

원저

고려홍삼 복합방이 실험적 뇌경색에 미치는 영향

오상진*, 박일현*, 김성훈**

ABSTRACT

Effects of Complex formula including Korea Red Ginseng (CKRG) on Brain Ischemia Induced by Occlusion of Middle Cerebral Artery

Sang-Jin Oh*, Il-Hyun Park*, Sung-Hoon Kim**

* Department of Biochemistry, Chungnam University,

** Graduate School of East-West Medical Science

This study was performed to investigate the effect of complex formula(CKRG) consisting of Panax ginseng Radix rubra Koreana, Ganoderma, Cinnamomi Cortex, Glycyrrhizae Radix and Laminariae Thallus on brain ischemia and injury such as KCN-induced brain injury, focal brain ischemia, pulmonary thrombosis. The results were summarized as follows:

1. CKRG extracts showed a decrease of the duration of KCN-induced coma and showed an increase in life expectancy.
2. CKRG extracts showed a decrease of neurologic grade in hind limb but did not affect neurologic grades in fore limb. Also, CKRG extracts showed a significant decrease of brain ischemic area and edema in MCA occlusion.
3. CKRG extracts showed a protective effect on pulmonary thrombosis induced by collagen and epinephrine.

These data suggested that CKRG extracts could be applied to the protection of brain ischemia and injury.

Key Words: CKRG, brain ischemia, KCN, MCA.

* 충남대학교 생화학과

** 경희대학교 동서의학대학원

접수일: 99. 5. 31 연락처: 김성훈 T. 02-961-9214

※ 본 연구는 1997년도 한의학연구원 2010 project 7-08-1-31-30 과제로 한의학연구원 연구비의 일부로 수행되었음

I. 서 론

중풍은 “有卒暴僵仆 或偏枯 或四肢不舉 或死 或不死者 世以中風呼之”¹⁾라 하여 뇌의 손상으로 인한 의식장애, 언어장애 및 수족의 운동 마비를 주증상으로 하는 뇌졸중의 범주에 속하는 질환이다²⁾.

뇌졸중은 우리나라 사망원인의 첫 번째로 나타나는 질환으로, 최근 산업화와 경제성장에 따른 생활방식 및 식생활의 변화로 출혈성 뇌혈관 질환인 뇌출혈 보다 허혈성 뇌혈관 질환인 뇌경색의 비율이 점차 증가하는 경향³⁾을 보이고 있다.

최근 심혈관 질환에 의한 사망이 증가함에 따라 그 원인이 되는 항혈전제와 혈액순환 개선제에 대한 연구가 비교적 활발히 진행되고 있다. 항혈전제는 prostaglandin 대사계에 관여하는 물질(aspirin, indomethacin 등), cyclic nucleotide에 영향을 미치는 물질(PGE₁, carbacycline), calcium 조절기구에 관여하는 물질(verapamil, colchicine) 및 receptor에 작용하는 물질(phentolamine) 등이 개발되었다. 그러나 최근에는 항혈전약이 부작용이 없이 항고지혈 및 혈류순환 개선작용을 나타내는 새로운 약물을 개발하기 위해 임상경험을 통해 유효했던 약물을 중심으로 각종 항혈전 연구, 심장과 뇌질환의 상관성 연구, 혈압 조절작용 등에 관한 연구는 비교적 활발히 진행되고 있지만, 최근 고지방식의 복용으로 야기된 비만, 고지혈증 및 심혈관 질환에 대해 고려홍삼 복합방을 이용하여 예방 및 치료하고자 하는 연구는 많지 않다.

인삼은 가공 방법에 따라 홍삼과 백삼으로 구분되는데, 홍삼은 인삼을 증기로 찌어 수치(修治: 한방이론에 근거하여 약재를 가공처리하여 약재 본래의 성질을 변화시키는 제약 기술의 일종을 지칭하고 있다¹¹⁾). 한방 문헌에서 인삼의 수치법(가공법)에 따른 氣味를 살펴보면 方藥合編¹²⁾에서 ‘生涼, 熟溫’, 本草備要에는 ‘生甘苦微涼’, 月支人蔘傳에는 ‘人蔘生用氣涼, 熟用氣溫’으로 분류하고 있다. 고려홍삼의 약리활성은 중추신경 작용, 뇌신경항진 효능, 항암활성, 면역조절 작용, 항당뇨 작용, 간

기능항진 작용, 심혈관장애 개선, 항동맥경화 작용, 혈압조절 작용, 갱년기 작용, 항스트레스 작용, 항게양 작용, 노화억제 작용, 방사선 치료에 따른 부작용억제 작용 및 마약 해독 작용 등 다양하다¹³⁾.

우리나라에서 고려홍삼은 전매품으로서 주로 인삼연초 연구원을 중심으로 고려홍삼에 관한 연구만 하여왔지만, 한약이 단미약물 외에 복합물이 더욱 유효한 효과를 발휘하고 있다는 점에서 이제는 고려홍삼과 다른 약물을 배합하여 상승효과를 나타내는 처방을 개발하는 것도 필요한 시점인데, 고려홍삼이 자양강장 하면서도, 항혈전 작용이 있다는 점에 착안하여 수종의 한약을 대상으로 한 in vitro screening에서 고려홍삼을 비롯한 몇종 약물이 항혈전 작용을 나타냄을 발견하고 이들 약물로 구성된 고려홍삼 복합방을 만들었다.

