⁺ 등의 free radical로 인한 뇌

* 교신저자 : 설인찬, 대전광역시 서구 대흥동, 대전대학교 부속한방병원 · E-mail : seolinch@dju.ac.kr, Tel : 042-229-6805 · 접수 : 2003/03/22 · 수정 : 2003/04/20 · 채택 : 2003/05/28

신경세포손상에 대한 방어작용, KCN을 이용한 全腦虛血에 대한 효과 및 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 局所腦虛血에 대한 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 180~250g의 Sprague-Dawley계(SD) 웅성 rat와 18~20g의 International Cancer Research계(ICR) mouse를 충북 음성에 있는 대한실험동물센터에서 구입하여 사용하였고, 실험 당일까지 고형 사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4%이상 삼양사 배합 사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃, 상대 습도 50±10%, 조명 시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약 물

본 실험에 사용한 加味鷄血藤湯(GMGHT)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하였고, 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Compositions of Gamigehyuldeung-tang

| 韓 藥 名 | 學 名 | 用 量(g) |
|--------------|----------------------------------|--------|
| 鷄 血 藤 | Spatholobus suberectus | 8.0 |
| 蒼 耳 子 | Xanthium strumarium | 8.0 |
| 獨 活 | Angelica pubescens f. biserrata | 8.0 |
| 藿 香 | Pogostemon calbin | 6.0 |
| 山 査 | Crataegus pinnatifida var. major | 6.0 |
| 蘇 葉 | Perilla frutescens | 6.0 |
| 木 香 | Aucklandia lappa | 4.0 |
| 冬 瓜 子 | Benincasa hispida Cong. | 4.0 |
| 南 星 | Arisaema amurense var. serratum | 4.0 |
| 大 腹 皮 | Areca catechu | 2.0 |
| 半 夏 | Pinellia ternata | 2.0 |
| 陳 皮 | Citrus unshiu | 2.0 |
| 白 朮 | Atractylodes macrocephala | 2.0 |
| 茯 苓 | Poria cocos | 2.0 |
| 厚 朴 | Magnolia officinalis | 2.0 |
| 桔 梗 | Platycodon grandiflorum | 2.0 |
| 川 芎 | Cnidium officinale | 2.0 |
| 知 母 | Anemarrhena asphodeloides | 2.0 |
| 黃 柏 | Phellodendron amurense | 2.0 |
| 甘 草 | Glycyrrhiza uralensis | 2.0 |
| 白 芷 | Angelica dahurica | 2.0 |
| Total amount | | 82.0 |

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 Sigma(U.S.A.)에서 구입한 buthionine sulfoximine(BSO), kainate N-methyl-D-aspartate(NMDA), ferrous chloride(Fe²⁺), α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid(AMPA), potassium cyanide (KCN), dulbecco's phosphate

buffered saline(DPBS-A), cresyl fast violet, paraformaldehyde, 3.8% sodium citrate, 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazoliumchloride와 중외제약(Korea)에서 구입한 gerorane(Enflurane 제제), normal saline과 Bayer Dental(Japan)에서 구입한 xantopren VL, optosil-Xantopren activator 등을 사용하였다. 기기는 serum separator(녹십자, Korea), minos-ST(Cobas Co., France), centrifuge(Beckman Co., U.S.A.), rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Switzerland), deep freezer(Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), autoclave(Hirayama, Japan), ultrasonic cleaner(Branson Ultrasonics Corp., U.S.A.), roller mixer(Gowon scientific technology Co., Korea), vortex(Vision Co., Korea), brain matrix(ASI Instrument, Warren, MI., U.S.A.), royal Multi-Plus(Royal Medical Co., Korea), camera(Nikon, Japan), ACL-100 (Instrumentation Laboratory, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 검액의 제조

GMGHT 2첩을 3,000ml round flask에 넣고 증류수 2,000ml 을 넣은 후, 3시간 가열 추출, 침전물을 3회 여별(3M filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 -70℃ deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 1첩당 8.5 g 의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 뇌손상 보호효과 실험

(1) In vitro test

① 대뇌 피질 신경세포 배양

신경세포의 배양을 위해서 15일 된 mouse 태아의 neocortices를 분리하여 조직을 단일 세포로 나누는 후 1×10⁵/well 의 세포를 5% horse serum, 5% fetal bovine serum, 2mM glutamine, 21mM glucose가 포함된 Eagle's minimal essential media(Eagle's salts, supplied glutamine-free)인 배양액을 이용하여 100μg/ml poly-D-lysine과 4μg/ml laminine로 coating된 24 well plate에 분주하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 3-5 일째에 glia의 번식을 억제하기 위해 Ara-C 로 처리한 후, DIV 7-10 이후에 실험을 하였다.

② 흥분성 세포독성의 유발과 분석

Neuron과 glia가 포함된 대뇌 피질 세포는 excitotoxins (NMDA 20uM, AMPA 20uM, kainate 50uM)를 처리하여 21mM glucose와 26.5mM bicarbonate가 포함된 Eagle's minimal essential media에 24 시간 동안 배양하였다. 신경 세포사는 24 시간 후 죽은 세포로부터 배지로 유리된 LDH 활성을 측정하여 정량화하였다.

③ 산화적 독성의 유발과 분석

Neuron과 glia가 포함된 대뇌 피질 세포는 oxidative stress(Fe²⁺ 100uM, buthionine sulfoximine 10mM)를 처리하여 21mM glucose와 26.5mM bicarbonate가 포함된 Eagle's minimal essential media에 24시간동안 배양하였다. 신경 세포사는 24시

간 후 죽은 세포로부터 배지로 유리된 LDH 활성을 측정하여 정량화하였다.

(2) In vivo test

① 전뇌허혈 유발 실험

전뇌허혈 모델은 Schubert¹³⁾의 방법에 준하였다. GMGHT 투여군은 하루에 20g ICR mouse를 기준으로 검액 5.6mg/20g/day을 생리식염수 0.2ml에 용해시켜 oral zonde(대중기기, Korea)를 이용하여 1회 경구 투여하였다. 대조군은 검액을 녹일 때 사용한 동량의 생리식염수를 경구투여 하였다. 경구투여 30분 후에 비치사량인 1.87mg/kg KCN을 ICR mouse 미정맥에 주사한 후 정향 반사를 소실한 후, 정향 반사를 회복할 때까지의 시간을 측정하였다. KCN 유발 생존시간 측정은 경구투여 30분 후에 치사량인 3.0mg/kg KCN을 미정맥 주사하여 치사율을 보았다.

② 국소 뇌허혈 유발 실험 (Middle Cerebral Artery Occlusion:MCA)

SD rat 8마리를 1군으로 하여 대조군과 GMGHT 투여군으로 구분하였다. 중대뇌동맥(MCA) 폐쇄 2시간 전에 실험 rat의 체중을 측정하고 GMGHT 56.6mg/200g/day을 생리식염수 2ml에 용해시켜 oral zonde(대중기기, Korea)를 이용하여 경구 투여한 후 중대뇌동맥 폐쇄 실험을 하고 마취에서 깨면 신경학적 검사를 하였다. 국소 뇌허혈 유발 24시간 후 희생하고 뇌절편 8개를 만들어 부종율과 허혈 면적을 계산하였다.

