

원저

# 當歸藥鍼의 血海 刺入이 Intraluminal Filament 挿入術에 依해 誘發된 白鼠의 虛血性 腦損傷에 미치는 影響

한상균\* · 이병렬\*\*

\*동신대학교 한의과대학 침구학교실

\*\*대전대학교 한의과대학 침구학교실

## Abstract

Effects of Angelica gigas Nakai herbal  
acupuncture into Hyolhae(SP10) of brain  
ischemic injury induced by Intraluminal Filament  
insertion in the rats

Han Sang-gyun\*, Lee Byung-ryul\*\*

\*Department of Acupuncture & Moxibustion College of Oriental Medicine,  
Dong-Shin University

\*\*Department of Acupuncture & Moxibustion College of Oriental Medicine, Dae-Jeon  
University

**Objective** : The aim of this study was to investigate effects of Angelica gigas Nakai(AGN) on the ischemic injury by intraluminal filament insertion in the rats.

- 접수 : 2004년 3월 8일 · 수정 : 2004년 3월 22일 · 채택 : 2004년 3월 23일  
· 교신저자 : 한상균, 동신대학교목포한방병원(530-822, 전라남도 목포시 상동 834번지)  
Tel. 011-290-4006 E-mail : omdangel@dreamwiz.com

**Methods** : The ischemia was induced by intraluminal filament insertion into middle cerebral artery. AGN herbal acupuncture into SP10 was carried out during 3 weeks after ischemic injury. Eight-arm radial maze was designed for the behavioral task. AGN herbal acupuncture showed neuroprotective agents in cresyl violet, acetylcholinesterase(AchE), choline acetyltransferase(ChAT) and nerve growth factor(NGF)-stain. Then check the effect of regional cerebral blood flow(rCBF) according to AGN herbal acupuncture in rats.

**Results** : The errors in the eight-arm radial maze task were significantly decreased in normal group compared with control group on 1~6days, AGN2(0.02g/kg) herbal acupuncture group on 1~5days, AGN3(0.1g/kg) on 1~3days, AGN4(0.5g/kg) on 1, 3~6days. The rate of correct choice was significantly increased in AGN1(0.01g/kg) and AGN4 herbal acupuncture groups. The density of neurons in the hippocampal CA1 was the most increased in normal group and AGN1, AGN3, AGN4 herbal acupuncture groups compared with control group. The density of AchE in the hippocampal CA1 had a tendency to increase in all the groups when they were compared with control group, but not significant. The density of ChAT in the hippocampal CA1 was significantly increased in normal group and AGN1, AGN4 herbal acupuncture groups compared with control group. The density of NGF in the hippocampal CA1 was significantly increased AGN4 herbal acupuncture group compared with control group. The rCBF was significantly increased in AGN1, AGN3 and AGN4 herbal acupuncture groups without the change of blood pressure.

**Conclusions** : These results suggest that AGN herbal acupuncture can be used for controlling stroke in early stage as herbal medication.

**Key words** : Angelica gigas Nakai herbal acupuncture, Hyolhae(SP10), regional cerebral blood flow(rCBF)

## I. 緒 論

허혈성 뇌손상은 뇌졸중의 하나로 혈전 및 색전으로 뇌혈관이 막혀 발생하는 뇌의 이상상태를 말한다<sup>1)</sup>. 뇌혈관 폐색이 발생하면 비가역적인 중추신경계의 손상을 유발하는데, 신경세포의 손상은 허혈동안 뿐만 아니라 재관류가

이루어진 이후에도 일어나 환자들의 회복지연 및 후유증 발생의 원인이 되고 있으며, 신경손상의 많은 부분이 몇 시간에서부터 며칠에 이르기까지 점진적으로 진행 된다<sup>2)</sup>.

