

# 加味六味地黃湯이 腦神經細胞 損傷 및 腦虛血 病態 모델에 미치는 영향

김진형 · 김윤식 · 설인찬 · 김동희<sup>1\*</sup>

대전대학교 한의과대학 순환기내과, 1: 대전대학교 한의과대학 병리학교실

## Study on the Effect of Gamiyukmijihwang-tang on the Brain damage

Jin hyung Kim, Yun Sik Kim, In Chan Seol, Dong Hee Kim<sup>1\*</sup>

Department of internal medicine, Collage of Oriental Medicine,

1: Department of Pathology, Collage of Oriental Medicine, Daejeon University,

This studt was investigated to prove the effect of GMYM on the brain damage. The results were as follows; 1. GMYM showed significantly inhibitory effect on LDH release by NMDA, AMPA and Kinate. 2. GMYM showed significantly inhibitory effect on LDH release by BSO and Fe<sup>2+</sup>. 3. GMYM decreased coma duration time in a infatal dose of KCN and showed 30% of survival rate in a fatal dose. 4. GMYM showed improvement of forelimb and hindlimb test after MCA occulusion in neurological exemination. 5. GMYM decreased ischemic area and edema incited by the MCA blood flow block. These results indicate that GMYM can be used in the brain damage subjected to brain ischemia. Further study will be needed about the functional mechanism and etc.

Key words : Gamiyukmijihwang-tang(加味六味地黃湯), brain damage, LDH, MCA occulusion

### 서 론

허혈성 뇌혈관질환은 뇌신경 손상으로 갑작스런 의식장애와 운동, 감각, 반사기능의 장애가 오는 뇌손상의 대표적인 질환<sup>1,3)</sup>으로 허혈성 뇌혈관질환으로 인한 사망률은 우리나라 사망율의 수위를 차지하고 있으며<sup>4)</sup> 후유증으로 인한 개인적 경제능력 손실과 정신적 장애 등은 사회적인 문제로 대두되고 있다<sup>5)</sup>. 현재 중풍을 예방하기 위한 목적으로 혈압 치료제, 뇌혈류 개선제 및 고지혈증 치료제의 약물들이 사용되고 있고 중풍 발생 후에는 혈전용해제를 사용하고 있으나 허혈로 인해 발생하는 뇌신경세포 손상을 보호해 줄 수 있는 적절한 치료제는 없는 실정이다. 허혈성 뇌혈관질환은 혈관폐쇄로 인하여 산소와 혈당공급이 소실되고, 세포막 붕괴와 에너지 생산과정의 와해로 세포대사의 변화가 발생한다<sup>6)</sup>. 따라서 허혈성 뇌혈관질환을 치료하기 위해서는 폐쇄된 혈류를 회복시키거나 세포막의 붕괴를 막고 세포손상을 방지하는 치료제를 개발이 요구되고 있다.

본 연구에 사용한 加味六味地黃湯은 六味地黃湯에 鷄血藤,

白茯苓, 南星, 荊芥, 蔓荊子, 川芎, 豨薺, 白僵蠶, 鈞鈎藤, 天麻, 牡丹皮, 梔子, 竹茹 등의 약물을 가미한 처방으로 임상에서 고혈압과 중풍 등의 질환에 활용할 수 있어 대전대학교 부속한방병원에서는 초기 뇌허혈 환자 치료에 응용하고 있다.

이에 저자는 加味六味地黃湯이 초기 중풍 환자의 뇌신경 세포손상을 보호하는 작용기전을 검증하고자 NMDA, AMPA, kainate로 유발된 뇌신경세포손상에 대한 방어작용, BSO, Fe<sup>2+</sup> 등의 free radical로 인한 뇌신경세포 손상에 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.

### 재료 및 방법

#### 1. 동물 및 약물

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

\* 교신저자 : 김동희, 대전광역시 동구 용운동, 대전대학교 한의과대학  
· E-mail : dhkim@dju.ac.kr Tel : 042-280-2623  
· 접수 : 2003/02/08 · 수정 : 2003/03/04 · 채택 : 2003/04/01

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 2주일 간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용한 加味六味地黃湯(GMYM)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하였고, 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. The Compositions of Gamiyukmijhwang-tang

韓藥名	學名	用量(g)
熟地黃	Rehmannia glutinosa	20.0
山查	Crataegus pinnatifida var. major	10.0
山藥	Disocorea japonica	8.0
鷄血藤	Spatholobus suberectus	8.0
地骨皮	Lycium chinense	8.0
柴胡	Bupleurum falcatum	8.0
南星	Arisaema amurense var. serratum	6.0
稀莩草	Siegesbeckia glabrescens	6.0
枸杞子	Lycium chinense	6.0
山茱萸	Cornus officinalis	6.0
茯苓	Poria cocos	6.0
甘草	Glycyrrhiza uralensis	6.0
牡丹皮	Paeonia suffruticosa	6.0
白僵蠶	Bombyx mori	6.0
釣鉤藤	Uncaria rhynchophylla	6.0
天麻	Castrodia elata	6.0
川芎	Cnidium officinale	6.0
蔓荊子	Vitex rotundifolia	6.0
荊芥	Schizonepeta tenuifolia	4.0
梔子	Gardenia jasminoides for. grandiflora	3.0
竹茹	Phyllostachys nigra var. henonis	3.0
Total amount		154.0

## 2. 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 Sigma(U.S.A.)에서 구입한 buthionine sulfoximine (BSO), kainate N-methyl-D-aspartate(NMDA), ferrous chloride(Fe<sup>2+</sup>), 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(복십자, Korea), minos-ST(Cobas Co., France), centrifuge(Beckman Co., U.S.A.), rotary vacuum 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.

