

흰쥐의 虛血性 中風證 모델에 관한 研究 (중뇌동맥 원 및 근위부폐색에 대한 양측 경동맥 1시간 결찰의 효과)

윤상협*

ABSTRACT

A study on cerebral ischemic model of rat
(Effect of 1 hour occlusion of CCA on the distal or proximal MCA
occlusioned site)

Sang-Hyub Yoon

Department of Internal Medicine, Kyung Hee Bundang Oriental Hospital,
Seung Nam city, Kyungido, Korea

With the purpose of producing easily the basal ganglia infarction into Chen's, cerebral ischemic model which is almost cortical infarct made by the ligation of distal part of MCA and 1 hr obliteration of both common carotid arteries in rat, the MCA obstruction was extended between rhinal fissure and olfactory tract with electrocauterization in place of 10-0 silk suture ligation of distal part of MCA.

Both original Chen's model and modified Chen's have shown the cortical infarction in dorsolateral & lateral frontoparietal cortex, but not any infarction in basal ganglia. However, the modified Chen's model have shown the effect of average 12% increase in cortical infarct than

* 경희대학교 분당한방병원 내과

※ 본 논문은 1995년 고향의학 학술연구비에 의하여 수행되었음.

that of original Chen's model.

This experimental results suggest the modified Chen's model can not reduce the blood flow of the lateral lenticulostriatal artery enough to make the basal ganglia infarction and that blood circulation of basal gagglia under its condition is probably being kept partly through the posterior cerebral artery via vertebral artery. Therefore, The follow-up observation on ischemic time lapse would be needed.

Key Word : animal model, cerebral ischemia, rat

서 론

중풍처방에 대한 일반 약리학적 연구는 상당한 성과가 있었으나, 손상뇌와 관련한 연구보고는 드물다. 한의학계의 이런 경향은 손상뇌에 대한 실험동물모형의 무관심에서 비롯되었을 것으로 추측되는 바, 향후 중풍증 연구의 활성화를 위해서도 실험동물모형에 대해 관심이 있어야 하겠다.

뇌허혈에 대한 여러 형태의 실험적 동물모형이 있으나¹⁾ 현재 보편적으로 활용되고 있는 것은 subtemporal approach²⁾ 혹은 intraluminal suture technique³⁾을 사용하여 흰쥐 중뇌동맥을 직접 조작하는 국소뇌허혈모형이다.

중뇌동맥에 의한 뇌경색 형태는 폐색되는 동맥의 부위에 따라 달리 나타난다. 피질부와 기저핵 부위의 경색은 중뇌동맥 근위부와 그것의 분지인 lateral lenticulostriatal artery가 폐색되어야 하며, 피질부만의 경색은 중뇌동맥의 원위부위의 폐색과 동시에 일정시간동안의 뇌혈류량 감소가 있으면 쉬게 이루어진다. 후자의 경우는 뇌경색을 용이하게 만들 수 있고 실험동물의 생존율이 높다는 장점이 있는 반면, 경색후 실험동물의 behavioral abnormality를 관찰할 수 없는 단점이 있고, 전자는 실험동물의 생존율도 높고 경색후의 behavioral abnormality를 관찰할 수 있지만, 실험적 기법이 어렵다는 것이 단점이다⁴⁾.

그래서 Chen⁵⁾은 보고하지 않았지만, 저자는 Chen의 방법을 응용하여 비교적 용이하게 피질부-기저핵 뇌경색을 유발시킬 목적으로 중뇌동맥 폐색부위를 rhinal fissure에서 rhinal fissure와 olfactory tract사이로 변경한 후, 형성되는 경색을 조사할 필요가 있을 것으로 사려되어 본 연구를 하게 되었다.

실 험

1. 실험동물의 준비

암수 구별없이 체중 280-340g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 14마리를 실험실환경(온도 20±2℃, 습도60%, 12시간, 암기; 12시간 명기)에 2주간 적응시켰다. 실험동물에 urethane 80mg/kg을 복강주사하여 마취시킨 후, heating pad위에 두고 직장온도를 38℃로 고정하였다. 우측 대퇴동맥에는 헤파린-생리식염수로 채워진 폴리에틸렌 카테터를 넣고 transducer(Gould/Statham)에 연결하여 혈압을 chart recorder(Grass, model 79E, CA., USA)에 기록하였다. 좌측 대퇴동맥 카테터는 동맥혈 가스분압(pH/Blood Analyzer, Ciba-Corning 238, CA., USA), hema tocrit (Microhematocrit Centrifuge, Hawksley, England), glucose(One Touch II, Johnson-Johnson Co., CA., USA) 측정용으로 사용하였다.