고혈압을 비롯한 고지혈증, 비만증, 당뇨병, 흡연 및 심장질환 등 뇌졸중 발생을 촉진하는 위험인자에 대한 적극적인 치료 및 예방을 통해 뇌졸중의 발생빈도가 줄어들고는 있으나, 아직도 흔한 사망원인이 되고 있고<sup>3-4)</sup>, 많은 후

유증으로 환자 본인뿐만 아니라 그 가족들에게 까지 정신적, 심리적, 경제적 고통을 야기하므로 빠른 치료와 예방이 중요한 질환이다.

뇌허혈로 인한 뇌세포 손상을 예방 또는 치료할 수 있을 것으로 알려진 것으로는 칼슘 통로 차단제, 뇌혈관 확장제, 뇌대사 억제제, free radical scavenger 등이 있으며<sup>5)</sup>, 한의학적으로 단일 약물<sup>6-8)</sup>, 복합 약물<sup>9-11)</sup> 등으로 실험적 연구가 진행되고 있지만 아직까지 뚜렷한 치료제가 없는 실정이다.

뇌허혈 치료에 있어 韓醫學的으로는 血虛의 관점으로 접근해 볼 수 있는바, 血虛를 치료하는 經穴 및 藥物 선택이 무엇보다 중요하다고 하겠다.

血海(Sp10)는 足太陰脾經의 경혈로 슬개골 내측 상방 2寸에 위치하고, 穴性은 調血和營, 清瀉血熱, 宣通下焦, 健脾利濕 등이며, 主治證은 血熱症, 血虛證, 血瘀證, 出血證 등이다<sup>12-13)</sup>.

當歸(*Angelica gigas Nakai*)는 繖形科에 속하는 다년생 초본의 뿌리로 性은 溫無毒, 味는 甘辛微苦하며 歸經은 心, 肝, 脾經의 三經이다. 養血潤燥, 活血舒筋하는 기능으로 一切 血證에 대한 主治를 가지고 있으며<sup>14)</sup>, 효능에 관한 실험적 연구는 鎮痛效果<sup>15)</sup>, 血液疾患<sup>16)</sup>, 肝疾患<sup>17)</sup>, 老化防止<sup>18)</sup>, 貧血<sup>19)</sup> 등이 보고되고 있다.

허혈성 뇌손상에 대한 실험 유형은 전뇌 허혈을 유발하는 방법으로 Pulsinelli WA 등<sup>20)</sup>의 양측 추골동맥 및 양측 경동맥 결찰법, Smith ML 등<sup>21)</sup>의 양측 경동맥 결찰 및 저혈압 유도법, Ogata J 등<sup>22)</sup>의 선천성 고혈압 백서에서의 양측 경동맥 결찰법 등이 있고, 국소 뇌허혈을 유발하는 방법으로 Zea Longa 등<sup>23)</sup>의 중대뇌동맥 결찰법이 있다. 실험적으로 뇌허혈을 야기하는 방법 중 백서를 이용한 중대뇌동맥의 폐쇄는 비교적 시술이 용이하고, 두개골 절개

도 필요 없을 뿐만 아니라 손상 범위가 넓지 않고, 前腦에만 국한하여 後腦에서의 혈류가 영향을 받지 않아 호흡과 체순환에 영향을 주지 않음으로써 뇌허혈 중 백서의 사망을 최소화 할 수 있어 널리 사용되고 있다<sup>24)</sup>.

이에 著者는 血海 當歸藥鍼이 중대뇌동맥 결찰법으로 虛血性 腦損傷이 유발된 白鼠에 미치는 영향을 알아보고자, 방사형 미로와 조직 화학적기법을 이용하여 행동 및 신경세포의 보호 작용에 미치는 효과를 관찰한 바 다음과 같은 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 실험동물

실험동물은 삼육동물센터로 부터 구입한 260~300g, 8주령의 수컷 SD계 백서로, 일주일 정도 실험실 환경(온도는 22±3℃, 습도는 50±10%)에 적응시킨 후 사용하였다. 각 cage당 3~4마리씩 넣어 두었으며, 물과 사료(고형 사료, 삼양유지)를 자유로이 섭취하도록 하였다.

