

원 저

韓醫學的 中風 動物 모델 設定을 爲한 實驗的 研究

채한*, 이현삼**, 홍무창*

* 경희대학교 한의과대학 생리학교실, ** 경희대학교 동서의학대학원 신경과학교실

Abstract

The Experimental Study on the Animal Stroke Model of Oriental Medicine

Han Chae*, Hyun-Sam Lee**, Moo-Chang Hong*

* Department of Physiology, College of Oriental Medicine,

** Department of Neuroscience, Graduate School of East-Weast Medical Science, Kyung-Hee University

The purpose of the present study was to explore the proper method for animal stroke model of Oriental medicine. To this end, brain ischemia was induced by distal middle cerebral artery occlusion(dMCAO) and proximal middle cerebral artery occlusion(pMCAO) and evaluated with the method of Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) staining and Swimming Behavior Test.

Results demonstrated that first, infarct size and volume of pMCAO group were significantly bigger than those of dMCAO group. Second, analysis of swimming behavior test revealed that the percentage of left turning angles of pMCAO was significantly bigger than that of dMCAO. Third, during swimming behavior test, there were peculiar traces of small successive circles that represent motor dysfunction and conscious disturbance among dMCAO group.

The results of the study thus indicate that non-invasive intraluminal method of pMCAO was the appropriate animal stroke model for Oriental medicine in the light of brain ischemia as hemiplegia and conscious disturbance. (*J Korean Oriental Med* 2000;20(4):82-92)

Keywords : middle cerebral artery occlusion, stroke, brain ischemia, animal model, behavior test, TTC staining

緒 論

中風이란 갑작스런 의식장애, 운동장애 및 언어장애 등의 증상이 나타나는 병증으로 정의되는데, 서양의학적으로 보았을 때 중추신경계질환들이 다수 포함되나 뇌졸중이 대표적이라 할 수 있다. 일반적으로

뇌혈관질환은 뇌의 급격한 순환장애로 인하여 발생하는데, 크게 폐쇄성(허혈성) 뇌혈관 질환과 출혈성 뇌혈관 질환의 두가지로 양분할 수 있고, 그 중 대부분은 허혈성 뇌혈관 질환이다.

한의학 임상에서 환자가 나타내는 증상들은 변증 시치라는 치료원칙에 적용되는 기본적인 자료가 되므로 중풍 동물실험모델 역시 이러한 임상증상이 잘 발현되는 것이 바람직하다. 그러나 동물 실험모델에서 언어장애는 현실적으로 기대하기 어렵고 의식장애는 그 평가가 쉽지 않기에 최소한 반신불수를 특

· 접수 : 2000년 2월 29일 · 수정 : 3월 2일 · 채택 : 3월 23일
· 교신저자 : 홍무창, 서울특별시 동대문구 회기동 1
(T. 02-961-0323)

징으로 하는 운동장애는 잘 나타나도록 해야 한다.

중풍에 대한 전반적인 연구를 위해서는 중풍의 임상 증상과 유사하고 신뢰할 만하며 재현 가능한 동물실험 모델이 필요하다.

흰쥐를 이용한 뇌허혈 모델에는 전뇌허혈 (global cerebral ischemia)과 국소뇌허혈 (focal cerebral ischemia)이 있다.

전뇌허혈 모델은 일시적으로 대뇌의 넓은 부위에 영향을 주어 특정 취약 부분에 신경학적 손상을 유발시키는 것으로, 주로 뇌허혈 발생시 뇌의 변화 기전을 연구하는데 사용되고 있다. 국소뇌허혈 모델은 한쪽 대뇌반구, 즉 대뇌피질 혹은 선조체에 국소적으로 허혈을 유발시키는 것으로, 운동장애가 일어나는 등 실제 임상 증상과 유사하여 뇌허혈 연구에 적절하다는 장점 때문에 뇌허혈에 대한 치료효과의 검증에 많이 사용되고 있다^{10,25)}.

이러한 국소뇌허혈 모델은 편측으로 허혈을 발생시킬 수 있어, 언어장애 및 의식장애, 특징적인 운동장애인 반신불수 등을 주증상으로 하는 한의학의 중풍 개념에 적합할 것으로 생각되나, 구체적인 평가는 된 바 없다.

국소뇌허혈을 일으키는 방법은 침습적인 두개골절제술 (craniectomy)을 통한 중뇌동맥 (middle cerebral artery; MCA)폐쇄와 비침습적인 혈관내수술실삽입술 (intraluminal suture)을 이용한 근위부 중뇌동맥의 폐쇄로 나눌 수 있다.

두개골절제술을 이용한 침습적 방법은 1975년 Robinson 등³⁴⁾에 의해 처음 도입된 후 Tamura 등³⁷⁾과 Chen 등⁷⁾의 개량을 거쳐 널리 사용되고 있는 기계적 소작술이나, 1985년 Waston 등³⁹⁾에 의해 도입된 광화학폐색술을 사용한다. 혈관내수술실삽입술을 이용한 비침습적 방법은 1986년 Koizumi 등⁴⁶⁾에 의해 처음 도입된 후 Zea Longa 등⁴⁰⁾과 Belayev 등¹⁸⁾의 개량을 거쳐 근위부 중뇌동맥의 폐쇄에 사용되고 있다.

이에 본 논문에서는, Chen 등의 침습적인 방법⁷⁾을 이용하여 두개골절제술 (craniectomy)을 통한 원위부 중뇌동맥 (distal middle cerebral artery; dMCA)의 영구적 폐쇄술과, Belayev 등의 비침습적인 방법¹⁸⁾을 이용

하여 혈관내수술실삽입술 (intraluminal suture)을 통한 근위부 중뇌동맥 (proximal middle cerebral artery; pMCA)의 영구적 폐쇄술을 시행하여 각각의 중풍 동물모델을 만들었다. 이를 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 염색을 통한 신경조직학적 평가와 water maze를 이용한 운동 기능의 신경행동학적 평가를 통하여 어떠한 수술기법에 의한 중풍 모델이 보다 더 한의학적 中風證 연구에 적합한가를 평가하여, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

實驗方法

1. 동물

실험동물은 대한실험동물센터에서 구입한 체중 180 g 전후의 Sprague-Dawley 계 흰쥐 수컷을 사용하였으며, 24마리를 각각 12마리씩 2개의 군으로 나누었다. 물과 펠렛사료(제일사료 주식회사, 대전)는 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실 내의 온도는 21~24℃, 습도는 40~60%로 유지하였고 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다. 실험실 환경에 2주간 적응시킨 후 사용하였으며 실험시의 흰쥐 체중은 250~300g 이었다.