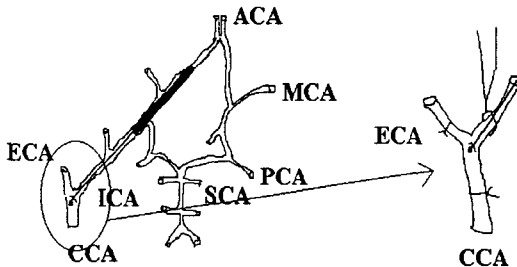


Fig. 1. Schematic representation of position of silicone rubber cylinder during occlusion of right middle cerebral artery(MCA). ACA : Anterior cerebral artery. PCA : Posterior cerebral artery. ICA : Internal carotid artery. ECA : External carotid artery. CCA : Common carotid artery. SCA : Superior cerebral artery.

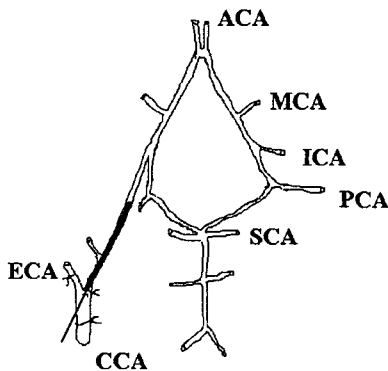


Fig. 2. Schematic representation of position of silicone rubber cylinder during occlusion of right middle cerebral artery(MCA). ACA : Anterior cerebral artery. PCA : Posterior cerebral artery. ICA : Internal carotid artery. ECA : External carotid artery. CCA : Common carotid artery. SCA : Superior cerebral artery

③ Silicon rubber cylinder 제작

Silicon rubber cylinder 제작은 Nagasawa¹⁴⁾ 등의 방법에 따라 4-0 규격의 나일론 봉합사(Deknatel Inc., Japan)를 적당한 길이로 잘라 열을 가해 한 쪽 끝에 매듭을 만들었다. 총 길이를 18mm로 만든 후 경화제를 섞은 silicon을 약 0.3mm 두께로 매듭 반대편에 얇게 8mm 두께로 덧씌워 silicon rubber cylinder를 만들었다.

④ 국소 뇌허혈 유발

Rat을 수술대에 고정시키고 Royal Multi-Plus(Royal Medical Co, Korea)를 사용하여 N₂O(아산화질소)와 O₂(산소)의 비율을 7:3으로 조정하여 enflurane로 흡입 마취하였다. Nagasawa¹⁴⁾의 방법에 따라 목 중앙을 절개하고 미주 신경에 손상을 주지 않도록 주의하면서 우측 총경동맥, 내경동맥 및 외경동맥을 분리한 뒤 총경동맥과 외경동맥을 결찰하고 곧바로 외경동맥과 내경동맥의 분지에 매듭을 제외한 프로브 전체를 삽입한 뒤 삽입부위 바로 위쪽을 결찰함으로써 동측 중대뇌동맥을 폐쇄하였다. 총 수술 시간은 30분 이내로 하였으며, 직장온도계를 사용하여 체온 하강을 판정하였고 적외선을 비추면서 보온하였으며, 중대뇌동맥을 폐쇄하고 60분 동안 N₂O와 O₂를 90%와 10% 비율로 하여 저산소 상태를 유발하였으며 폐쇄 120분 후에 프로브를 1cm정도 당겨 재관류를 행하였다.

⑤ 허혈면적 및 부종률 측정

수술 24시간 후에 rat에서 뇌를 꺼내어 brain matrix(ASI Instruments, Warren, MI, U.S.A.)를 이용하여 2mm두께의 coronal brain slice를 얻은 후 이 중 8 slice만을 선택하여 2% triphenyltetrazolium chloride (TTC) 용액을 가하고 37°C에서 20분간 배양하였다. TTC에 의해 정상 조직은 짙은 빨간색으로 염색되나, 허혈이 일어난 조직은 염색되지 않음으로써 정상 조직과의 구분이 가능하였다. 배양 종료 후 바로 사진을 찍어 현상하고, 염색된 조직을 10% formalin neutral buffer로 고정시켰다. coronal slice에서 허혈면적을 측정하였고, 허혈면적 및 부종율은 아래의 식에 의해 산출하였다¹⁵⁾.

$$\text{虛血面積(\%)} = \frac{C}{A+B} \times 100$$

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

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)

⑥ 신경학적 검사

중대뇌동맥 폐쇄 후, 저산소증 유발 후 및 재관류 후에 대한 각각의 신경학적 검사를 실행하여 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 신경학적 결손 정도를 측정하였다. 신경학적 결손 정도는 Bederson¹⁶⁾의 방법에 의하여 그 정도를 forelimb은 4등급으로, hindlimb은 2등급으로 나누어 점수화 하였으며 증상에 따른 등급 분류는 Table 2와 같다.

⑦ 조직학적 관찰

각 실험군으로부터 적출한 뇌조직은 전두엽으로부터 2mm 간격으로 절개한 다음 허혈성 손상의 육안적 정도를 파악하기 위해 각 부분들은 TTC 염색 후 즉시 4% paraformaldehyde 고정액

에 24시간 동안 고정하였다. 고정이 완료된 각 조직들은 흐르는 수돗물에서 12시간 수세 후 통상의 방법에 따라 알코올 농도 상승순으로 탈수 및 xylene에 투명 과정을 거친 다음 파라핀 블록을 제작하였다. 허혈성 손상에 의한 신경세포의 손상 정도는 Nissl 소체에 대한 특수 염색으로, 파라핀 블록을 이용하여 4 μ m 두께로 파라핀 절편을 만들어 탈파라핀 및 함수과정을 거친 다음 0.1% cresyl fast violet 염색액에 실온에서 30분간 염색 후 95% alcohol로 탈색하고 탈수 및 투명과정을 마친 다음 봉입하여 광학현미경(Olympus-BH2, Japan)하에서 검경 및 사진 촬영하였다.

Table 2. The Neurologic Examination Grading System

| | Grade | Neurologic examination |
|-----------|---------|--|
| Fore-limb | Grade 0 | No deficit |
| | Grade 1 | Forelimb flexion when suspended by the tail |
| | Grade 2 | Reduced forepaw resistance to lateral push |
| | Grade 3 | Circling behaviour during suspension (body twisting) |
| Hind-limb | Grade 0 | Immediate placement of the behind back on to the table(normal) |
| | Grade 1 | No limb placement / movement |

(3) 통계처리

실험 결과는 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리하였으며 P<0.05 이하의 수준에서 유의성을 검정하였다.

