

## 가미혈부축어탕 Hexane층의 항혈전활성과 뇌손상 보호효과

이민섭<sup>1</sup> · 노석선<sup>1</sup> · 임낙철<sup>1</sup> · 송호철<sup>†</sup> · 신순식<sup>#</sup> · 김성훈\*

경희대학교 동서의학대학원

<sup>1</sup>대전대학교 한의과대학

<sup>#</sup>동의대학교 한의과대학

### Antithrombotic Activity and Protective Effects of hexane fraction of Kamihyulbuchukeotang (KHBT) on brain injury by KCN and MCA occlusion

Min-Seop Lee,<sup>1</sup> Seok-Sun Roh,<sup>1</sup> Rak-Cheol Lim,<sup>1</sup> Ho-Chul Song,<sup>†</sup>  
Soon Shik Shin<sup>#</sup> and Sung-Hoon Kim\*

Department of Oncology, Kyunghee University, <sup>1</sup>Seochunri, Kiheungheup, Yongin 449-701

<sup>1</sup>Department of Oriental Medicine, Taejon University, 96-3, Yongwondong, Donggu, Taejon, 301-776

<sup>#</sup>Department of Oriental Medicine, Dong-Eui University, 45-1, Yangjungdong, Jingu, Pusan 614-030, Korea

**Abstract** – This study was performed to investigate the antithrombotic activity and protective effect of hexane fraction of Kamihyulbuchukeotang (KHCTH) on brain injury by KCN and MCA occlusion, a prescription of HCT added with *Lumbricus* and *Notoginseng Radix*. Experimental parameters are brain ischemia by MCA occlusion assay, KCN-induced brain injury, pulmonary thrombosis and platelet aggregation assay. The results were summarized as follows; 1. KHCTH extracts significantly inhibited the duration of KCN-induced coma (67%) and mortality (80%). 2. KHCTH extracts significantly suppressed brain ischemic area and edema following MCA occlusion and protected neuron cells as compared with control data. 3. KHCTH extracts inhibited pulmonary thrombosis induced by collagen and epinephrine. 4. KHCTH extracts inhibited platelet aggregation induced by collagen, ADP as agonist up to 76.9% and 32.3% respectively at 1 mg/ml more effective than water extract of KHCT. These data suggested that KHCTH could be applied as the protector of brain ischemia and injury and antithrombotic agent.

**Key words** – MCA occlusion, KCN, immunohistology, platelet aggregation, pulmonary embolism

血府逐瘀湯은 王清任<sup>1)</sup>의 醫林改錯에 수재된 처방으로 “胸脇疼痛, 或頑固性頭痛, 內熱煩悶, 失眠多夢, 心悸怔忡, 急躁善怒 或舌邊出現青筋, 瘀斑” 등 주로 두부나 흉협부에서 발현되는 어혈증과 에 활용되고 있다. 어혈은 생리적 기능을 상실한 혈액이 응취하여 형성된 일종의 병리적인 산물인 동시에 치병인자가 되는 것으로 혈액순환장애, 혈류속도감소 및 혈액성분

변화의 병리상태를 포괄하는데,<sup>2)</sup> 김 등<sup>3)</sup>은 혈액의 순행이 불량하여 국부의 맥관이나 장부중에 혈액이 어체되거나, 맥관을 벗어난 이경의 혈액을, 김<sup>4)</sup>은 위상고혈압, 동맥경화증으로 인한 뇌출혈로 생성된 혈종을, 유<sup>5)</sup>는 전혈집도가 항진된 상태를, 쟁<sup>6)</sup>과 陳 등<sup>7)</sup>은 혈액순환장애로 인한 국부땀혈, 울혈, 출혈, 혈전형성, 수종, 혈액성분의 변화 및 조직의 증식과 변성 등을 포괄하고 있어 혈전이 어혈과 유사한 개념으로 인식되고 있으며, 이 혈전이 중풍의 중요 원

\*교신저자 : Fax : 031-205-1074

인이다.

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”<sup>8)</sup>라 하여 뇌의 손상으로 인한 의식장애, 언어장애 및 수족의 운동 마비를 주증상으로 하는 뇌졸중의 범주에 속하는 질환으로, 우리나라 사망원인의 수위를 차지하는데, 최근 산업화와 경제성장에 따른 생활방식 및 식생활의 변화로 출혈성 뇌혈관 질환인 뇌출혈 보다 허혈성 뇌혈관 질환인 뇌경색의 비율이 점차 증가하는 경향<sup>9)</sup>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.<sup>10)</sup> 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 있는데, 최근 한방제제가 부작용이 적으면서 실제 임상에서 좋은 효과를 나타낸다는 점에서 이를 이용한 연구가 비교적 활발히 진행되고 있다.

