

원저

加味豨簽湯이 高血壓 및 腦損傷에 미치는 效果

유종삼, 김동희¹⁾, 박종오¹⁾, 남궁욱²⁾, 홍석

동신대학교 한의과대학 내과학교실, 대전대학교 한의과대학 병리학교실¹⁾, 대전대학교 한의과대학 신경생리학교실²⁾

Protective Effects of *Gamiheechum-tang* (*Jiaweixiqian-tang*) on Hypertension and Brain Damage

Jong-Sam Ryu, Seok Hong, Jong-O Park¹⁾, Uk Namgung²⁾, Dong-Hee Kim¹⁾

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongshin University
Department of Pathology¹⁾, 3: Department of Neurophysiology, College of Oriental Medicine, Daejeon University²⁾

Objective : The goal of the present study was to investigate the protective effect of *Gamiheechum-tang* (*Jiaweixiqian-tang*; GHCT) on brain tissue damage from chemical or ischemic insults.

Methods : Levels of cultured cortical neuron death caused by toxic chemicals were measured by LDH release assay. Neuroprotective effects of GHCT on brain tissues were examined in vivo by ischemic model of middle cerebral artery (MCA) occlusion.

Results : Animal groups treated with GHCT showed significantly decreased hypertension, and reduced levels of aldosterone, dopamine, and epinephrine in the plasma. GHCT treatments (10-200 μ g/ml) significantly decreased cultured cortical neuron death mediated by AMPA, kainate, BSO, or Fe²⁺ when measured by LDH release assay. Yet, cell death mediated by NMDA was effectively protected by GHCT at the highest concentration examined (200 μ g/ml). In the in vivo experiment examining brain damage by MCA occlusion, affected brain areas by ischemic damage and edema were significantly less in animal groups administered with GHCT compared to the non-treated control group. Neurological examinations of forelimbs and hindlimbs showed that GHCT treatment improved animals' recovery from ischemic injury. Moreover, the extent of injury in cortical and hippocampal pyramidal neurons in ischemic rats was much reduced by GHCT, whose morphological features were similarly observed in non-ischemic animals.

Conclusion : The present data suggest that GHCT may play an important role in protecting brain tissues from chemical or ischemic injuries. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(3):72-83)

Key Words: *Gamiheechum-tang* (*Jiaweixiqian-tang*; GHCT), hypertension, brain damage, LDH, ischemia, MCA occlusion, pyramidal neurons

서론

- 접수 : 2003년 4월 24일 · 논문심사 : 2003년 5월 1일
· 채택 : 2003년 6월 23일
· 교신저자 : 김동희, 대전광역시 동구 용운동 대전대학교 한의과대학 병리학교실
(Tel: 042-280-2623, E-mail: dhkim@dju.ac.kr)

뇌졸중은 뇌혈관의 폐색이나 출혈로 인하여 급격한 의식장애 및 운동장애 등을 유발하는 뇌혈관 장애와 이로 인한 뇌신경증후군을 지칭하는 것으로,

최근에는 생활 수준 향상과 식생활의 서구화에 따른 동맥경화의 증가에 의해 허혈성 뇌질환이 늘어나는 추세에 있어 사회적 문제로 대두되고 있다²⁾.

뇌허혈로 인해 뇌에 산소와 포도당 공급이 소실되고, 세포막 붕괴와 에너지 생산 과정의 와해로 인한 세포 대사의 변화로 결국 세포 괴사에 이르게 된다³⁾. 최근 이러한 세포 손상 기전에 대한 실험 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 흥분성 아미노산의 과도한 분비, 칼슘 대사장애, 산소 유리기의 생성 증가 등이 주 기전으로 추정되고 있다⁴⁾.

한의학에서 뇌졸중은 중풍의 범주에 속하는데, 중풍은 風, 火, 濕痰, 氣虛, 血瘀로 인해 心竅와 清陽之府인 뇌가 응색되어 卒然昏到, 人事不省, 半身不遂, 言語不利, 口眼喎斜 등의 증상을 유발하는 질환으로⁵⁾, 최근 중풍에 활용되는 祛痰, 活血, 補虛, 清熱하는 약재와 처방을 이용한 연구⁶⁻¹¹⁾가 활발하게 시도되고 있다.

임상에서 중풍에 활용되고 있는 加味 豨 蠲 湯은 祛風清熱하면서 補虛祛痰하는 효능을 가진 약재들로 구성된 처방으로, 이 중 군약인 豨 蠲 은 祛風濕하는 효능이 있으며¹²⁾, 기존의 연구에서 이미 혈관의 이완과 혈압 강하 효과 및 혈전 억제에 미치는 영향에 관하여 보고된 바 있다¹³⁻¹⁵⁾.

이에 저자는 보다 효과적인 뇌졸중의 치료 처방을 개발하기 앞서, 현재 임상에서 뇌졸중에 응용되고 있는 加味 豨 蠲 湯의 작용 기전을 탐색하고자, SHR의 혈압, 심박수 및 혈장 성분의 변화를 검색하고, 배양한 생쥐의 대뇌피질 신경세포에 NMDA, AMPA, Kainate, BSO, Fe²⁺를 처리하여 각각의 LDH 유리량을 측정하였으며, 뇌허혈시의 뇌손상 보호효과를 알아

보고자 백서의 중대뇌동맥 혈류를 차단한 국소뇌허혈에 대한 보호효과 등을 관찰하였다.