이에 저자는 고려홍삼 복합방의 항혈전과 뇌경색에 대한 효과를 실험적으로 입증하고자, 폐색전(Pulmonary embolism) 억제효과, potassium cyanide(이하 KCN이라 함)을 이용한 백서의 전뇌허혈 모델에서 혼수시간과 생존시간의 단축효과, 중대뇌동맥의 혈류를 차단한 백서의 국소 뇌허혈 모델에서 사망 또는 신경학적 결손 정도와 국소의 허혈면적과 부종을 등을 관찰하여 뇌경색 예방효과를 검토하였던 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 동물 및 재료

1) 동물

본 실험을 위하여 사용된 흰쥐는 체중 180~250g의 Sprague-Dawley계(대한실험동물센터, 충청북도 음성) 수컷 흰쥐를 사용하며 실험당일 까지 고형사료(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4% 이상 삼양사료(주))와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 또한

18~20g의 ICR (International Cancer Research)계 생쥐를 한국 화학연구소(대전, 한국)에서 공급받아 전뇌허혈 유발 실험에 사용하였다. 동물실 환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시켜 체중변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다. 실험 당일까지 사료는 고품사료(항생제 무첨가, 삼양사료(주))와 물을 충분히 공급하였다.

2) 재료의 선정과 용량

고려홍삼 등 수중생약을 이용한 in vitro 항혈전 스크리닝(Table 1)중 유효한 5가지 한약으로 구성된 고려홍삼복합방(Table 2)을 만들어 본 실험에 사용하였다.

Table 1.

Inhibitory effects of samples on the human platelet aggregation.

Sample	Inhibition (%)
홍삼	59.8
영지	92.9
육계피	37.6
감초	30.2
다시마	11.6

Table 2.

The compositions of CKRG extracts(CKRG : Complex of Korea Red Ginseng : 고려홍삼복합방)

韓藥名	生藥名	用量(mg)/200g rat	用量(g)/60kg human
고려홍삼	Korea red Ginseng	6.90	2.07
영지	Ganoderma japonicum	0.43	0.13
육계피	Cinnamomum cassia Presl	0.39	0.12
감초	Glycyrrhiza uralensis Fisch	1.97	0.59
다시마	Laminaria japonica Aresch	1.89	0.57
Total amount		11.58	3.48

3) 검역의 조제

고려홍삼, 영지, 육계피, 감초, 다시마 각각

을 3000ml round flask에 넣고 증류수 2000ml을 넣었다. 3시간 가열추출하고 침전물을 3회 여별(3M filter paper)한 후, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator에서 감압 농축하였다. 이 round flask를 -84°C deep freezer에서 1시간 동안 방치하고 freeze dryer로 동결 건조하여 고려홍삼, 영지, 육계피, 감초, 다시마 각각에 대하여 무게 대비로 건조추출물 32.00%, 4.99%, 5.45%, 25.00%, 37.00%를 얻어 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

4) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 KCN(potassium cyanide; Sigma Co., U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A; Sigma Co., U.S.A.), normal saline(중외제약, Korea), Collagen(Sigma Co., U.S.A.) Ephineprine (Sigma Co., U.S.A.), 3.8% Sodium citrate (Sigma Co., U.S.A), 2,3,5-Triphenyl-2H-Tetrazolium Chloride(Sigma Co., U.S.A), Gerorane(Enflurane제제, 중외제약, Korea), ADP reagent(Chrono-Log Corp., U.S.A), Collagen reagent(Chrono-Log Corp., U.S.A), Thrombin reagent(Chrono-Log Corp., U.S.A), Xantopren VL(Bayer Dental, Japan), Optosil-Xantopren Activator(Bayer Dental, Japan), IL Test TM PT-Fibrinogen HS(Instrumentation Laboratory, U.S.A.), IL Test TM APTT Lyophilized silica(Instrumentation Laboratory, U.S.A.) 등을 사용하였다.

기기는 serum separator(녹십자, Korea), Minos-ST(Cobas Co., France), centrifuge (Beckman Co., U.S.A.), rotary vaccum evaporator(Büchi 461, Swiss), 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), Lumi

-Aggregometer(Chrono-Log Corp., U.S.A.), Camera(Nikon, Japan), ACL-100(Instrumentation Laboratory, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 뇌허혈 유발 실험

(1) 전뇌허혈 유발 실험

(i) KCN 유발 혼수시간

전뇌허혈 모델은 Schubert 등⁴⁾의 방법에 준하여 만들었다.

고려홍삼복합방 투여군은 하루에 20g ICR 생쥐를 기준으로 검액 1.16mg/20g/day을 생리식염수 0.2ml에 용해시켜 oral zonde(대중기기, 한국)를 이용하여 1회 경구투여하였고, 대조군은 검액을 녹일 때 사용한 동량의 생리식염수를 경구투여 하였다. 경구투여 30분 후에 비치사량인 1.87mg/kg KCN을 미정맥주사하고 정향반사를 소실한 후부터 정향반사를 회복할 때까지의 시간을 측정하였다.

(ii) KCN 유발 생존시간

전뇌허혈 모델은 Schubert 등⁴⁾의 방법에 준하여 만들었다.