2. 허혈성 뇌손상 유발

1) 근위부 중뇌동맥 폐쇄

뇌허혈을 만들기 위하여 Belayev 등의 비침습적 편측 중뇌동맥 폐쇄법¹⁸⁾을 이용하여, 끝부분을 등글고 크게 만든 수술용 봉합사(4-0, nylon)를 poly-L-lysine으로 코팅하여 right external carotid artery에서부터 Willis circle로 삽입하는 방법을 채택하였다 (Fig. 1). 실험동물은 수술시행 12시간 전부터 절식시켰으며 시행한 수술의 절차는 다음과 같다.

(1) 마취

Chloral hydrate와 생리식염수를 섞어 3.5%의 농도로, 본 실험에 이용한 흰쥐의 무게에 대하여 2 ml을 i.p. injection하였으며, 수술에 적절한 마취상태의 유지를 위하여 경우에 따라 수술도중에 적당량을 더 주사하였다.

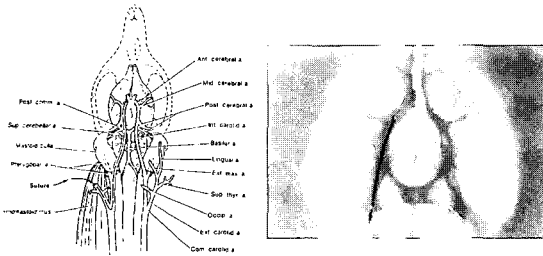


Fig. 1. Diagram of the intraluminal method of the proximal MCA occlusion. A poly-L-lysine coated suture thread was inserted through the external carotid artery and set at the bifurcation of the middle cerebral artery from internal carotid artery under 3.5% chloral hydrate anesthesia.

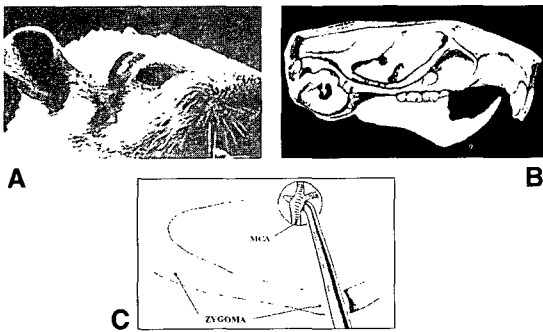


Fig. 2. Diagram of the craniectomy method of the distal MCA occlusion. At first, craniectomy was performed at lateral side of brain skeleton and dorsal part of MCA was coagulated by bovie. Ipsi-lateral common carotid artery was temporary bound and contra-lateral CCA was bound with 3-0 silk suture thread under 3.5% chloral hydrate anesthesia.

(2) 근위부 중뇌동맥의 폐쇄

수술용 현미경 (Carl Zeiss, Zeiss, Germany) 하에서 먼저 anterior triangle의 근육을 분리하여 ECA (external carotid artery)와 CCA(common carotid artery)를 노출시킨다. Occipital artery와 superior thyroid artery를 electric coagulator (Ellman, Dento-Surg 90 FFP, USA)를 사용하여 cutting 한다(세기는 4). ECA의 distal part는 결찰하고, 수술용 봉합사(5-0, silk)로 고정고리를 두 개 만들어 놓은 후, ICA(internal

carotid artery)와 CCA는 artery clamp(microvascular clip)와 수술용 봉합사(3-0, silk)를 사용하여 혈행을 완전 차단한다.

Microdissecting spring scissor로 ECA의 혈관벽을 약간 절개 후 준비한 수술용 봉합사(4-0, nylon)를 삽입한다. 수술용 봉합사(Ethicon 4-0 Ethilon, nylon)는 끝을 둥글게 만들어 poly-L-lysine solution(SIGMA Diagnostics, p8920, 0.1% w/v in water)으로 coating 한다.

삽입 후에는 ICA와 CCA를 다시 관류시키고, ECA의 원위부를 절단하고 수술용 봉합사를 ICA쪽으로 밀어 넣는다. 이때 lateral part로 분지하는 pterygopalatine artery로 수술용 봉합사가 들어가지 않도록 방향에 유의한다. Tip은 carotid bifurcation으로부터 흰쥐의 무게에 따라 18-20 mm 위치의 우측 중뇌동맥의 origin에 오게 하였으며, 이후 前頸部의 피부를 봉합, 소독하고 마취에서 깨어난 후 자유롭게 움직이게 하였다(Fig. 1).

2) 원위부 중뇌동맥 폐쇄

뇌허혈을 만들기 위하여 양측 CCA를 결찰함과 동시에 편측 원위부 중뇌동맥을 소작하여 폐쇄하는 Chen 등의 침습적 편측 중뇌동맥 폐쇄법⁶⁾을 채택하였다(Fig. 2). 실험동물은 수술시행 12시간 전부터 절식시켰으며 시행한 수술의 절차는 다음과 같다.

(1) 마취

Chloral hydrate와 생리식염수를 섞어 3.5%의 농도로, 본 실험에 이용한 흰쥐의 무게에 대하여 2 ml을 i.p. injection하였으며, 수술에 적절한 마취상태의 유지를 위하여 경우에 따라 수술도중에 적당량을 더 주사하였다.

(2) 원위부 중뇌동맥의 폐쇄

수술용 현미경 (Carl Zeiss, Zeiss, Germany) 하에서 먼저 anterior triangle의 근육을 분리하여 양측 CCA(common carotid artery)를 노출시키고, 우측은 수술용 봉합사(3-0, silk)를 사용하여 영구히 결찰하여 혈행을 차단하고, 좌측은 결찰할 수 있도록 고리를 만들어 놓는다.