이 일환으로 저지는 혈부축어탕 본방에 항혈전효과가 탁월한 구인<sup>11)</sup>과 散瘀止痛止血하는 효능이 있는 田七<sup>12)</sup>을 가미한 가미혈부축어탕을 시료로 항혈전을 실험적으로 입증하고자, 폐색전(Pulmonary embolism) 및 혈소판응집 억제효과를 살펴보고, 뇌경색에 대한 보호효과를 살펴보기 위해 potassium cyanide(이하 KCN이라 함)을 이용한 백서의 전뇌허혈 모델에서 혼수시간과 사망시간의 단축효과, 중대뇌동맥의 혈류를 차단한 백서의 국소 뇌허혈 모델에서 신경학적 결손 정도와 국소의 허혈면적과 부종을 등을 관찰하여 뇌경색 보호효과를 검토하였던 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

**동물** - 본 실험을 위하여 사용된 흰쥐는 체중 180~250 g의 Sprague-Dawley계(대한실험동물센터, 충청북도 음성) 수컷 흰쥐를 사용하며 실험당일까지 고휘

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 삼양사료(주))와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2°C를 계속 유지하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 또한 18~20 g의 ICR(International Cancer Research)계 생쥐를 한국 화학연구소(대전, 한국)에서 공급받아 전뇌허혈 유발 실험에 사용하였다. 동물실 환경은 온도 23±2°C, 상대습도 50±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 고휘 사료(항생제 무첨가, 삼양사료(주))와 물을 충분히 공급하였다.

**재료의 선정과 용량** - 재료는 혈부축어탕<sup>1)</sup>에 구인과 전칠은 가미한 가미혈부축어탕(KHCTH)으로 처방내용은 아래와 같다(Table I).

**검액의 조제** - 가미혈부축어탕 1200 g을 3000 ml round flask에 넣고 증류수 2000 ml을 넣었다. 3시간 가열추출하고 침전물을 3회 여별(3M filter paper)한 후, 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압농축하였다. 이 round flask를 -84°C deep freezer에서 1시간 동안 방치하고 freeze dryer로 동결건조하여 가미혈부축어탕 핵산층(KHCTH)을 34 g 얻어 실험시 용해하여 사용하였다.

**시약 및 기기** - 실험에 사용한 시약은 KCN (potassium cyanide; Sigma Co., U.S.A.), dulbecco's

**Table I.** 가미혈부축어탕(KHCTH)의 처방구성

약재명	생약명	용량
당귀	Angelicae gigantis radix	12 g
우슬	Achyranthis bidentatae radix	12 g
홍화	Carthami Flos	12 g
생지황	Rehmanniae radix	12 g
도인	Persicae semen	16 g
지각	Aurantii fructus	8 g
적작약	Paeonia radix rubra	8 g
시호	Bupleuri radix	4 g
감초	Glycyrrhizae radix	4 g
길경	Platycodi radix	6 g
천궁	Cnidii rhizoma	6 g
구인	Lumbricus	8 g
전칠	Notoginseng radix	8 g
합계		116 g

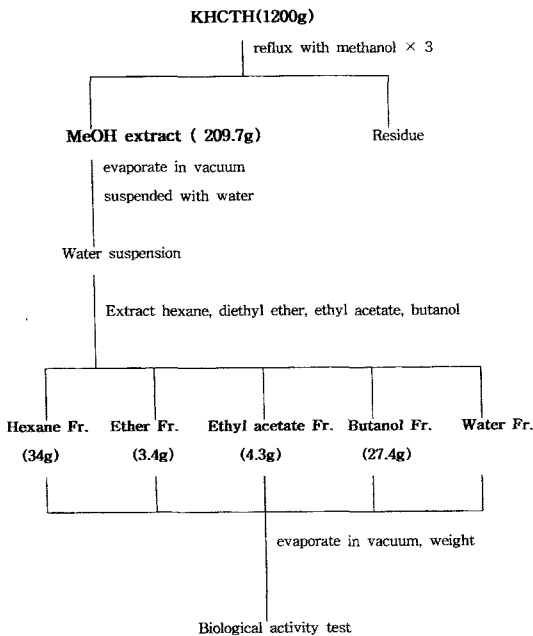


Fig. 1. Schematic diagram for hexane fraction from KHCTH.