방 법

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 180~250 g의 Sprague-Dawley계(SD: 대한실험동물센터) 웅성 백서와, 웅성 Spontaneous Hypertensive Rat(SHR, 대한실험동물센터)으로 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)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) 약물

본 실험에 사용한 加味 豨 蠲 湯(GHCT)의 구성 약물은 동신대학교 부속한방병원에서 구입하였고, 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 NMDA(N-methyl-D-aspartate, sigma), AMPA(α -amino- 3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, sigma), kainate (sigma), Fe²⁺(ferrous chloride, sigma), BSO (buthionine sulfoximine, sigma), dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS-A; Sigma Co., U.S.A), normal

The Compositions of Gamiheecheum-tang(Jiaweixiqian-tang;GHCT) Extracts

韓藥名	生藥名	用量(g)	韓藥名	生藥名	用量(g)
豨蠲(九蒸)	Siegesbeckiae Herba	16	龍骨	Fossilia Osis Mastodi	4
柴胡	Bupleuri Radix	8	牡蠣	Ostreae Concha	4
牛膽南星	Arisaematis Rhizoma	5	大黃	Rhei Radix et Rhizoma	3
茯苓	Poria	5	枳實	Aurantii Immaturus Fructus	3
黃芩	Scutellariae Radix	5	人蔘	Ginseng Radix	2
芍藥	Paeoniae Radix Alba	5	甘草	Glycyrrhizae Radix	2
桂枝	Cinnamomi Ramulus	4	山查肉	Crataegii Fructus	4
Total amount					70

saline(중외제약, Korea), sodium citrate(Sigma Co., U.S.A), 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazoliumchloride (Sigma Co., U.S.A), gerorane (중외제약, Korea), xantopren VL(Bayer Dental, Japan), optosil-Xantopren activator(Bayer Dental, Japan), cresyl fast violet(Sigma Co., U.S.A), paraformaldehyde(Sigma Co., U.S.A), Aldosterone RIA Diagnostic kit(Abbott Co., U.S.A), superoxide dismutase(Stressgen Co., USA), Histostain plus kit (Zymed Co., U.S.A), H₂O₂(Sigma Co., U.S.A), formalin(Sigma Co., U.S.A), glutaraldehyde(Sigma Co., U.S.A), OsO₄(Sigma Co., U.S.A), toluidine blue(Sigma Co., U.S.A), hematoxylin(Sigma Co., U.S.A), eosin(Sigma Co., U.S.A) 등을 사용하였다. 기기는 centrifuge (Beckman Co., U.S.A), rotary vacuum evaporator(Buchi 461, Switzerland), deep freezer (Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), autoclave (Hirayama, Japan), ultrasonic cleaner (Branson Ultrasonics Co., 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), physiograph Model 7 (GRASS Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A), optical microscope(Olympus BH-2., Japan)등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

GHCT 4칩을 3,000 ml round flask에 넣고 증류수 2,000 ml를 넣은 후, 3시간 가열 추출, 침전물을 3회 여과(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, 1칩당 23.6 g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 항고혈압 작용

(1) SHR을 이용한 혈압 측정

혈압과 심박수의 측정은 SHR 백서를 대조군과 GHCT 투여군으로 나누어 대조군(n=5)은 생리식염수를, GHCT 투여군(n=5)은 농축된 GHCT를 5주간 매일 786 mg/kg의 농도로 물에 타서 경구 투여하였다. 5주간 식염수와 GHCT 투여한 후, cage에서 2시간 동안 안정시키고, 37.5℃ 예비 보온기에 10분간 넣어 두었다가, physiograph Model 7 (GRASS Instrument Co. Quincy, Mass., U.S.A.) 7P8 channel로 마취하지 않은 상태에서 각 군(n=5)의 혈압을 측정하였다. Chart paper 1 cm에 혈압은 50 mmHg (baseline ; 0)으로 보정하였다.

(2) 채혈 및 혈장 분리

백서를 ether로 마취시킨 다음, 쇄골하정맥에서 혈장 1 ml를 채혈하여 3 mg/ml EDTA 용액을 0.5 ml로 채운 용기에 가한 후, 4℃에서 3,000 r.p.m.으로 15분간 원심 분리시켜 혈장을 확보한 다음 catecholamine과 aldosterone의 정량을 위하여 -80℃에 보관하였다.

(3) 혈장 성분의 측정

① Aldosterone 정량

Aldosterone 정량은 RIA법¹⁶⁾에 따라 동위원소 I-125 추적자를 이용한 시판용 aldosterone RIA Diagnostic kit(DPC Co., U.S.A.)을 사용하였고, Gamma counting은 Gamma count Cobra II 분석 장비를 이용하여 정량하였다.

② Catecholamine 정량

Hjerdahl 변법¹⁷⁾에 따라 혈장중의 catecholamine을 4℃에서 추출하였다. 혈장 0.1M HClO₄를 가하여 제단백하고 acid washed alumina에 흡착시킨 다음 증류수로 수세하고, 0.1M HClO₄에 용출시켜 용출액 20 μl를 HPLC(High Performance Liquid Chromatography; Waters Model U6K Injector, 510 pump)에 주입하여 norepinephrine, epinephrine, dopamine의 함량을 측정하였다. HPLC에서 분리된 물질들은 정량(Data Module: Waters model 745)하였다. Column은 C18 stainless steel column (5 μ, 150 mm×4.6 mm Waters model 460: KCl reference electrode)이며, 가해진 전압은 +0.63V였다. 측정에 필요한 시약은 특급품을 사용하였으며, 증류수는 Milli -QTM Waters system

(Millipore)을 통과시킨 초순수를 사용하였다.

3) 뇌손상 보호작용

(1) 대뇌 피질 신경세포 배양

15일 된 mouse 태아의 neocortices를 분리하여 조직을 단일 세포로 나눈 후 5% horse serum, 5% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 21 mM glucose가 포함된 Eagle's minimal essential media(Earle's salts, supplied glutamine-free) 배양액을 이용하여 배양하였다. 배양한 신경세포 1×10⁵/well를 100 μg/ml poly-D-lysine과 4 μg/ml laminine로 precoating된 24 well plate에 분주하여 다시 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 3-5 일째에 glia의 번식을 억제하기 위해 Ara-C로 처리한 후, DIV 7-10 이후에 실험을 실시하였다.