좌의 우측 temporal-parietal 부위의 털을 깎은 후

쥐의 눈 뒤를 zygoma에서 temporalis muscle에서부터 squamosal bone까지 절개한다. squamosal bone이 zygoma의 앞쪽 끝부분에 접하는 부분을 관찰할 수 있도록 근육을 충분히 깊게 절개한다(Fig. 2A). 중뇌 동맥 분기부가 있는 부위를 찾은 후, #6의 dental burr를 사용하여 1-2mm 직경의 두개골 절제술을 시행한다(Fig. 2B). drill이 dura mater를 뚫고 가지 않게 하기 위해서, burr hole을 완전히 뚫지 않고 구멍 속에 있는 남은 골편들을 forcep을 이용하여 제거한다. Dura mater는 #11 scalpel blade를 사용하여 조심스럽게 뚫는다. needle을 사용하여 dural opening을 절개하여 MCA를 주변의 pia-arachnoid에서 분리한다(Fig. 2C). 이를 electric coagulator (Ellman, Dento-Surg 90 FFP, USA)를 사용하여 폐색하고 수술 부위를 봉합한다. 준비해 놓았던 좌측 CCA의 고리를 1시간동안 결찰한 후 풀어주고, 수술 부위를 봉합한다.

3. 허혈성 뇌손상 부위 면적과 체적의 측정

허혈성 뇌손상 부위 면적의 변화를 측정하기 위하여 다음과 같은 조직염색과 영상분석을 시행하였다.

1) 뇌의 적출 : 뇌허혈 유발 24시간 후에 실험동물을 20% chloral hydrate 로 가볍게 마취한 후 단두하여 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌를 차가운 생리식염수에 넣어 약간 굳게 만든 다음 rat brain atlas의 interaural distance에 따라 2mm 두께의 절편으로 만들었다.

2) Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 염색 : 뇌 절편을 2% TTC용액에 담가 37℃에서 30분간 염색하여 정상 뇌조직은 밝은 적색, 허혈성 뇌손상 부위는 백색으로 잘 구분이 되도록 하였다.

3) 면적의 측정 : TTC로 염색된 각각의 뇌절편을 동일한 자와 함께 사진촬영하고 사진을 scanner (Epson, GT-9500, Japan)로 scan하여 컴퓨터 (Macintosh, Power PC 6200/75, USA)에 입력한 다음 영상분석용 "NIH Image" software (NIH, Ver. 1.66, USA)를 사용하여 면적을 측정하였다. 허혈성 뇌손상 부위의 면적 (A)는 부종에 의하여 면적이 늘어난 것을 보정하기 위하여, 먼저 정상측 뇌 반구

(hemisphere)의 면적 (B)를 측정하고 손상측 뇌 반구의 정상조직 면적 (C)를 측정한 다음 정상측 뇌 반구의 면적에서 손상측 뇌 반구의 정상조직 면적을 감하는 방법으로 계산하였다.¹⁸⁾

$$\text{Correct infarct volume} = \text{Left hemisphere volume} - (\text{Right hemisphere volume} - \text{Measured infarct volume})$$

4) 체적의 측정 : 측정된 각 절편의 면적을 아래와 같은 식을 이용하여 뇌허혈 손상 체적을 계산하였다.

$$\text{Total infarct volume} = \frac{\sum \text{area}(\text{mm}^2) \text{ per side}}{\text{No. of sides analyzed}} \times 12\text{mm}(\text{Max. extent of infarct})$$

4. Swimming Behavior Test

1) 실험장치의 구성⁴⁾

수조의 재질은 스테인레스 스틸이고 직경 1.32m, 높이 50cm 이다. 수조에 높이 42cm로 물을 채우고 1kg의 탈지분유(skimmed milk)를 풀어 수조 내의 색깔을 동일하게 하였다. 실험시 물의 온도는 22±2℃로 일정하게 유지하였으며, 실험실 조도에 따른 카메라와 tracker의 level을 적절히 조절하였다. 수조 위에는 CCD Camera를 설치하여 실험시 관찰되는 동물의 행동양상을 tracker를 통해 computer로 전송하여 Video Tracking System(Poly-Track, SDI, USA)을 사용하여 기록하였고, Maze의 주변은 카메라, 실험대, 컴퓨터, 의자 등 공간단서들을 일정하게 유지하였으며 실험시 실험자의 위치 또한 동일하게 하였다.

2) 실험방법

중대뇌동맥을 폐쇄한지 24시간 후에 유영 실험을 시행하여 운동기능 실조 및 행동 특징 등을 관찰하였다.

실험동물들을 water tank의 중앙에서 유연하게 북쪽으로 5cm 유도한 후, 60초 동안 자유유영을 시키면서 유영 상태를 0.05초 간격으로 추적하여 컴퓨터로 기록한 후, 자유유영 중 total path length, percentage of left turning angles, percentage of left turns 및 자유 유

영 중 관찰된 행동 특징을 분석하였다.

Percentage of left turning angles는, 매 측정시 0°를 기준으로 좌·우측으로 이동한 총 각도에서 좌측으로 이동한 각도를 %화 한 것이다.

$$\text{Percentage of Left Turning Angles} = \frac{\text{좌측 유명 각도}}{\text{좌측 유명 각도} + \text{우측 유명 각도}} \times 100$$

Percentage of left turns는, 매 측정시 0°를 기준으로 좌·우측 및 직선으로 유명한 전체 횡수에서 좌측으로 회전한 횡수를 %화 한 것이다.

$$\text{Percentage of Left Turning Angles} = \frac{\text{좌측 유명 횡수}}{\text{좌측유명횡수} + \text{우측유명횡수} + \text{직선유명횡수}} \times 100$$

5. 실험군의 분류

실험군은 근위부 중뇌동맥 폐쇄군(pMCAO), 원위부 중뇌동맥 폐쇄군(dMCAO)으로 나누어 군당 12마리씩 실험을 진행하였다.

- ① 근위부 중뇌동맥 폐쇄군(pMCAO) : Belayev 등의 방법으로 중대뇌동맥을 폐쇄한 군으로 위 실험방법에 따라 시행하였다.
- ② 원위부 중뇌동맥 폐쇄군(dMCAO) : Chen 등의 방법으로 중대뇌동맥을 폐쇄한 군으로 위 실험방법에 따라 시행하였다.