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 vacuum 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(Ro-

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

### 실험방법

**KCN 유발 혼수시간** - 전뇌허혈 모델은 Schubert 등<sup>12)</sup>의 방법에 준하여 만들었다.

가미혈부축어탕 핵산층 투여군은 하루에 20 g ICR 생쥐를 기준으로 검액 10 mg/20 g/day을 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde(대종기기, 한국)를 이용하여 1회 경구투여하였고, 대조군은 검액을 녹일 때 사용한 동량의 생리식염수를 경구투여 하였다. 경구투여 30분 후에 비치사량인 1.87 mg/kg KCN을 미정맥 주사하고 정향반사를 소실한 후부터 정향반사를 회복할 때까지의 시간을 측정하였다.

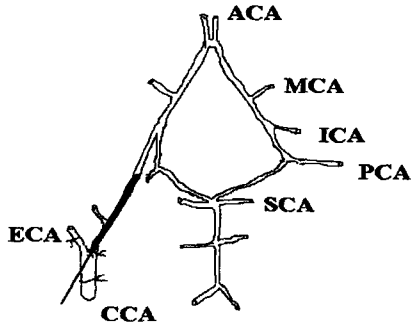
**KCN 유발 생존시간** - 전뇌허혈 모델은 Schubert 등<sup>12)</sup>의 방법에 준하여 만들었다.

가미혈부축어탕 핵산층 투여군은 검액 10 mg/20 g/day을 생리식염수 0.2 ml에 용해시켜 oral zonde(대종기기, 한국)를 이용하여 1회 경구투여하였고, 대조군은 검액을 녹일 때 사용한 동량의 생리식염수를 경구투여 하였다. 경구투여 30분 후에 치사량인 3.0 mg/kg KCN을 미정맥주사한 직후부터 호흡정지에 이르기까지의 시간을 생존시간(sec)로 정하였다.

**실험군 설정 및 검액투여** - 흰쥐 4마리를 1군으로 하여 대조군(control)과 가미혈부축어탕 핵산층 투여군(KHCTH)으로 구분하였다. 중대뇌동맥 폐쇄 2시간 전에 실험 흰쥐의 체중을 측정하고 가미혈부축어탕 핵산층 13.2 mg/250 g/day(성인 2침분량)을 생리식염수 2 ml에 용해시켜 oral zonde(대종기기, 한국)를 이용하여 MCA 수술전 2시간에 경구 투여하였고, 국소 뇌허혈 유발 24시간 후 sacrifice하고 뇌절편 8개를 만들어 부종율과 허혈면적을 계산하였다.

**Silicone rubber cylinder 제작** - Silicone rubber cylinder의 제작은 Nagasawa 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 4.0 규격의 나일론 봉합사(Deknatel Inc.)를 적당한 길이로 잘라 열을 가해 한 쪽 끝에 매듭을 만들었다. 총 길이를 18 mm로 만든 후 경화제를 섞은 실리콘을 약 0.3 mm 두께로 매듭 반대편에 8 mm 정도 덧씌워 silicone rubber cylinder를 만들었다.

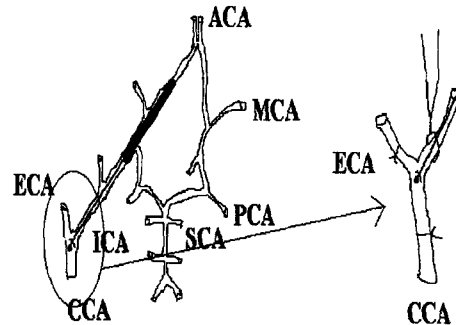
**국소 뇌허혈 유발** - 백서를 수술대에 고정시키고



**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.

Royal Multi-Plus(Royal Medical Co., Korea)를 사용하여  $N_2O$ (아산화질소)와  $O_2$ (산소)의 비율을 7:3으로 조정하여, enflurane으로 흡입마취하였다. Nagasawa 등<sup>13)</sup>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. 2). 총 수술 시간은 30분 이내로 하였으며, 직상온도계를 사용하여 체온 하강을 판정하였고 적외선을 비추면서 보온하였으며, 중대뇌동맥을 폐쇄하고 60분 동안  $N_2O$ 와  $O_2$ 를 9:1의 비율로 하여 저산소상태를 유발하였으며 폐쇄 120분 후 프로브를 1 cm 정도 당겨 재관류를 행하였다(Fig. 3).