(2) 과흥분성 세포 손상과 산화적 세포 손상의 유발 및 분석

Neuron과 glia가 포함된 대뇌 피질세포에 각각 NMDA 20 μM, AMPA 20 μM, kainate 50 μM, Fe²⁺ 100uM, buthionine sulfoximine 10 mM를 처리한 후 21 mM glucose와 26.5 mM bicarbonate가 포함된 Eagle's minimal essential media에 24시간 동안 배양하였다. 신경 세포사는 24시간 후 죽은 세포로부터 배지로 유리된 LDH 활성을 측정하여 정량화하였다.

(3) 국소 뇌허혈 유발

백서 8마리를 1군으로 하여 대조군과 GHCT 투여군으로 구분하였다. 중대뇌동맥(MCA) 폐쇄 2시간 전에 실험 백서의 체중을 측정하고 GHCT 157.3 mg/200 g/day을 생리식염수 2 ml에 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. 먼저 백서를 수술대에 고정시키고 Royal Multi-Plus(Royal Medical Co, Korea)를 사용하여 N₂O(아산화질소)와 O₂(산소)의 비율을 7 : 3으로 조정하여 enflurane로 흡입 마취하였다. Nagasawa의 방법¹⁸⁾에 따라 목 중앙을 절개하고 미주 신경에 손상을 주지 않도록 주의하면서 우측 총경동맥, 내경동맥 및 외경동맥을 분리한 뒤 총경동맥과 외경동맥을 결찰

하고 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 1 cm정도 당겨 재관류를 행하였다.

허혈 면적 및 부종율 측정은 수술 24시간 후에 백서의 뇌를 꺼내어 brain matrix(ASI Instruments, Warren, MI., U.S.A)를 이용하여 2 mm두께의 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 않음으로 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 산출하였다.

$$\text{虛血 面積(\%)} = \frac{C}{A+B} \times 100 \quad \text{浮腫率(\%)} = \frac{A-B}{2 \times B} \times 100$$

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)

신경학적 검사는 중대뇌동맥 폐쇄 후, 저산소증 유발 후 및 재관류 후에 대한 각각의 신경학적 검사를 실행하여 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 신경학적 결손 정도를 측정하였다. 신경학적 결손 정도는 Bederson의 방법¹⁹⁾에 의하여 그 정도를 forelimb은 4등급으로, hindlimb은 2등급으로 나누어 점수화 하였으며 증상에 따른 등급 분류는 다음과 같다.

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

The Neurologic Examination Grading System

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

Table 1. The Effect of GHCT on Blood Pressure

	Control	GHCT
BP(mmHg)	173.3±3.3	157.0±3.4*

Control : Saline treated group GHCT : 786 mg/kg of GHCT treated group
* : Statically significant value compared with control data by T test
(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

Table 2. The Effect of GHCT on the Plasma Level of Aldosterone in SHR

	Control	GHCT
Plasma aldosterone levels (pg/ml)	27.2±1.1	7.8±1.8**

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 블럭을 제작하였다. 허혈성 손상에 의한 신경세포의 손상 정도는 Nissl 소체에 대한 특수 염색으로, 4µm 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.

성적

1. 항고혈압 효과

1) 혈압에 미치는 영향

SHR을 이용한 혈압 측정에서는 대조군이 173.3±3.3 mmHg로 나타난 반면, GHCT 투여군은 157.0±3.4 mmHg로 나타나 유의성있는(p<0.05) 감소를 보였다 (Table 1).

2) 혈장 성분에서 미치는 영향

(1) Aldosterone 함량의 변화

Table 3. The Effect of GHCT on the Plasma Level of Catecholamine in SHR

	Control	GHCT
Plasma dopamine levels (pg/ml)	106.4±8.8	64.4±12.4**
Plasma norepinephrine levels (pg/ml)	589.6±163.2	475.8±142.1
Plasma epinephrine levels (pg/ml)	5060.4±670.2	882.5±229.5*

혈장 성분 검색 결과, aldosterone 농도는 대조군이 27.2±1.1 ng/dL, GHCT 투여군이 7.8±1.8 ng/dL로 나타나 유의성 있는(p<0.01) 감소를 보였다(Table 2).

(2) Catecholamine 함량의 변화

Catecholamine 중 dopamine 함량은 대조군이 106.4±8.8 pg/ml, GHCT 투여군이 64.4±12.4 pg/ml로 유의성있는(p<0.01) 감소를 보였으며, epinephrine 함량은 대조군이 5060.4±670.2 pg/ml, GHCT 투여군이 882.5±229.5 pg/ml로 나타나 이 역시 유의성 있는(p<0.05) 감소를 보였다. 이에 비해 norepinephrine 함량은 대조군, GHCT 투여군이 각각 589.6±163.2 pg/ml, 475.8±142.1 pg/ml로 감소되었으나 유의성은 없었다(Table 3).

2. 뇌손상 보호 효과

1) 과흥분성 세포 손상에 대한 방어 작용

(1) NMDA에 의한 세포 손상에 대한 방어 작용

배양한지 13-15일 된 대뇌피질 세포에 20µM NMDA를 단독으로 처리한 대조군은 90.70±2.19(%)로 LDH 양이 측정되었고, GHCT 10, 30, 100, 200 µg/ml 농도로 투여한 실험군은 각각 95.27±5.17(%), 89.77±5.01(%), 95.77±5.83(%), 83.30±3.99(%)로 나타났다(Fig. 1).