고려홍삼복합방 투여군은 검액 1.16mg/20g/day을 생리식염수 0.2ml에 용해시켜 oral zonde(대중기기, 한국)를 이용하여 1회 경구투여하였고, 대조군은 검액을 녹일 때 사용한 동량의 생리식염수를 경구투여 하였다. 경구투여 30분 후에 치사량인 3.0mg/kg KCN을 미정맥주사한 직후부터 호흡정지에 이르기까지의 시간을 생존시간(sec)로 정하였다.

(2) 국소 뇌허혈 유발 실험(MCA occlusion)

(i) 실험군 설정 및 검액투여

흰쥐 4마리를 1군으로 하여 대조군(control)과 고려홍삼복합방 투여군(CKRG)으로 구분하였다. 중대뇌동맥 폐쇄 2시간 전에 실험 흰쥐의 체중을 측정하고 고려홍삼복합방 14.48 mg/250g/day을 생리식염수 2ml에 용해시켜 oral zonde(대중기기, 한국)를 이용하여 경구투여하였다. 국소 뇌허혈 유발 24시간 후 sacrifice하고 뇌절편 8개를 만들어 부종율과 허혈면적을 계산하였다.

(ii) Silicone rubber cylinder 제작

Silicone rubber cylinder의 제작은 Nagasawa 등⁵⁾의 방법에 따라 4-0 규격의 나일론 봉합사(Deknatel Inc.)를 적당한 길이로 잘라 열을 가해 한 쪽 끝에 매듭을 만들었다. 총 길이를 18mm로 만든 후 경화제를 섞은 실리콘을 약 0.3mm 두께로 매듭 반대편에 8mm 정도 덧씌워 silicone rubber cylinder를 만들었다.

(iii) 국소 뇌허혈 유발

백서를 수술대에 고정시키고 Royal Multi-Plus(Royal Medical Co., Korea)를 사용하여 N2O(아산화질소)와 O2(산소)의 비율을 7:3으로 조정하여, enflurane으로 흡입마취하였다. Nagasawa 등⁵⁾의 방법에 따라 목 중양을 절개하고 미주 신경에 손상을 주지 않도록 주의하면서 오른쪽 총경동맥(CCA; common carotid artery), 내경동맥(ICA; internal carotid artery) 및 외경동맥(ECA; external carotid artery)을 분리한 뒤 총경동맥과 외경동맥을 결찰하고 곧바로 외경동맥과 내경동맥의 분지점에 매듭을 제외한 프로브 전체를 삽입한 뒤 삽입부위 바로 위쪽을 결찰함으로써 오른쪽 중대뇌동맥(MCA; middle cerebral artery)을 폐쇄하였다(Fig. 1). 총 수술 시간은 30분 이내로 하였으며, 직상온도계를 사용하여 체온 하강을 방지하였고 적외선을 비추면서 보온하였으며, 중대뇌동맥을 폐쇄하고 60분 동안 N2O와 O2를 9:1의 비율로 하여 저산소상태를 유발하였으며 폐쇄 120분 후 프로브를 1cm 정도 당겨 재관류를 행하였다(Fig. 2).

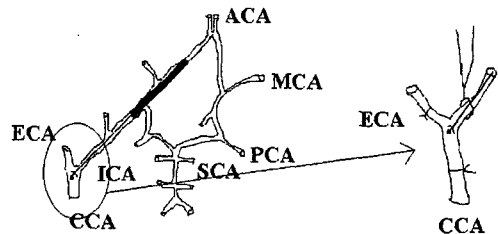


Figure 1.

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.

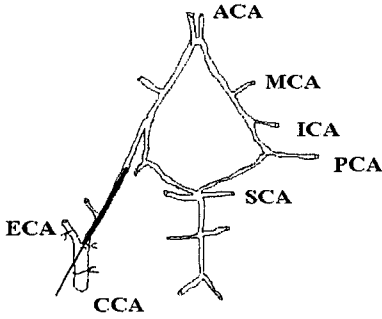


Figure 2.

Schematic representation of position of silicone rubber cylinder after recirculation 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.

(iv) 신경학적 검사

중대뇌동맥 폐쇄 후, 저산소증 유발 후 및 재관류 후에 대한 각각의 신경학적 검사를 행하여 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 신경학적 결손 정도를 측정하였다. 신경학적 결손 정도는 Bederson⁶⁾ 등의 방법에 의하여 그 정도를 forelimb(앞다리)의 경우는 4등급으로, hindlimb(뒷다리)의 경우는 2등급으로 나누어 점수화 하였으며 증상에 따른 등급 분류는 Table 3과 같다.

Table 3.

The neurologic examination grading system

Grade	Neurologic examination
Grade 0	No deficit
Forelimb	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

(v) 허혈 면적 및 부종 측정

수술 24시간 후에 흰쥐에서 뇌를 꺼내어 brain matrix(ASI Instruments, Warren, MI., U.S.A)를 이용하여 2mm두께의 coronal brain slice를 얻은 후, 이 중에서 8 slice만을 선택

하여 2% triphenyltetrazolium chloride(TTC) 용액을 가하고 37℃에서 50분간 배양하였다. TTC에 의해 정상 조직은 짙은 빨강색으로 염색되나, 허혈이 일어난 조직은 염색되지 않음으로써 정상 조직과의 구분이 가능하였다. 배양 종료 후 염색된 조직을 10% formalin neutral buffer 용액으로 고정시키고, 2-3일 내에 칼라 사진용 필름으로 사진을 찍어 현상한 뒤 coronal slice에서의 허혈 면적을 측정하였다. 허혈 면적 및 부종율은 아래의 식에 의해 산출하였다.