## 3. 검액의 조제

GMYM 2첩을 3,000ml round flask에 넣고 증류수 2,000ml를 넣은 후, 3시간 가열 추출, 침전물을 3회 여별(3M filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 -70℃ deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 1첩당 17.55 g of 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

## 4. 뇌손상 보호 효과 실험

### 1) In vitro test

#### (1) 대뇌 피질 신경세포 배양

신경세포의 배양을 위해서 15일 된 mouse 태아의 neocortices를 분리하여 조직을 단일 세포로 나눈 후 1×10<sup>5</sup>/well의 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 precoating된 24well plate에 분주하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 3-5 일째에 glia의 번식을 억제하기 위해 Ara-C로 처리한 후, DIV 7-10 이후에 실험을 하였다.

#### (2) 흥분성 세포독성과 산화적 독성의 유발과 측정

Neuron과 glia가 포함된 대뇌 피질 세포는 excitotoxins (NMDA 20uM, AMPA 20uM, kainate 50uM), oxidative stressor(Fe<sup>2+</sup> 100uM, buthionine sulfoximine 10mM)를 처리하여 21mM glucose와 26.5mM bicarbonate가 포함된 Eagle's minimal essential media에 24시간 동안 배양하였다. 신경 세포사는 24시간 후 죽은 세포로부터 배지로 유리된 LDH 활성을 측정하여 정량화하였다

### 2) In vivo test

#### (1) 전뇌허혈 유발 실험

전뇌허혈 모델은 Schubert<sup>7)</sup>의 방법에 준하였다. GMYM 투여군은 ICR mouse에게 검액 11.7mg/20g/day를 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde(대중기기, Korea)를 이용하여 1회 경구 투여하였다. 대조군은 검액을 녹일 때 사용한 동량의 생리식염수를 경구 투여하였다. 경구투여 30분 후에 비치수량인 1.87mg/kg KCN을 ICR mouse 미정맥에 주사한 후 정향 반사를 소실한 후, 정향 반사를 회복할 때까지의 시간을 측정하였다. KCN 유발 생존시간 측정은 경구 투여 30분 후에 비치수량인 3.0mg/kg KCN을 미정맥 주사하여 치사율을 보았다.

#### (2) 국소뇌허혈 유발 실험 (Middle Cerebral Artery Occlusion :MCA)

Rat 8마리를 1군으로 하여 대조군과 GMYM 투여군으로 구분하였다. 중대뇌동맥(MCA) 폐쇄 2시간 전에 실험 rat의 체중을 측정하고 GMYM 117.0mg/200g/day를 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.

① Silicon rubber cylinder 제작

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

② 국소뇌허혈 유발

Rat를 수술대에 고정시키고 Royal Multi-Plus(Royal Medical Co, Korea)를 사용하여 N<sub>2</sub>O(아산화질소)와 O<sub>2</sub>(산소)의 비율을 7:3으로 조정하여 enflurane로 흡입 마취하였다. Nagasawa<sup>8)</sup>의 방법에 따라 목 증양을 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, 직상온도계를 사용하여 체온 하강을 방지하였고 적외선을 비추면서 보온하였으며, 중대뇌동맥을 폐쇄하고 60분 동안 N<sub>2</sub>O와 O<sub>2</sub>를 90%와 10% 비율로 하여 저산소 상태를 유발하였으며 폐쇄 120분 후에 프로브를 1 cm정도 당겨 재관류를 행하였다.

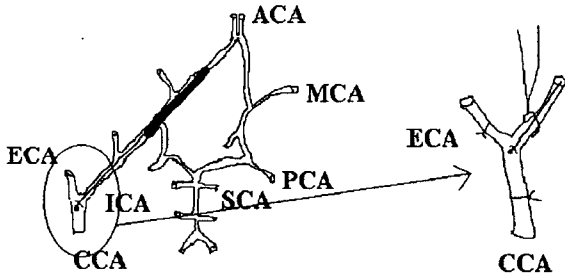


Fig. 1. Schematic representation of position of silicone rubber cylinder during occlusion of right middle cerebral artery(MCA). ACA : Anterior cerebral artery, PCA : Posterior cerebral artery, ICA : Internal carotid artery, ECA : External carotid artery, CCA : Common carotid artery, SCA : Superior cerebral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

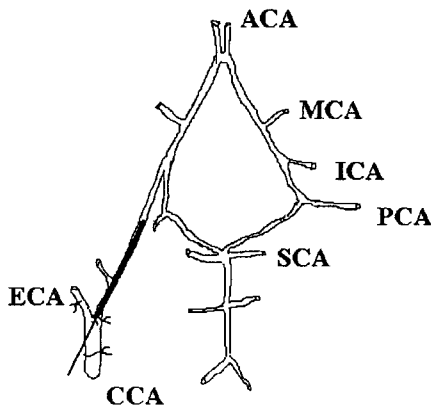


Fig. 2. Schematic representation of position of silicone rubber cylinder during occlusion of right middle cerebral artery(MCA). ACA : Anterior cerebral artery, PCA : Posterior cerebral artery, ICA : Internal carotid artery, ECA : External carotid artery, CCA : Common carotid artery, SCA : Superior cerebral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

③ 허혈면적 및 부종률 측정

수술 24시간 후에 rat에서 뇌를 꺼내어 brain matrix(ASI Instruments, Warren, MI., U.S.A.)를 이용하여 2mm 두께의 coronal brain slice를 얻은 후 이 중 8 slice만을 선택하여 2% triphenyltetrazolium chloride (TTC) 용액을 가하고 37℃에서 20분간 배양하였다. TTC에 의해 정상 조직은 짙은 빨강색으로 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 허혈 면적을 측정하였고, 허혈 면적 및 부종률은 아래의 식에 의해 산출하였다<sup>9)</sup>.

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

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

A : 각 coronal slice에서의 허혈이 유발된 대뇌 반구 면적(mm<sup>2</sup>)  
 B : 각 coronal slice에서의 대측 대뇌 반구 면적(mm<sup>2</sup>)  
 C : 각 coronal slice에서의 허혈 면적(mm<sup>2</sup>)

④ 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 Bederson<sup>10)</sup>의 방법에 의하여 그 정도를 forelimb은 4등급으로, hindlimb은 2등급으로 나누어 점수화 하였으며 증상에 따른 등급 분류는 Table 2와 같다.

