

원저

Hirudin 藥鍼이 中大腦動脈閉塞으로 誘發된 흰쥐의 神經損傷 保護 效果

석재욱* · 정태영* · 임성철* · 서정철* · 김미려** · 양재하*** · 한상원*

대구한의대학교 한의과대학 *침구학교실, **약리학교실, ***생리학교실

Abstract

The Protective Effect of Hirudin Herbal-acupuncture against the Neuronal Damage Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion(MCAO) in Rats

Suk Jae-wook*, Jung Tae-young*, Lim Seong-cheol*, Seo Jeong-chul*, Kim Mi-ryeo**,
Yang Chae-ha*** and Han Sang-won*

Department of *Acupuncture & Moxibustion, **Pharmacology, ***Physiology, College of Oriental Medicine,
Daegu Hanny University

Objective : In order to prove the effect of Hirudin Herbal-acupuncture this experimental studies were performed by using rats that had neuronal damage due to the Middle Cerebral Artery Occlusion(MCAO).

Methods : Microdialysis probes were implanted into the coordinate of striatum of anesthetized rats which consist of sham-operated 8 rats, MCAO-operated 8 rats and Hirudin Herbal-acupuncture administrated 8 rats before MCAO operating. The Hirudin Herbal-acupuncture(0.5mg/kg) was

- 접수 : 2004년 7월 22일 · 수정 : 2004년 7월 24일 · 채택 : 2004년 7월 25일
· 교신저자 : 한상원, 대구광역시 수성구 상동 165 대구한의대학교 부속대구한방병원 침구과
Tel. 053-770-2129 E-mail : hansw@dhu.ac.kr

administrated to rats 30 minutes before having an operation causing the MCAO. The surgical excision lead the cross resected brain to the acute ischemic state. The brain was sliced in 2mm thickness and stained with cresyl violet buffer for the measurement of cerebral infarcted area and volume.

Results : Based on the result of the tissue inspection for the cerebral ischemic cell, Hirudin Herbal-acupuncture significantly protect neurocytes.

Conclusion : We suggest Hirudin Herbal-acupuncture produces protective effects against the neuronal damage induced by MCAO. Therefore, Hirudin Herbal-acupuncture may prevent delayed neuronal death(DND) in selectively vulnerable focal areas of the brain effectively.

Key words : Hirudin, Herbal-acupuncture, Middle Cerebral Artery Occulsion(MCAO), Neuronal Damage

I. 緒 論

醫學의 發達로 人間の 壽命이 延長되면서 成人病이 增加하고 그 危險因子 治療의 未盡함으로 因해 腦血管疾患의 發生頻度는 增加하고 있다. 腦血管疾患(cerebrovascular diseases)은 腦血管의 病理學的 異常에 依해 일어나는 意識障礙와 神經學的인 損傷으로 因한 運動 및 感覺障礙 등을 隨伴하는 症候群을 總稱하는 것으로¹⁾, 虛血性 腦血管疾患과 出血性 腦血管疾患으로 分類할 수 있다. 腦血管疾患은 食生活의 西歐化, stress, 運動不足 그리고 高血壓의 積極的인 治療로 因해 出血性 腦血管疾患보다는 虛血性 腦血管疾患의 發生比率이 漸次 增加하고 있는 趨勢이다²⁻³⁾.

虛血性 腦血管疾患은 中風の 範疇에 屬하며³⁾, 中風 急性期는 大部分 本虛標實과 上盛下虛證이므로, 治療는 本虛證이 있어도 標實證을 爲主로 治療한다. 急治其標의 原則에 따라 平肝熄風, 清熱滌痰, 化痰

通腑, 活血通絡 등의 治法을 多用하는데, 이 때에는 邪氣가 盛하고 症候가 實하기 때문에 빨리 病邪를 除去하기 爲한 治療로, 清心開竅 蘇醒醒神志 涼解熱毒의 效能이 있는 藥을 많이 使用하고 있다⁴⁻⁷⁾.