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

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

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

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

C : 각 coronal slice에서의 허혈 면적(mm²)

(VI) 폐색전(Pulmonary thrombosis)에 대한 실험

실험적 혈전의 유도는 Kimura 등⁷⁾의 실험 방법에 준하여 실시하였다. 실험 동물은 몸무게 약 18~20g 정도의 수컷 ICR mouse를 사용했고 혈전의 유발은 혈소판 응집시약 (11.3 μg의 collagen과 1.32 μg의 epinephrine)이 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS) 200 μl에 함유되도록 조제하고 mouse 몸무게 20g당 200 μl의 용량으로 꼬리정맥에 주사했다. 항혈전 효과를 알아보기 위하여 실험동물을 24시간 절식시킨 후 혈소판 응집시약의 정맥주사 2시간 전에 고려홍삼복합방 1.16mg/20g을 ICR mouse에 경구투여하였으며, 대조군으로는 aspirin 100mg/kg을 경구투여 하였다. 항혈전 효과는 혈소판 응집시약의 투여로 인하여 발생하는 mouse 뒷다리의 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물의 숫자의 백분율로 계산하며, 여기서 마비는 15분 이상 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림 상태가 지속될 때를 기준으로 한다.

(VII) 통계 처리

실험 결과는 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리하였으며 P<0.05 또는 P<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 실험결과

1. 뇌허혈에 대한 효과

1) 전뇌허혈에 대한 효과

(1) KCN 유발 혼수시간에 미치는 효과
비치사량의 KCN(1.87mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발시킨 백서의 혼수시간은 대조군이 222.33±31.50sec로 나타났다.

대조군에 비해 실험군은 56.33±13.24sec로 유의성 있는 혼수시간 단축효과를 나타내었다(Table 4).

Table 4.

The duration of KCN-induced(1.87mg/kg i.v.) coma 30 min. after oral administration of CKRG extracts in ICR mice

Group	No. of Animals	Duration of coma(sec)
Control	10	222.33 ± 31.50 ^{a)}
CKRG	10	56.33 ± 13.24 ^{***}

a) : Mean ± Standard Error

Control : 1.87mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of normal saline

CKRG : 1.87mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of 1.16mg/20g of CKRG extracts

* : Statistically significant value compared with control data

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

(2) KCN 유발 생존시간에 미치는 효과

치사량의 KCN(3.0mg/kg/20g i.v.)에 의해 유발시킨 백서의 생존시간은 대조군이 24.6±3.78sec로 나타났다. 대조군에 비해 실험군은 61.2±4.60sec로 유의성 있는 생존시간 증가효과를 나타내었다(Table 5).

Table 5.

The survival duration of KCN-induced(3.0mg/kg i.v.) coma 30 min. after oral administration of CKRG extracts in ICR mice

Group	No. of Animals	Survival duration of coma (sec)
Control	10	24.6 ± 3.78a)
CKRG	10	61.2 ± 4.60***

2) 국소 뇌허혈에 대한 효과

(1) 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 신경학적 결손 정도의 변화에 미치는 효과

Forelimb의 신경학적 결손정도는 대조군의 경우 operation, hypoxia, recirculation 후의 등급은 각각 2.78±0.15, 2.89±0.11과 2.57±0.20이었는데 비하여 고려홍삼복합방 투여군의 경우는 각각 2.34±0.33, 2.59±0.24과 2.42±0.19으로 등급의 변화가 거의 없었다(Table 6). 또한 Hindlimb의 신경학적 결손정도는 대조군의 경우 operation, hypoxia, recirculation 후의 등급은 각각 0.44±0.18, 0.11±0.11, 0.14±0.14이었는데 비하여, 고려홍삼복합방 투여군의 경우는 각각 0.11±0.11, 0.0±0.0, 0.0±0.0으로 상당히 호전되었다(Table 7).

Table 6.

Effect of CKRG on variation of neurologic grades in MCA occluded SD rats (Forelimb)

	Operation	Hypoxia	Recirculation
Control	2.78 ± 0.15	2.89 ± 0.11	2.57 ± 0.20
CKRG	2.34 ± 0.33	2.59 ± 0.24	2.42 ± 0.19

Table 7.

Effect of CKRG on variation of neurologic grades in MCA occluded SD rats (Hindlimb)

	Operation	Hypoxia	Recirculation
Control	0.44 ± 0.18	0.11 ± 0.11	0.14 ± 0.14
CKRG	0.11 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

(2) 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적 및 부종율에 미치는 효과

중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적과 부종율은 대조군에 비하여 고려홍삼복합방 투여군이 유의성 있게 감소하였다(Table 8-9, Fig 3-4).

Table 8.

Effect of CKRG on ischemic ratio in MCA occluded SD Rats

No. of slices control (n=3)	The mean area of infarction (%)	No. of slices CKRG (n=4)	The mean area of infarction (%)
1	9.30 ± 3.36	1	5.36 ± 2.31
2	25.70 ± 3.04	2	2.56 ± 1.02***
3	28.04 ± 2.31	3	1.64 ± 0.44***
4	22.25 ± 7.26	4	3.02 ± 1.85*
5	16.00 ± 7.68	5	2.10 ± 1.21
6	4.41 ± 2.91	6	3.89 ± 2.32
7	0.80 ± 0.20	7	1.73 ± 0.69
8	ND	8	1.82 ± 1.28

Table 9.