6. 통계처리

실험결과의 분석은 Student t-test를 이용하여 위험

도 p<0.05 및 p<0.01로 유의성을 검증하였다.

實驗成績

1. 허혈성 뇌손상 부위 면적

근위부 중뇌동맥(pMCA) 폐쇄군과 원위부 중뇌동맥(dMCA) 폐쇄군 모두 허혈성 뇌손상이 후방의 interaural 2.57mm에서부터 전방의 interaural 10.97mm까지 모두에서 나타났다(Fig. 3).

근위부 중뇌동맥 폐쇄군의 경우 뇌손상이 반뇌의 cortex와 basal ganglia에 걸쳐 매우 크게 나타났으나, 원위부 중뇌동맥 폐쇄군의 경우 dorso-lateral cortex 부위를 중심으로 적은 부위에서 뇌손상이 발생하였다. 근위부 중뇌동맥 폐쇄군에 있어서 interaural 10.97mm, 9.04mm, 7.41mm에서의 뇌손상 부위가 유의하게 컸다(Table 1, Fig. 4).

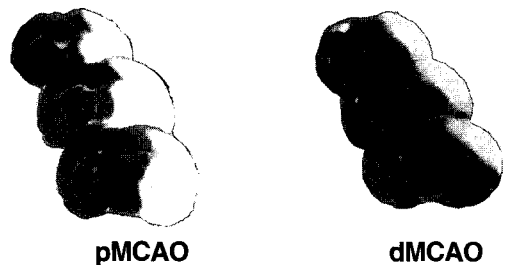


Fig. 3. Serial coronal sections of the rat brain of the pMCAO and dMCAO groups. Note the difference of infarcted area between two groups.

Table 1. Infarct Areas in Coronal Sections of Rat Brain after pMCAO and dMCAO Groups

Group	Infarcted Area (mm ²)					
	10.97 ^{a)}	9.04 ^{a)}	7.41 ^{a)}	5.71 ^{a)}	4.25 ^{a)}	2.57 ^{a)}
pMCAO	19.87±2.96	28.83±3.30	26.56±3.94	20.69±4.66	9.74±2.05	6.28±1.85
dMCAO	4.39±2.02***	12.58±3.46**	12.43±2.20**	11.06±2.03	12.92±3.19	10.06±2.80

The numbers are shown as Mean ± Standard Error pMCAO : Proximal part of middle cerebral artery occluded rats group
dMCAO : Distal part of middle cerebral artery occluded rats group

** and *** indicate that their statistical significances are P<0.01, P<0.001, compared to the value for pMCAO Group.

^{a)} means distance from interaural line.

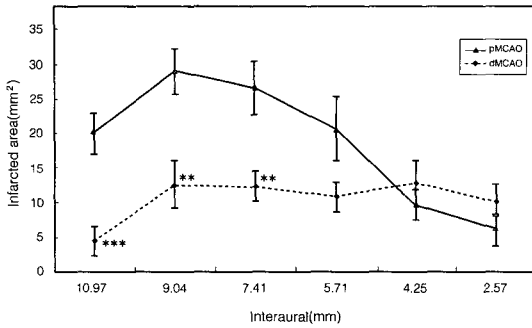


Fig. 4. Infarcted areas at brain Section 2.57 to 10.97 mm from interaural line. Error bars indicate standard error of the mean. Statistical significance compared to the value for pMCAO group (**; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$).

2. 허혈성 뇌손상 부위 체적

허혈성 뇌손상 부위 면적을 사용하여 계산한 허혈성 뇌손상 부위 체적에 있어서, 근위부 중뇌동맥 폐쇄군의 $244.31 \pm 21.75 \text{mm}^3$ 에 비해서 원위부 중뇌동맥 폐쇄군은 $180.12 \pm 26.93 \text{mm}^3$ 으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 5).

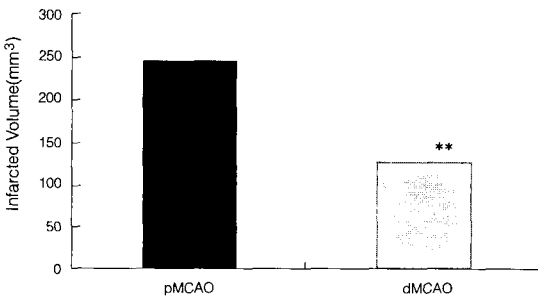


Fig. 5. Infarct volume after pMCAO and dMCAO Groups. Error bars indicate standard error of the mean. Statistical significance compared to the value for pMCAO group (**; $P < 0.01$).

3. Total Path Length

60초간 자유유영에서 근위부 중뇌동맥 폐쇄군은 $17.77 \pm 1.35 \text{m}$ 로, 원위부 중뇌동맥 폐쇄군은 $16.61 \pm 1.16 \text{m}$ 로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 6).

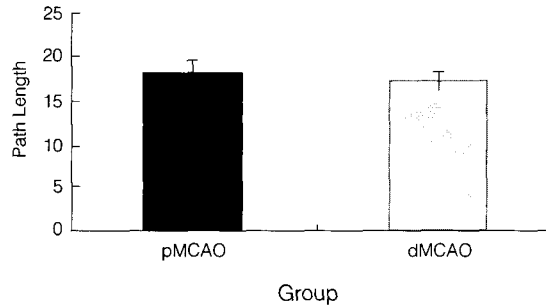


Fig. 6. Total path length of the pMCAO and dMCAO group in water bath. Error bars indicate standard error of the mean.

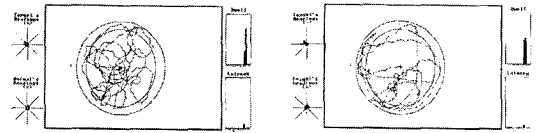


Fig. 7. Swimming patterns of the pMCAO and dMCAO rat in water bath. Note the left rotation of the pMCAO rat. + indicates the starting point of swimming.

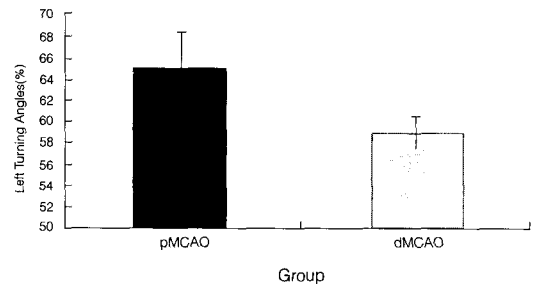


Fig. 8. Percentage of left turning angles of the pMCAO and dMCAO Group in water bath. Error bars indicate standard error of the mean.