水蛭은 水蛭科(거머리과; Hirudinidae)에 속한 거머리(水蛭: *Hirudo nipponica* Whitman) 등의 乾燥體로⁸⁾, 性은 平有小毒하고 味는 辛鹹苦하며 肝經으로 入하고 破血祛瘀, 散癥通經의 效能이 있어서 癥瘕痞塊, 血瘀經閉, 跌打損傷을 主治한다⁹⁻¹⁰⁾. 水蛭의 主成分인 Hirudin은 피부이식 후 국소 혈액축적이나 국소 혈액응고를 제거하는 데 쓰이며, 최근에는 靜脈血栓症의 예방 및 치료 등 全身적인 抗血液凝結을 위해 그 使用이 시도되고 있다¹¹⁾ 水蛭藥鍼에 대한 연구로는 endotoxin을 주입하여 유발시킨 血栓症에 대한 연구는 있으나¹²⁾, 아직까지 中大腦動脈을 閉塞시킨 動物모델을 利用하여 腦虛血過程에 미치는 影響에 關한 研究은 거의 없는 실정이다.

이에 著者는 破血祛瘀, 散癥通經하는 效能으로 血栓治療 作用이 있을 것으로 예상되는 水蛭의 주성분

인 Hirudin 藥鍼液으로 腦虛血 誘發時 腦組織細胞 保護效果에 따른 腦卒中 治療機轉을 實驗的으로 研究하기 爲해 人爲的으로 中大腦動脈 閉塞術로 腦虛血을 誘發시킨 흰쥐에게 Hirudin 藥鍼液을 合谷(LI4)¹³⁾에 注入한 後, 腦梗塞部位의 容積을 測定하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 動物 및 材料

1) 動物

動物은 體重 240~260g의 Sprague-Dawley系 雌性 흰쥐(大韓實驗動物센터)를 使用하였고, 물과 펠렛飼料(제일사료 Co., 대전)를 자유롭게 먹도록 하였으며, 飼育室內의 溫度는 21~24℃, 濕度는 40~60%로 維持하였고, 낮과 밤의 週期는 各各 12時間으로 하였으며, 實驗室 環境에 2週間 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 材料

藥鍼液은 Sigma社의 Hirudin Fragment 54-65를 구입하여 使用하였다.

2. 方法

1) 試藥의 調製

본 實驗에 사용된 Hirudin은 주사용 식염수(normal saline)를 가하여 調製하였다.

2) 藥鍼群

흰쥐 8마리를 1個群으로 하여 control group은 腦虛血만 誘發시켰고, sham group은 腦虛血은 誘發시키지 않고, 마취상태에서 같은 부위에 봉합만 하였으며, tail group은 주사용 식염수(normal saline) 0.2ml

을 꼬리에 注入하였다. 그리고 合谷(LI4)에 相應하는 實驗動物의 體表 上的 兩側 穴位에 saline group은 주사용 식염수(normal saline)를, sample group은 Hirudin 藥鍼液을 各各 0.1ml(0.5mg/kg)씩 1回 注入하였다.

3) 中大腦動脈閉塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)에 의한 흰쥐의 腦虛血 誘發^{14,15)}

正常群을 除外한 흰쥐를 N₂O(70%)/O₂(30%)와 混合된 3% isoflurane으로 吸入 麻酔시킨 後, 頸部를 切開하여 右側 總頸動脈과 外頸動脈을 結紮하였다. 15분동안 動物을 安定시킨 後, 外頸動脈을 조금 자르고 0.25mm直徑의 nylon monofilament를 內頸動脈쪽으로 約 17mm程度 밀어 넣어 中大腦動脈을 閉塞하였다. 切開된 部位를 縫合한 後 麻酔에서 恢復시켰는데, 手術 및 麻酔 恢復期間동안 溫度調節裝置를 利用하여 直腸內 溫度를 37℃로 維持시켰으며, 腦虛血이 誘發된 흰쥐를 곧바로 microdialysis system에 連結시켰다.

4) 組織檢査

(1) Probe 위치확인을 위한 組織檢査¹⁶⁾

MCAO 2時間後 microdialysis 實驗이 끝난 흰쥐의 cerebral infarcted area 및 volume을 測定하기 爲해 各 群의 흰쥐 8마리씩에 對하여 組織檢査를 施行하였다. 組織染色을 하기 以前에 perfusion을 爲하여 여러 個의 buffer를 準備하였다. 固定液은 H₂O 1,800ml, 37% formalin 200ml, KH₂PO₄ 8g, Na₂HPO₄ 20g을 混合하여 만들었으며, 0.9% saline은 NaCl 9g을 H₂O 1000ml에 溶解시켜 準備하였다. Microdialysis 分析을 마친 흰쥐를 sodium pentobarbital 80mg/kg으로 腹腔 麻酔한 後, 手術臺에 固定하여 胸廓을 열고 descending aorta를 結紮하였다. 心尖部位에 穿刺하여 먼저 0.9% saline 100ml를 흘려서 血液을 씻어내고 800ml의 固定液을 충분히 灌流한 後, 頭蓋骨로부터 腦를 分離하여 다시 固定液에 17時間동안 貯藏하여 postfixation하였다. Vibratome(Campden Instruments