(2) AMPA에 의한 세포 손상에 대한 방어 작용

배양한지 13-15일 된 대뇌피질 세포에 20µM AMPA를 단독으로 처리한 대조군은 48.27±2.60(%)

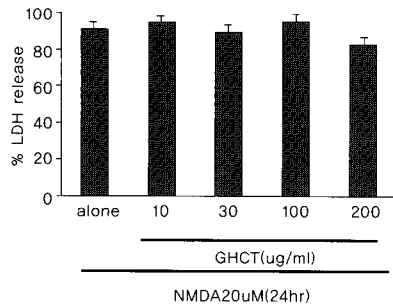


Fig. 1. Inhibitory effect of GHCT on LDH release induced by NMDA.

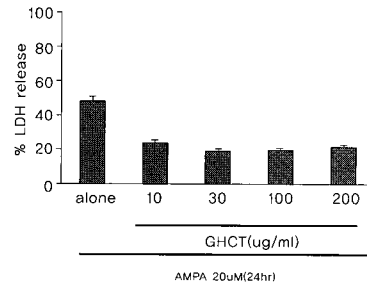


Fig. 2. Inhibitory effect of GHCT on LDH release induced by AMPA.

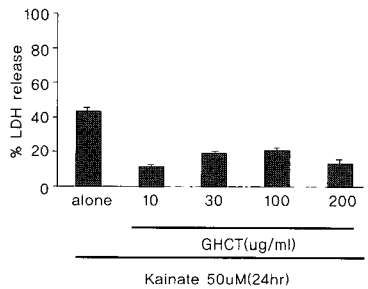


Fig. 3. Inhibitory effect of GHCT on LDH release induced by Kainate.

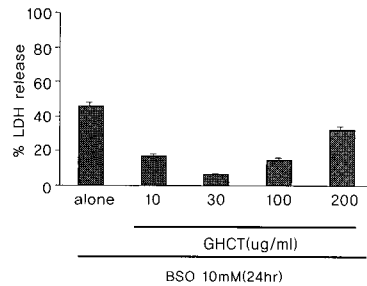


Fig. 4. Inhibitory Effect of GHCT on LDH Release Induced by BSO.

로 LDH 량이 측정되었고, GHCT 10, 30, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 투여한 실험군은 각각 $24.03 \pm 1.31(\%)$, $19.20 \pm 5.08(\%)$, $19.86 \pm 1.81(\%)$, $21.50 \pm 1.31(\%)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 모든 농도에서 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 2).

(3) Kainate에 의한 세포 손상에 대한 방어 작용

배양한지 13-15일 된 대뇌피질 세포에 50 μM kainate를 단독으로 처리한 대조군은 $43.49 \pm 3.71(\%)$ 로 LDH 량이 측정되었고, GHCT 10, 30, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 투여한 실험군은 각각 $12.32 \pm 2.37(\%)$, $19.99 \pm 2.92(\%)$, $21.03 \pm 2.44(\%)$, $14.86 \pm 2.17(\%)$ 로 대조군에 비하여 모든 농도에서 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 3).

2) 산화적 세포 손상에 대한 방어 작용

(1) BSO에 의한 세포 손상에 대한 방어 작용

배양한지 13-15일 된 대뇌피질 세포에 10mM BSO를 단독으로 처리한 대조군은 $45.74 \pm 0.64(\%)$ 로

LDH 방출량이 측정되었고, GHCT 10, 30, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 투여한 실험군은 각각 $17.34 \pm 4.94(\%)$, $6.02 \pm 1.63(\%)$, $14.63 \pm 4.07(\%)$, $32.50 \pm 4.23(\%)$ 로 나타나 대조군에 비하여 모든 실험군에서 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 4).

(2) Fe^{2+} 에 의한 세포손상에 대한 방어 작용

배양한지 13-15일 된 대뇌피질 세포에 100 μM Fe^{2+} 를 단독으로 처리한 대조군은 $51.99 \pm 4.49(\%)$ 로 LDH 량이 측정되었고, GHCT 10, 30, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 투여한 실험군은 각각 20.06 ± 1.71 , $9.41 \pm 2.33(\%)$, $8.01 \pm 1.00(\%)$, $7.34 \pm 0.30(\%)$ 로 나타나 농도 의존적으로 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 5).

3) 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적 및 부종율에 미치는 효과

중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적율과 부종율은 fig.6에서 보는 바와 같이 전반적으로 GHCT 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 나타

Table 4. Forelimb and Hindlimb Test of Rat

Sample	Operation	Hypoxia	Recirculation	
Forelimb	Control	3.00±0.00	2.25±0.25	2.5±0.28 ^{a)}
	GHCT	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Hindlimb	Control	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00 ^{b)}
	GHCT	0.75±0.25	0.00±0.00	0.5±0.28

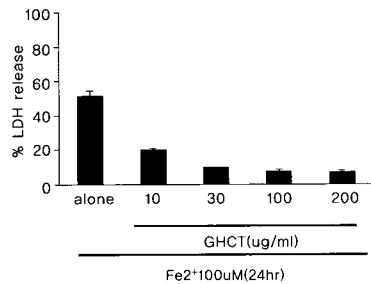


Fig. 5. F Inhibitory Effect of GHCT on LDH Release Induced by Fe²⁺.

내었다(Fig. 6).

2) 신경학적 검사

Forelimb test의 결과는 대조군은 3.00±0.00, 2.25±0.25, 2.5±0.28로 나타나는데 비하여 GHCT 투여군은 1.00±0.00, 1.00±0.00, 1.00±0.00로 나타나 호전 현상을 보였다. Hindlimb test의 결과는 대조군은 1.00±0.00, 1.00±0.00, 1.00±0.00, GHCT 투여군은 0.75±0.25, 0.00±0.00, 0.5±0.28으로 나타나 이 역시 호전 현상을 보였다(Table 4).