### 2. 실험군의 구성 및 절차

실험군의 분리는 백서를 정상(Normal)군, Ischemia유발(Control)군, Ischemia유발 후 당귀1(0.01g/kg)약침 시술군(AGN1), 당귀2(0.02g/kg)약침 시술군(AGN2), 당귀3(0.1g/kg)약침 시술군(AGN3), 당귀4(0.5g/kg)약침 시술군(AGN4)으로 나누었다.

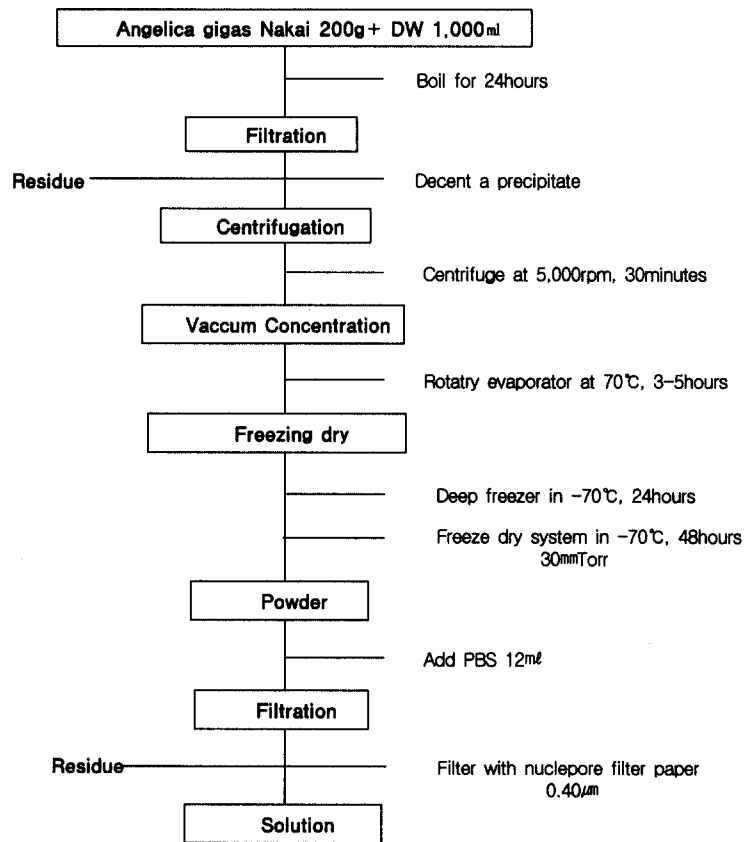
Ischemia 유발 3시간 후부터 각 군은 1회/1일(오전 10시) 치료를 시작하여, 21일간 약침을

시술한 다음 22일부터 27일까지 誤行路 선택수를 측정하고 28일에 正行路 선택율을 측정하여 행동검사를 행한 다음 백서를 관류고정하여 조직검사를 하였다.

뇌혈류량과 혈압변동의 측정의 경우 약침시술은 백서를 30동안 안정시킨 후 시행되었는데, 각 당귀 약침을 농도별(0.01~0.5g/kg)로 시술한 다음 변동되는 뇌혈류량(regional cerebral blood flow, rCBF)을 30분 간격으로 120분 동안 관찰하였다.

### 3. 약침 제조

본 실험에 사용된 약재인 당귀(*Angelica gigas Nakai*)는 동신대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 엄선하여 사용하였다. 雜質을 제거한 당귀의 根莖 200g을 증류수 1,000ml과 함께 24시간 동안 증류수를 계속 보충해가며 끓인 다음 여과지로 여과한 후, 고속원심분리기(Centricon T-42K, Italy)로 5,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 rotary vaccum evaporator(Buchi, Netherlands)



Scheme 1. Procedure for manufacturing herbal-acupuncture of *Angelica gigas Nakai*, extracted solution by Freezing dry method

로 수분을 증발시켜 100ml로 감압 농축하였으며, 농축된 檢液을 동결건조기(삼원, 한국)로 -70℃에서 동결 건조시켜 최종적으로 29g의 시료를 얻었다. 최종적으로 얻어진 시료는 약침 시술을 위하여 각 농도별로 PBS에 희석하여 사용하였다(Scheme 1).