752M vibroslice tissue cutter, England)을 利用하여 100 μ m씩, bregma 1mm부터 bregma -0.5mm까지 coronal section하여 腦切片을 만들었다. 染色을 爲해 xylene, 100% ethanol, 95% ethanol, 70% ethanol, 25% ethanol, 蒸溜水, differentiation solution(mixture of 70% ethanol 225ml, ether 25ml, glacial acetic acid 2drops), cresyl violet stain solution(mixture of cresyl violet 2g, 1M acetic acid 185ml, 1M sodium acetate 15ml, H₂O 600ml)을 準備하였다. 乾燥된 腦組織을 染色하기 以前에 脫脂 脫水를 爲하여 xylene(1hr), 100% ethanol(10mins), 95% ethanol(10mins), 70% ethanol(10mins), 蒸溜水(1dip)의 順序로 過程을 거쳤다. 染色을 爲하여 cresyl violet stain solution(25mins), 蒸溜水(10dips), 25% ethanol(10mins), differentiation solution(12mins), 95% ethanol(10mins), 100% ethanol(10mins), xylene(10mins)을 順序대로 거친 後, permount를 利用하여 slide glass를 完成하고 probe 위치를 Paxinos의 atlas와 比較확인하여 얻었다.

(2) 腦梗塞 部位의 容積 測定

中風誘發 24시간 後 對照群과 實驗群의 人腦를 2mm간격으로 잘라 200ml의 saline에 TTC(2, 3, 5 - Triphenyltetrazolium chloride) 4g을 녹여 미리 제조해둔 2% TTC용액에 담겨 37 $^{\circ}$ C water bath에서 30분간 염색하였다. 염색된 절편은 4% formaline용액으로 조직을 고정시켰다. 고정된 조직의 腦梗塞 部位의 容積은 Image analyzer system (OPTIMAS, Edmonds,

WA, USA)을 利用하여 測定하였다.

3. 統計處理

實驗結果의 統計的 有意性은 ANOVA(One-Way Analysis of Variance)와 post-hoc LSD(Least Significant Difference) test¹⁷⁾를 利用하여 檢證하였으며, P<0.05 水準인 것을 有意하다고 認定하였다.

III. 成 績

1. 腦梗塞 部位의 容積 測定

Control 群의 striatum과 cortex의 梗塞 容積은 각각 146.3 \pm 11.2, 286.4 \pm 29.9mm³ 였고, saline 群의 striatum과 cortex의 梗塞 容積은 각각 103.3 \pm 10.9, 276.4 \pm 17.2mm³ 였으며, tail 群의 striatum과 cortex의 梗塞 容積은 각각 151.1 \pm 15.2, 287.8 \pm 11.3mm³ 로 이 중 saline 群의 striatum의 梗塞 容積만 control 群에 비하여 有意性(P<0.05) 있게 감소하였다.

Sample 群의 striatum의 梗塞 容積은 62.3 \pm 13.9mm³ 로 control 群과 saline 群에 비하여 모두 매우 有意性(P<0.001) 있게 감소하였으며, cortex의 梗塞 容積은 182.9 \pm 22.8mm³ 로 control 群과 saline 群에 비하여 모두 有意性(P<0.05) 있게 감소하였다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effect of Hirudin Herbal-acupuncture on Infarction Dimension in the Rat Brain after Middle Cerebral Artery Occulsion(MCAO)

Group	No. of Animal	Infarction volume(mm ³)	
		Striatum	Cortex
Control	8	146.3±11.2a)	286.4±29.9
Saline	8	103.3±10.9*	276.4±17.2
Tail	8	151.1±15.2	287.8±11.3
Hirudin	8	62.3±13.9****	182.9±22.8**

Infarction volume was measured after Herbal-acupuncture at bilateral Hapgok(LI4) in rats subjected to permanent focal cerebral ischemia induced by 24 hours of middle cerebral artery occlusion(MCAO). Saline were given at bilateral Hapgok as control material and tail were used as non-specific control point

a) Mean± S.E.