성 적

1. In vitro test

1) 세포손상에 대한 방어효과

(1) NMDA에 의한 세포손상에 대한 방어효과

대조군은 62.08 \pm 4.62(%), GMGHT를 100, 300, 1000, 2000 μ g/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 73.84 \pm 2.21(%), 59.87 \pm 5.45(%), 32.88 \pm 6.30(%), 24.50 \pm 5.97(%)로 나타나 1,000 μ g/ml 농도 이상의 실험군에서 유의성있게 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 3).

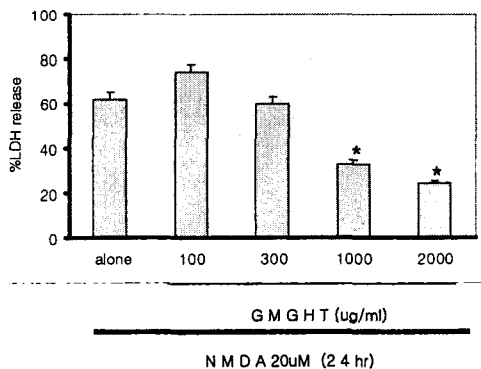


Fig. 3. Inhibitory effect of GMGHT on LDH release induced by NMDA

(2) AMPA에 의한 세포손상에 대한 방어효과

대조군은 46.07 \pm 1.50(%), GMGHT를 100, 300, 1,000, 2,000 μ g/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 38.19 \pm 2.58(%), 27.03 \pm 2.20(%), 16.01 \pm 3.31(%), 14.87 \pm 3.38(%)로 나타나 100 μ g/ml 농도 이상의 실험군에서 유의성있게 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 4).

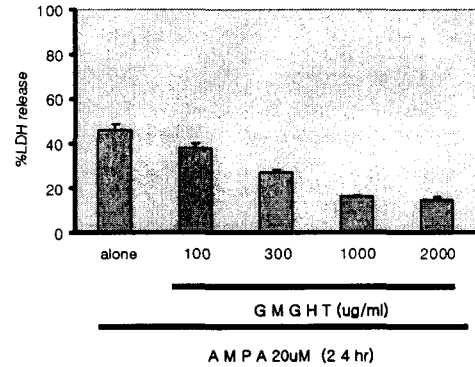


Fig. 4. Inhibitory effect of GMGHT on LDH release induced by AMPA

(3) Kainate에 의한 세포손상에 대한 방어 효과

대조군은 47.25 \pm 6.56(%), GMGHT를 100, 300, 1,000, 2,000 μ g/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 25.60 \pm 4.24(%), 18.45 \pm 3.05(%), 19.05 \pm 1.62(%), 9.54 \pm 2.10(%)로 나타나 100 μ g/ml 농도 이상의 실험군에서 유의성있게 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 5).

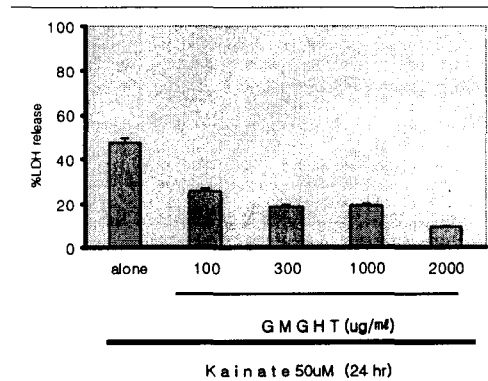


Fig. 5. Inhibitory effect of GMGHT on LDH release induced by Kainate

2) free radical에 의한 세포손상에 대한 방어효과

(1) BSO에 의한 세포손상에 대한 방어효과

대조군은 52.63 \pm 5.41(%), GMGHT를 100, 300, 1,000, 2,000 μ g/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 22.75 \pm 4.17(%), 6.46 \pm 3.18(%), 12.07 \pm 2.97(%), 26.50 \pm 7.31(%)로 나타나 100, 300, 1000 μ g/ml 농도로 투여한 실험군에서 유의성 있게 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 6).

(2) Fe²⁺에 의한 세포손상에 대한 방어 효과

대조군은 57.34 \pm 3.07(%), GMGHT를 100, 300, 1,000, 2,000

μg/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 27.46±5.03(%), 39.17±3.19(%), 17.44±3.89(%), 19.90±2.08(%)로 나타나 대조군에 비하여 모든 실험군에서 유의성 있게 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 7).

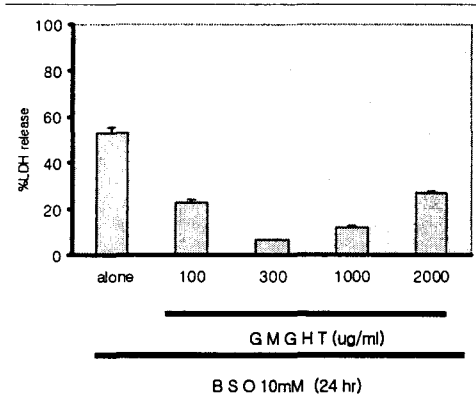


Fig. 6. Inhibitory Effect of GMGHT on LDH Release Induced by BSO

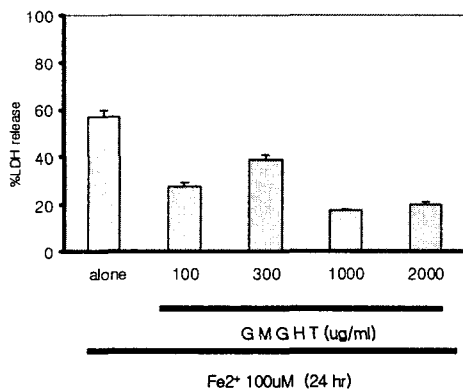


Fig. 7. Inhibitory Effect of GMGHT on LDH Release Induced by Fe²⁺

2. In vivo test

1) 전뇌허혈에 대한 효과

(1) KCN 유발 혼수 시간에 미치는 효과

비치사량의 KCN(1.87mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발된 ICR mouse의 혼수시간은 대조군이 20.57±4.45sec, GMGHT 투여군은 17.26±5.10sec로 나타났다(Table 3).

Table 3. The Duration of Coma in ICR Mice induced by KCN(1.87mg/kg i.v.)

| Group | Sec |
|---------|------------|
| Control | 20.57±4.45 |
| GMGHT | 17.26±5.10 |

a) : Mean ± Standard Error, Control : 1.87mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of normal saline. GMGHT : 1.87mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of 5.6mg/20g of GMGHT extracts

(2) KCN 유발 생존율에 미치는 효과

치사량의 KCN(3.0mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발된 대조군의 생존율은 0%인데 비하여 GMGHT 투여군은 30%의 생존율을 보였다(Table 4).

Table 4. The Survival rate in ICR Mice induced by KCN(3.0mg/kg i.v.)

| Group | % |
|---------|----|
| Control | 0 |
| GMGHT | 30 |

a) : Mean ± Standard Error, Control : 3.0mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of normal saline. GMGHT : 3.0mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of 5.6mg/20g of GMGHT extracts

2) 국소뇌허혈에 대한 효과

(1) 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적 및 부종율에 미치는 효과
중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적(Fig. 8)과 부종율(Fig. 9, 10)은 대조군에 비하여 GMGHT 투여군에서 현저하게 감소 효과를 나타냈다.