4. Percentage of Left Turning Angles

근위부 중뇌동맥 폐쇄군의 경우 우측 반뇌의 뇌허혈로 인한 좌측 반신마비로 좌측을 향해 연속된 작은 동심원 형태의 특이 궤적을 그리게 된다(Fig. 7).

근위부 중뇌동맥 폐쇄군은 $65.19 \pm 3.30\%$ 로, 원위부 중뇌동맥 폐쇄군의 $58.70 \pm 1.48\%$ 에 비하여 좌측

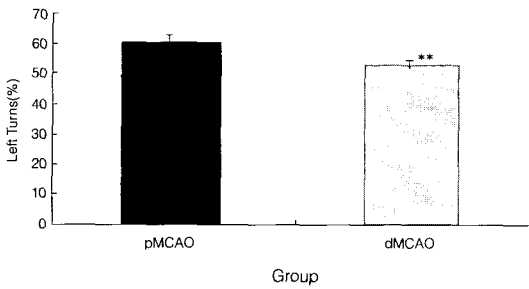


Fig. 9. Percentage of left turns of the pMCAO and dMCAO group in water bath. Error bars indicate standard error of the mean. Statistical significance compared to the value for pMCAO group(**; $P < 0.01$).

유영각도가 컸으나, 유의한 차이를 보이지는 않았다 (Fig. 8).

5. Percentage of Left Turns

근위부 중뇌동맥 폐쇄군은 $59.55 \pm 2.50\%$ 로, 원위부 중뇌동맥 폐쇄군의 $51.63 \pm 1.07\%$ 에 비하여 좌측으로 유의하게 많은 유영을 하였다(Fig. 9).

考 察

中風이란 暴付, 卒暴彊付, 不知人, 不省人事, 昏到, 昏不知人, 精神夢寐 등의 갑작스런 의식장애, 或偏枯, 或四肢不舉, 手足病, 半身不遂, 口眼尙斜 등의 운동장애 및 或舌強不語, 暴病, 言語蹇澁 등의 언어장애 증상이 나타나는 병증으로 정의된다¹⁾.

이는 서양의학의 중추신경계 질환 중 뇌혈관질환(cerebrovascular accident)의 범주에 해당되는데, 뇌의 급격한 순환장애로 인하여 갑작스런 의식장애와 운동장애(주로 반신불수) 및 언어장애 등을 일으키는 질환을 말한다. 일반적으로 뇌혈관질환은 뇌의 급격한 순환장애로 인하여 발생하는데, 이는 원인이전에 따라 폐쇄성(허혈성) 뇌혈관 질환과 출혈성 뇌혈관 질환으로 양분되며 대부분을 허혈성 뇌혈관 질환이 차지하고 있다²⁾.

중풍에 대한 한의학적 치료가 높은 임상적인 성과

를 보이고 있음에도 적절한 한의학적 중풍모델의 선정이 미흡하여 연구에 제약이 되고 있다. 중풍을 유발하는 실험모델은 매우 다양하며, 각 모델들에 따라 뇌허혈 손상 부위 및 그에 따른 운동기능 실조의 양상이 달라 한의학적 중풍의 양상과 많은 차이가 있으며, 반신불수, 의식장애, 언어장애 등을 주증으로 하는 한의학적 중풍 동물실험모델에 쉽게 부합되지 않는다³⁾.

한의학 임상에서 환자가 나타내는 증상들은 변증 시치라는 치료원칙에 적용되는 기본적인 자료가 되므로, 중풍 동물실험모델 역시 이러한 임상증상이 잘 발현되는 것이 바람직하다. 그러나 동물 실험모델에서 언어장애는 현실적으로 기대하기 어렵고 의식장애는 그 평가가 쉽지 않기에 최소한 반신불수를 특징으로 하는 운동장애는 잘 나타나도록 해야 한다.

중풍에 대한 전반적인 연구를 위해서는 임상 증상과 유사하고 신뢰할 만하며 재현 가능한 동물실험모델이 필요하다. 보다 효과적인 한의학적 치료를 위해서는 고전에 소개된 다양한 치료법들을 검증하고 이를 통하여 새로운 치료이론을 수립해 나갈 필요가 있다.

중풍에 대한 연구를 위해서는 유발 방법이 간단하고, 치사율이 낮으면서, 재현 가능한 동물 모델이 필요한데, 이는 뇌조직에 대한 직접적 접근과, 비정상적 관류(abnormal perfusion)라는 개념이 적용될 수 있는 맥관계(vascular system)가 존재해야 하기 때문이다⁴⁾⁶⁾. 이를 위해서는, 실험동물의 가격이 싸며, 다루기 쉽고, 종내의 동질성이 높고, 뇌혈관의 해부학적 구조와 생리가 고등동물과 유사해야 한다⁵⁾. 실험용 쥐는 행동, 감각-운동, neocortex의 비율 등이 인간과 유사하며, 선행연구가 많으면서 이상의 조건을 모두 충족시킨다⁷⁾.

흰쥐를 이용하여 중풍 즉, 허혈성 뇌손상을 일으키는 실험 모델은 크게 전뇌허혈(global cerebral ischemia)과 국소뇌허혈(focal cerebral ischemia)로 나눌 수 있다¹⁰⁾.

전뇌허혈 모델은 일시적으로 대뇌의 넓은 부위에 영향을 주어 특정 취약 부분에 신경학적 손상을 유

발시키는 것으로, 주로 뇌허혈 발생시 뇌의 변화 기전을 연구하는데 사용되고 있다. 이에, 양측 총경동맥을 결찰하는 two-vessel occlusion 방법과 양측 총경동맥 및 추골동맥 모두를 결찰하는 four-vessel occlusion이 있다¹⁰⁾. 이러한 모델들은 실험동물에 마취상태 또는 각성 상태에서 실험할 수 있는 장점이 있으나, 마취나 저혈압으로 인한, 결과 해석의 어려움, 50% 정도의 낮은 생존율, 허혈후 발작으로 인한 급사 등의 단점이 있다¹⁰⁾.