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	Circulating 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

⑤ 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 고정액에 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 4μm 두께로 파라핀 절편을 만들어 탈파라핀 및 합수과정을 거친 다음 0.1% cresyl fast violet 염색액에 실온에서 30분간 염색 후 95% alcohol로 탈색하고 탈수 및 투명과정을 마친 다음 봉입하

여 광학현미경(Olympus-BH2, Japan)하에서 검경 및 사진 촬영 하였다.

3) 통계처리

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

성 적

1. In vitro test

1) NMDA에 의한 세포손상에 대한 방어효과

대조군은 74.13±4.40(%), GMYM 100, 300, 1,000, 2,000 µg/ml의 농도로 투여한 실험군은 각각 76.13±8.89(%), 55.81±6.77(%), 57.02±2.20(%), 37.50 ±2.39%)로 LDH 유리량이 나타나 1,000 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다 (Table 3).

Table 3. Inhibitory Effect of GMYM on LDH Release induced by NMDA(20µg/ml)

Group	LDH Release(%)
Control	74.13±4.40*
SAM A	76.13±8.89*
SAM B	55.81±6.77*
SAM C	57.02±2.20*
SAM D	37.50±2.39*

Control : NMDA(20µ M/ml) treated group, SAM A : NMDA(20µ M/ml) and GMYM(100µg/ml) treated group, SAM B : NMDA(20µ M/ml) and GMYM(300µg/ml) treated group, SAM C : NMDA(20µ M/ml) and GMYM(1000µg/ml) treated group, SAM D : NMDA(20µ M/ml) and GMYM(2000µg/ml) treated group. \* : Statistically significant value compared with control data. (\* : P<0.05)

2) AMPA에 의한 세포손상에 대한 방어 작용

대조군은 43.45±3.90(%), GMYM 100, 300, 1,000, 2,000 µg/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 31.61±5.98(%), 35.00±5.06(%), 28.35±2.86(%), 25.25 ±2.32%)로 LDH 유리량이 나타나 이 역시 1000 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의성있게 억제 하였다(Table 4).

Table 4. Inhibitory Effect of GMYM on LDH Release induced by AMPA(20 µ M/ml)

Group	LDH Release(%)
Control	43.45±3.90*
SAM A	31.61±5.98*
SAM B	35.00±5.06*
SAM C	28.35±2.86*
SAM D	25.25±2.32*

3) Kainate에 의한 세포손상에 대한 방어 작용

대조군은 44.05±7.10(%), GMYM 100, 300, 1,000, 2,000 µg/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 37.46±1.82(%), 34.41±5.49(%), 23.10±1.24(%), 17.05 ±3.37%)로 LDH 유리량이 나타나 2000 µg/ml 농도에서만 대조군에 비하여 유의성있게 억제하였다(Table 5).

4) BSO에 의한 세포손상에 대한 방어 작용

대조군은 47.05±1.10(%), GMYM 100, 300, 1000, 2000 µg/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 31.48±2.36(%), 17.76±2.08(%),

30.36±2.92(%), 46.12± 8.78%)로 LDH 유리량이 나타나 100, 300, 1000 µg/ml 농도로 투여한 실험군에서 유의성있게 억제하였다 (Table 6).

Table 5. Inhibitory Effect of GMYM on LDH Release induced by Kainate(50 µ M/ml)

Group	Kainate(%)
Control	44.05±7.10*
SAM A	37.46±1.82*
SAM B	34.41±5.49*
SAM C	23.10±1.24*
SAM D	17.05±3.37*

Table 6. Inhibitory Effect of GMYM on LDH Release induced by BSO(10mM/ml)

Group	LDH Release(%)
Control	47.75±1.10*
SAM A	31.48±2.36*
SAM B	17.76±2.08*
SAM C	30.36±2.92*
SAM D	46.12±8.78*

Control group : BSO(10mM/ml) treated group, SAM A : BSO(10mM/ml) and GMYM(100 µg/ml) treated group, SAM B : BSO(10mM/ml) and GMYM(300µg/ml) treated group, SAM C : BSO(10mM/ml) and GMYM(1000µg/ml) treated group, SAM D : BSO(10mM/ml) and GMYM(2000µg/ml) treated group. \* : Statistically significant value compared with control data. (\* : P<0.05)

5) Fe<sup>2+</sup>에 의한 세포손상에 대한 방어 작용

대조군은 54.18±5.80(%), GMYM 100, 300, 1000, 2000 µg/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 53.38±2.77(%), 48.57±6.26(%), 9.94±3.29(%), 14.50± 1.99%)로 LDH 유리량이 나타나 1000, 2000 µg/ml 농도로 투여한 실험군에서 유의성있게 억제하였다 (Table 7).

Table 7. Inhibitory Effect of GMYM on LDH Release induced by Fe<sup>2+</sup>(100 µ M/ml)

Group	LDH Release(%)
Control	54.18±5.80*
SAM A	53.38±2.77*
SAM B	48.57±6.26*
SAM C	9.94±3.29*
SAM D	14.50±1.99*

2. In vivo test

1) 전뇌허혈에 대한 효과

(1) KCN 유발 혼수시간에 미치는 효과

비치사량의 KCN(1.87mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발시킨 ICR mouse의 혼수시간은 대조군이 20.57±4.45sec, GMYM 투여군은 18.65±2.14sec로 나타났다(Table 8).

Table 8. The Duration of Coma in ICR Mice induced by KCN(1.87 mg /kg i.v.)