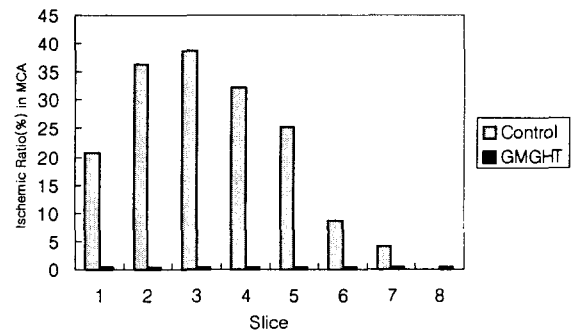


Fig. 8. Ischemic ratio in MCA occluded SD rats. Control : Oral administration of normal saline, GMGHT : Oral administration of 56.6mg/200g of GMGHT

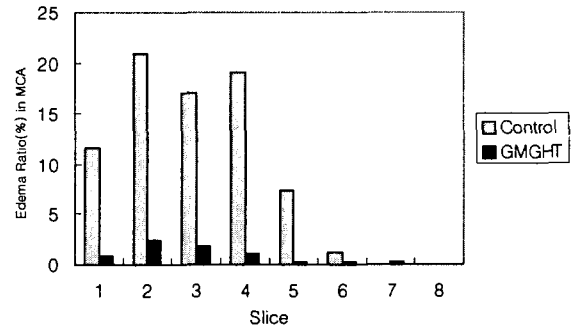


Fig. 9. Edema ratio in MCA occluded SD rats

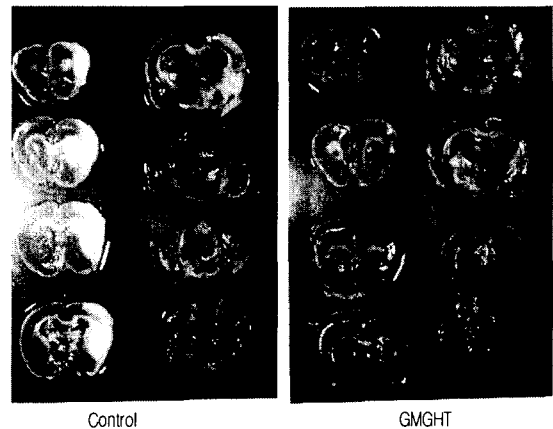


Fig. 10. Ischemic and edema in MCA occluded SD rats. Control : Oral administration of normal saline, GMGHT : Oral administration of 56.6mg/200g of GMGHT

(2) 신경학적 검사

① Forlimb test

Forlimb의 신경학적 등급은 대조군은 3.00±0.00, 2.25±0.25, 2.50±0.28, GMGHT 투여군은 1.00±0.00, 1.75±0.25, 1.75±0.25로 나타나 호전현상을 보였다(Table 5).

Table 5. The Neurogenic Grade of Forlimb Test of Rat Treated in GMGHT

| Sample | Neurogenic grade | | |
|---------|------------------|-----------|---------------|
| | Operation | Hypoxia | Recirculation |
| Control | 3.00±0.00 | 2.25±0.25 | 2.50±0.28 |
| GMGHT | 1.50±0.28 | 1.75±0.25 | 1.75±0.25 |

a) : Mean ± Standard Error, Control : Oral administration of normal saline, GMGHT : Oral administration of 56.6mg/200g of GMGHT

② Hindlimb test

Hindlimb의 신경학적 등급은 대조군은 1.00±0.00, 1.00±0.00, 1.00±0.00, GMGHT 투여군 0.50±0.28, 0.75±0.25, 0.50±0.25로 나타나 호전현상을 보였다(Table 6).

Table 6. The Neurogenic Grade of Hindlimb Test of Rat Treated in GMGHT

| Sample | Neurogenic grade | | |
|---------|------------------|-----------|---------------|
| | Operation | Hypoxia | Recirculation |
| Control | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| GMGHT | 0.50±0.28 | 0.75±0.25 | 0.50±0.28 |

a) : Mean ± Standard Error, Control : Oral administration of normal saline, GMGHT : Oral administration of 56.6mg/200g of GMGHT

(3) 조직학적 관찰 결과

① 정상군

Cresyl fast violet (CFV) 염색 결과 정상군의 대뇌피질에서는 신경세포들로 구성된 6층의 대뇌피질층(cortex layer)과 각 층에 존재하는 세포들이 잘 관찰되었다. 특히 제3층과 5층에 걸쳐 나타나는 큰 피라미드 세포(large pyramidal neuron)들이 강한 염색성을 보였다. 주변에는 크고 작은 혈관들도 잘 관찰되었다. 해마영역의 CA1~3 영역 부분에서 관찰소견은 양측모두에서 피라미트모양의 CFV 염색에 강한 염색성을 보이는 세포들과 다소 염색성이 약하고 둥근 핵을 가진 세포들이 함께 관찰되었다(Fig. 11).

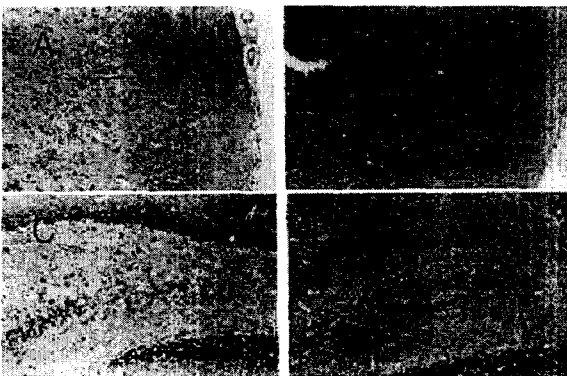


Fig. 11. Light micrographic appearance of the cerebral cortex and hippocampus, Cresyl fast violet stain, ×100. A : Normal cerebral cortex portion, B : Ischemic cerebral cortex portion, C : Normal hippocampal formation portion, D : Ischemic hippocampal formation portion

② 대조군

대조군에서는 정상 대뇌반구 쪽에서 관찰되는 대뇌피질의 형태학적 소견으로는 6층의 대뇌 피질층(cortex layer)의 구분이 잘되고, 특히 제3층과 5층에 걸쳐 나타나는 큰 피라미드 세포(large pyramidal neuron)들이 cresyl fast violet 염색에 강한 염색성을 보였다. 반면 허혈성 손상을 받은 대뇌반구의 피질영역에서는 대뇌 피질층의 구분이 어렵고 대부분의 세포핵들은 위축되고 세포간 경계는 불분명하고, 주변에는 크고 작은 공포(vacuole)들이 관찰되었다. 정상 대뇌 반구쪽의 해마형성체를 이루는 CA1~4 영역 부분과 치아이랑(dentate gyrus) 부근에서 관찰되는 신경세포들은 cresyl fast violet 염색에 강한 염색을 보이는 피라미드 세포들과 비교적 둥근 핵을 가진 과립세포들이 주로 관찰되었다. 반면 허혈성 손상을 받은 대뇌반구의 해마형성체 주변에서는 피라미드세포들은 거의 보이지 않고 주로 과립세포들과 작은 공포성 세포들이 관찰되었다(Fig. 12).