Effect of CKRG on edema ratio in MCA occluded SD Rats

No. of slices control (n=3)	The mean extent of edema(%)	No. of slices CKRG (n=4)	The mean extent of edema(%)
1	14.30 ± 3.78	1	2.01 ± 0.99*
2	12.99 ± 1.32	2	0.98 ± 0.24***
3	10.58 ± 1.74	3	12.07 ± 2.35
4	10.02 ± 0.06	4	6.32 ± 1.35*
5	8.61 ± 1.68	5	7.32 ± 3.56
6	3.66 ± 0.23	6	3.95 ± 1.22
7	2.56 ± 0.64	7	ND
8	2.26 ± 2.26	8	ND

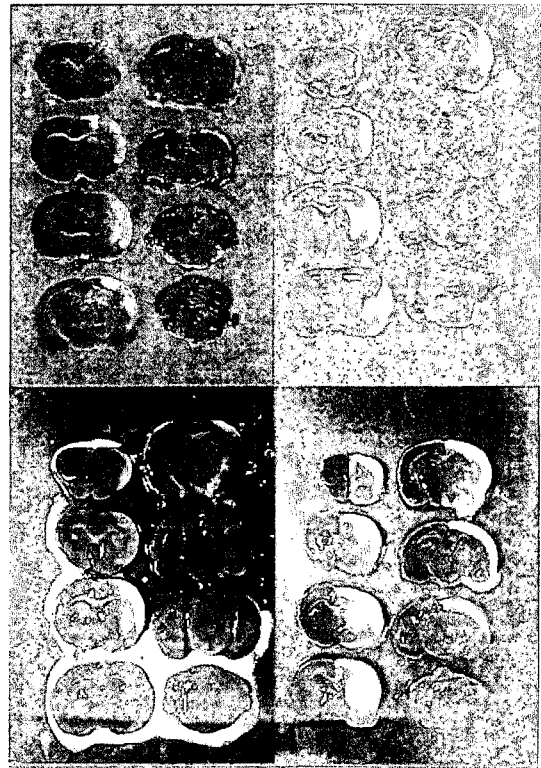


Figure 3.

Ischemic area in 8 slices in control groups: red color: normal brain tissue area, white color: ischemic brain tissue area.

IV. 고 찰

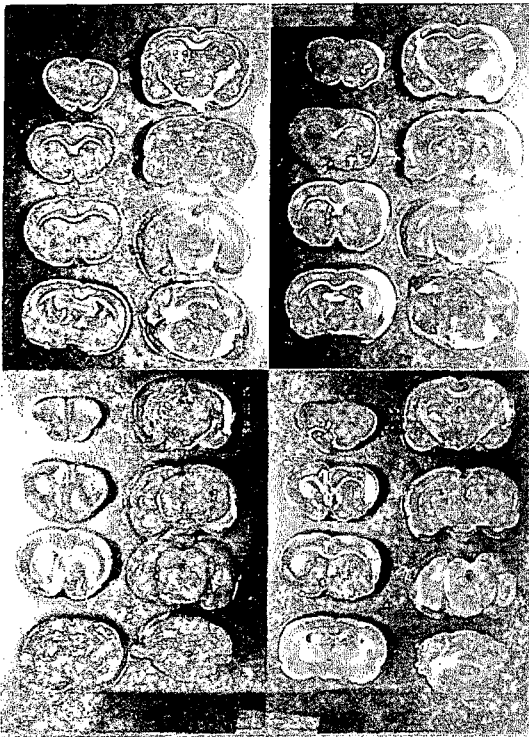


Figure 4.

Ischemic area in 8 slices in CKRG groups: red color: normal brain tissue area, white color: ischemic brain tissue area.

(3) 폐색전(Pulmonary embolism)에 대한 효과

대조군은 collagen과 epinephrine에 의해서 폐색전이 유도되어 16마리 중 16마리 모두가 죽거나 15분간 이상 마비가 지속이 되었는데, 비교 물질로 사용한 aspirin은 16마리 중 6마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속이 되었다. 고려홍삼복합방 투여군의 경우는 16마리 중 2마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 87.5%의 억제효과를 나타내었다(Table 10).

Table 10.

Effect of CKRG on pulmonary embolism mice.

Dose(mg/20g)	No. of killed or paralyzed / No. tested	% Protection
Control HBSS ^a	16/16	-
Aspirin 1	6/16	62.5
CKRG 1.16	2/16	87.5

뇌졸중은 우리 나라 사망원인의 첫 번째로 나타나는 질환으로, 최근 산업화와 경제성장에 따른 생활방식 및 식생활의 변화로 출혈성 뇌혈관 질환인 뇌출혈보다 허혈성 뇌혈관 질환인 뇌경색의 비율이 점차 증가하는 경향²³⁾을 보이고 있어, 미국의 경우에는 약 80%가 폐쇄성, 20%가 출혈성으로 인식되고 있고, 우리 나라의 경우에도 나¹³⁾는 폐쇄성이 약 50%로 보고하였으며, 윤¹⁴⁾은 폐쇄성이 85%, 출혈성이 15%로 보고하였다. 이에 저자는 발병율이 날로 증가하고 있는 중풍 및 뇌손상 질환에 대해 뇌기능 저하를 개선할 수 있는 대책과 방제의 개발이 어느 때보다 시급하다고 생각되어 고려홍삼을 가미한 고려홍삼복합방을 이용하여 폐색전 억제효과, potassium cyanide(이하 KCN이라 함)을 이용한 흰쥐의 전뇌허혈 모델에서 비치사량 투여시의 혼수 시간의 단축효과와 치사량 투여시의 생존 시간의 증가 효과 및 중대뇌동맥의 혈류를 차단한 흰쥐의 국소 뇌허혈모델에서 사망 또는 신경학적 결손 정도와 국소의 허혈면적과 부종을 관찰하여 뇌순환 대사 개선 효과를 살펴보았다.