3) 조직학적 관찰

(1) 대조군

대조군의 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 관찰

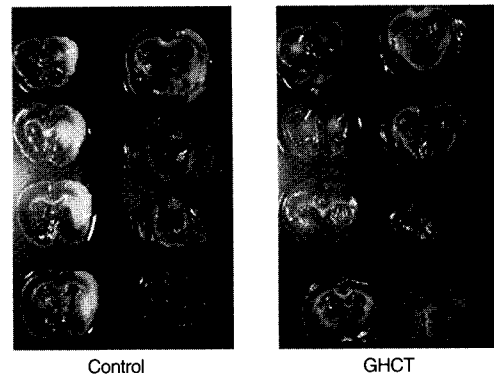


Fig. 6. Ischemic and edema in MCA occluded SD rats.

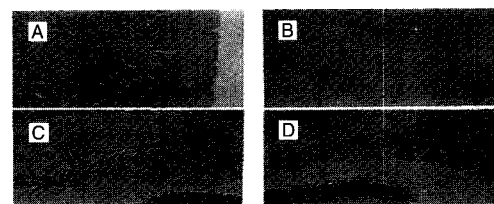


Fig. 7. Light micrographic appearance of the cerebral cortex and hippocampus, the control group and cresyl fast violet stain, X100. A. Normal cerebral cortex portion (left) B. Ischemic cerebral cortex portion (right) C. Normal hippocampal formation portion (left) D. Ischemic hippocampal formation portion (right).

되는 신경세포들은 cresyl fast violet 염색에 강한 염색을 보이는 피라미드 세포들과 비교적 등근핵을 가진 과립세포들이 주로 관찰되었다. 반면 허혈성 손상을 받은 대뇌반구의 해마형성체 주변에서는 피라미드세포들은 거의 보이지 않고 주로 과립세포들과 작은 공포성 세포들이 관찰되었다(Fig. 7).

(2) GHCT 투여군

손상 받지 않은 정상 대뇌 반구쪽의 대뇌 피질과 해마 형성체 주변의 관찰 소견은 대조군의 정상 대뇌 반구와 동일한 관찰 소견을 보였다. 손상된 대뇌 반구쪽의 대뇌 피질 부위에서는 cresyl fast violet에 강한 염색을 보이는 피라미드 세포수가 약간 감소하였으나, 전체적인 조직의 보존 상태는 손상받지 않은 부위와 유사하였다. 해마형성체 주변조직 역시 손상 받지 않은 부위와 아주 유사한 조직학적 소견을 보

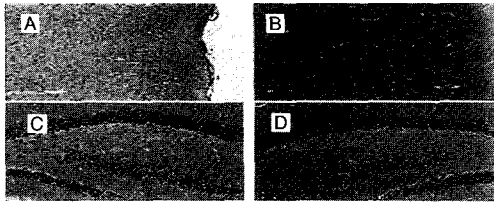


Fig. 8. Light micrographic appearance of the cerebral cortex and hippocampus, the GHCT group and cresyl fast violet stain, X100. A. Normal cerebral cortex portion (left) B. Ischemic cerebral cortex portion (right) C. Normal hippocampal formation portion (left) D. Ischemic hippocampal formation portion (right).

였다(Fig. 8).

고찰

뇌는 인체 산소 소비량의 20%를 소모하는 생명의 중추로서 자체적으로는 산소와 포도당의 비축능력이 없어 심장에서부터 지속적인 혈액을 공급받아 인체의 활동을 원활하게 한다²⁰.

뇌혈관은 혈관내 압력에 따라 자동적으로 일정한 압력을 유지하게 해 주는 자동조절능에 의해 조절되는데, 혈관 협착을 초래하는 여러 가지 병적인 상태, 즉 동맥경화, 동맥염, 종양, 외상 등에서는 자동 조절 기능이 상실되기도 한다. 그러나 만약 정상적으로 50-60 ml/100gm/min의 뇌혈류량이 유지되지 못하고 감소하게 되면 뇌의 저산소성이나 허혈성 손상 등이 발생하여 뇌조직에 허혈증이나 경색 등의 이상 병변이 초래되어, 뇌조직 대사가 저하되고, 점차적으로 세포사가 이루어져 뇌세포의 변성 및 괴사가 일어남으로 의식장애, 운동장애, 언어장애 등의 증상이 나타나게 되는데^{21,22}, 뇌신경세포 손상 정도를 결정하는 주된 결정요소는 허혈의 기간과 이 기간중의 뇌혈류의 정도에 따라 달라진다.

허혈성 뇌혈관 질환이 발생하면 혈전 용해제를 제외하고는 뇌신경세포 손상을 보호해 줄 수 있는 적절한 치료제가 현재로서는 없는 실정인어서, 혈류를 회복시키거나 세포내로의 칼슘유입을 막는 등의 적

극적인 초기 중재를 통해 신경세포를 보호할 수 있는 약제의 개발이 필요한 실정이다.

최근 연구를 살펴보면 뇌허혈로 인한 세포손상에 적절한 CPP(cerebral perfusion pressure)의 조절, 칼슘통로차단제(calcium channel blockers)의 이용, glucocorticoids의 항부종과 항염작용, 삼투압제제를 이용한 항부종요법, 저체온요법(hypothermia), 면역 및 호르몬을 이용하는 것 등이 있으며, 또한, 뇌허혈시 excitotoxin antagonists와 free-radical scavengers 와 inhibitors을 이용한 뇌손상 억제에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다²³.