Group	Sec
Control	20.57±4.45
GMYM	18.65±2.14

a) : Mean ± Standard Error, Control : 1.87mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of normal saline, GMYM : 1.87mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of 11.7mg/20g of GMYM

(2) KCN 유발 생존율에 미치는 효과

치사량의 KCN(3.0mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발시킨 대조군의 생존율은 0%인데 비하여, GMYM 투여군은 30%의 생존율을 나타냈다(Table 9).

Table 9. The Survival rate in ICR Mice induced by KCN(3.0mg/kg i.v.)

Group	%
Control	0
GMYM	30

2) 국소뇌허혈에 대한 효과

(1) 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적 및 부종율에 미치는 효과  
중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적(Table 10)과 부종율(Table 11, Fig. 4)은 대조군에 비하여 GMYM 투여군에서 감소 효과가 나타났다.

Table 10. Ischemic Ratio in MCA occluded SD Rats

No. of slices (n=4)	CONTROL(%)	GMYM(%)
1	20.78 ± 4.20	ND
2	36.30 ± 2.35	ND
3	38.71 ± 4.68	ND
4	32.25 ± 2.62	ND
5	25.24 ± 5.36	ND
6	8.70 ± 3.24	ND
7	4.01 ± 2.08	ND
8	ND	ND

a) : Mean ± Standard Error, Control : Oral administration of normal saline, GMYM : Oral administration of 117.0mg/200g of GMYM, ND : Not detectable

Table 11. Edema Ratio in MCA occluded SD Rats

No. of slices (n=4)	CONTROL(%)	GMYM(%)
1	11.71 ± 3.56	2.73 ± 2.15
2	20.87 ± 5.28	4.69 ± 1.13
3	17.03 ± 3.26	ND
4	19.15 ± 4.79	ND
5	7.35 ± 1.89	ND
6	1.17 ± 3.86	ND
7	ND	ND
8	ND	ND

a) : Mean ± Standard Error, Control : Oral administration of normal saline, GMYM : Oral administration of 117.0mg/200g of GMYM, ND : Not detectable

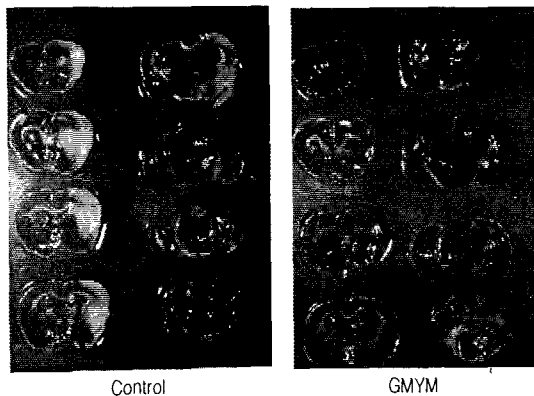


Fig. 4. Ischemic and edema in MCA occluded SD rats. Control : Oral administration of normal saline, GMYM : Oral administration of 117.0mg/200g of GMYM

(2) 신경학적 검사

① Forlimb test

Forlimb의 신경학적 등급은 대조군이 3.00±0.00, 2.25±0.25, 2.50±0.28 인데 비해 GMYM 투여군은 1.00±0.00, 1.25±0.25, 1.25±0.25로 나타나 호전현상을 보였다(Table 12).

Table 12. The Neurogenic Grade of Forlimb Test of Rat treated in GMYM

Sample	Neurogenic grade		
	Operation	Hypoxia	Recirculation
Control	3.00±0.00	2.25±0.25	2.50±0.28
GMYM	1.00±0.00	1.25±0.25	1.25±0.25

a) : Mean ± Standard Error, Control : Oral administration of normal saline, GMYM : Oral administration of 117.0mg/200g of GMYM

② Hindlimb test

Hindlimb의 신경학적 등급은 대조군은 1.00±0.00, 1.00±0.00, 1.00±0.00인데 비해 GMYM 투여군 0.5±0.28, 0.5±0.28, 0.5±0.28로 나타나 호전현상을 보였다(Table 13).

Table 13. The Neurogenic Grade of Hindlimb Test of Rat treated in GMYM

Sample	Neurogenic grade		
	Operation	Hypoxia	Recirculation
Control	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
GMYM	0.50±0.28	0.50±0.28	0.50±0.28

a) : Mean ± Standard Error, Control : Oral administration of normal saline, GMYM : Oral administration of 117.0mg/200g of GMYM

(3) 조직학적 변화

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 큰피라미트세포(large pyramidal neuron)들이 강한 염색성을 보였다. 주변에는 크고 작은 혈관들도 잘 관찰되었다. 해마 영역의 CA1~3 영역 부분에서 관찰소견은 양측모두에서 피라미트 모양의 CFV 염색에 강한 염색성을 보이는 세포들과 다소 염색성이 약하고 둥근 핵을 가진 세포들이 함께 관찰되었다(Fig. 5).

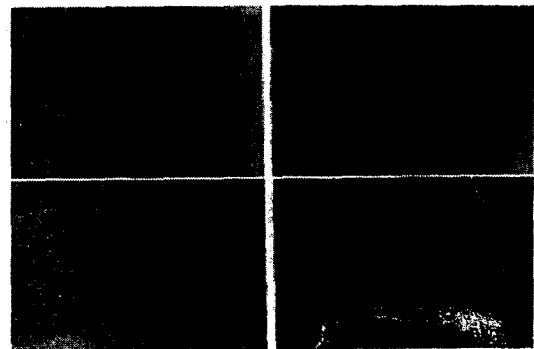


Fig. 5. Light micrographic appearance of the cerebral cortex and hippocampus, the normal group and cresyl fast violet stain, ×100. A : Normal cerebral cortex portion, B : Ischemic cerebral cortex portion, C : Normal hippocampal formation portion, D : Ischemic hippocampal formation portion

② 대조군

대조군에서는 정상 대뇌반구 쪽에서 관찰되는 대뇌피질의 형태학적 소견으로는 6층의 대뇌피질층(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 대뇌피질층의 구분이 어렵고 대부분의 세포핵들은 위축되고 세포간 경계는 불분명하고, 주변에는 크고 작은 공포 (vacuole)들이 관찰되었다. 정상 대뇌반구쪽의 해마형성체를 이루는 CA1~4 영역 부분과 치아이랑(dentate gyrus) 부근에서 관찰되는 신경세포들은 cresyl fast violet 염색에 강한 염색을 보이는 피라미드세포들과 비교적 둥근핵을 가진 과립세포들이 주로 관찰되었다. 반면 허혈성 손상을 받은 대뇌반구의 해마형성체 주변에서는 피라미드세포들은 거의 보이지 않고 주로 과립세포들과 작은 공포성 세포들이 관찰되었다(Fig. 6).