#### 4. 약침 시술

약침은 양측 혈해 부위에 시술하였다. 혈해는 인체와 상응한 곳에 취하였는데, 즉 하지의 슬개골 위쪽 대퇴골 내측을 기준으로 하여 인체에 상응하는 점을 혈해로 취하였다. 동결건조 후 얻어진 당귀 분말을 균별로 나누어 0.01g(0.0125g/ml), 0.02g(0.025g/ml), 0.1g(0.125g/ml), 0.5g(0.625g/ml)을 0.8ml의 PBS에 희석하여 각각 0.1ml씩 혈해 부위 皮下 筋層에 주사기 28gauge(Samwoo, Korea)를 사용하여 시술하였다.

#### 5. 허혈성 뇌손상 유발

뇌허혈은 Zea Longa<sup>28)</sup> 등의 방법에 따라 중대뇌동맥을 폐색시켜 만들었다. 백서를 70% N<sub>2</sub>와 30% O<sub>2</sub>가 혼합된 5% isoflurane을 이용하여 흡입마취 유도를 한 후 2% isoflurane으로 계속 유지시켰다.

백서의 직장에 체온측정 probe를 삽입하고 가온등과 가온 매트리스를 이용하여 실험기간 동안 체온을 38℃로 유지하였다. 중대뇌동맥을 폐색하기 위하여 경부 정중선을 따라 피부를 절개하고 흉골혀근과 흉골저작근 사이에 총경동맥을 노출한 후 내경동맥내로 치과 인상제(Durelon, Germany)가 발라진 intraluminal filament(직경 0.28mm, rounded tip)를 삽입하여 그 끝이 중대뇌동맥까지 도달하도록 하였다.

총경동맥과 외경동맥은 결찰하여 혈류차단 2시간이 지난 후, 중대뇌동맥에 위치한 intraluminal filament를 제거하고, 우측 총경동맥을 결찰하여 측부 순환을 통하여 재관류를 시켰다.

#### 6. Eight-arm radial maze task

목재로 제작된 8개의 통로가 중앙의 출발 영역(central platform)을 중심으로 매 45도 각도(방사형)로 뻗어 나온 형태의 장치를 이용하였다(Fig. 1). 중앙 출발 영역은 직경 50cm인 원에 내접하는 정팔각형 상자로 높이는 25cm였다.

走路는 출발 상자의 각 면에 뚫린 10×25cm 크기의 통로와 연결되어 있으며, 길이는 70cm 이고 동물이 바깥으로 나가지 못하게 하였다. 주로의 끝에는 보상으로 제공하는 먹이나 물을 담을 수 있는 7×5×3cm 크기의 음식 접시를 설치하였다. 백서가 주로를 출입하는 행동을 비디오카메라로 녹화하여 백서가 각 주로를 방문한 횟수와 오류 여부를 계산하였다. 실험에 들어가기 전 36시간 동안 사육 상자에서 먹이를 박탈하고 배고픔을 유발시킨 백서를 행동 관찰실로 옮겨와 30분간 환경에 적응시켰다.

획득시행동안의 오행로 선택수는 백서를 미로의 출발 상자에 넣고 1분간 두어 상황에 적응시킨 후 1분이 지나면 각 주로로 통하는 통로를 개방하여 백서가 자유롭게 미로 속을 돌아다니게 하였다. 백서가 주로를 방문하여 끝까지 달리면 보상 용기에서 먹이를 먹게 하였다. 그러나 동일한 주로를 반복해서 방문하면 두 번째 방문부터는 먹이를 제공하지 않고 반응은 오류로 기록하였다. 백서가 300초 동안에 8개의 주로를 모두 방문하지 못하면 시행을 중

지시키고, 그 시행은 실패로 간주하여 오행로를 선택하는 기간을 기록하였다.