허혈로 세포괴사에 이르는 과정에 관여하는 주요한 인자는 glutamate나 aspartate와 같은 아미노산계 신경 전달물질이다. 뇌신경세포에 산소의 공급이 중단되면 세포내 ATP 생산이 감소되어 Na⁺-K⁺ pump가 제대로 작용을 하지 못하게 되며, 이로 인해 세포내의 K⁺ 농도가 증가되어 세포막의 탈분극이 일어나고, glutamate에 의해 작용되는 통로에 작용하여 Ca²⁺, Na⁺, Cl⁻와 물이 들어가게 한다. 초기 세포사는 과도한 부종과 삼투압의 변화에 따른 세포막의 용해에 의해 일어나며, 지연성 세포사는 세포내 Ca²⁺농도가 증가하여 유리기형성, 세포막 손상, arachidonic acid 대사물질 형성 및 미토콘드리아 작용부전 등을 일으킨다^{21,22}. 한편 phospholipase가 활성화되어서 신경세포의 인지질을 파괴하며, prostaglandins, leukotrienes, free radical 등이 침착되고 단백질과 효소가 변성하여 세포부종이 발생한다²⁴.

뇌혈관질환은 한의학적으로 중풍의 범주에 속하는데, 이에 대한 원인으로 張²⁵은 外感風邪와 正氣虛로 보았고, 金元時代의 劉²⁶은 각각 痰火說을 주장하였으며, 清代의 王²⁷은 氣虛血瘀를 주 원인으로 보았다. 이에 대한 치료법으로 祛痰活血, 清熱補虛하는 약제가 다용되고 있으며, 최근에는 이러한 약물과 처방을 시료로 중풍과 관련된 연구가 진행되고 있다.

加味稀 養湯은 임상에서 중풍에 응용되고 있는 처방으로, 개별 약제에 대한 본초학적 효능을 살펴보면 稀 養은 祛風濕, 強筋骨하는 효능이 있으며, 熟用(酒蒸製)하면 성질이 溫하여 風濕으로 인한 四肢麻痺,

半身不遂, 筋骨不利에 사용되어진다. 柴胡, 黃芩, 大黃은 清熱하면서 解鬱通經하며, 牛膽南星은 風痰을 치료하는 聖藥으로서 清熱化痰, 熄風定驚하고, 茯苓, 人蔘, 甘草는 補氣健脾하는 補氣藥으로 사용된다. 芍藥은 疏肝止痛, 養血斂陰하며, 桂枝는 溫經通脈, 助陽化氣하고, 龍骨, 牡蠣는 平肝潛陽, 鎮驚安神의 대표약물이다. 枳實, 山楂肉은 理氣消積하는 약물이다²⁸⁾.

종합해보면 加味稀簽湯은 祛風清熱하면서 補虛祛痰하는 효능으로 중풍에 응용될 수 있으리라 사료되어 고혈압과 뇌손상에 미치는 본 약재의 효능을 실험적으로 규명하고자 하였다.

본 실험에서는 항고혈압에 대한 작용을 알아보고자 SHR 모델의 혈압 변동과 혈장 성분중 aldosterone과 catecholamine 함량 변화를 측정하였고, 뇌신경세포의 보호 효과를 알아보기 위하여 in vitro에서 배양한 생쥐의 대뇌피질 신경세포에 NMDA, AMPA, Kainate 등으로 과흥분성 세포 손상을 유발하고 BSO, Fe²⁺ 등으로 산화적 세포 손상을 일으킨 후 각각의 세포에서 유리되는 LDH 양을 측정하였으며, 뇌허혈시의 뇌손상 보호효과를 알아보기 위하여 in vivo에서 백서의 중대뇌동맥 혈류를 차단한 국소뇌허혈에 대한 보호효과 등을 관찰하여 평가하였다.

먼저 GHCT가 혈압에 미치는 영향을 밝히기 위해 SHR에 생리식염수를 투여한 대조군과 GHCT을 투여한 실험군으로 나누어 혈압을 측정한 결과, 대조군에 비해 유의성있는 혈압 상승 억제 효과를 보였다 (Table 1).

Aldosterone은 부신피질에서 분비되는 호르몬으로 원위세뇨관의 이온교환부위에 작용하여 Na⁺, OH 재흡수와 K⁺, H⁺ 분비를 촉진하여 세포외액의 양이나 전해질 농도를 정상으로 유지하는 역할을 하며, aldosterone이 과잉되면 순환혈량의 증가와 혈압상승을 가져온다²⁹⁾. Catecholamine은 catechol에 amine기가 붙은 모든 화합물을 말하며 dopamine, norepinephrine, epinephrine, isoproterenol 등이 대표적이다. dopamine, norepinephrine, epinephrine은 α1-수용체와 β1-수용체를 흥분시켜 혈관수축과 심근수축력을 증가시키므로 혈압과 심장 박동수를 증가시킨다²⁹⁾.

본 실험에서는 혈장성분 중 aldosterone, dopamine, epinephrine의 농도는 모두 대조군에 비해 GHCT 투여군이 유의성 있게 감소하였으며, norepinephrine 농도는 대조군에 비해 감소는 하였으나 유의성은 없었다 (Table 2,3).

이상의 항고혈압 작용에 대한 실험에서 aldosterone과 catecholamine의 농도를 모두 감소시킨 것으로 보아 加味稀簽湯은 전해질의 조절 기전과 혈관의 수축 이완 기전에 작용하여 혈압을 하강시킨 것으로 사료된다.

뇌졸중과 퇴행성 신경계 질환에서 신경세포의 사멸을 유도하는 경로로 과흥분성 세포손상, 산화적 손상 및 apoptosis가 알려져 있다. 과흥분성 세포손상은 glutamate가 Glutamate receptor의 활성을 통하여, 세포내에 Ca²⁺과 Na⁺ 등의 양이온들의 과도유입을 유도하여 신경세포의 사멸을 유도한다³⁰⁾. 흥분성 아미노산의 수용체는 효현제에 따라 NMDA 수용체, AMPA 수용체, kainate 수용체로 구분된다³¹⁾.