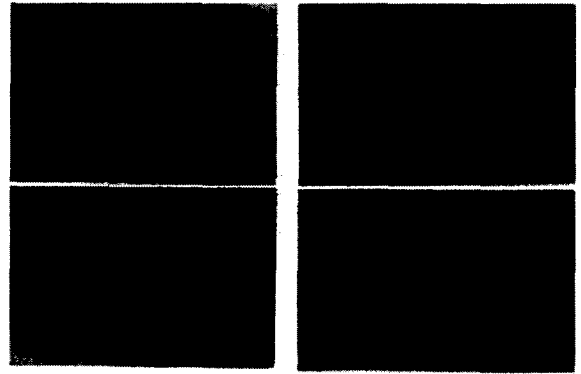


Fig. 12. Light micrographic appearance of the cerebral cortex and hippocampus, Cresyl fast violet stain, ×100. A : Normal cerebral cortex portion, B : Ischemic cerebral cortex portion, C : Normal hippocampal formation portion, D : Ischemic hippocampal formation portion

③ GMGHT 투여군

정상부위나 손상받은 쪽의 대뇌피질의 모두에서 조직학적 소견은 유사하였다.

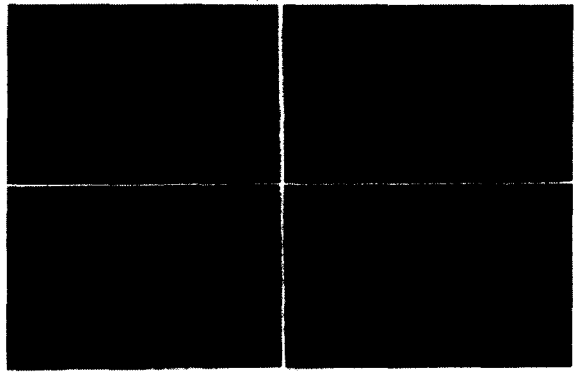


Fig. 13. Light micrographic appearance of the cerebral cortex and hippocampus, Cresyl fast violet stain, ×100. A : Normal cerebral cortex portion, B : Ischemic cerebral cortex portion, C : Normal hippocampal formation portion, D : Ischemic hippocampal formation portion

해마형성체 주변에서는 손상 받지 않은 쪽에 손상받은 부위 쪽의 CA1~CA4 영역 부분과 치아이랑 주변부의 피라미드세포들이 약간 수적 감소가 의심되나 과립세포들은 변화를 보이지 않아 전체적인 조직학적 소견은 정상 부위와 같이 양호하였다 (Fig. 13).

고 찰

腦血管 疾患은 우리나라 성인의 제일 흔한 사망원인이다. 미국에서의 뇌졸중으로 인한 사망 비율보다 약 2배에 이르는 수치이다. 미국에서도 뇌졸중이 성인의 세번째로 흔한 사망 원인이며, 전세계적으로 인구 10만명당 약 200명의 환자가 매년 발생하는 것으로 알려져 있다²⁾. 뇌손상의 대표적인 질환인 허혈성 뇌혈관질환은 뇌혈관의 순환장애로 인해 뇌의 신경손상이 야기되어 갑작스런 의식장애와 운동, 감각, 반사기능의 장애를 일으키는 것^{3,13)}으로 한의학에서는 中風의 범주에 속한다³⁾. 뇌허혈로 인한 세포손상 보호에 대한 연구는 적절한 뇌관류압의 조절, hyperventilation을 통한 동맥혈내 이산화탄소 분압을 감소와 두개내 용적과 뇌압과 뇌혈량의 감소, Barbiturates를 이용한 뇌대사율의 감소, Calcium channel blockers의 이용, Glucocorticoids의 항부종과 항염작용, hemodilution, 삼투압제제를 이용한 항부종, hypothermia 및 면역 및 호르몬의 이용 등¹²⁾이 있어왔으나 최근에는 뇌허혈시 Excitotoxin antagonists와 free-radical scavengers & inhibitors를 이용한 뇌손상 억제에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{8,12)}. 虛血이란 어떤 조직에서 필요한 충분한 산소를 공급하지 못하여 혈류의 부족으로 인한 증상이 발현될 때의 상태를 말한다. 뇌허혈에 의한 뇌신경세포 손상의 정도를 결정하는 주된 결정 요소는 허혈의 기간과 이 기간중의 뇌혈류의 정도이다. 국소뇌허혈이나 전뇌허혈의 구분이 있으나 뇌혈류가 18ml/100gm/min 미만에서는 뇌허혈이 발생하게 된다¹²⁾.

腦虛血은 두가지 병리생리학적 과정을 통해 발생하는데, 하나는 뇌혈관폐쇄로 인하여 뇌에 산소와 혈당 공급이 소실되어 발생하고, 둘째는 세포막 붕괴와 에너지 생산과정의 왜해로 인하여 세포대사의 변화를 일으켜 발생하게 된다^{5,6)}. 허혈로 인한 세포괴사에 이르는 과정에 관여하는 주요한 인자는 glutamate나 aspartate와 같은 아미노산계 신경전달물질이다. 이것이 신경 시냅스에서 유리되면 이것들에 의하여 조절되는 관문이 열림으로 인하여 양이온이 들어와서 시냅스 후막을 탈분극시키고 이러한 흥분성 신경전달물질이 다량 유리되면서 신경독성을 갖게 된다. 이들 신경독성 물질에 의해 일어나는 손상의 과정은 뇌신경세포에 산소의 공급이 중단되면 세포내 ATP 생산이 감소되어 Na⁺-K⁺ pump가 올바르게 작용을 하지 못하게 하며, 이로 인해 세포의 K⁺ 농도가 증가하게 되어 세포막의 탈분극이 일어나고 glutamate에 의해서 작용되는 통로에 작용하여 Ca²⁺, Na⁺, Cl⁻와 물이 들어가게 한다. 초기 세포사는 과도한 부종과 삼투압의 변화에 따른 세포막의 용해에 의해 일어나며, 지연 세포사는 세포내 Ca²⁺ 농도가 증가하여 free radical 형성, 세포막 손상, arachidonic acid 대사물질 형성 및 미토콘드리아 작용부전 등으