검사시행동안의 정행로 선택율은 백서가 5일 동안의 획득시행에서 학습 준거에 도달하는 경우 6일째에 기억을 관찰하는 검사를 시행하여, 4분 동안에 8개의 주로중 2개의 주로를 택해 들어가면 출발 상자에 다시 넣어 30초 동안 머무르게 한 후 나머지 6개의 주로중 바르게 선택된 수를 관찰하였다. 같은 주로를 다시 택하거나, 240초 이상 경과되면 시행을 중지시켰다.

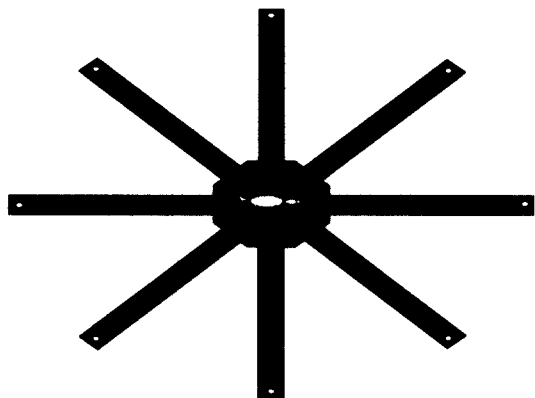


Fig. 1. Apparatus of eight-arm radial maze. Number of errors: The task was started on the 4th week after ischemic treatment, and performed four trials per day for 5days. Rate of Correct choice: The task was started on the 6day after acquisition test

## 7. 뇌혈류량 측정

백서를 stereotactic frame(DKI, U.S.A.)에 고정시키고 정중선을 따라 두피를 절개하여 두정골을 노출시킨 후 bregma의 4~6mm 측방, 1~2mm 후방에 직경 5~6mm의 두개창 수술을

시행하였다. 이때 두개골의 두께를 최대한 얇게 남겨 경막외출혈을 방지하도록 하였다. Laser doppler flowmetry(LDF, Transonic Instrument, U.S.A.)용 needle probe(직경 0.8mm)를 대뇌(두정엽)피질 표면에 수직이 되도록 stereotactic micromanipulator를 사용하여 뇌연막동맥에 조심스럽게 근접시켰다.

## 8. 혈압 측정

백서를 urethane(750mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후 체온을 37~38°C로 유지할 수 있도록 heat pad 위에 양와위로 고정시켰다. 당귀 약침을 농도별(0.01~0.5g/kg)로 시술하였을 때의 혈압(blood pressure, BP)변동은 동물의 대퇴동맥에 삽입된 polyethylene tube에 연결된 pressure transducer(Grass, U.S.A.)를 통하여 MacLab과 Macintosh computer로 구성된 data acquisition system으로 120분 동안 관찰하였다.

## 9. Immunohistochemistry

### 1) Cresyl violet 염색

모든 행동 실험이 끝난 직후 백서를 pentobarbital sodium (100mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후, 0.9% saline 200ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액(fixative) 800ml로 심장을 통해 관류하였다. 처음 고정액 200ml는 2분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 800ml는 25분간에 걸쳐 천천히 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 경과 후 고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4°C에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌조직중 hippocampus 부위를 30 $\mu$ m의 두께로 잘랐다. PBS로 조직을 몇 차례 씻고 xylene

(5min), 100% alcohol(2min), 95% alcohol(1min), 70% alcohol(1min), D.W.(2min)순으로 옮겨 담아 탈지, 탈수를 시킨 다음 cresyl violet buffer (5min)로 염색을 하였다. 염색이 끝난 조직은 광학현미경을 사용하여 고배율( $\times 200$ )에서 신경세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다.