**허혈 면적 및 부종 측정** - 수술 24시간 후에 흰쥐에서 뇌를 꺼내어 brain matrix(ASI Instruments, Warren, MI., U.S.A)를 이용하여 2 mm 두께의 coronal brain slice를 얻은 후, 이 중에서 8 slice만을 선택하여 2% triphenyltetrazolium chloride(TTC) 용액을 가하고 37°C에서 50분간 배양하였다. TTC에 의해 정상 조직은 짙은 빨간색으로 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 사



**Fig. 3.** 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.

진용 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( $mm^3$ )

B : 각 coronal slice에서의 대측(반대측) 대뇌 반구 면적( $mm^3$ )

C : 각 coronal slice에서의 허혈 면적( $mm^3$ )

**Platelet aggregation assay** - 혈소판 응집 억제능은 platelet aggregometer를 이용한 Born등<sup>14)</sup>의 탁도 측정법으로 측정하였다. 혈소판농축액(Rh(+) O type)은 대전 적십자 혈액원에서 공급받아 사용하였다. 혈소판 농축액을 냉장 원심분리기(Beckmann co., USA)에서 1000 rpm, 10분간 원심분리하여 적혈구를 침강시키고 상층액을 취해 자동 혈구계산기, Minos-ST (COBAS co. France)를 이용하여  $3 \times 10^8$  cells/ml 혈소판수를 맞추어 PRP(platelet rich plasma)로 사용하였고, 상층액의 일부를 다시 2500 r.p.m, 20분간 원심분리하여 상층액을 PPP(platelet poor plasma)로 사용하였다.

혈소판 응집효과는 Whole Blood Lumi-Aggregometer(Chrono-Log Co. Ltd., U.S.A)를 사용하여 pla-

telet aggregation을 측정하였다. Cuvette에 PRP 400  $\mu$ l, agonist(ADP나 collagen) 50  $\mu$ l, sample 50  $\mu$ l를 조심스럽게 넣고 1 mg/ml의 고농도에서 시작하여 낮은 농도로 항혈전작용을 평가하였다.

**폐색전(Pulmonary thrombosis) 실험** - 실험적 혈전의 유도는 Kimura 등<sup>15)</sup>의 실험방법에 준하여 실시하였다. 실험 동물은 몸무게 약 18~20 g 정도의 수컷 ICR mouse를 사용했고 혈전의 유발은 혈소판 응집시약(11.3  $\mu$ g의 collagen과 1.32  $\mu$ g의 epinephrine)이 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS) 200  $\mu$ l에 함유되도록 조제하고 mouse 몸무게 20 g당 200  $\mu$ l의 용량으로 꼬리정맥에 주사했다. 항혈전 효과를 알아보기 위하여 실험동물을 24시간 절식시킨 후 혈소판 응집시약의 정맥주사 2시간 전에 가미혈부죽여탕 액산 총 10 mg/20 g을 ICR mouse에 경구투여하였으며, 대조군으로는 aspirin 100 mg/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 하였다.

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

**결 과**

**KCN 유발 혼수시간에 미치는 효과** - 비치사량의 KCN(1.87 mg/kg/20 g i.v.)에 의해 유발시킨 생쥐의

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

Group	No. of Animals	Duration of coma(sec)
Control	10	58.12±6.72 <sup>a)</sup>
KHCTH	10	31.42±2.38***

<sup>a)</sup> : Mean  $\pm$  Standard Error

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

KHCTH : 1.87 mg/kg KCN i.v. injected group after oral administration of 10 mg/20 g of KHCTH extracts

\* : Statistically significant value compared with control data (\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001)

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

Group	No. of Animals	Alive mice
Control	10	0
KHCTH	10	8

혼수시간은 대조군이 58.12±6.72 sec로 나타났다. 대조군에 비해 실험군은 31.42±2.38 sec로 유의성 있는 혼수시간 단축효과를 나타내었다(Table II).

**KCN 유발 치사억제 효과** - 치사량의 KCN(3.0 mg/kg/20 g i.v.)에 의해 유발시킨 생쥐의 사망은 대조군에서 모두 죽었지만 실험군에서는 2마리만 죽어 대조군에 비해 80% 억제효과를 보였다.

**중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적 및 부종율에 미치는 효과** - 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적율과 부종율은 MCA 결찰후 뇌허혈로 인한 뇌손상에서

**Table IV.** Effect of KHCTH on the edema and ischemic ratio in MCA treated rats

No. of sample	허혈면적(%)	부종율(%)	No. of sample	허혈면적(%)	부종율(%)
C-1 <sup>a)</sup>	9.56	15.76	KHCTH-1 <sup>b)</sup>	0.8	2.56
C-2	26.70	13.87	KHCTH-2	12.4	9.42
C-3	28.52	18.58	KHCTH-3	21.42	11.58
C-4	22.25	10.26	KHCTH-4	19.30	10.42
C-5	17.22	9.71	KHCTH-5	12.3	9.52
C-6	4.41	4.26	KHCTH-6	4.2	3.48
C-7	1.56	3.27	KHCTH-7	ND	1.42
C-8	ND	2.89	KHCTH-8	ND	1.21