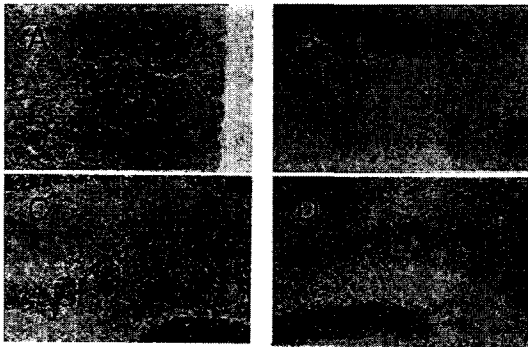


Fig. 6. Light micrographic appearance of the cerebral cortex and hippocampus, the control group and cresyl fast violet stain, ×100. A : Normal cerebral cortex portion, B : Ischemic cerebral cortex portion, C : Normal hippocampal formation portion, D : Ischemic hippocampal formation portion

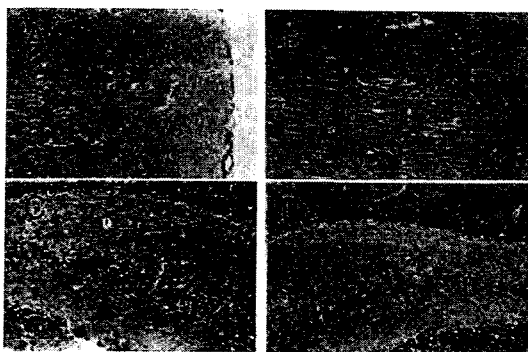


Fig. 7. Light micrographic appearance of the cerebral cortex and hippocampus, the GMYM group and cresyl fast violet stain, ×100. A : Normal cerebral cortex portion, B : Ischemic cerebral cortex portion, C : Normal hippocampal formation portion, D : Ischemic hippocampal formation portion

③ GMYM 투여군

손상 받지 않은 정상 대뇌반구쪽의 대뇌피질과 해마형성체 주변의 관찰소견은 대조군의 정상 대뇌반구와 동일한 관찰소견을 보였다. 허혈성 손상된 대뇌반구쪽의 대뇌피질부위에서는 손

상 받지 않은 부위의 피질에서 보이는 관찰소견과 유사하게 6층의 피질층과 각층에서 구분되는 세포들의 관찰이 뚜렷하였다. 해마형성체 주변에서는 손상 받지 않은 쪽과 비교해 피라미드세포들이 수적 감소를 보였으나 과립세포들의 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 7).

고찰

뇌허혈의 병리생리학적 과정은 혈관폐쇄로 인하여 산소와 혈당 공급이 소실과 세포막 붕괴와 에너지 생산과정의 와해로 인한 세포대사의 변화로 뇌세포는 과사된다<sup>26)</sup>. 뇌세포가 허혈에 빠지는 경우는 범위에 따라 전뇌허혈과 국소뇌허혈로 구분이 되는데<sup>11)</sup>, 전뇌허혈은 뇌혈류가 중단되면 심한 저산소증 상태가 되고 이로 인하여 세포내에 APT의 감소로 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>pump에 장애가 오고 Na<sup>+</sup>의 세포내 유입에 수분이 수동적으로 따라 들어가 세포 내에 부종이 유발되며 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<sup>12)</sup>. 또한 국소뇌허혈은 심한 허혈 상태의 중심부와 이를 둘러싸는 불완전한 허혈 상태의 주변부로 나누어지는데, 이 주변부에서는 측부순환이 부분적으로 뇌혈류를 공급하고 있어 세포의 ion 경사는 유지되나 전기적 활성도는 없는 상태가 되고 허혈 중심부에서는 전뇌허혈과 비슷한 일이 일어난다. 그러나 이 주변부에서 뇌혈류가 한계치 이하로 떨어지면 세포내 Ca<sup>2+</sup>이 증가하여 뇌세포의 비가역적인 손상을 가져올 수 있다<sup>13-14)</sup>. 뇌허혈로 인한 세포손상기전을 차단하려는 연구는 적절한 cerebral perfusion pressure의 조절, hyperventilation를 통한 동맥혈내 이산화탄소분압을 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 등이 있다<sup>15)</sup>. 최근 뇌허혈로 인한 뇌세포괴사를 억제하는 연구는 NMDA channel과 관련된 glutamate 수용체의 차단과 free radical의 차단을 통한 뇌신경 보호에 그 중점을 두고 있다<sup>15-19)</sup>. Glutamate는 신경전달물질로 뇌허혈시에 뇌세포에서 배출되는데, 이 물질이 신경세포를 흥분시켜 Na<sup>+</sup>과 Ca<sup>2+</sup>을 세포내로 유입시키고 비가역적인 세포 손상을 가져오며 신경세포에 죽음을 초래하게 된다. Glutamate의 수용체는 촉진성 NMDA 수용체와 non-NMDA 수용체로 구분된다. NMDA 수용체는 NMDA, 글리신, 아연, Mg<sup>2+</sup>, 펜사이클린과 결합하고, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, 가 세포내로 들어오는 데에 영향을 주며, non-NMDA 통로는 Na<sup>+</sup>와 K<sup>+</sup>에 대하여는 투과적이지 않다. 이러한 흥분성 수용체는 Ca<sup>2+</sup>, free radical 그리고 단백질 분해효소를 증가시켜 중요한 독성 작용을 일으킨다. 신경세포 내에서 산화질소 합성효소에 의한 산화질소의 합성은 glutamate에 대한 반응을 증가시키게 된다<sup>20)</sup>. 그러므로, 뇌허혈 발생시에 glutamate와 같은 흥분성 신경전달물질이 유리되어 수용체 작용을 통해 과량의 칼슘이