*, P<0.05, **, P<0.01, ***, P<0.001 as compared with the corresponding data of Control group

+, P<0.05, ++, P<0.01, +++, P<0.001 as compared with the corresponding data of Saline group

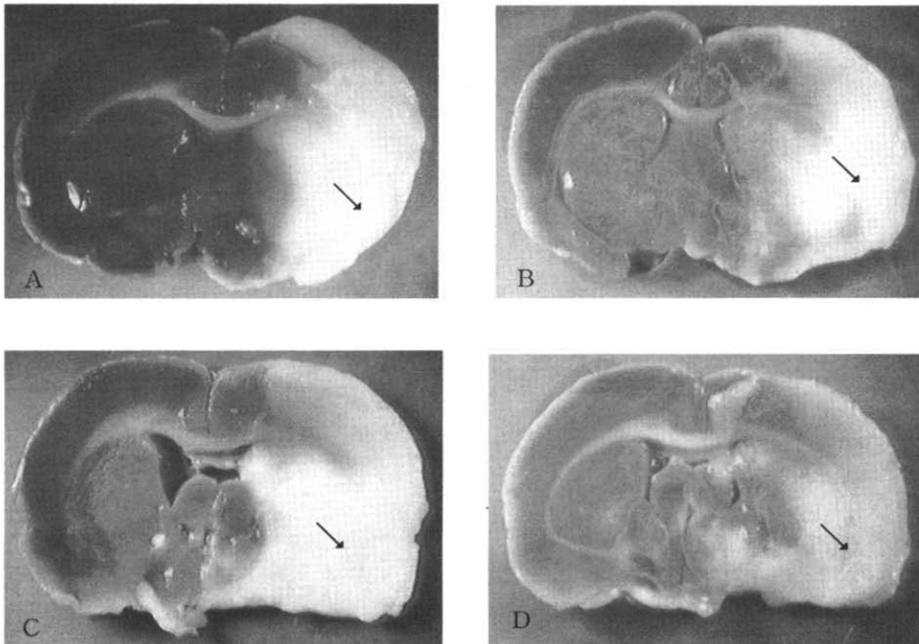


Fig. 1. The infarction dimension of the rat brain after MCAO. The rats were pretreated with each method. A : control, B : saline, C : Tail, D : hirudin group

IV. 考 察

현재 醫學界에서 사고로 절단된 손가락, 귀 등을 접합하는데 거머리의 特性을 이용하고 있다¹⁸⁻¹⁹⁾. 水蛭은 水蛭科(거머리과; Hirudidae)에 속한 環節動物인 蛭屬(Whitmania pigra Whitman)과 거머리(水蛭; Hirudo nipponica Whitman) 및 柳葉蛭屬(Whitmania acranulata Whitman)의 乾燥體이며, 寬水蛭, 馬蛭, 至掌으로 불리기도 한다²⁰⁾. 性은 平有小毒하고 味는 辛鹹苦하며 肝經으로 入하고 破血祛瘀, 散瘀通經의 效능이 있어서 癥瘕痞塊, 血瘀經閉, 跌打損傷을 주치한다^{9, 10)}.

기존의 보고에 의하면 水蛭의 經口投與를 통한 血栓症의 실험에서 安²¹⁾은 혈소판수, Fibrinogen 量, PT(prothrombin time)에서 有意性 있는 效과를 보고 하였으며 FDP농도에서는 有意性이 인정되지 않았다. 한편 朴²¹⁾은 瘀血에 관한 熊膽의 治療效과를 실험적으로 규명하기 위하여 水蛭을 比較藥物로 채택하여, 연구한 결과 Fibrinogen 量과 PT는 熊膽 및 水蛭 投與群에서 모두 有意性이 인정되어 熊膽 및 水蛭은 血栓症과 고점도혈증에 관련되어 나타나는 高血壓, 動脈硬化症, 心血管疾患 및 腦血管疾患 등의 예방과 치료에 效과적으로 應用될 수 있다고 하였다.