<sup>a)</sup>C1-8 : Brain slice number of control group

<sup>b)</sup>KHCTH 1-8 : Brain slice number of KHCTH- treated group

c) ND : not detectable

KHCTH : Hexane fraction of Kamihyulbuchukeotang

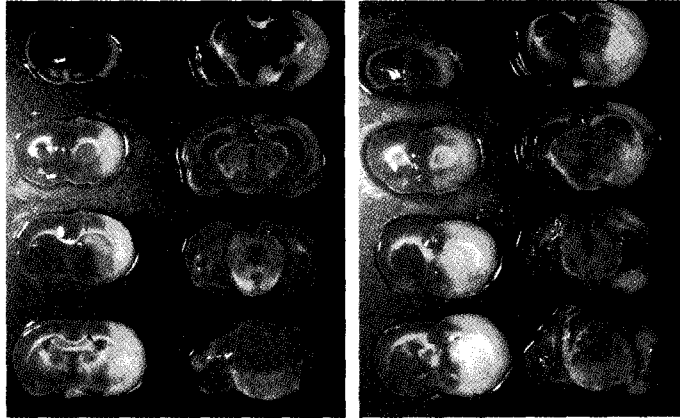


Fig. 4. Photographs of Control and KHCTH groups Left:Control group, Right:KHCTH group showing normal brain tissue area as red color, and ischemic brain tissue area as white color.

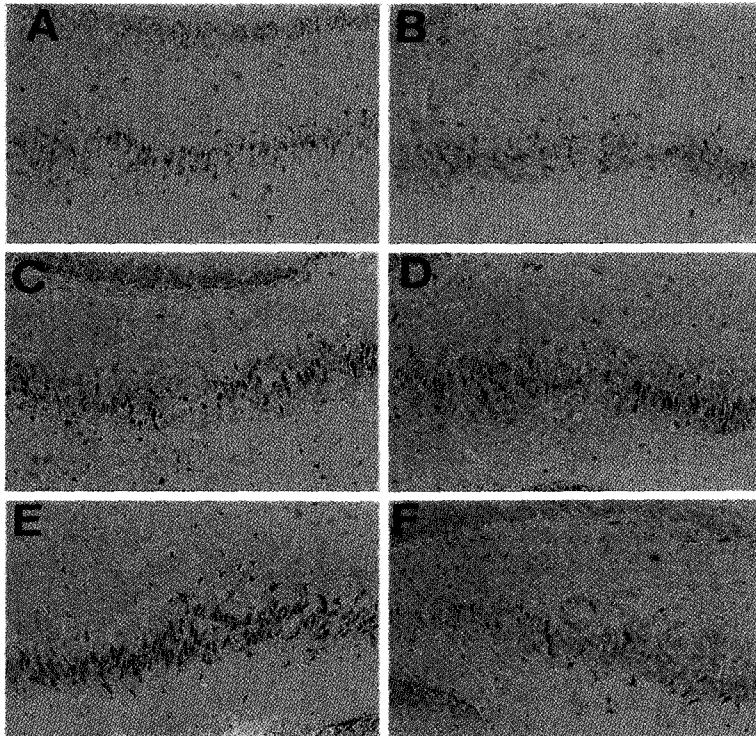


Fig. A. Light micrograph of normal portion in hippocampus, the control group, cresyl violet stain, X100  
 Fig. B. Light micrograph of ischemia portion in hippocampus, the control group, cresyl violet stain, X100  
 Fig. C. Light micrograph of normal portion in hippocampus, the KHCT. Hexane group, cresyl violet stain, X100  
 Fig. D. Light micrograph of ischemia portion in hippocampus, the KHCT. Hexane group, cresyl violet stain, X100  
 Fig. E. Light micrograph of normal portion in hippocampus, the KHCT. Ether group, cresyl violet stain, X100  
 Fig. F. Light micrograph of ischemia portion in hippocampus, the the KHCT. Ether group, cresyl violet stain, X100

는 손상이 많은 허혈면적은 C3에서 대조군의 75%, C2에서 대조군의 46%로, 부종면적은 C3에서 대조군의 62%, C2에서 대조군의 68%로 억제되었다(Table

IV., Fig. 4).

뇌신경세포 보호에 미치는 효과 - 각 실험군별 뇌 조직들은 cresyl violet으로 염색한 결과 양성을 보이

는 신경세포를 살아있는 신경세포로 간주하였다. 대뇌 피질부분에서는 피라미드형 신경세포 부위에 강한 염색성을 보였다.