은 세포 내로 유입되어 excitotoxicity를 일으킴으로서 궁극적으로 뇌신경세포의 과사가 오는 것을 막기 위한 NMDA와 non-NMDA 수용체에 대한 길항제가 필요하며, 채<sup>16)</sup>의 국소 뇌허혈에 미치는 Glutamine의 역할, 최<sup>17)</sup>의 뇌허혈 발생전 K<sup>+</sup> 통로 조작이 해마의 [K<sup>+</sup>] 및 Glutamate 농도에 미치는 영향 등의 실험적 연구에서도 그 중요성과 가능성을 제시하고 있다.

Free radical은 허혈성 뇌손상시 세포내 과량의 cytotoxic 갈슘이온은 NOS의 활성화 및 과량의 NO 생성을 통해 reactive oxygen species 를 발생되면서 그 생성이 증가된다. 또한 자발적 또는 치료에 의해 허혈 부위의 혈류가 회복되어져 재관류가 일어날 때는 공급되는 산소가 free radical들을 발생시키는 생화학적 반응을 증강시킬 수 있으며, 이러한 free radical들은 DNA 손상 외에도 lipid peroxidation에 의해 세포막을 손상시킨다. 유리 지방산이 활성화되어서 신경세포막의 인지질을 파괴하고, prostaglandins, leukotrienes, free radical 등이 침착되고 세포내 단백질과 효소가 변성하여 세포 부종이 발생하는데 이 과정에서 free radical의 생성을 억제함으로써 free radical에 의한 peroxidation과 외세포막의 파괴를 제어할 수가 있다<sup>6,18,19)</sup>. 길<sup>18)</sup>의 쥐에서 허혈 및 재관류시 뇌의 온도변화에 의한 hydroxylradical 생성의 변화, 임<sup>19)</sup>의 Nitric Oxide Synthase의 억제가 전뇌허혈/재관류시 Hydroxyl Radical 생성에 미치는 영향 등의 연구에서와 같이 free radical들에 의한 뇌신경세포 손상을 방지하기 위하여 항산화제를 뇌졸중 치료를 위한 신경보호제의 개발은 하려는 노력이 활발하게 시도되고 있다. 加味六味地黃湯은 六味地黃湯에 活血祛瘀, 祛風除濕하는 鷄血藤, 白茯苓, 南星, 荊芥, 蔓荊子, 川芎, 稀莖과 平肝潛陽, 理氣疏風, 清熱安神하는 白僵蠶, 釣鉤藤, 天麻, 牡丹皮, 梔子, 竹茹 등의 약물을 가미한 처방이다(Table 1).

六味地黃湯<sup>21)</sup>에 대한 실험적 연구는 안<sup>22)</sup>의 항산화에 미치는 영향, 정<sup>23)</sup>의 국소뇌허혈량 및 혈압에 미치는 영향 등이 있었으나 뇌손상에 대한 실험적 연구는 이루어지지 않았다.

이에 저자는 加味六味地黃湯의 뇌손상억제에 대한 작용기전을 검증하여 효능을 입증하고자 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, 뇌손상 보호작용에 대한 실험은 세포독성에 의한 뇌세포손상 평가와 free radical에 의한 뇌세포손상 평가를 실시하였고 배양된 대뇌피질 세포에 NMDA, AMPA, kainate, BSO 및 Fe<sup>2+</sup>를 처리한 대조군과 GMYM을 투여한 실험군에서 각각의 LDH 유리량을 측정하였다. LDH는 생체 또는 장기에 널리 분포하며 유출효소로서 이 효소의 활성이 증가하는 것은 생체내 어느 장기에 세포파괴가 있어 혈중에 유출된다<sup>24)</sup>. 그러므로 본 실험에서는 glutamate receptor와 free radical에 대한 반응을 억제하게 되면 뇌허혈로 인한 뇌세포 과사를 억제하게 되므로 LDH의 유리량을 측정함으로써 그 세포과사 정도를 평가하였다. 먼저 NMDA에 의한 세포 손상에 대한 방어 효과에서는 1,000 µg/ml 농도 이상의 실험군에서 LDH 유리량을 유의성있게 억제하였고(Table 2), AMPA에 의한 세포 손상에 대한 방

어 효과에서도 1,000 µg/ml 농도 이상의 실험군에서 유의성있게 LDH 유리량을 억제하였다(Table 3). Kainate에 의한 세포 손상에 대한 방어 효과에서는 2,000 µg/ml 농도 실험군에서 유의성있게 LDH 유리량을 억제하였으며(Table 6), BSO에 의한 세포 손상에 대한 방어 효과에서는 GMYM 100 µg/ml 농도 이상의 실험군에서 대조군에 비하여 유의성있게 LDH 유리량을 억제하였다(Table 5). 자유 유리기에 대한 방어 작용 검색으로 BSO와 Fe<sup>2+</sup> 등의 free radical로 세포 손상을 유발한 실험에서는 각각 100 µg/ml, 1,000 µg/ml 농도 이상의 실험군에서 대조군에 비하여 유의성있게 LDH 유리량을 억제하였다(Table 5, 6).