로 일어난다^{8,12)}. 한편 유리지방산의 활성화는 신경세포의 인지질을 파괴하며 prostaglandins, leukotrienes, free radical 등이 침착되고 단백질과 효소가 변성하여 세포부종이 발생한다. 또한 허혈성 뇌손상에 있어 세포 내 과량의 cytotoxic Ca²⁺은 Nitric Oxide Synthase(NOS)의 활성화 및 과량의 NO를 생성한다. NO는 세포간 또는 세포내 messenger로서 superoxide와 반응하여 반응성이 가장 큰 활성산소인 hydroxyl radical을 생성하기 때문에 뇌의 노화에 중요한 원인으로 인식되고 있으며, 반응성 산소류 (Reactive Oxygen Species ; ROS)를 발생시킨다^{10,18)}. 또한 mitochondria에 있어 증가된 Ca²⁺은 에너지 공급을 더욱 감소시키고 free radical들의 생성 증가를 초래한다. 이와 같은 free radical들은 DNA 손상 외에도 lipid peroxidation에 의해 세포막을 손상시킨다. 더욱이 자발적 또는 치료에 의해 허혈 부위의 blood flow가 회복되어져 reperfusion이 일어날 때 공급되는 산소가 free radical들을 발생시키는 생화학적 반응을 증가시킨다^{5,10,11)}. 뇌허혈은 뇌혈관질환에 해당하며 한방에서는 中風의 범주에서 논의되고 있다. 이러한 中風의 原因說로서는 風, 火, 氣虛, 濕痰 및 瘀血, 등이 있으며³⁾, 瘀血을 血栓의 범주로 본 崔¹⁹⁾는 中風의 瘀血論의 고찰과 活血化癥法의 치료 근황이 있었고, 혈전에 대한 실험적 연구로 薛²⁰⁾의 補陽還五湯, 安²¹⁾의 加味通絡化癥湯, 申²²⁾의 紅花四物湯, 姜²³⁾의 清泡逐瘀湯이 있었으며, 臨床의 研究에는 孫²⁴⁾의 瘀血證의 뇌혈류 측정, 樊²⁵⁾의 益氣活血法을 이용한 초기 뇌경색환자 치료가 있었다. 또한 전뇌허혈과 국소뇌허혈 유발시의 抗浮腫과 抗虛血에 대한 실험적 연구, NO생성과 뇌손상 억제효과에 대한 실험적 연구, amyloid β protein에 의한 PC12 cells and B103 cells의 손상억제에 대한 실험적 연구들이 있어왔다²⁶⁻³⁰⁾. 그러나, 뇌허혈시 excitotoxin antagonists와 free radical scavengers & inhibitors를 이용한 뇌손상억제에 대한 한약물의 실험적 연구는 많지 않았다. 加味鷄血藤湯은 鷄血藤, 山查肉, 木香, 厚朴, 川芎은 活血行氣祛瘀하고 冬瓜子, 天南星, 半夏, 桔梗은 割痰하고 獨活, 蒼耳子, 藿香, 白芷, 紫蘇葉은 祛風除濕하고 大腹皮, 陳皮, 茯苓, 知母, 黃柏은 健脾利水瀉火의 효능^{31,32)}을 가지고 있어 임상적으로 고혈압과 중풍 등의 질환에 활용할 수 있는 처방으로 대전대학교 부속한방병원에서는 초기 뇌허혈 환자 치료에 응용하고 있다.

이에 저자는 加味鷄血藤湯의 작용기전을 검증하여 효능을 입증하고 뇌세포 손상 보호 약물을 개발하기 위해 뇌허혈시 야기되는 glutamate receptor와 free radical 및 全腦虛血과 中大腦動脈의 혈류를 차단한 局所腦虛血에 대한 보호효과 등의 연구를 통한 뇌손상 억제효과 실험을 하였다. 먼저 본 실험에서 배양된 대뇌피질 세포에 NMDA, AMPA, kainate, BSO 및 Fe²⁺을 처리하여 LDH 유리량을 측정하였다. Glutamate receptor는 촉진성 NMDA 수용체와 non-NMDA 수용체로 구분된다. NMDA 수용체는 NMDA, 글리신, 아연, Mg²⁺, 펜사이클리딘과 결합하고, Na⁺, K⁺, Ca²⁺가 세포내로 들어오는데에 영향을 주며, non-NMDA 통로는 Na⁺와 K⁺에 대하여는 투과적이지 않다. 이러한 흥분성 수용체는 Ca²⁺, free radical, 그리고 단백질 분해효소를 증가시켜 중요한 독성 작용을 일으킨다. 신경세포 내에서 산화질

소 합성효소에 의한 산화질소의 합성은 glutamate에 대한 반응을 증가시킨다³³⁾. Lactic Dehydrogenase(LDH)는 생체 또는 장기에 널리 분포하여 장기손상시 다량 배출된다는 점에서 LDH 활성 증가는 생체내 어느 장기에 세포파괴가 이루어지고 있다는 것을 의미한다³⁴⁾. 그러므로 glutamate receptor와 free radical에 대한 반응을 억제하게 되면 뇌허혈로 인한 뇌세포괴사를 억제하게 되므로 LDH의 유리량을 측정함으로써 그 세포괴사 정도를 측정할 수 있다. NMDA에 의한 세포손상에 대한 방어효과에서는 GMGHT 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이상의 실험군에서 유의성있게 LDH 유리량을 억제하였으며(Fig. 3), AMPA와 Kainate에 의한 세포손상에 대한 방어효과에서도 GMGHT 모든 실험 농도에서 대조군에 비하여 유의성있게 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 4,5). BSO에 의한 세포손상에 대한 방어효과에서는 GMGHT 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도이상에서 대조군에 비하여 유의성 있게 LDH 유리량을 억제하였으며(Fig. 6), Fe^{2+} 에 의한 세포손상에 대한 방어효과에서는 모든 실험 농도에서 유의성있게 LDH 유리량을 억제함으로써(Fig. 7), 본 시료가 glutamate에 의한 세포독성과 free radical에 의한 세포손상을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다. 뇌세포가 허혈에 빠지는 경우는 범위에 따라 전뇌허혈과 국소뇌허혈로 구분이 된다^{35,36)}. 전뇌허혈은 뇌혈류가 중단되면 심한 저산소증 상태가 되고 이로 인하여 세포내에 APT의 감소로 Na^+/K^+ pump에 장애가 오고 K^+ 의 세포내 유입에 수분이 수동적으로 따라 들어가 3분 안에 세포내에 부종이 유발되며 5-10분 후에는 lactate의 증가 및 glucose의 소멸이 발생하는데, 가역성 병변이나 허혈이 계속되면 mitochondria의 손상으로 ATP가 고갈되고 인지질의 소실과 toxic oxygen radicals 등으로 인하여 세포내 손상 및 칼슘 농도의 증가로 인하여 비가역성 병변으로 진행이 된다^{35,36)}. 또한 국소뇌허혈은 심한 허혈 상태의 중심부와 이를 둘러싸는 불완전한 허혈 상태의 주변부로 나누어지는데, 이 주변부에서는 측부순환이 부분적으로 뇌혈류를 공급하고 있어 세포의 이온경사는 유지되나 전기적 활성도는 없는 상태가 되고 허혈 중심부에서는 전뇌허혈과 비슷한 일이 일어난다. 그러나 이 주변부에서 뇌혈류가 한계치 이하로 떨어지면 세포내 Ca^{2+} 이 증가하여 뇌세포의 비가역적인 손상을 가져올 수 있다^{35,36)}. 본 실험에서 전뇌허혈 유발에 사용한 KCN¹³⁾은 세포내 mitochondria의 cytochrome oxidase의 활성을 억제하고 전자전달계에서의 효소이용을 제한하여 고에너지 인산화합물을 고갈시킴으로써 세포독성을 발현한다. 비치사량의 KCN(1.87mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발시킨 혼수 시간을 측정 한 결과, 加味鷄血藤湯 투여군에서 혼수시간이 단축은 보였으나 유의성있는 단축효과는 나타나지 않았다(Table 3). 致死량의 KCN(3.0mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발시킨 生存率 측정에서는 대조군의 생존율은 0%인데 비하여 加味鷄血藤湯 투여군은 30%의 생존율이 나타났(Table 4). 이는 金³⁷⁾과 裴²⁶⁾의 실험과 유사한 결과를 나타낸 것으로 加味鷄血藤湯이 급성 뇌조직 손상에 대하여 보호효과가 있음을 시사하는 것이라 사료된다.