정상 내피는 혈전형성 저항성 표면이지만 손상을 받은 내피는 혈전증을 심하게 촉진한다. 이에 대해 두 가지의 메카니즘으로 제한되어 있는데, 첫 번째는 내피 세포가 혈전 형성 능력을 가진 내피하 결합조직과 순환혈액을 격리시키는 것이고, 둘째는 내피의 표면에 존재하거나 또는 활발하게 분비되는 항혈전성 인자 및 혈전 촉진성 인자들을 말한다. 혈관의 손상이 발생하면 혈소판은 특수 교원질 수용체인 당단백질 I a/II a(glycoprotein I a/II a, 이하 GPI a/II a)를 통하여 혈관내피의 교원질 원섬유(collagen fibril)에 유착되고 이때 von Willebrand Factor(이하 vWF)가 교원질(collagen)과 혈소판의 특수 교원질 수용체인 GP I b/IX을 연결하는 역할을 담당하여 혈관벽에 혈소판을 유착된 상태로 유지시킨다. 혈소판의 집착이 일어남과 동시에 collagen, thrombin, epinephrin 등의 수용체 작용 물질

들의 결합은 혈소판 인지질들로 부터 arachidonic acid의 분비를 촉매한다⁹⁾.

활성화된 혈소판은 혈장에 과립성 내용물을 분비하게 되는데, 치밀 과립(dense granule)에서는 저장되어 있던 calcium, serotonin, adenosine diphosphate(ADP) 등을 분비하고, alpa 과립(α -granule)에서는 vWF, fibronectin, thrombospondin, heparin neutralizing protein (platelet factor IV), platelet derived growth factor(PDGF) 등을 포함한 여러 단백질들을 분비한다. 이들 분비물들 중 serotonin, ADP는 purinergic 수용체와 결합하여 활성화될때 혈소판의 GP IIa/IIIa가 노출되어 섬유소원이 붙어 혈소판 사이를 연결하여 좁으므로써 혈소판 응집이 일어나게 된다. 혈전증의 발생 유형과 이로 인한 손상은 혈액의 흐름 상태의 차이와 손상 부위에 따라 달라진다. 혈류가 느린 정맥에서 형성된 혈전은 섬유소가 풍부하며, 적혈구가 많고, 혈소판이 적어 적색혈전이라고도 하는데, 종종 하지정맥에서 발생한 불안정한 색전은 폐순환계의 장애를 발생시키며, 혈액의 흐름이 빠른 동맥에서 형성된 응괴들은 주로 혈소판들로 구성되고 섬유소는 거의 없어 백색혈전이라고도 하는데, 쉽게 떨어져 말초부 동맥의 혈전을 유발하는데 특히 뇌순환계에 혼하여 뇌졸중을 포함한 신경학적인 기능장애를 일으킨다⁸⁾.

폐색전 실험에서 대조군은 collagen과 epinephrine에 의해서 폐색전이 유도되어 16마리 중 16마리 모두가 죽거나 15분 이상 마비가 지속이 되었는데, 비교물질로 사용한 aspirin 투여군은 16마리 중 6마리가 죽거나 15분 이상 마비가 지속이 되어 62.5%의 억제효과를 나타내었으나, 실험군은 16마리 중 2마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 87.5%의 억제효과를 나타내었다.

뇌세포가 허혈상태에 빠지는 경우는 전뇌허혈과 국소뇌허혈로 나눌 수 있으며 뇌세포의 손상기전은 차이점을 가지고 있다. 전뇌허혈은 뇌혈류가 중단되면 조직이 심한 저산소증 상태가 되고 이로 인하여 세포내 ATP가 고갈되어 해당작용(glycolysis)이 일어나게

되며 젖산증에 빠지게 되고, 이 무산소성 산증이 뇌세포를 죽게한다⁹⁾. 이에 반해 국소뇌허혈은 심한 허혈 상태의 중심부와 이를 둘러싸는 불안정한 허혈상태의 주변부로 나누어진다. 이 주변부에서는 측부순환이 부분적으로 뇌혈류를 공급하고 있어 세포의 ion 경사는 유지되나 전기적 활성도는 없는 상태가 된다. 허혈 중심부에서는 전뇌허혈과 비슷한 일이 일어나나 주변부에서 산증은 현저하지 않다. 그렇지만 이 주변부에서 뇌혈류가 한계치 이하로 떨어지면 세포내 Ca^{2+} 이 증가하여 뇌세포의 비가역적 손상을 가져올 수 있다. 국소 뇌허혈에서 뇌손상이 일어나는 부위의 가장 자리인 주변부(penumbra)에서는 뇌혈류가 한계치에 이르게 되고 전기활동은 없어지지만 아직은 가역적인 상태이다. 많은 연구에서 이 위태로운 뇌조직에 뇌혈류 재개의 중요성이 강조되고 있다. 그러나 전뇌허혈에서는 이러한 변화는 일과성으로 지나간다⁹⁾.