또한 glutamate receptor는 촉진성 NMDA(N-methyl-D-aspartate)수용체와 비-NMDA(non-NMDA)수용체로 구분되는데, NMDA 수용체는 NMDA, 글리신, 아연, 마그네슘이온(Mg²⁺), 펜사이클리딘(PCP, 합성헤로인)과 결합하고, Na⁺, K⁺, Ca²⁺ 등이 세포내로 들어오는데에 영향을 주며, 비-NMDA 통로는 Na⁺와 K⁺에 대하여는 투과적이지 않다. 이러한 흥분성 수용체는 Ca²⁺, free radical 그리고 단백질 분해효소를 증가시켜 중요한 독성 작용을 일으킨다^{30,31)}.

산화적 손상이 신경계 질환에 영향을 끼친다는 증거로는 허혈 후 reactive oxygen species의 생성증가, PD의 흑질에서 Fe²⁺의 증가, reduced glutathione의 감소, glutathione peroxidase의 감소, catalase의 감소, Alzheimer's disease에서 나타나는 β-amyloid에 의한 free radical의 생성, ALS에서 Cu/Zn superoxide dismutase(SOD-1) gene에서의 point mutation 등을 들 수 있다. 세포내 free radical의 생성이 증가하면, lipid peroxidation에 의한 membrane lipid의 파괴, OH에 의한 DNA 손상, 이중 결합 구조나 -SH를 포함하는 산화반응에 의해 단백질의 변성 등은 신경세포의 사멸

로 나타날 수 있다^{30,31)}.

LDH(Lactic Dehydrogenase)는 생체 또는 장기에 널리 분포하며, 소위 유출 효소라는 관점에서 이 효소 활성 증가를 평가할 경우에는 한정된 장기에 초점을 맞출 수 없는 결점도 있으나 장기 손상의 비특이적 marker라는 점에서 역으로 이용할 수도 있다. 즉 이 효소의 활성이 증가하는 것은 생체내 어떤 장기에 세포 파괴가 있다는 것이다³²⁾.

그러므로 glutamate receptor에 대한 반응을 억제하게 되면 뇌허혈로 인한 세포괴사를 억제 하게 되고 LDH의 유리량을 측정함으로써 그 세포괴사 정도를 알 수 있다.

본 실험에서 AMPA, kainate에 의한 세포 손상 방어 작용에서는 GHCT 투여군에서 대조군에 비하여 모든 농도에서 LDH 유리량을 억제하였으나(Fig.2,3), NMDA에 의한 세포손상에 대한 방어 작용에서는 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도 실험군을 제외하고는 LDH 유리량을 억제하지 못하였다(Fig.1).

자유 유리기에 의한 방어 작용에서 BSO에 대한 방어 작용은 GHCT 투여군 모든 농도에서 LDH 유리량을 억제하였는데, 특히 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 가장 많이 억제하였으며(Fig. 4), Fe²⁺에 대한 방어 작용에서는 대조군에 비해 농도 의존적으로 LDH 유리량을 억제하였다(Fig. 5).

이러한 실험 결과로 GHCT가 뇌허혈 등으로 야기되는 NMDA, AMPA, Kainate로 인한 과흥분성 세포 손상과 BSO, Fe²⁺로 인한 산화적 손상에 의한 뇌세포의 손상을 방어, 보호하는 효과가 있다는 것을 알 수 있다.

뇌허혈은 범위에 따라 전뇌허혈과 국소뇌허혈로 구분이 되는데, 전뇌허혈은 뇌혈류가 중단되면 심한 저산소증 상태로 인해 세포내의 Na⁺-K⁺ pump에 장애가 와서 K⁺와 수분이 세포내로 유입되어 3분 안에 세포내에 부종이 유발되며, 5-10분 후에는 젖산 증가 및 포도당의 소멸이 발생하는데, 허혈이 계속되면 mitochondria의 손상으로 ATP가 고갈되고, 인지질의 소실과 toxic oxygen radicals 등으로 인한 세포내 손상 및 칼슘 농도의 증가로 비가역성 병변으로 진행

된다^{33,34)}.

국소 뇌허혈은 심한 허혈 상태의 중심부와 이를 둘러싸는 불완전한 허혈 상태의 주변부로 나누어지는데, 이 주변부에서는 측부 순환이 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 Ca²⁺이 증가하여 뇌세포의 비가역적인 손상을 가져올 수 있다^{33,34)}.

국소뇌허혈 유발실험은 silicon rubber cylinder를 이용한 중대뇌동맥 폐쇄-재관류 모델을 선택하였으며, 이 방법은 허혈 후 재관류에 의한 영향을 연구할 수 있는 장점을 가지고 있다. 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적율과 부종율은 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였는데(Fig. 6), 이는 GHCT가 두개내 혈관 폐쇄로 인한 급성기 뇌허혈 및 뇌경색과 뇌부종을 억제하고 뇌손상을 보호하는 효과가 있음을 시사하고 있다.

본 실험에서 중대뇌동맥 폐쇄 후, 저산소증 유발 후 및 재관류 후에 대한 각각의 신경학적 검사를 시행하여 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 신경학적 결손 정도를 측정하였는데, forelimb 및 hindlimb test에서 호전 양상을 보였다(Table 4).

조직학적 관찰에서는 GHCT 투여군에서 손상된 대뇌 반구쪽의 대뇌 피질 부위에서는 cresyl fast violet에 강한 염색을 보이는 피라미드 세포수가 약간 감소하였으나, 전체적인 조직의 보존 상태는 손상 받지 않은 부위와 유사하였다. 해마 형성체 주변조직 역시 손상 받지 않은 부위와 아주 유사한 조직학적 소견을 보였다(Fig. 8).

이상의 연구 결과를 보아 加味 稀 籜 湯은 고혈압에 그 효과가 인정되며, 각종 세포독성 물질에 의한 지연성 뇌손상, 부종 및 세포 조직 괴사에 대한 유의성 있는 결과로 뇌의 신경학적 결손의 조기 회복에 활용될 수 있다고 보여진다.