본 실험에서 국소뇌허혈에 사용된 Silicon rubber cylinder 제작은 Nagasawa 등의 방법¹⁴⁾에 의거하였는데, 허혈 후 재관류

를 연구할 수 있는 장점을 가지고 있다^{38,39)}. 또한 조직 손상을 검증하기 위한 TTC 용액은 심근경색에 사용된 이후^{40,41)}, 뇌경색 부위를 측정하는데도 널리 사용되고 있다^{38,39)}. 정상 뇌조직에서는 mitochondria내에 존재하는 탈수소 효소와 TTC 용액이 반응하여 formazan이 형성되어 적색으로 나타나고, 뇌경색 발생부위는 세포내 mitochondria의 비가역적 손상으로 탈수소 효소가 소실되어 백색으로 남게되어 병변 부위를 구별할 수 있다⁴⁰⁾. 그러므로 시간 경과에 따른 뇌경색의 변화에 대한 TTC 용액을 이용한 관찰은 동맥폐쇄 후에 탈수소 효소의 감소 정도에 좌우되며 병변의 진행에 따라 감소 속도가 비례한다고 알려져 있어⁴³⁾, TTC 용액의 염색 양상은 조직의 비가역적 손상 정도와 비례되므로 뇌경색의 시간변화에 따른 발생 위치와 크기를 알 수 있다⁴⁴⁾. 뇌경색으로 인한 뇌부종은 뇌용액을 폐쇄시킨 직후 수분부터 약 4 시간까지 지속되는 cytotoxic edema와 그 후 진행되는 vasogenic edema로 나누기도 하고^{6,40,45)}, 발병기전에 따라 맥관원성 부종, 세포독성 부종, 간질성 부종으로 분류하기도 한다⁴⁶⁾. 뇌부종은 혈뇌장벽 때문에 삼투압의 이동이 제한받고 뇌자체에 림프관이 없어 중추신경계의 수분 함량이 증가되어 발생하는데^{6,46)}, 두개내압의 증가를 유발하거나 악화시킴으로 뇌질환의 중요한 합병증이 된다^{7,40)}. 본 실험에서 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적율과(Fig. 8) 부종율(Fig. 9)은 모두 대조군에 비하여 감소효과를 보여 安²¹⁾, 林²⁹⁾, 裴²⁶⁾, 등과 유사한 실험 결과가 나왔으며, 신경학적검사에서는 forelimb 및 hindlimb test에서 호전 양상을 보임으로써(Table 5,6), 加味鷄血藤湯이 두개내혈관 폐쇄로 인한 급성기 뇌허혈 및 뇌경색과 뇌부종을 억제하고 뇌손상을 보호하는 일정한 효과가 있음을 알 수 있다.

이 같은 결과는 조직학적 관찰에서 정상 대뇌피질과 해마형성체 주변 관찰 소견이 정상군과 동일하고, 허혈 손상된 대뇌피질과 해마형성체 주변 관찰 소견 역시 약간의 조직 괴사 소견이 보인 점과 부합된다(Fig. 11,12). 이상의 결과를 종합하면 加味鷄血藤湯은 뇌허혈로 인한 세포괴사에 이르는 과정에 주요한 인자로 작용하는 glutamate 등과 같은 신경계 전달물질을 차단하여 신경독성 물질에 의해 일어나는 세포손상을 방어하고 free radical에 의한 세포막손상을 억제하여 뇌손상을 보호하는 효과가 있는 것으로 사료된다. 또한 허혈면적 및 뇌부종의 감소효과와 신경결손 정도를 호전시켜 뇌허혈로 인한 뇌손상에 활용할 가치가 높을 것으로 보여지며, 항 후 그 기전에 대하여는 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

加味鷄血藤湯이 뇌신경 세포손상을 보호하는 작용 기전을 검증하고자 NMDA, AMPA, kainate로 유발된 뇌신경 세포손상에 대한 방어작용, BSO, Fe^{2+} 등의 free radical로 인한 뇌신경 세포손상에 대한 방어작용, KCN을 이용한 全腦虛血에 대한 효과 및 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 局所腦虛血에 대한 효과를 관찰한 결과, 加味鷄血藤湯은 cytotoxin으로 인한 뇌손상 억제효과에서 NMDA, AMPA, kainate를 투여한 대조군보다 LDH 유리량을

유의성 있게 억제하였고, free radical로 인한 뇌손상 억제효과에서 BSO, Fe²⁺를 투여한 대조군보다 LDH 유리량을 유의성 있게 억제하였으며, 비치사량의 KCN에서는 혼수 시간 단축을 보였고, 치사량의 KCN에서는 대조군에 비하여 30% 生存率 증가를 나타내었다. 또 中大腦動脈 血流遮斷에 의한 虛血面積 및 浮腫率을 감소시켰고, 局所腦虛血 유발 후 forelimb 및 hindlimb 신경학적 검사에서 호전양상을 보였으며, 조직학적 관찰에서 정상부위와 같은 조직학적 소견을 보였다.