2. 뇌경색 유발

뇌경색 유발은 Chen⁵⁾의 방법을 사용하였다. 간기하면, 실험동물을 spine position으로 고정시킨 다음 경부에 midline incision을 가하고 양측 경동맥을 주위조직으로부터 분리하여 5-0 suture silk로 결찰할 수 있도록 준비하였다. 다음 동물을 lateral position으로 두고 좌측 안와와 귀사이를 2cm 정도 절개하여 측두근을 절제한 후 infratemporal fossa가 노출되게 하였다. subtemporal craniectomy하고 25-gauge needle로 경막을 제거하여 rhinal fissure와 olfactory tract사이의 중뇌동맥을 노출시켰다. 중뇌동맥 폐색부위를 rhinal fissure부분(이하 Chen Group이라 함)과 rhinal fissure에서 olfactory tract사이(Modified Chen Group이라 함)로 나누고, Chen Group은 10-0 silk suture로, Modified Chen Group은 전기소작으로 폐색시켰다.그 다음 동시에 양측 경맥동맥을 1시간 동안 결찰시켰다.

3. 뇌혈류량 측정

뇌혈류량 측정은 Aukland⁶⁾, Pasztor⁷⁾등의 수소가스쟁화법을 이용하였다. 실험동물을 stereotaxic apparatus에 고정시킨 후, 수술현미경하에 두피를 절개하여 Paxinos and Watson atlas⁸⁾에 따라 bregma에서 A-2mm, L±4mm 떨어진 부위에 직경 1mm의 천공을 뚫었다. 직경 125µm, 길이 2.0mm인 teflon-coated platinum(90%) -irridium(10%) wire의 끝을 0.5mm 벗긴 백금 전극을 두개천공부위에 수직으로 대뇌피질에 삽입하고 dental cement로 고정시켰다. 이 전극을 뇌혈류량 측정증폭장치에 연결하여 multipen recorder(Rikadenki R-69, Tokyo, Japan)에 기록되게 하였다. 기준전극은 침전극으로 하였으며 실험동물의 꼬리에 삽입하였다.

4. 조직확인 및 경색면적 측정

뇌경색 확인은 Bederson⁹⁾과 Isayama¹⁰⁾등의 방법을 수정하여 사용하였다. 경색유발 1시간후에 실험동물에 20% urethane 1cc를 복강주사하여 마취시킨 즉시 150cc 생리식염수로 intracardiac perfusion한 다음, 뇌를 적출하고 냉동고에 10분간 얼려서 brain slicer(Zivic miller Laboratories, PA., USA)에 넣고 frontal tip에서 2mm 간격으로 절단하고 각절편을 2% tripheny tetrazolium chloride용액에 37°C, 30분간 담구어 고정시켰다. 각절편의 경색면적 측정은 Image analysis system(Zoom stereomicroscope + Image pro⁺ software + Computer)을 사용하였고, % infarct area로 표시하였다.

$$\% \text{infarct area} = \frac{\text{infarcted area}}{\text{total hemisphere area}}$$

5. 통계처리

모든 자료는 mean ± S.D.로 나타내었으며 유의성 비교는 Mann-Witney U test를 사용하였고 p < 0.05이하인 경우 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

실험성적

1. 생리적 변수 및 뇌혈류량

뇌혈류량의 변화를 일으킬 수 있는 생리적 변수로 평균동맥혈압, pH, PaO₂, PaCO₂, 헤마토크리트 및 혈당을 측정하였는데 각 Group간 및 Group내의 허혈 유발전과 유발 1시간후의 비교에서 유의한 차이는 인정되지 않았다(Table 1). 뇌혈류량도 각 Group간의 동측 및 대측반구 모두에서 유의한 차이를 관찰할 수 없었지만, 동측반구의 경우에는 허혈전 과 허혈 1시간후에 유의성이 있는 혈류량의 감소가 있었다(Table 2).

Table 1. Physiological Variables in both Groups

Variable	C-Group		MC-Group	
	0	1(hr)	0	1(hr)
MABP(mmHg)	100 ± 3a)	98 ± 5	101 ± 5	106 ± 6
pH	7.38 ± 0.02	7.36 ± 0.14	7.39 ± 0.13	7.44 ± 0.07
PaCO2(mmHg)	41.2 ± 3.7	42.7 ± 4.3	41.7 ± 6.7	42.7 ± 7.8
PaO2(mmHg)	98 ± 10	93 ± 8	100 ± 11	100 ± 9
Hematocrit(%)	41.3 ± 0.6	41.5 ± 2.5	40.4 ± 1.3	40.9 ± 0.9
Glucose(mg%)	110 ± 9	116 ± 10	105 ± 13	115 ± 14

a) ; mean ± S.D.(N=7)

MABP ; mean arterial blood pressure

C-Group, Chen Group ; MC-Group, Modified Chen Group.