결론

加味豨薟湯이 혈압 및 뇌손상에 미치는 효과를 검색하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味豨薟湯 투여군은 대조군에 비하여 혈압을 유의성있게 감소시켰다.
2. 加味豨薟湯 투여군은 대조군에 비하여 aldosterone, dopamine, epinephrine 함량을 유의성 있게 감소시켰으나, norepinephrine 함량은 유의성이 나타나지 않았다.
3. 加味豨薟湯 투여군은 AMPA, Kainate에 의한 세포 손상에 대하여 모든 농도에서 LDH 유리량을 억제하였으나, NMDA에 대하여서는 200 μ g/ml 농도 투여군을 제외하고는 LDH 유리량을 억제하지 못하였다.
4. 加味豨薟湯 투여군은 BSO 및 Fe²⁺에 의한 세포 손상에 대하여 모든 농도에서 LDH 유리량을 억제하였다.
5. 加味豨薟湯 투여군은 중대뇌동맥 폐쇄 실험에서 대조군에 비하여 허혈 면적을 및 부종을 유의성 있게 감소시켰으며, 신경학적 검사에서도 유의적인 호전현상을 나타내었다.
6. 加味豨薟湯 투여군은 손상된 대뇌 반구쪽의 대뇌 피질 부위에서 피라미드 세포수가 약간 감소하였으나, 대조군에 비하여 전체적인 조직 보존상태가 손상받지 않은 부위와 유사하였으며, 해마 형성체 주변 조직 역시 손상 받지 않은 부위와 유사하게 나타났다.

참고문헌

1. Raymond D., Adams. 아담스 神經科學. 서울: 정담출판사. 1998:715,720-2,770-2.
2. 안재훈. 열공경색과 피질경색에 있어서의 혈청지질에 대한 연구. 대한의학협회지. 1991; 34(1):78-82.
3. 대한신경외과학회. 신경외과학. 중앙문화사. 1998: 150-6,275-6.
4. 채창희. 흰쥐에서 일시적 국소 뇌허혈에 미치는 Glutamate의 역할. 대한마취과학회지. 2000;38:1062-7.

5. 임소영. Nitric Oxide Synthase의 억제가 뇌허혈/재관류시 Hydroxyl Radical 생성에 미치는 영향. 대한마취과학회지. 1999;36:710-22.
6. 굴송백. 실용중의심혈관병학. 과학기술문헌출판사. 1993:423,427,434,440,442,446,451,455,460.
7. 박중양. 사향·우황·삼칠근 복합방이 고지혈증 및 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1999.
8. 강영록. 원지와 석창포의 단독 및 혼합투여가 백서의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1997.
9. 안규석. 구인, 수질, 제조 및 오공의 혈전증에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1990;11(2): 92-101.
10. 설인찬. 가미보양환오탕이 고지혈증, 혈전, 고점도혈증, 고혈압 및 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1998.
11. 홍석. 천마구등음이 혈전, 뇌허혈 및 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교대학원. 1999.
12. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울: 영림사. 1999; 124-125, 149-150, 178-179, 242-244, 276-277, 302-304, 350-351, 369-370, 450-451, 491-492, 513-514, 531-533, 540-541, 581-582. 1999.
13. 신흥묵. 회침의 혈관 이완 효과와 항산화 동태에 관한 연구. 대한한의학회지. 2000;21 (1):77-83.
14. 김호철. 생희침과 주증희침추출물이 자발성고혈압흰쥐의 항고혈압작용에 미치는 영향. 본초학회지. 1998;13(1):53-8.
15. 김호현. 회림이 가토의 혈관내피세포성 이완인자에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1997; 18(2):15-32.
16. Ogihara T. A non-chromatographic non-extraction radioimmunoassay for serum aldosterone, J. Chin. Endocrinol. Metab 1977;45:726.
17. Hjendahl P. Catecholamine measurement in plasma by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Methods in Enzymology 1987;142:521.
18. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. Stroke 1989;20: 1037-43.
19. 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 1986;17:4726.
20. 서울대학교 의과대학 내과학교실 편. 내과학. 서울:

- 군자출판사. 1996:146-58.
21. 서울대학교 의과대학. 신경학. 서울: 서울대학교 출판부. 1993:179-87.
 22. Isselbach KJ et al. Harrison's Principle of Internal Medicine, 13th ed. McGraw-Hill Book Company. 1994:2233-41.
 23. 김인세. 뇌허혈과 뇌보호. 대한마취과학회지. 1997; 33:195-203.
 24. Gulyaeva N, Onufriev MV, Stepanichev MY. NO synthase and free radical reneration in brain region of old rats; correlations with individual behaviour. Neuro Report. 1994;6:94-6.
 25. 장중경. 금궤요략. 서울: 아울로스출판사. 1994:131-3.
 26. 유완소. 유하간상한삼육서. 서울: 성보사. 1976:31, 281-2.
 27. 왕청임. 의림개작. 서울: 의성당. 1994:84-5.
 28. 강영록. 원지와 석창포의 단독 및 혼합투여가 백서의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1997.
 29. 이귀녕, 이종순. 임상병리파일. 서울: 의학문화사. 1996:440-1.
 30. 홍사석. 이우주의 약리학 강의. 서울: 의학문화사. 1993:107-15,186-7.
 31. The Merk manual(17/E). 서울: 도서출판한우리. 2002:1465-6.
 32. 이귀녕, 권오현. 임상병리파일(3/E). 서울: 의학문화사. 2000:374-6.
 33. 신용철 외. 급성 국소 허혈성 뇌부종으로 인한 외조직의 생화학적 변화에 대한 실험적 연구. 대한신경외과학회지. 1989;18(4):525-33.
 34. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사. 1994:112-122, 125-129,591-593,1218-1220,1263-1264.