## 2) Acetylcholinesterase(AchE) 염색

뇌 조직을 PBS에 3회 정도 세척한 후 0.1M sodium hydrogen phosphate buffer( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , pH6.0) 325ml에 acetyl -choline iodide 250mg을 녹인 용액에 0.1M sodium citrate 25ml, 30mM copper sulfate 50ml, 5mM potassium ferricyanide 50ml, 증류수 50ml을 넣어 혼합한 다음 수 초간 기다리면 옅은 녹색을 나타내는데, 이때 뇌 조직을 넣고 실온에서 1~2시간 동안 배양하였다. 모든 처리를 거친 뇌 조직을 광학현미경으로 관찰하였다.  $200 \times 200 \mu\text{m}$  크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 200배로 확대하여 hippocampus에서 AchE 신경세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다.

## 3) Choline acetyltransferase(ChAT) 및 Nerve Growth Factor(NGF) 염색

뇌 조직을 PBS에 3회 정도 세척한 후 ChAT 유전자 발현 연구에 가장 널리 사용되고 있는 primary sheep polyclonal ChAT anti - body (1:1,500, Monoclonal, Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE, U.S.A.)와 anti-NGF(1:500, polyclonal, Snata Cruz Bilotechnology Inc., California, U.S.A. )를 사용하였다. 1차 항체는 PBS에 0.3% Triton X-100을 첨가한

PBST에서 2% 토끼 혈청과 0.1% sodium acid (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)로 2,000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에  $4^\circ\text{C}$ 에서 72시간 동안 지속적으로 흔들어 주면서 배양하였다. 그 후 3번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음 2시간 동안 실온에서 2% 토끼 혈청을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated anti-sheep serum(Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.)에 반응시켰다. PBST로 3번 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent(Vector)에 위치시켰다. PBS로 몇 번 행군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzidine (DAB)을 사용하여 발현시켰다. 통제군 조직에는 1차 항체를 생략하거나 nonimmuno sheep serum으로 대체하였는데, 이들 두 경우 다 특정 표지가 나타나지 않았다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 광학현미경으로 200배로 확대하여 hippocampus에서 ChAT-immunoreactive 및 NGF-immunoreactive 신경 세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다.

## 10. 통계처리

모든 측정값은 평균값 표준오차(mean $\pm$ SE)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Window용 SPSS를 이용하였다. 각 집단간 행동 측정치중 오행로 선택수의 비교는 repeated ANOVA test를 시행 하였고, 정행로 선택율, 뇌혈류, 혈압 및 면역조직 화학분석법의 측정값 은 비모수적 방법으로 Mann-Whitney U test를 시행하였다<sup>25)</sup>. 전체 실험의

통계적인 유의성은 신뢰구간  $P < 0.05$ 에서 의미를 부여하였다.

### III. 成 績

#### 1. 방사형 미로 학습에서 오행로 선택수

오행로 선택수는 제 1일째 정상군은  $4.4 \pm 0.18$ 회, 대조군은  $6.4 \pm 0.14$ 초, AGN1군은  $4.9 \pm$

$0.52$ 회, AGN2군은  $4.0 \pm 0.33$ 회, AGN3군은  $4.3 \pm 0.71$ 회, AGN4군은  $4.2 \pm 0.15$ 회를 나타내어 대조군에 비해 정상군, AGN2군, AGN3군, AGN4군에서 유의하게 감소하였다.

학습이 진행됨에 따라 대조군에 비해 정상군은 2일~6일째 유의하게 감소하였고 ( $P < 0.01$ ), AGN2군은 2, 3일째 ( $P < 0.01$ ), 4, 5일째 ( $P < 0.05$ )에 유의하게 감소하였으며, AGN3군은 2일째 ( $P < 0.01$ ), 3일째 ( $P < 0.05$ ), AGN4군은 3일~6일째까지 유의하게 감소되었다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2).