Table 2. Regional Cerebral Blood Flow in both Groups

Group	Nos. animal	Ipsilateral Hemis.		Contralateral Hemis.	
		0	1(hour)	0	1(hour)
C-Group	7	48.4 ± 10.8a)	12.8 ± 4.2**	50.6 ± 7.3	51.4 ± 12.1
MC-Group	7	47.3 ± 10.0	10.3 ± 6.9**	51.8 ± 9.6	49.6 ± 13.4

a) ; mean ± S.D.(ml/100g/min)

** p<0.01; Significance by Mann-Witney U test

Hemis. ; hemisphere

C-Group, Chen Group ; MC-Group, Modified Chen Group.

Table 3. Relative Infarct Area at Different Slice Interval in Groups

Group	Nos. Animal	Slice Intervals				
		2mm	4mm	6mm	8mm	10mm
C-Group	N=7	0±0	27.8±3.3a)	24.1±2.4	17.8±2.0	11.8±1.4
MC-Group	N=7	13.8±8.4*	33.9±4.7*	37.4±2.1*	30.0± 5.1*	24.2±2.4*

a) ; mean±S. D. (%) (N=7)

* p<0.05 ; Significance by Mann-Witney U test

C-Group, Chen Group ; MC-Group, Modified Chen Group.

2. 뇌경색 면적측정

각 Group간의 경색면적을 조사하기 위하여 frontal tip을 기준을 해서 2, 4, 6, 8, 10mm되는 곳의 경색면적을 %infarct area로 나타내어 비교

하였던 바, 2mm부위에서의 Chen Group은 전혀 경색이 유발되지 않았고, Modified Chen Group은 13.8±8.4%로 나타났다. 4mm에서는 Chen Group이 27.8±3.3%, Modified Chen Group이 33.9±4.7%로 6mm에서는 Chen Group이 24.1±2.4%, Modified

Chen Group이 37.4±2.1%로, 8mm에서는 Chen Group이 17.8±2.0%, Modified Chen Group이 30.0±5.1%로, 10mm에서는 Chen Group이 11.8±1.4%, Modified Chen Group이 24.2±2.4%로 나타났다. 그래서 Modified Chen Group이 Chen Group보다 유의성이 있는 확장된 경색을 형성시켰으나 기저핵 부위에서의 경색을 보여주지 못하였다(Table 3).

고찰 및 결론

뇌허혈의 병태생리 및 치료약물의 효능을 위해서 쥐, mongolian gerbilis, 고양이, 토끼, 침팬지 등의 다양한 동물이 이용되고 있지만¹⁾ 가장 많이 활용되는 것은 쥐이다. 실험동물로 쥐를 많이 활용하는 이유는 경제적으로 유지비가 저렴하고, neurochemical data가 풍부하며, 뇌순환이 사람과 유사하다는 것이다^{11,12)}.

그 동안 subtemporal approach의 실험기법에 대한 흰쥐 뇌경색 성공률 및 경색 면적의 정량화에 대하여 여러가지 요인들이 언급되어지만^{13,14)} 가장 주요한 것은 전뇌동맥 또는 후뇌동맥에서의 retrograde flow의 차단과 lateral striatal artery의 폐색으로 나타났다¹⁵⁾.

한편 subtemporal approach를 통해 중뇌동맥에 접근하는 과정에서 rhinal fissure에서 olfactory tract로의 접근은 용이하지만 lateral lenticulo-striatal artery를 확인하기 위해서는 zygomatic arch를 제거하거나 또는 spatula로 뇌를 뒤로 미는 등⁹⁾의 추가적 기술이 요구되어 어렵다. 그래서 저자는 기저핵 부위의 경색을 유발시킬 목적으로 Chen의 방법중 10-0 silk로 rhinal fissure부위를 결찰하는 것 대신에 폐색부위를 rhinal fissure에서 olfactory tract사이로 연장하고 전기소작으로 폐색시켰다. 즉 뇌혈류와 관련시켜 말하자면, 저자가 폐색시킨 범위가 전뇌동맥 또는 후뇌동맥에서의 retrograde flow가 차단시켰다고 전제했을 때, 양측 경동맥 1시간의

결찰이 lateral striatal artery 폐색과 유사한 효과가 있는지를 확인하고자 실험하였다.