허혈성 손상부위와 정상부분을 비교한 결과 정상 대뇌피질 부에서는 살아있는 신경세포들이 다수 관찰되었고, 허혈성 손상부위에서는 살아있는 신경세포들을 거의 관찰할 수 없었다. 각 실험군별 비교결과 허혈성 손상부위에서는 혈부축어탕의 Hexane 층군이 대조군에 비해서 살아 있는 세포들이 많이 관찰되었다. Hippocampus영역에서는 광학현미경상 x100배하에서 사진 촬영하여 cresyl violet에 양성을 보이는 세포를 살아있는 신경세포로 간주하여 숫자를 세어서 수치화하였는데, 대조군에서는 37.1% 인데 비해 혈부축어탕 Hexan층은 80.0%로 대조군의에 비해 2배정도의 신경세포 생존을 확인할 수 있었다. 그러나 가미혈부축어탕 에테르층은 36.7%로 대조군과 차이가 없었다 (Fig A-F).

**혈소판응집 저해작용** - 강한 혈소판응집 agonist인 collagen에 대해 가미혈부축어탕은 75%로 대조군 78%에 비해 큰 변화가 없었지만 가미혈부축어탕 Hexan층은 18.01%로 76.9%의 저해율을 나타냈다(Table V). 그러나 ADP에 대해서는 가미혈부축어탕은 73%로 대조군 77%에 비해 큰 변화가 없었지만 가미혈부축어탕 Hexan층은 52.03%로 32.43%의 저해율을 나타냈다(Table VI).

**폐색전(Pulmonary embolism)에 대한 효과** - 대조군은 collagen과 epinephrine에 의해서 폐색전이 유

**Table V.** Effect of KHCTH on neuron cells in hippocampus after MCA occlusion

Groups	Normal portion (%)	Ischemia portion (%)
Control	100	37.1
KHCTH	100	80
KHCTE	100	36.7

**Table VI.** Effect of KHCTH on platelet aggregation in human platelet rich plasma induced by ADP

SAMPLE	Concentration (mg/ml)	Aggregation (%)	Inhibition (%)
Control (DMSO)	0.2	77.00	0
KHCT	0.2	73.38	4.83
KHCTH	0.2	52.03	32.43

\*The Data were calculated from three separate experiments.

**Table VII.** Inhibitory effect of KHCTH on pulmonary embolism in mice

	Dose (mg/20 g)	No. of killed or paralyzed /No. tested	% Protection
Control	HBSS*	3/5	-
Aspirin	1	0/5	100
KHCTH	1.16	1/5	80

도되어 5마리 중 3마리 모두가 죽거나 15분간 이상 마비가 지속이 되었는데, 비교 물질로 사용한 aspirin은 5마리 모두가 살았지만, 가미혈부축어탕 Hexan층 투여군의 경우는 5마리 중 1마리만이 죽거나 15분 이상 마비가 지속되어 대조군의 2배정도로 보호효과를 나타냈다(Table VII).

## 고 찰

뇌졸중은 우리 나라 사망원인의 첫 번째로 나타나 는 질환으로, 최근 산업화와 경제성장에 따른 생활방 식 및 식생활의 변화로 출혈성 뇌혈관 질환인 뇌출혈 보다 허혈성 뇌혈관 질환인 뇌경색의 비율이 점차 증 가하는 경향<sup>10)</sup>을 보이고 있어, 미국의 경우에는 약 80%가 폐쇄성, 20%가 출혈성으로 인식되고 있고, 우리 나라의 경우에도 나<sup>15)</sup>는 폐쇄성이 약 50%로 보고 하였으며, 윤<sup>16)</sup>은 폐쇄성이 85%, 출혈성이 15%로 보 고하였다. 이에 저자는 발병율이 날로 증가하고 있는 중풍 및 뇌손상 질환에 대해 뇌기능 저하를 개선할 수 있는 대책과 방제의 개발이 어느 때보다 시급하다 고 생각되어 구인과 전질을 가미한 가미혈부축어탕 Hexan층을 이용하여 폐색전 억제효과, 혈소판응집억제 효과, potassium cyanide(이하 KCN이라 함)을 이용한 흰쥐의 전뇌허혈 모델에서 비치사량 투여시의 혼수시 간의 단축효과와 치사량 투여시의 생존 효과 및 중대 뇌동맥의 혈류를 차단한 흰쥐의 국소 뇌허혈모델에서 허혈면적과 부종을 및 신경조직학적 효과를 살펴 보았다.