국소뇌허혈 모델은 한쪽 대뇌반구, 즉 대뇌피질 혹은 선조체에 국소적으로 허혈을 유발시켜 국소적 경색과 피사를 유발시키는 것으로, 실제 인간의 임상 증상과 유사하여 뇌허혈 치료에 대한 연구에 적절하다는 장점으로, 뇌허혈에 대한 연구에 많이 사용되고 있다²⁵⁾.

이러한 국소뇌허혈 모델은 편측으로 허혈을 발생시키는데, 그 증상이 언어장애 및 의식장애, 특징적인 운동장애인 반신불수 등을 주증상으로 하는 한의학의 중풍개념이 적합할 것으로 생각되나 구체적인 평가는 된 바 없다.

국소뇌허혈을 유발하는 방법으로는, 두개골절제술(craniectomy)을 포함하는 방법으로는 중뇌동맥을 물리적으로 폐쇄하는 기계적 소작술과 광화학적 혈전유발을 사용한 광화학폐색술이 있으며, 두개골절제술을 사용하지 않는 방법으로는 비침습적인 혈관내 수술실삽입술(intraluminal suture)이 있다¹⁰⁾.

1975년 Robinson 등³⁴⁾에 의해 처음 도입된 후, 1981년 Tamura 등³⁷⁾의 개량을 거쳐 최근 연구에 사용되고 있는 기계적 소작술은, 두개골 절제술을 통해 머리에 구멍을 뚫어 중뇌동맥을 찾은 후 이를 전기적으로 소작하거나 실로 묶어 폐색³⁸⁾하는 방법이다. 1986년 Chen 등⁷⁾은 이러한 방법의 성공률을 높이고 경색의 크기를 일정하게 하기 위하여, rhinal fissure 위에서 중뇌동맥의 원위부를 폐색함과 동시에 영구적인 동측 총경동맥폐색과 일시적인 대측 총경동맥폐색을 시행하였는데, 이는 생존율 제고와 허혈 부위로의 CBF를 감소시키는데 매우 효과적이다^{33,34)}.

1985년 Waston 등³⁹⁾에 의해 도입된 광화학폐색술

은, 고정맥(femoral vein)을 통해 혈액 내로 Rose bengal을 넣은 후 두개골절제술을 통해 뚫은 작은 구멍으로 laser를 쏘아 혈관폐색을 유발하는 방법으로, 혈액내의 요소들로 인해 blood-brain barrier와 CBF에 영향을 주어 급성 증상이 일정하기 어렵다³⁰⁾.

혈관내수술실삽입술을 이용한 비침습적 방법은 1986년 Koizumi 등¹⁶⁾에 의해 처음 도입되었다. 이 방법은 실 끝 5mm를 silicon coating한 4-0의 실로 proximal MCA의 혈행을 막는 방법으로, 치사율이 높다는 단점에도 불구하고 큰 범위의 경색을 유발할 수 있었다. 1989년에는 Zea Longa 등⁴⁰⁾이 이를 개선하여 실의 끝부분을 불 주변에서 가열하여 둔하게 하였으나, 성공률이 56%로 낮고 치사율이 60%로 여전히 높은 단점¹⁷⁾을 지니고 있었다. 1996년 Belayev 등¹⁸⁾은 재현성과 치사율을 모두 개선하였는데, 삽입되는 실의 앞쪽 20mm 부분에 poly-L-lysine (polycationic polymerized amino acid)을 coating하는 방법을 사용하였다. poly-L-lysine은 면역세포화학적 염색을 위한 조직분절 준비에 사용되는 약품으로 조직이 slide glass에 단단히 붙도록 하는 기능이 있다. 이는 poly-L-lysine 분자가 solid surface에 강하게 붙음과 동시에 열려있는 cationic site들이 세포 표면의 anionic site에 결합하기 때문으로, 이로 인해 삽입된 실이 중뇌동맥의 기시부를 완전히 폐색할 수 있게 된다³¹⁾.

이러한 국소뇌허혈 모델 중에서 한의학적으로 모델로 응용할 수 있을 것으로 생각되는 두개골절제술(craniectomy)을 통한 원위부 중뇌동맥(distal middle cerebral artery; dMCA)의 영구적 폐쇄술과, 혈관내수술실삽입술 (intraluminal suture)을 통한 근위부 중뇌동맥(proximal middle cerebral artery; pMCA)의 영구적 폐쇄술을 선정하여 각각의 중풍 동물모델을 만들고 이에 대한 평가를 시행하였다.

뇌허혈 연구에 있어서 조직학적 결과와 행동학적 결과가 상이할 수 있으므로, 손상 부위에 대한 신경조직학적 측정과 손상 기능에 대한 신경행동학적 척도를 함께 사용하였다⁹⁾. 중뇌동맥 폐쇄 모델에 대한 많은 연구들이 발생 24시간 전후의 초기상태를 대상으로 하는데¹¹⁾, 이는 급성기의 상태가 증상 개선과

후유증에 미치는 영향이 매우 크기 때문이다.

본 연구는 신경조직학적 평가에 있어서 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 염색을 통해 경색의 크기를 측정하였고, 신경행동학적 척도로는 water maze를 이용한 수중유영검사를 사용하였다. 수중유영검사는 중뇌동맥 폐쇄로 인한 행동을 보다 종합적으로 살펴볼 수 있는데, 궤적의 분석을 통해 인지능력의 손상과 운동능력의 손상을 동시에 측정할 수 있다²⁾.

본 실험에서, 근위부 중뇌동맥 폐쇄군의 허혈성 뇌손상은 반뇌의 dorso-lateral and lateral and inferior cortex와 basal ganglia에 걸쳐 매우 크게 나타났으나, 원위부 중뇌동맥 폐쇄군은 dorso-lateral cortex 부위를 중심으로 작게 나타났다.