본 실험의 결과에서 Chen Group과 Modified Chen Group 모두 피질부 경색만을 보여주었다. Modified Chen Group은 Chen Group에 비하여 평균적으로 약 12% 정도 경색면적을 확대시키는 효과만 있었으며 목적하는 바의 기저부 경색을 유발시키지는 못하였다. Sigeno등¹⁶⁾은 중뇌동맥 원위부 폐색시 기저핵부위의 경색은 전혀 형성되지 않았으며 피질부 경색도 50%정도만 가능하였다고 하였다. 이렇게 원위부 폐색에서 뇌경색이 쉽게 형성되지 않는 이유로는 첫째 vertebral artery를 통한 지속적 혈액관류, 둘째 쥐의 특징적인 다이아몬드형태의 전뇌동맥과 중뇌동맥 end-artery간의 문합동에 의하여 뇌혈류량이 유지되기 때문이다¹⁷⁾. 이것의 작용을 차단시키기 위해서는 양측 경동맥 결찰⁵⁾, 또는 인위적 출혈¹⁸⁾이나 혈합강하제¹⁹⁾에 의한 저혈압(50 mmHg 이하) 유발동에 의하여 뇌혈류량의 감소가 강구되어야 한다. 이러한 현상은 Chen등⁵⁾의 보고에도 나타나 있는데, rhinal fissure부위 동맥 폐색만으로는 경색이 유발되지 않았고, rhinal fissure부위의 폐색에 양측경동맥 1시간의 결찰이 동반되었을 경우 dorsolateral & lateral frontoparietal cortex에 96%의 infarct이 형성되었다고 하였다.

Menzies등¹⁵⁾은 최대의 뇌경색을 확보하기 위해서는 lateral lenticulo-striatal artery를 포함하는 중뇌동맥 주요 branch 모두가 폐색되어야 하며, 이것의 성공률은 91%정도이며, lateral lenticulo-striatal artery 폐색이 기저부 경색에 중요하다고 하였다. 또한 중뇌동맥 주요 branch의 폐색 없이 중뇌동맥기시부와 lateral lenticulo-striatal artery를 폐색시키는 intraluminal suture technique³⁾의 경우도 피질-기저부에 경색이 형성된다는 사실은 lateral striatal artery의 혈류량 감소가 기저부 경색형성에 필수적임을 알 수 있다. 따라서 본 실험의 결과는 변형된 Chen Group도

형의 1시간 양측 경동맥 결찰이 기저부 경색을 유발할 만큼의 lateral lenticulostriatal artery의 혈류량을 감소시키지 못한다는 것을 시사하며, 향후 허혈의 경시적 변화에 대한 추적연구가 있어야 할 것으로 사려된다.

REFERENCES

1. Molinari GF, Laurent JP: A classification of experimental models of brain ischemia. *Stroke* 7 : 14-17, 1976
2. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM : Focal cerebral ischemia in the rat : 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1 : 53-60, 1981
3. 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
4. Hossmann KA, Miles G, Paschen W, Matsuoka Y, Schuier FJ, Bosma HJ : Experimental infarcts in cat, gerbilis and rats. In : Stefanovich V(ed) *Stroke : Animal models*. Pergamon Press, Oxford, England, pp 123-137, 1983
5. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD : A model of focal ischemic stroke in the rat : Reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17 : 738-743, 1986
6. Aukland K, Bower BFF, Berliner RW : Measurement of local blood flow with hydrogen gas. *Circ Res* 14 : 167-187, 1964
7. Pasztor E, Symon L, Dorsch NWC, Branston NM: The hydrogen clearance method in assessment of blood flow in cortex, white matter and deep nuclei of baboons. *Stroke* 4 : 556-567, 1973
8. Paxinos G, Watson C: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed, Academic Press, Sydney, 1986
9. Bederson JB, Pitts LH, T suji 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
10. Isayama K, Pitts LH, Nishimura MC : Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetra-zolium chloride staining to delineate rat brain infarcts. *Stroke* 22 : 1394-1398, 1991
11. Ginsberg MD, Busto R: Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20 : 1627-1642, 1989
12. Duverger D, MacKenzie ET : The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: Influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration and age. *J Cereb Blood Flow Metab* 8 : 449-461, 1988
13. Kagostrom e, Smith ML, Siesjo BK : cerebral circulatory responses to hypercapnia and hypoxia in the recovery period following complete and incomplete cerebral ischemia in the rat. *Acta Physiol Scand* 118 : 281- 291, 1983
14. Menzies SA, Hoff JT, Betz AL : Middle cerebral artery occlusion in rats : A neurologic and pathologic evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 31 : 100-

- 107, 1992
15. Rubino GJ, Young W: Ischemic cortical lesions after permanent occlusion of individual middle cerebral artery branches in rats. *Stroke* 19 : 870-877, 1988
 16. Shigeno T, McCulloch J, Graham DI, Mendelow AD, Teasdale GM: Pure cortical ischemia versus striatal ischemia: Circulatory, metabolic, and neuropathologic consequences. *Surg Neurol* 24 : 47-51, 1985
 17. Coyle P: Dorsal cerebral arterial collaterals of the rat. *Ana Record* 203 : 405-410, 1982
 18. Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM, Ford I, McCulloch J, Teasdale GM, Graham DI: Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50 : 402-410, 1987
 19. Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjo BK: Models for studying long term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 69 : 385-401, 1984