이상의 실험결과 NMDA, AMPA 및 kainate 등의 세포독성 물질과 Fe<sup>2+</sup>와 BSO 등의 free radical에 의한 뇌세포 손상에 있어서 GMYM은 뇌허혈 차단에 의한 glutamate receptor를 억제하여 세포내 갈슘유입을 저하시킴으로써 뇌세포 손상을 방지하는 것으로 사료된다. 또한 이 같은 결과는 항 후 다양한 처방을 시료로 평가한 결과와의 비교치를 통하여 상대적인 평가가 이루어질 수 있을 것으로 보인다. 현재 보고된 수준의 단일 물질과는 농도면에서 큰 차이가 있지만, 본 시료가 여러 한약재로 구성된 복합이라는 점에서 매우 유의성있는 결과로 사료되어, 개별 약물에 대한 검색이 요구된다. 뇌허혈유발 실험은 전뇌허혈과 국소뇌허혈을 유발한 후에 전뇌허혈에서는 혼수시간과 생존율을 측정하고 국소뇌허혈에서는 뇌허혈면적, 부종율을 살피고 조직학적 검사와 신경학적 검사를 시행하였다.

전뇌허혈 유발에 사용한 KCN법<sup>7)</sup>은 세포내 mitochondria의 cytochrome oxidase의 활성을 억제하고 전자전달계에서의 효소 이용을 제한하여 고에너지 인산화합물을 고갈시킴으로써 세포독성을 발현한다. 미치사량의 KCN(1.87mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발시킨 혼수 시간을 측정한 결과, 加味六味地黃湯 투여군에서 혼수시간의 단축이 나타내었다(Table 7).

치사량의 KCN(3.0mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발시킨 생존율 측정 결과, 대조군의 생존율은 0%인데 비하여 加味六味地黃湯 투여군은 30%의 생존율을 나타내었다(Table 8). 이는 김<sup>25)</sup>과 배<sup>14)</sup>의 실험과 유사한 결과를 나타냈으며 加味六味地黃湯은 mitochondria의 손상으로 ATP가 고갈되고 인지질의 소실과 toxic oxygen radicals 등으로 인하여 세포내 손상 및 갈슘 농도의 증가하는 등의 cytochrome oxidase의 활성억제를 차단하여 급성 뇌조직 손상에 대한 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

국소뇌허혈에 사용된 Silicon rubber cylinder 제작은 Nagasawa 등의 방법<sup>8)</sup>에 의거하였는데, 허혈 후 재관류를 연구할 수 있는 장점을 가지고 있다<sup>26,27)</sup>. 또한 조직 손상을 검증하기 위한 TTC 용액은 심근경색에 사용된 이후<sup>28,29)</sup>, 뇌경색 부위를 측정하는데도 널리 사용되고 있다<sup>26,27)</sup>. 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 있다<sup>30)</sup>. 그러므로 시간 경과에 따른 뇌경색의 변화에 대한 TTC 용액을 이용한 관찰은 동맥폐쇄 후 탈수소 효소의 감소 정도에 좌우되며 병변

의 진행에 따라 감소 속도가 비례한다고 알려져 있어<sup>31)</sup>, TTC 용액의 염색 양상은 조직의 비가역적 손상 정도와 비례되므로 뇌경색의 시간변화에 따른 발생 위치와 크기를 알 수 있다<sup>32)</sup>. 뇌경색으로 인한 뇌부종은 뇌동맥을 폐쇄시킨 직후 수분부터 약 4시간까지 지속되는 세포독성 부종과 그 후 진행되는 혈관인성 부종으로 나누기도 하고<sup>133)</sup>, 발병기전에 따라 맥관원성 부종, 세포독성 부종, 간질성 부종으로 분류하기도 한다<sup>34)</sup>. 뇌부종은 혈뇌장벽 때문에 삼투압의 이동이 제한받고 뇌자체에 림프관이 없어 중추신경계의 수분함량이 증가되어 발생하는데, 두개내압의 증가를 유발하거나 악화시킴으로 뇌질환의 중요한 합병증이 된다<sup>33,34)</sup>. 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈면적 및 부종에 미치는 효과에서는 허혈 면적율과 부종율을 측정하여 허혈면적율에서는 대조군에 비하여 GMYM 투여군은 감소 효과를 나타내었고(Table 9), 부종율에서는 대조군에 비하여 GMYM 투여군에서 감소 효과를 나타내었다(Table 10, Fig. 4). 이는 안<sup>35)</sup>, 배<sup>14)</sup> 등과 비슷한 실험 결과로 加味六味地黃湯이 두개내혈관 폐색로 인한 급성기 뇌허혈시 측부순환을 활성화시키고 세포내 Ca<sup>2+</sup>유입을 차단하여 허혈중심부를 둘러싼 주변부의 부종을 억제하여 뇌손상을 보호하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

본 실험에서 중대뇌동맥 폐쇄 후, 저산소증 유발 후 및 재관류 후에 대한 각각의 신경학적 검사를 시행하여 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 신경학적 결손정도를 측정하였다. Forlimb test의 결과는 대조군에 비하여 GMYM 투여군은 1.00±0.00, 1.25±0.25, 1.25±0.25로 호전현상을 보였고(Table 11), Hindlimb test의 결과는 대조군에 비하여 GMYM 투여군 0.50±0.28, 0.50±0.28, 0.50±0.28로 호전현상을 보였다(Table 12). 조직학적 관찰에서 정상 대뇌피질과 해마형성체 주변 관찰 소견은 정상군과 동일하였으며, 허혈 손상된 대뇌피질과 해마형성체 주변 관찰 소견은 약간의 조직 괴사 소견이 보였으나 전체적인 조직학적 소견은 정상부위와 같이 양호하였다(Fig. 5, 6, 7).