이상의 결과로 미루어 보아 加味鷄血藤湯은 뇌허혈로 인한 초기 뇌세포손상을 방지하는 효과가 있고 허혈성 뇌경색 및 급성기 뇌손상에 활용될 수 있다고 보여지며 그 작용기전에 대해서는 향후 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

- 통계청 : 死亡原因統計年譜, 大田, 統計廳, pp.16-17, 1999.
- 최창락 외 : 神經外科學(2/E), 서울, 中央出版社, p.263-268, 2001.
- 全國韓醫科大學 心系內科學教室 : 心系內科學, 서울, 書苑堂, pp.73-74, p.77, pp.110-112, 277-279, 420-422, p.427, 430, 505, 1999.
- 곽응인 외 : 圖解腦神經外科學, 서울, 第一出版社, pp.42-47, p.343, pp.394-397, 1992.
- 아담스 신경과학 편찬위원회 역 : 아담스 신경과학, 서울, 도서출판 정담, pp.720-722, 1998.
- 이광우 · 정희원 편저 : 임상신경학, 서울, 고려의학, pp.128-131, 203-204, 1997.(119)
- 이중달 역 : 그림으로 설명한 병리학, 서울, 고려의학, pp.127-134, p.231, 733, 736, pp.741-746, 1991.(121)
- 채창희 : 흰쥐에서 일시적 국소 뇌허혈에 미치는 Glutamate의 역할, 대한마취과학회지, (38):1062-1067, 2000.
- 김상은 : 국소뇌허혈에서 NMDA 수용체 길항제가 국소 뇌포도당 대사에 미치는 영향, 대한핵의학회지, (29)3:294-306, 1995.
- 임소영 : Nitric Oxide Synthase의 억제가 전뇌허혈/재관류시 Hydroxyl Radical 생성에 미치는 영향, 대한마취과학회지, (36):710-722, 1999.
- 길호영 : 쥐에서 허혈 및 재관류시 뇌의 온도변화에 의한 hydroxyl radical 생성의 변화, 대한마취과학회지, (27)9:1035-1044, 1994.
- 김인세 : 뇌허혈과 뇌보호, 대한마취과학회지, (33):195-203, 1997.
- Schubert J, Brill WA : Antagonism of experimental cyanide toxicity in relation to the in vivo activity of cytochrome oxidase. J Pharmacol Exp Ther, 162(2):352-359, 1968.
- Nagasawa H, 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.
- 정혜주 : 뇌허혈 동물모델을 이용한 뇌기능개선제의 효능에 관한 연구 (I), 국립보건안전연구원보, 7(1):178-185, 1994.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H : Rat middle cerebral artery occlusion; Evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke, 17:472-476, 1986.
- 해리슨 번역 편찬위원회 역 : HARRISON'S 내과학, 서울, 도서출판정담, p.2409, 1997.
- Gulyaeva N, Onufriev MV and Stepanichev MY : NO synthase and free radical reneration in brain region of old rats; correlations with individual behaviour. Neuro Report, 6:94-96, 1994.
- 최 현 외 : 中風의 瘀血論的 考察 및 活血化痰法에 의한 治療 近況, 大韓韓醫學會誌, 11(1):145-150, 1991.
- 설인찬 : 補陽還五湯이 高脂血症, 血栓, 高粘度血症, 高血壓 및 腦損傷에 미치는 影響, 韓方成人病學會誌, 4(1):133-162, 1998.
- 안택원 : 加味通桂化痰湯이 血栓, 腦虛血 및 腦損傷에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 1999.
- 신대철 외 : 紅花四物湯 및 丹參飲이 血栓生成抑制에 미치는 影響, 東醫病理學會지, 16(2):136-144, 1995.
- 강순희 외 : 清泡逐瘀湯 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.
- 손 립 외 : 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.
- 반문유 : 益氣活血法 治療早期 腦梗塞 60例 治效評估, 寧寧中醫雜誌, 17(5):10-12, 1996.
- 배경일 : 疏風補心湯이 高血壓, 血栓 및 腦損傷에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 2002.
- 이경수 : 소속명탕 추출물이 전뇌허혈 및 국소뇌허혈에 미치는 영향, 동의한의학회연구논문집, vol8(1):107-116, 1999.
- 최영 : 通痺飲이 혈전 및 뇌손상에 미치는 영향, 大田大學校 大學院, 2001.
- 임승민 : 三氣飲과 通痺飲이 뇌손상 및 혈전에 미치는 영향, 大田大學校 大學院, 2001.
- 이재용 : 烏藥順氣散이 뇌손상 및 고혈압에 미치는 영향, 大田大學校 大學院, 2001.
- 이상인 외 : 本草學, 永林社, 서울, pp.125-126, 129-131, 141-142, 161-163, 182-183, 260-261, 291-294, 302-304, 347-349, 353-354, 365-366, 409-410, 445-446, 448-451, 460-461, 477-478, 536-537, 540-541, 1997.
- 신재용 : 신씨본초학(각론), 수문사, 서울, pp.13-16, 16-20, 221-223, 255-257, 271-275, 286-288, 357-362, 371-372, 450-456, 495-497, 498-500, 589-592, 592-594, 600-603, 615-617, 653-657, 690-691, 697-699, 725-726, 1987.
- The Merk manual 편집위원회 : The Merk manual(17/E), 도서출판한우리, 서울, pp.1465-1466, 2002.
- 이귀녕, 권오현 : 임상병리과일(3th/Edition), 의학문화사, pp.374-376, 2000.

35. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 고문사, pp.112-122, 125-129, 591-593, 1218-1220, 1994.
36. 신용철 외 : 급성 국소 허혈성 뇌부종으로 인한 외조직의 생화학적 변화에 대한 실험적 연구, 대한신경외과학회지, 18(4):525- 533. 1989.
37. 金鍾仁 : 地黃飮子가 腦損傷 및 高血壓에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 2001.
38. 金賢執 : 局所 腦梗塞 急性期에서의 再灌流에 關한 實驗的 研究, 서울大學校 大學院, 1990.
39. 宋東植 : 흰쥐의 可逆的과 非可逆的 虛血性 腦梗塞 모델에서 中大腦動脈 閉鎖後 時間經過에 따른 腦梗塞의 크기, 啓明大學校 大學院, 1994.
40. Itoya M, Morrison JD, Downey HF : Effect of ethanol on myocardial infarct size in a canine model of coronary artery occlusion-reperfusion. Mol Cell Biochem, 186(1-2): 35-41, 1998.
41. Gorman JH 3rd, Gorman RC, Plappert T, Jackson BM, Hiramatsu Y, St. John-Sutton MG, Edmunds LH Jr : Infarct size and location determine development of mitral reurgitation in the sheep model, J Thorac Cardiovasc Surg, 32(6):615-622, 1998.
42. Nachlas MM, Tson KC, Souza ED, Cheng CS and Seligman AM : Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J Histochem Cytochem, 5:420-436, 1963.
43. Fine G, Morales A, Scherpella J : Experimental myocardial infarction. Arch Pathol, 82:4-8, 1966.
44. Li F, Irie k, Anwer MS, Fisher M : Delayed triphenyl tetrazolium chloride staining remains useful for evaluating cerebral infarct volume in a rat stroke model. J Cereb Blood Flow Metab, 17(10):1132-1135, 1997.
45. Kurt J. Isselbacher : HARRISON'S Principles of Internal Medicine (13th edition), 서울, 정담, p.156, pp.341-347, p.1914. 2409, 2452, 1997.
46. Anish Bahra, Katia Cikurel : Mosby's crash course (Neurology), 서울, 한우리, pp.121-122, 2000.