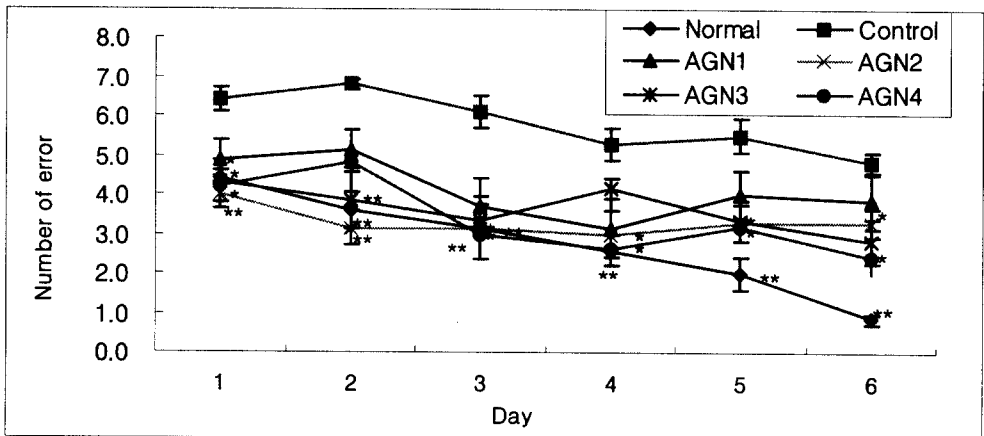


Fig. 2. Acquisition curves of the eight-arm radial maze task in brain injury. The task was started on the 4th week after brain injury, and performed four trials per day for 6 days. Repeated Measures of one-way ANOVA (Tukey test) of in the errors revealed among the groups [ $F(5,36) = 14.978$ ,  $P < 0.001$ ]. Results are shown as means  $\pm$  S.E. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$  as compared with the corresponding data of control group

#### 2. 방사형 미로 학습에서 정행로 선택률

정행로 선택률은 정상군은  $54.8 \pm 10.74\%$ , 대조군은  $33.3 \pm 9.76\%$ , AGN1군은  $61.1 \pm 5.14\%$ ,

AGN2군은  $56.7 \pm 9.55\%$ , AGN3군은  $47.2 \pm 4.74\%$ , AGN4군은  $76.7 \pm 5.63\%$ 로, 대조군에 비해 AGN1군 ( $P < 0.05$ ), AGN4군 ( $P < 0.01$ ) 등이 유의하게 증가하였다 (Fig. 3).



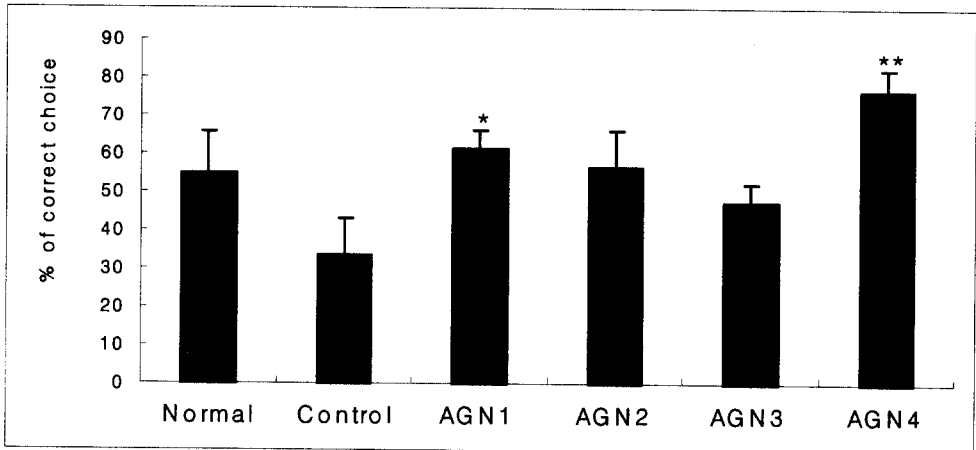


Fig. 3. Retention histogram of the eight-arm radial maze task in brain injury. The task was started on the 6day after acquisition test, and performed four trials. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as means  $\pm$  S.E. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$  as compared with the corresponding data of control group