水蛭藥鍼 效果에 대한 實驗的 研究로는 金 등¹²⁾이 endotoxin을 주입하여 유발시킨 血栓症에서 對照群의 혈소판수는 正常群에 비하여 현저히 감소하였으며, 水蛭藥鍼群 및 紅花藥鍼群 모두 對照群에 대하여 증가하는 경향을 나타내었는데, 특히 水蛭藥鍼群은 有意性있는 증가를 나타내었다고 하였다.

水蛭의 주성분인 Hirudin은 피부이식 후 국소 혈액축적이나 국소 혈액응고를 제거하는 데 쓰이며, 최근에는 靜脈血栓症의 예방 및 치료 등 全身的인 血液凝結 防止에도 그 사용이 시도되고 있다¹¹⁾. Hirudin은 대표적인 血液凝結 防止劑인 heparin보다 30여 년 전에 발견되었으며, 현재는 유전자 재조합에 의해 대

량생산이 가능하다²²⁻²³⁾. 천연 Hirudin은 66개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량은 7kD 정도이다. Hirudin의 작용은 혈액응고과정에서 중요한 역할을 하는 thrombin을 선택적으로 억제하여 신속하게 혈액응고를 억제한다²⁴⁾. 또한 전신성 혈관내 응고(disseminated intravascular coagulation)와 혈전생성을 억제하며 투여 후 출혈빈도는 heparin보다 적게 나타난다²⁵⁾. 우리나라에서도 1980년대부터 Hirudin의 임상응용에 대해 많이 연구되어 왔으며²⁶⁻²⁷⁾ 외국에서도 혈전증에 Hirudin을 이용한 많은 보고가 있다²⁸⁾. 그러나 中人腦動脈을 閉塞시킨 動物모델에 Hirudin을 이용한 研究는 아직까지 드문 실정이다²⁹⁾.

中風은 卒中昏倒 半身不遂 口舌歪斜 神志昏迷 舌強言蹇 或不語 遍體麻木 등의 症候를 일컫으며³⁰⁾, 이것은 腦血管의 循環障敝로 因하여 猝然히 일어나는 意識障敝와 腦의 神經學的인 損傷에 의한 諸般運動 및 感覺障敝 등을 隨伴하는 症候群을 總稱한다³¹⁾.

中風의 主要 原因을 살펴보면 內經을 비롯한 隨唐 및 宋代 醫家들은 주로 風과 虛를 原因으로 하였고³²⁾, 金元時代의 劉³³⁾는 主火說을, 朱³⁴⁾는 濕痰을, 李³⁵⁾는 正氣自虛로 因한다고 主張하였고, 清代以後 葉³⁶⁾은 肝風內動을, 王³⁷⁾은 氣虛瘀血이 原因이 된다고 主張하였다. 이를 通해 살펴보면 風, 火, 濕痰, 虛, 瘀血 등이 主要 原因이 됨을 알 수 있다.

中風 治療는 中風이라 하여 相異한 治法이 要求되는 것은 아니다. 疾病의 原因 및 性質에 따라 先後緩急과 輕重 등의 治療方法이 있는 것이다. 中風은 本虛標實과 上盛下虛의 症이라 할 수 있으므로, 大部分 急性期에는 비록 本虛證이 있어도 標實證을 爲主로 治療한다. 急卽治其標의 原則에 따라 平肝熄風, 清熱瀉痰, 化痰通腑, 活血通絡 등의 治法을 多用한다^{4, 7)}. 이때에는 邪氣가 盛하고 症候가 實하기 때문에 빨리 病邪를 除去하기 爲해서 藥物療法 以外에도 拮法, 鍼法, 開竅法, 取嚏法, 吐法, 蒸法²⁾ 등의 多樣한 治法을 使用할 수 있다.

腦虛血은 두 가지 病態生理學的 過程으로 發生하는데, 첫째는 血管閉鎖로 因하여 酸素와 血糖 供給이

消失된다는 점이고, 둘째는 細胞膜 崩壞와 에너지 生産過程의 瓦解로 細胞代謝의 變化를 招來한다는 것이다. 最近 觀察에 따르면 神經細胞에 죽음을 招來하는 細胞內 過程은 治療할 수 없는 것이 아니고, 血流을 恢復시키거나 細胞內로의 Ca^{2+} 流入을 遮斷하거나 아니면 興奮性 神經傳達物質을 妨害함으로써 神經細胞를 죽음으로부터 피하게 할 수 있고, 治療的 可能性³⁸⁾도 있다는 報告가 많아 本 實驗을 하게 되었다.