이상의 결과를 종합하면 加味六味地黃湯은 뇌허혈로 인한 세포괴사에 이르는 과정에 주요한 인자로 작용하는 신경계 전달물질인 glutamate 등의 수용체 활성을 차단하여 세포손상을 보호하고 free radical에 의한 세포막손상을 억제하여 뇌손상을 보호하는 효과가 있는 것으로 사료된다. 또한 뇌허혈시 재관류와 측부순환을 활성화, mitochondria의 손상으로 인한 cytochrome oxidase의 활성억제 차단등의 기전을 통해 허혈면적 및 뇌부종의 감소와 신경결손 정도를 호전시킴으로써 뇌허혈로 인한 뇌손상을 회복시키는 것으로 보여지며 향후 그 기전에 대해서는 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

加味六味地黃湯이 뇌손상을 억제하고 뇌신경세포 손상을 보호하는 작용기전을 검증하고자 NMDA, AMPA, kainate로 유발된 뇌신경세포 손상에 대한 방어작용, BSO, Fe<sup>2+</sup> 등의 free radical로 인한 뇌신경세포 손상에 대한 방어작용, KCN을 이용한 전뇌허혈에 대한 효과 및 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 국소뇌허

혈에 대한 효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 加味六味地黃湯은 NMDA, AMPA 및 kainate를 투여한 대조군보다 LDH 유리량을 유의성있게 억제하였다. BSO 및 Fe<sup>2+</sup>을 투여한 대조군보다 LDH 유리량을 유의성있게 억제하였다. KCN 실험에서 유발된 혼수시간을 단축시켰고, 30%의 생존율을 보였다. 국소뇌허혈 유발 후 forelimb 및 hindlimb 신경학적 검사에서 호전양상을 보였다. 중대뇌동맥 혈류차단에 의한 허혈면적 및 부종율을 유의성있게 감소시켰다.

이상의 결과로 미루어 보아 加味六味地黃湯은 뇌허혈로 인한 초기 뇌세포손상을 방지하는 효과가 있어 허혈성 뇌경색 및 급성기 뇌손상에 활용될 수 있다고 보여지며 그 작용 기전에 대해서는 향후 계속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## 참고문헌

1. 해리슨 번역 편찬위원회 역 : HARRISON'S 내과학, 서울, 도서출판정담, p.1914, 2409, 2542, 1997.
2. 全國韓醫科大學 心系內科學教室 : 東醫心系內科學, 서울, 書苑堂, (上)p203, pp.438~462, (下)pp.72~73, 1995.
3. 郭隆璘 : 圖解腦神經外科學, 서울, 第一醫學社, pp.394~397, 1992.
4. 統計廳 : 死亡原因統計年譜, 대전, 통계청, pp.16~17, 1999.
5. 이정아 : 뇌졸중후 우울증과 일상생활 수행능력과의 상관관계, 동의신경정신과학회지 11;149-154, 2000.
6. 아담스 신경과학 편찬위원회 역 : 아담스 신경과학, 서울, 도서출판 정담, pp.720-722, 1998.
7. 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.
8. 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.
9. 정해주 : 뇌허혈 동물모델을 이용한 뇌기능개선제의 효능에 관한 연구 (I), 국립보건안전연구원보, 7(1):178-185, 1994.
10. 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.
11. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 고문사, pp.112-122, 125-129, 591-593, 1218-1220, 1994.
12. 大韓神經外科學會 : 神經外科學, 서울, 中央出版社, pp.275-279, 1998.
13. 신용철 : 급성 국소 허혈성 뇌부종으로 인한 외조직의 생화학적 변화에 대한 실험적 연구, 대한신경외과학회지, 18(4): 525-533. 1989.
14. 배경일 : 疏風補心瀉이 高血壓, 血栓 및 腦損傷에 미치는 영향, 大田大學校 大學院, 2002.
15. 김인세 : 뇌허혈과 뇌보호, 대한마취과학회지 33:195-203, 1997.



16. 채창희 : 흰쥐에서 일시적 국소 뇌허혈에 미치는 Glutamine의 역할, 대한마취과학회지 38:1062-1067, 2000.
17. 최규택 : 뇌허혈 발생전 K<sup>+</sup> 통로 조작이 해마의 [K<sup>+</sup>] 및 Glutamate 농도에 미치는 영향, 대한마취과학회지 36:510-517, 1999.
18. 길호영 : 쥐에서 허혈 및 재관류시 뇌의 온도변화에 의한 hydroxylradical 생성의 변화, 대한마취과학회지 27(9):1035-1044,1994.
19. 임소영 : Nitric Oxide Synthase의 억제제 전뇌허혈/재관류시 Hydroxyl Radical 생성에 미치는 영향, 대한마취과학회지 36:710-722, 1999.
20. The Merk manual 편집위 : The Merk manual(17th Edition), 도서출판한우리, 서울, pp.1465-1466, 2002.
21. 신재용 : 방약합편해설, 서울, 전통의학연구소, p.49, 1993.
22. 안상원 : 熟地黃과 六味地黃湯이 노화과정 흰쥐에서의 항산화기전에 미치는 영향, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 8(1):593-623, 1999
23. 정현우 : 六味地黃湯加味方이 국소뇌혈류량 및 혈압에 미치는 실험적 효과, 대한동의병리학회지 14(2):245-255, 2000.
24. 이귀녕 : 임상병리과일(3th/Edition), 의학문화사, 서울, pp.374-376, 2000.
25. 김윤식 : 滌痰湯과 加味滌痰湯이 腦損傷 및 血栓에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 2000.
26. 김현집 : 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.
27. 송동식 : 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.
28. 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.
29. 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.
30. Nachlas MM, Tson KC, Souza ED, Cheng CS and SeligmanAM : Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J Histochem Cytochem, 5:420-436, 1963.
31. Fine G, Morales A, Scherpella J : Experimental myocardial infarction. Arch Pathol, 82:4-8, 1966.
32. 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.
33. 이광우·정희원 편저 : 임상신경학, 서울, 고려의학, pp.128-131, 203-204, 1997.
34. Anish Bahra, Katia Cikurel : Mosby's crash course (Neurology), 서울, 한우리, pp.121-122, 2000.
35. 안택원 : 加味通栓化痰湯이 血栓, 腦虛血 및 腦損傷에 미치는 影響, 大田大學校 大學院, 1999.