근위부 중뇌동맥 폐쇄군의 경우, Interaural 10.97mm, 9.04mm, 7.41mm에서의 뇌손상이 유의하게 크게 나타났으며, Caudate Putamen, Hippocampus, Thalamus 등의 손상으로 인해 인지기능의 실조가 나타났다. 또한 손상 범위가 크고 부종이 매우 심하게 나타났는데, 이러한 부종은 실제 임상에 있어서 흔하게 보이는 증상의 하나로, 이러한 경우 운동기능 장애, 학습·기억 능력의 장애, 의식 장애 등의 증상을 보인다³⁸⁾. 원위부 중뇌동맥 폐쇄군에 있어서는, collateral supply를 막지 못해 경색 범위가 작았으며, 앞발과 뒷발을 담당하는 primary and secondary somatosensory cortex region인 superior cortex 부분에 경색이 나타났다²⁰⁾.

허혈성 뇌손상 부위 체적은 근위부 중뇌동맥 폐쇄군에서 $244.31 \pm 21.75 \text{mm}^3$ 였다. 이는 본 연구와 동일한 방법을 사용한 Minematsu 등²³⁾의 $225.0 \pm 127.8 \text{mm}^3$ 이나 Meadows 등²²⁾의 $251.0 \pm 74.8 \text{mm}^3$ 과 비교해 볼 때 매우 작은 coefficient of variation을 지니는 것으로, neuro-protective한 약물의 치료 효과를 조사하기 위한 동물실험모델이 갖추어야 할 중요한 요소이다.

60초간 수중유영 중, 유영거리에 있어서 두 군간 유의한 차이가 없었으며, 회전각도 비율에 있어서 근위부 중뇌동맥 폐쇄군에서 크게 나타났으나 유의하지는 않았다. 회전수 비율에 있어서는 근위부 중뇌동맥 폐쇄군에서 유의하게 크게 나타났다. 이는, 근위부 중뇌동맥 폐쇄군의 경우에는 편측의 운동 능력과 인

지 능력이 매우 떨어진 상태에서 계속적으로 헤엄치려고 하는 욕구에 의해 방향전환 없이 계속적으로 유영해 나간 반면, 원위부 중뇌동맥 폐쇄군의 경우에는 인지 능력에는 변화가 없는 상태에서 약한 운동 능력의 장애가 있었으므로 좌우 방향전환이 많고 벽을 타고 올라가려고 했던 것이 원인이라 보인다. 본 연구에 사용된 원위부 중뇌동맥 폐쇄술을 사용한 Coyle 등⁸⁾의 연구에서도 실험 동물을 좁은 표면 위를 걷게 했을 때 보행의 불균형이나 자세의 이상을 보이지 않았다고 하였다.

실험동물의 수영 형태는 앞발과 뒷발의 능력을 복합적으로 반영하며, 정서적인 상황, 인지능력 등도 영향을 미치는 것으로 추측된다²⁾. 근위부 중뇌동맥 폐쇄군의 경우에는 좌측 반신마비로 인한 운동기능 실조와 인지 능력의 저하로 좌측을 향해 연속된 작은 동심원 형태의 특이 궤적을 계속적으로 그리게 되며, 원위부 중뇌동맥 폐쇄군의 경우에는 특이 궤적보다는 수조의 벽면을 타고 오르려는 행동, 좌우로 방향을 바꾸는 행동, 수조의 벽면을 따라 수영하는 행동, 수조를 가로질러 수영하는 행동 등을 많이 보였다.

원위부 중뇌동맥 폐쇄는 침습으로 인한 intracranial pressure의 변동²⁹⁾이나 박테리아의 침범이나 조직의 손상을 초래한다는 단점⁸⁾을 지니고 있으며, 근위부 중뇌동맥 폐쇄는 calcium channel blocker²⁴⁾, excitatory amino acid antagonist¹²⁾ 등과 같은 치료 약물의 효과를 평가하기 위해 사용된다는 장점⁸⁾이 있고, 부종, 해마의 손상으로 인한 의식장애도 나타내고 있다.

수중 유영시 편측 유영각도 비율과 편측 회전수의 비율, 유영 궤적의 특징 등을 종합적으로 살펴볼 때, 한의학적 中風證의 半身不遂, 人事不省 등을 적절히 반영할 수 있는 중풍 실험동물모델로는 혈관내수술 실삽입술을 사용한 비침습적 근위부 중뇌동맥 폐쇄법이 적합할 것으로 생각된다.

結 論

중풍의 한의학적 임상증상에 부합하는 실험동물모

델을 선정하기 위하여, 침습적인 두개골절제술을 사용한 원위부 중뇌동맥 폐쇄술과 비침습적인 혈관내 수술실삽입술을 사용한 근위부 중뇌동맥 폐쇄술을 시행하여 각각의 중풍 동물모델을 만들고, 이를 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 염색을 통한 신경 조직학적 평가와 수중유영실험을 이용한 운동 기능의 신경행동학적 평가를 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 허혈성 뇌손상 부위의 면적과 체적을 측정한 결과, 근위부 중뇌동맥 폐쇄술로 유발된 경색 면적과 체적이 원위부 중뇌동맥 폐쇄술에 비하여 유의하게 큰 결과를 보였다.
2. 60초간 수중유영 중, 회전각도 비율에 있어서 근위부 중뇌동맥 폐쇄군에서 크게 나타났으나 유의하지는 않았다. 회전수 비율에 있어서는 근위부 중뇌동맥 폐쇄군에서 유의하게 크게 나타났다.
3. 수중 유영시의 궤적을 관찰한 결과, 근위부 중뇌동맥 폐쇄군에서는 운동기능 실조와 인지능력 저하를 반영하는 좌측을 향한 연속된 작은 동심원 형태의 특이궤적이 보였으나, 원위부 중뇌동맥 폐쇄군에서는 나타나지 않았다.

이상의 결과에서 볼 때, 본 연구에서 시행한 혈관내수술실삽입술을 통한 근위부 중뇌동맥 폐쇄술이 한의학적 中風證을 적절히 반영할 수 있는 중풍 실험동물 모델로서 적합할 것으로 생각된다.