뇌조직에 허혈성 병변이 초래되면 10-20초 내에 뇌파에서 뇌의 활동이 정지되었음을 볼 수 있으며, 30초내에 sodium-potassium pump의 장애가 오고 sodium의 세포내 유입에 수분물이 수동적으로 따라 들어가 3분내에 세포내 부종이 유발되며 5-10분 후에는 lactate의 증가 및 glucose의 소멸이 오게 된다. 이때까지는 가역성 병변이나, 이후에도 허혈이 계속되면 mitochondria의 손상이 와서 비가역성 병변으로 진행된다고 알려져 있다¹⁰⁾.

본 실험에서는 전뇌허혈을 일으키는 방법으로 비치사량의 KCN(1.87mg/kg, i.v.)에 의해 유발시킨 생쥐의 혼수시간을 측정하였다.

KCN은 세포내 mitochondria의 cytochrome oxidase의 활성을 억제하고 전자 전달계에서의 효소이용을 제한하여 고에너지 인산화합물(ATP)을 고갈시킴으로써 세포 독성을 발현한다¹⁰⁾. 또한 KCN으로 유발된 저산소상태시 뇌기능 장애를 촉진하는 요인으로는 lactate 등의 산성대사물의 축적(조직 acidosis), 순환 shock에 의한 중독성의 뇌허혈 등을 들 수 있으며, 본 실험에서 비치사량의 KCN (1.87mg/kg/20g, i.v.)에 의해 유발시킨 생쥐의

혼수시간에 대한 작용을 경시적으로 검토한 결과 유의성 있는 혼수시간의 단축작용(74.66%)을 나타내었다.

본 실험에서는 국소 뇌허혈을 일으키는 방법으로 silicone rubber cylinder를 이용한 중대뇌동맥 폐쇄-재관류 모델을 선택하였으며, 이 방법은 최근에 개발된 방법으로서 허혈후 재관류에 의한 영향을 연구할 수 있는 장점을 가지고 있다.

정¹⁶⁾은 중대뇌동맥 폐쇄 모델을 이용하여 정상혈압쥐와 선천성고혈압쥐의 뇌허혈 발생율이 각각 65%와 88%로 보고하여 조기 재관류를 시행하지 않더라도 뇌혈관측부순환 및 폐쇄기간에 따라 뇌허혈 유발의 성공률이 달라질 수 있다.

흰쥐 4마리를 1군으로하여 대조군과 고려홍삼복합방 투여군을 구분하였는데, 60분 재관류로 인하여 대조군 4마리에서 2% triphenyltetrazolium chloride(TTC) 염색상 뇌경색의 소견이 관찰되었다.

TTC 용액을 사용한 조직 손상의 검증은 심근폐색에 이용된 이후, 1980년대부터 뇌경색에 널리 사용되고 있다. 정상 뇌조직에서는 사립체(mitochondria)내에 존재하는 탈수소효소(dehydrogenase)와 TTC 용액이 반응하여 formazan이 형성되어 적색으로 나타나고, 뇌경색 발생부위는 세포내 사립체의 비가역적 손상으로 탈수소효소가 소실되어 백색으로 남게 되어 병변 부위를 구분 할 수 있다¹⁷⁾. 그러므로 시간 경과에 따른 뇌경색의 변화에 대한 TTC 용액을 이용한 관찰은 동맥 폐쇄 후 탈수소효소의 감소 정도에 좌우되며 병변의 진행에 따라 감소 속도가 비례된다고 알려져 있어, TTC 용액의 염색 양상은 조직의 비가역적 손상 정도와 비례되므로 뇌경색의 시간변화에 따른 발생 위치 및 크기를 알 수 있다. 뇌경색에 수반되는 뇌부종은 뇌동맥을 폐쇄시킨 직후 수분부터 약 4시간까지 지속되는 세포독소성 부종(cytotoxic edema)과 그 후 진행되는 혈관인성 부종(vasogenic edema)으로 나눌 수 있다. 뇌동맥의 폐쇄후 곧 발생하는 경한 뇌부종의 원인은 뚜렷치 않으나

혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier)이 정상인 점으로 보아 세포독소성 부종으로 생각되고 있다. 뇌동맥의 폐쇄후 약 2시간부터 미세혈액순환의 이상이 뚜렷해지고 혈액-뇌장벽의 파괴가 시작되어 모세혈관의 투과성이 변하며, 이온교환 펌프(ion exchange pump) 또는 세포막의 투과성의 변화로 세포외의 Na⁺ 이온과 수분이 세포내로 유입되고 세포내 K⁺ 이온이 세포외로 유출되며 뇌조직의 수분함량이 증가된다¹⁸⁾. 뇌부종이 심해지면 미세혈액순환은 더욱 감퇴되어 뇌경색과 뇌부종을 더욱 악화시키는 악순환이 계속된다. 뇌경색으로 인한 뇌부종을 예측하기는 불가능하나 뇌동맥의 폐쇄지속 기간 또는 조직의 괴사정도에 따라 변화를 보이며 동맥폐쇄후 3-4시간부터 시작되고 12-13시간후에 뚜렷해지며, 3-4일에 정점에 이르고 1주일-2주 후에 소실된다¹⁹⁾.