虛血性 腦損傷을 誘發하는 動物實驗 model은 두 種類가 있는데, global ischemic model과 focal ischemic model 方法이 있다. 全體的인 腦虛血 誘發은 兩側 總頸動脈을 結紮하는 方法과 兩側 總頸動脈 및 椎骨基底動脈 모두를 結紮하는 方法이 있는데, 이 方法은 腦幹의 虛血로 因한 急性 死亡 등으로 實驗 成功率이 낮다는 報告³⁹⁾가 있어, 本 實驗은 局所的인 虛血을 誘發시키는 方法을 施行하였다. 可逆性 腦虛血模型의 實驗보다는 實際 臨牀的인 治療方面에 接近하기 爲해 非可逆性 腦虛血模型으로 하였다.

腦虛血로 因해 梗塞에 빠지면 腦組織에 廣範圍한 壞死가 일어나는데, 이는 生體가 生存하고 있는 한 一定한 過程을 거쳐 膠質性(gelatinous) 및 膠癭痕(glial scar) 現狀으로 된다. 虛血性 神經細胞 變化(ischemic neuronal change)의 肉眼的 所見은 48시간이 經過하여야 하며, 顯微鏡的 所見은 12시간이 經過하여야 虛血性 神經細胞變化和 浮腫 現狀을 볼 수 있는데⁴⁰⁾, 本 實驗은 MCAO手術과 2시간의 microdialysis 實驗이 끝난 後, 腦를 切開하여 cresyl violet buffer로 染色하여 組織檢査를 施行하였다. Hirudin 藥鍼을 MCAO手術 30分前에 處置하여 腦虛血時 神經組織細胞 損傷을 保護하고 抑制하는 藥理作用이 있는지를 알아보는데 그 目的을 두었다. Image analyzer system을 利用하여 環徑의 腦梗塞 部位의 容積을 測定한 結果, 對照群에 比해 藥鍼處置群에서 매우 有意性있는 腦組織 損傷 減少가 觀察되었다.

以上에서 살펴본 바와 같이 Hirudin 藥鍼은 腦梗塞 部位의 容積에서 有意性이 認定되어 急性期中 風治療 및 遲延性 神經細胞壞死 防止에 利用할 수

있을 것으로 思慮된다.

V. 結 論

Hirudin 藥鍼은 臨牀에서 虛血性 腦血管疾患의 急性期 治療 및 遲延性 腦神經細胞壞死 防止에 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

VI. 參考文獻

1. Raymond D. Adams 外. 아담스 신경과학. 서울: 정담. 1998: 715-28.
2. 金永錫. 臨牀中風學. 서울: 書苑堂. 1997: 303-4, 437.
3. 全國韓醫科大學 心系內科學教室. 서울: 書苑堂. 1999: 502, 505-6.
4. 沈全魚 外. 中風證治. 北京: 中醫古籍出版社. 1988: 1, 6, 8-10, 13-4.
5. 叢汝滋. 腦病的中醫論治. 北京: 人民衛生出版社. 1993: 78-86.
6. 陳輝. 實用中醫腦科學. 北京: 學苑出版社. 1993: 62-74.
7. 原實齡. 內科急症治療學 5. 上海: 上海科學技術出版社. 1988: 270-3.
8. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울: 永林社. 1991: 424-5, 431-2.
9. 辛民教. 原色臨牀本草學. 서울: 永林出版社. 1988: 461-2, 467-8.
10. 中佑求. 中氏本草學. 서울: 壽文社. 1988: 554-5, 566-7.
11. 백정환, 신준호, 박주현. 피관 부전증의 구제를