뇌세포가 허혈상태에 빠지는 경우는 전뇌허혈과 국 소뇌허혈로 나눌 수 있으며 뇌세포의 손상기전은 차 이점을 가지고 있다. 전뇌허혈은 뇌혈류가 중단되면 조직이 심한 저산소증 상태가 되고 이로 인하여 세포 내 ATP가 고갈되어 해당작용(glycolysis)이 일어나게 되며 젖산증에 빠지게 되고, 이 무산소성 산증이 뇌 세포를 죽게한다.<sup>18)</sup> 이에 반해 국소뇌허혈은 심한 허

혈 상태의 중심부와 이를 둘러싸는 불완전한 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 가장자리인 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 지나간다.<sup>18)</sup>

뇌조직에 허혈성 병변이 초래되면 10-20초내에 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 있다.<sup>20)</sup>

본 실험에서는 전뇌허혈을 일으키는 방법으로 비치사량의 KCN(1.87 mg/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 발현한다.<sup>12)</sup> 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(1.87 mg/kg/20 g, i.v.)에 의해 유발시킨 생쥐의 혼수시간에 대한 작용을 경시적으로 검토한 결과 유의성 있는 혼수시간의 단축작용(67%)를 나타냈으며, 치사율도 80% 보호작용을 나타냈다.

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.

정<sup>21)</sup>은 중대뇌동맥 폐쇄 모델을 이용하여 정상혈압

쥐와 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 가미혈부축어탕 핵산층 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 있다.<sup>22)</sup> 그러므로 시간 경과에 따른 뇌경색의 변화에 대한 TTC 용액을 이용한 관찰은 동맥 폐쇄후 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 생각하고 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 증가된다.<sup>23)</sup> 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 소실된다.<sup>23)</sup>

뇌허혈성 병변에 기인한 뇌손상 정도의 측정은 공학 현미경이나 전자 현미경적 소견을 기초로하여 뇌



세포 미세 구조물의 변화 혹은 뇌조직의 파괴정도와 같은 병리학적 소견으로 손상 정도를 기늴하거나, 또는 뇌경색 혹은 뇌허혈성 병변 범위의 광범성을 기준하여 그 손상 정도를 측정하는 방법으로 대별할 수 있다. 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 허혈 면적율과 부종을 측정에서 MCA 결찰후 뇌허혈로 인한 손상이 많은 허혈면적은 C3에서 대조군의 75%, C2에서 대조군의 46%로, 부종면적은 C3에서 대조군의 62%, C2에서 대조군의 68%로 억제되었고, 각 실험군별 뇌 조직들은 cresyl violet으로 염색한 결과 양성을 보이는 신경 세포를 살아있는 신경세포를 수치화하였는데, 대조군에서는 37.1%로 허혈성 손상부위에서는 살아있는 신경세포들을 거의 관찰할 수 없었지만, 혈부축어탕 핵산층은 80.0%로 대조군에 비해 2배정도의 신경 세포 생존을 확인할 수 있어 뇌허혈 손상 보호효과가 있는 것으로 보이지만, 가미혈부축어탕 에테르층은 36.7%로 대조군과 차이가 없어 효과가 전혀 없었다 (Fig A-F).

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 Ia/IIa (glycoprotein I a/II a, 이하 GP I 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 접착이 일어남과 동시에 collagen, thrombin, epinephrin 등의 수용체 작용 물질들의 결합은 혈소판 인지질들로부터 arachidonic acid의 분비를 촉매한다.<sup>17)</sup>

활성화된 혈소판은 혈장에 과립성 내용물을 분비하게 되는데, 치밀 과립(dense granule)에서는 저장되어 있던 calcium, serotonin, adenosine diphosphate (ADP) 등을 분비하고, 알파 과립( $\alpha$ -granule)에서는 vWF, fibronectin, thrombospondin, heparin neutralizing protein(platelet factor IV), platelet derived growth factor(PDGF) 등을 포함한 여러 단백질을 분비한다. 이들 분비물들 중 serotonin, ADP는 puri-

nergic 수용체와 결합하여 활성화될때 혈소판의 GP II a/III a가 노출되어 섬유소원이 붙어 혈소판 사이를 연결하여 좁으로써 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 흔하여 뇌졸중을 포함한 신경학적 기능장애를 일으킨다.<sup>19)</sup>

가미혈부축어탕 핵산층의 항혈전효과에서 강한 혈소판응집 agonist인 collagen에 대해 가미혈부축어탕은 75%로 대조군 78%에 비해 큰 변화가 없었지만 가미혈부축어탕 핵산층은 18.01%로 76.9%의 저해율을 나타냈으며, ADP에 대해서는 가미혈부축어탕은 73%로 대조군 77%에 비해 큰 변화가 없었지만 가미혈부축어탕 핵산층은 52.03%로 32.43%의 저해율을 나타내어 가미혈부축어탕 핵산층이 물층보다 유효함을 알 수 있었고, 폐색전실험에서도 가미혈부축어탕 핵산층 투여군은 대조군의 2배정도로 보호효과를 나타내어 가미혈부축어탕 핵산층이 항혈전 효과가 있음을 시사하고 있다(Table VII).