뇌허혈성 병변에 기인한 뇌손상 정도의 측정은 공학 현미경이나 전자 현미경적 소견을 기초로하여 뇌세포 미세 구조물의 변화 혹은 뇌조직의 파괴정도와 같은 병리학적 소견으로 손상 정도를 가늠하거나, 또는 뇌경색 혹은 뇌허혈성 병변 범위의 광범성을 기준하여 그 손상 정도를 측정하는 방법으로 대별할 수 있다. 본 연구의 목적은 뇌경색으로 인한 신경학적인 결손, 허혈면적 및 부종을 측정하여 고려홍삼복합방의 허혈성 뇌손상 경감 효과를 평가하는데 있다. 본 실험 결과 뇌허혈 면적은 실험군이 대조군에 비하여 감소되어 있었고, 부종율도 대조군에 비하여 현저히 감소되었으며, 신경학적 결손 회복율에서 대조군에 비하여 hindlimb의 호전이 관찰되어, 국소 혈류차단으로 야기된 흰쥐의 뇌경색에 있어 허혈면적의 축소와 부종의 억제는 물론 신경학적인 결손의 회복에도 효과가 있는 것으로 나타나 임상에 있어 뇌경색의 예방에 활용될 수 있을 것으로 사료되지만 면역조직학적 연구 등 보충 연구도 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

고려홍삼복합방이 뇌허혈증과 뇌손상증에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 전뇌허혈 유발 실험에서는 KCN 유발 혼수시간에 대해서 유의성 있는 혼수시간 단축효과(74.66%)를 나타내었고, KCN 유발 생존시간에 대해서는 유의성 있는 생존시간 증가효과(248.78%)를 나타내었다.

2. MCA occlusion 의한 국소 뇌허혈 유발 실험에서 forelimb에 대해서는 신경학적 변화가 거의 없었으나, hindlimb에서는 호전되었다. 또한 허혈면적과 부종율에 대해서도 감소를 나타내었다.

3. Collagen과 epinephrine 혼합액에 의해 유도된 pulmonary embolism에 대한 보호 효과 실험에서 대조군에 비해 87.5%의 보호작용을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 고려홍삼복합방은 항혈전과 뇌허혈 및 손상 억제효과가 있어 뇌혈관질환에 활용 가능성을 보였지만 향후 지속적인 보충연구가 필요하다.

참고문헌

1. 王安道 : 醫經溯洄集, 臺北, 五洲出版社 ; 15, 1981.
2. 全國韓醫科大學 心系內科學教室 編 : 東醫心系內科學, 서울, 壽苑堂, (上) ; 200, 202-237, 400-407, 448-462, 485, (下) 89-93, 97-107, 113, 163, 417-430, 1988.
3. 徐舜圭 : 成人病·老人病學, 서울, 고려의학 ; 37-49, 77-83, 107-122, 137-139, 142-149, 151, 155-158, 186, 189-193, 196-201, 1992.
4. Schubert, J., Brill, W. A. ; Antagonism of experimental cyanide toxicity in relation to the in vivo activity of cytochrome oxidase., J. Pharmacol. Exp. Ther. 162 (2), 352-359, 1968.
5. Nagasawa, H. and Kogure, K. ; Correlation of between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of cerebral artery occlusion. Stroke, 20, 1037-1043,1989.

6. Benderson, J. B., Pitts, L. H., Tsuji, M., Nishimura, M. C., Davis, R. L. and Bartkowski, H. ; Rat middle cerebral artery occlusion : Evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke, 17, 472-476,1986.
7. Kimura, Y., Tani, T. and Watanabe, K. ; Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. Arzneim. Forsh., Drug Res., 35(II), 1144-1149,1985.
8. 大韓病理學會 編 : 病理學, 서울, 高文社, 125-146, 449-455, 479-485, 1259-2261,1990.
9. Plum F. :The clinical problem, how much anoxia-ischemia damages the brain ?, Arch Neurol Vol. 29, 359-360,1973.
10. Thomas M. Devlin Ph.D. : Textbook of Biochemistry with clinical correlations. WILEY MEDICAL PUBLICATION, 311-318,1982
11. 한국인삼연초연구원:최신고려인삼, 천일인쇄사, 3-7, 1996
12. 黃度淵:方藥合編,남산당, 119, 1992
13. 나영설의최근 뇌졸중에 대한 역학적 고찰, 경희의학, Vol. 7, No. 3, 280-286,1992.
14. 윤진구:뇌졸중에 관한 임상통계적 연구, 서울, 경희대학교 대학원,Vol. 19, 15-21,1985
15. Cotran K. Robbins:Robbins pathologic basis of disease,W.B. Saunders Co.,98-105, 1989.
16. 정혜주의:뇌허혈 동물모델을 이용한 뇌기능 개선제의 효능에 관한 연구(1), 국립보건안전연구원보 7(1), 178-183,1994
17. Fallon J.T. : Simplified method fro histochemical demonstration of experimental myocardial infarct, Circulation 60(Supple. 2), 11-42, 1979.
18. 정환영, 뇌부종의 정의와 기전, 대한신경외과학회지 1(1), 107-110,1972.