參考文獻

1. 김영석. 임상중풍학. 서울. 서원당. 1997 : 303-8, 317-29.
2. 우태을 : 중풍 동물 모델의 운동기능실조에 대한 연구, 경희대학교, 1999.
3. 全國韓醫科大學 心系內科學教室. 東醫心系內科學(下). 서울: 書苑堂. 1995 : 244-6.
4. 정봉교 외 2인. 흰쥐의 내측중격핵 손상이 MORRIS 수중미로과제의 학습에 미치는 효과. 한국심리학회지 1993 ; 5:29-44.
5. Bartus RT, Dean RL, Cavanaugh K, Eveleth D, Carriero D, and Lynch G. Time-related neuronal

changes following middle cerebral artery occlusion: Implications for therapeutic intervention and the role of calpain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1995;15:969-979.

6. 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;17:472-476.
7. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD. A model of focal ischemic stroke in the rat. Reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 1986;17:738-743.
8. Coyle P. Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke*. 1982; 13, 6.
9. Florence Wahl, Monique Allix, Michel Plotkine, Roger G. Neurological and Behavioral Outcomes of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke*. 1992; 23:267-272.
10. Ginsberg MD. Busto R, Rodent Models of Cerebral Ischemia. *Stroke* 1989; 20: 1627-1642.
11. Grabowski M, Brundin P, Johansson BB. Paw-reaching, sensorimotor, and rotational behavior after brain infarction in rats. *Stroke*. 1993;24:889-895.
12. Graham DI, Ozyurt E, Park CK, N원 DG, Teasdale GM, McCulloch J. Protective effects of the NMDA antagonist, MK-801, on focal ischemic brain damage, in Ginsberg MD, Dietrich WD (eds): *Cerebrovascular Diseases-Sixteenth Research (Princeton) Conference*. New York, Raven Press, Publishers, 1989; 65-72.
13. Hossman, K.-A., Schmidt-Kastner, R. and Grosse Ophoff, B., Recovery of integrative central nervous function after one hour global cerebro-circulatory arrest in normothermic cat, *J. Neurol. Sci*. 1987; 77: 305-320.
14. Iversen LL, Iversen SD, Snyder SH. *Handbook of Psychopharmacology, Vol 9. chemical pathways in the brain*. London: Plenum Press, 1978.
15. Klatzo I. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1967; 17: 548-564.
16. Koisumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema, I . a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*. 1986; 8:1-8.
17. Laing RJ, Jakubowshi J, Laing RW. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best? *Stroke*. 1993; 24: 294-298.
18. Ludmila Belayev, Ofelia F. Alonso, Raul Busto,

- Weizhao Zhao, Myron D. Ginsberg. Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat by Intraluminal Suture Neurological and Pathological Evaluation of an Improved Model. *Stroke*, 1996; 27: 1616-1623.
19. Markgraf CG, Green EJ, Hurwitz BE, Morikawa E, Dietrich WD, McCabe PM, Ginsberg MD. Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*. 1992; 575:238-246.
 20. Markgraf CG, Green EJ, Watson B, McCabe PM, Schneiderman N, Dietrich WD, Ginsberg MD. Recovery of sensorimotor function after distal middle cerebral artery photothrombotic occlusion in rats. *Stroke*. 1994; 25:153-159.
 21. Mazia D, Schatten G, Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *J Cell Biol*. 1975; 66:198-200.
 22. Meadows ME, Fisher M, Minematsu K. Delayed treatment with a noncompetitive NMDA antagonist, CNS-1102, reduces infarct size in rats. *Cerebrovasc. Dis*. 1994; 4: 26-31.
 23. Minematsu K, Fisher M, Li L, Davis MA, Knapp AG, Cotter RE, McBurney RN, Sotak CH, Effects of a novel NMDA antagonist on experimental stroke rapidly and quantitatively assessed by diffusion-weighted MRI. *Neurology*. 1993; 43: 397-403.
 24. Mohamed AA, Gotoh O, Graham DI, Osborne KA, McCulloch J, Mendelow AD, Teasdale GM, Harper AM. Effect of pretreatment with the calcium antagonist nimodipine on local cerebral blood flow and histopathology after middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol*. 1985;18:705-711.
 25. Molinari GF, Laurent JP. A classification of experimental models of brain ischemia. *Stroke*. 1976; 7:14-17.
 26. Morris RGM: An attempt to dissociate "spatial mapping" and "working-memory" theories of hippocampal function. In: W Seifert, eds. *Neurobiology of the hippocampus*. London: Academic Press. 1983: 405-432.
 27. Mossy J, Morphological validation of ischemic stroke models. In: Price TR, Nelson E(eds). *Cerebrovascular diseases, 11th Princeton conference*. New York: Random House. 1979: 3-10.
 28. Nedergaard M. Mechanism of brain damage in focal ischemia. *Acta Neurol scand*. 1988; 77:81-101.
 29. O'Brien MD, Waltz AG. Transorbital approach for occluding the middle cerebral artery without craniectomy. *Stroke*. 1973; 4:201-206.
 30. Obana, W.G., Pitts, L.H. and Nishimura, M.C., Effect of opiate antagonists on middle cerebral artery occlusion infarct in the rat. *J. Neurosurg*. 1988; 69: 98-103.
 31. Ohta H, Nishikawa H, Kimura H, Anayama H, Miyamoto M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience* 1997 Aug;79(4):1039-50.
 32. Packard, M.G., Hirsch, R. and White, N.M., Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *J. Neurosci*. 1989; 9: 1465-1472.
 33. Robinson Rg, Coyle JT. The differential effect of right versus left hemispheric cerebral infarction on catecholamines and behavior in the rat. *Brain Res* 1980; 188:63-78.
 34. Robinson RG, Shoemaker WJ, Schlumpf M, Valk T, Bloom TE. Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines and behaviour. *Nature* 1975; 255:332-334.
 35. Robinson RG. Differential behavior and biochemical effects of right and left hemispheric infarction in the rat. *Science*. 1979; 205:707-701.
 36. Shinoda M, Matsuo A, Toide K. Pharmacological studies of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, in rats with middle cerebral artery occlusion. *Eur J Pharmacol* 1996 Jun 3;305(1-3):31-8.
 37. 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 Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1:53-60.
 38. Tominaga T, Ohnishi ST. Interrelationship of brain edema, motor deficits and memory impairment in rats exposed to focal ischemia. *Stroke*. 1989; 20:513-518.
 39. Waston B, Dietrich W, Busto R, Wachtel M, Ginsberg M. Introduction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*. 1985; 17:497-506.
 40. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20:84-91.