- 위한 약용거머리 치료법. 대한두경부중양학회지. 2000 ; 16(1) : 20-5.
12. 김영태, 한상원 水蛭 및 紅花藥鍼이 Endotoxin으로 誘發된 血栓症에 미치는 影響. 大韓針灸學會誌. 1997 ; 14(1) : 464-77.
 13. 全國韓醫科大學 鍼灸·經穴學敎室. 鍼灸學(上). 서울 : 집문당. 2000 : 323-5.
 14. Warner DS, Martin H, Ludwig P, McAllister A, Keana JFW and Weber E. In vivo models of cerebral ischemia : Effects of parenterally administered NMDA receptor glycine site antagonists. J. Cereb. Blood flow Metab. 1995 ; 15 : 188-96.
 15. Lei B, Adachi N, Nagaro T, Arai T. The effect of dopamine depletion on the H₂O₂ production in the rat striatum following transient middle cerebral artery occlusion. Brain Res. 1997 ; 764(1-2) : 299-302.
 16. Hillered L, Hallstrom A, Segersvard S, Persson L, Ungerstedt U. Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. J. Cereb Blood Flow Metab. 1989 ; 9 : 607-16.
 17. 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.
 18. 정월선, 박준형, 심지연, 최인철, 이재원. 허파 림기인성 혈소판감소증 환자에서 Hirudin을 사용하여 심폐우회술을 시행한 예. 대한마취과학회지. 2000 ; 176 : 270-4.
 19. 노종훈 外. 정맥 문합대신 거머리만을 이용한 절단된 외이의 재접합 치험례. 大韓成形外科學會誌. 2001 ; 28(6) : 667-70.
 20. 安圭錫 蚯蚓, 水蛭, 蟻蟻 및 蜈蚣이 血栓症에 미치는 影響. 大韓醫學會誌. 1990 ; 11(2) : 92-101.
 21. 박창국. 응답 및 수질이 어혈병태모형에 미치는 영향. 동서의학. 1994 ; 19(2) : 5-42.
 22. 최윤주 外. 효소면역측정법(ELISA)을 이용한 유전자 재조합 히루딘의 정량. 藥學會誌. 1997 ; 41(1) : 74-80.
 23. 韓國遺傳工學研究組合 編. 거머리추출 血栓溶解劑 및 抗凝劑 遺傳工學. 1991 ; 36 : 84-6.
 24. 조홍근, 박시훈, 신길자, 백금련, 정광희, 강석민, 이상학. 가토 경동맥 외번모델에서 히루딘(Hirudin)의 항 혈소판 응집효과. 순환기. 1999 ; 29(10) : 1121-8.
 25. Saito M, Asakura H, Jokaji H, Uotani C, Kumabashiri I, Morishita E, Yamazaki M, Aoshima K, Matsuda T. Recombinant hirudin for the treatment of disseminated intravascular coagulation in patients with haematological malignancy. Blood Coagul Fibrinolysis. 1995 ; 6(1) : 60-4.
 26. 김수신. 거머리의 임상적 이용에 대한 고찰. 中韓醫學. 1985 ; 292 : 7-15.
 27. 玄柄煥, 林棧煥. 研究用發製品の 經濟性分析 研究 히루딘을 중심으로. 忠南大農業科學研究 1997 ; 24(1) : 55-62.
 28. Xi G, Keep RF, Hua Y, Xiang J, Hoff JT. Attenuation of thrombin-induced brain edema by cerebral thrombin preconditioning. Stroke. 1999 ; 30(6) : 1247-55.
 29. Masada T, Xi G, Hua Y, Keep RF. The effects of thrombin preconditioning on focal cerebral ischemia in rats. Brain Res. 2000 ; 867(1-2) : 173-9.
 30. 張笑平. 中醫急症救治. 湖南 : 湖南科學技術出版社. 1991 : 145-6.
 31. 李文鎬. 內科學(上). 서울 : 學林社. 1986 : 179-210.

32. 黃文東 實用中醫內科學. 上海：上海科學技術出版社. 1988：414.
33. 劉完素 河間三六書. 서울：成輔社. 1976：37-8.
34. 朱震亨 丹溪心法附與. 서울：大星文化社. 1982：67-8.
35. 李杲 東垣十種醫書. 서울：大星文化社. 1983：64-5.
36. 葉桂 臨證指南醫案. 上海：上海科學技術出版社. 1993：17-8.
37. 王清任 中國醫學大成(醫林改錯) 2. 上海：上海科學技術出版社. 1992：15-6.
38. Sinom RP, Swan JH, Griffith T. Blockade of NMDA receptors may protect against ischemic brain damage in the brain. *Science*. 1984；226：850-2.
39. Hickey RW, Akino M, Strausbaugh S, De Courtmn-Myers GM. Use of the Morris water maze and acoustic startle chamber to evaluate neurologic injury after asphyxial arrest in rats. *Pediatr. Res*. 1996；39(1)：77-84.
40. 지제근. 신경병리학. 서울：서울대학교출판부. 1990：61-3.