이상의 결과를 종합하면 가미혈부축어탕 보다 가미혈부축어탕 핵산층은 항혈전 효과 뇌허혈과 뇌손상 보호효과가 있는 것으로 보이지만, 더욱 신호전달과 분자생물학적 작용기전 연구가 필요하다고 사료된다.

## 결 론

가미혈부축어탕 핵산층이 뇌허혈증, 뇌손상증 및 혈전에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 전뇌허혈 유발 실험에서는 KCN 유발 혼수시간에 대해서 유의성 있는 혼수 억제효과(67%)를 나타내었고, KCN 치사율도 80% 억제율을 나타내었다.
2. MCA occlusion 의한 국소 뇌허혈 유발 실험에서 대조군에 비해 허혈면적과 부종율에 대한 감소를 나타내었다.
3. 폐색전 저해효과는 대조군의 2배정도, 혈소판응

집 저해는 가미혈부축어탕 핵산층이 불증보다 유효했고 collagen에 대해 76.9%, ADP에 대해 32.3%의 저해율을 나타냈다.

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

## 감사의 글

본 연구는 1997년도 한의학연구원 2010 project HMP 99-O-11-0002-A 과제로 한방치료기술사업 연구비로 수행되었음

## 인용문헌

- 王清任(1976) 醫林改錯, 북경, 인민위생, 8, 40-43, 75-84.
- 김성훈 외: 동의병리학, 대전, 한림원, pp.348-356, 1994.
- 김완희 외: 장부변증론치, 서울, 정보사, pp.59-62, p.190, pp.193-194, 371-375, 1985.
- 김광호: 당귀수산이 피하혈중에 미치는 영향, 서울, 경희한의대논문집, Vol. 8, pp.23-31, 1985.
- 有地滋: 瘀血概念의 重要性, 東洋醫學, Vol. 26, pp.60-65, 1983.
- 鄧士賢: 活血化瘀藥의 藥理與應用, 雲南中醫雜誌, Vol. 5, pp.50-53, 1985.
- 陳見如: 淺述瘀血的病因和診斷, 新中醫, Vol. 3, pp.15-19, 1982.
- 王安道: 醫經溯回集, 台北, 五洲出版社, 15, 1981.
- 서순규: 성인병·노인병학, 서울, 고려의학; 37-49, 77-83, 107-122, 137-139, 142-149, 151, 155-158, 186, 189-193, 196-201, 1992.
- 홍사석: 이우주의 약리학 강의, 의학문화사, 438-449, 1993.
- 전국한의과대학 본초학교실: 본초학, p.400, p. 509, 영림사, 1991.
- 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.
- 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.
- Born, GVR, Cross, MJ: The aggregation of blood platelets. *J. of Physiol.*, 168: 178-195, 1968.
- 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.
- 나영실의 최근 뇌졸중에 대한 역학적 고찰, 경희의학, Vol. 7, No. 3, 280-286, 1992.
- 윤진구: 뇌졸중에 관한 임상통계적 연구, 서울, 경희대학교 대학원, Vol. 19, 15-21, 1985
- Plum F.: The clinical problem, how much anoxia-ischemia damages the brain ?, *Arch Neurol* Vol. 29, 359-360, 1973.
- 大韓病理學會 編: 病理學, 서울, 高文社, 125-146, 449-455, 479-485, 1259-2261, 1990.
- Thomas M. Devlin Ph.D. : Textbook of Biochemistry with clinical correlations. WILEY MEDICAL PUBLICATION, 311-318, 1982
- 정혜주외: 뇌허혈 동물모델을 이용한 뇌기능개선제의 효능에 관한 연구(1), 국립보건안전연구원보 7(1): 178-183, 1994
- Fallon J.T.: Simplified method fro histochemical demonstration of experimental myocardial infarct, *Circulation* 60(Supple. 2), 11-42, 1979.
- Cotran K. Robbins: Robbins pathologic basis of disease, W.B. Saunders Co., 98-105, 1989.
- 정환영, 뇌부종의 정의와 기전, 대한신경외과학회지 1(1): 107-110, 1972.

(2000년 10월 12일 접수)