### 3. 뇌혈류량 변화

혈해에 대한 농도별 당귀약침이 뇌혈류 변화에 미치는 영향을 보기 위해 0분, 30분, 60분, 120분 간격으로 관찰한 결과, AGN1군에서는 약침 시술전 100%에 비하여 109.8 $\pm$ 8.14%, 117.3 $\pm$ 6.80%, 116.3 $\pm$ 16.43%, 103.2  $\pm$ 15.25%를 각각 나타내었고, AGN2군에서는 약침 시술전 100%에 비하여 102.5 $\pm$ 4.51%, 110.4 $\pm$ 8.33%, 107.9 $\pm$ 13.23%, 109.3 $\pm$ 6.45%를 각각 나타내었고, AGN3군에서는 약침 시술전 100%에 비하여

109.6 $\pm$ 1.67%, 119.6 $\pm$ 5.95%, 112.0 $\pm$ 6.71%, 111.2 $\pm$ 7.83%를 각각 나타내었으며, AGN4군에서는 약침 시술전 100%에 비하여 110.9 $\pm$ 4.51%, 107.4 $\pm$ 5.73%, 113.0 $\pm$ 3.42%, 117.1 $\pm$ 5.50%를 각각 나타내었다.

뇌혈류량은 AGN1군에서는 60분( $P < 0.05$ ), AGN3군에서는 30분( $P < 0.01$ ), 60분( $P < 0.05$ ), AGN4군에서는 30분( $P < 0.05$ ), 90분( $P < 0.01$ ), 120분( $P < 0.05$ )에서 유의하게 증가하였다 (Fig. 4).

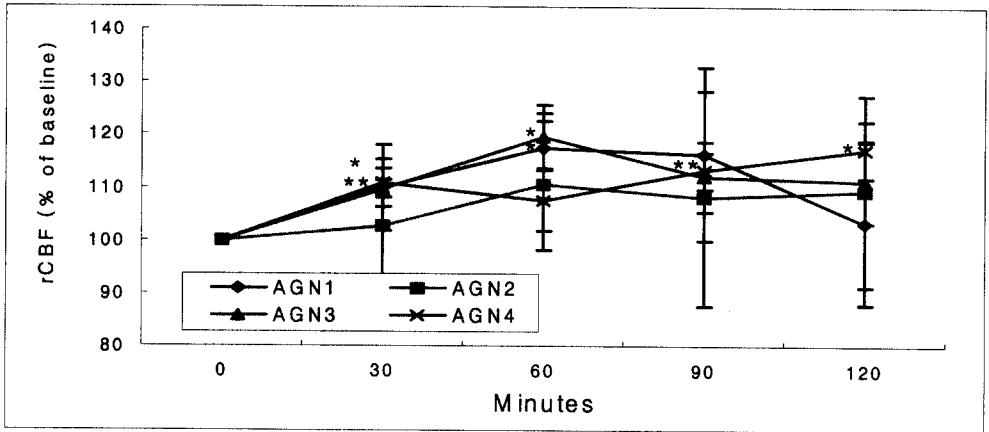


Fig. 4. Effect of administration according to AGN herbal acupuncture on rCBF in rats. The rCBF of Y-axis are an comparison values about before herbal acupuncture 100%. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. \*, Statistically different compared with before acupuncture(P<0.05). \*\*, Statistically different compared with before acupuncture(P<0.01)

#### 4. 혈압 변화

혈해에 대한 농도별 당귀약침이 혈압 변화에 미치는 영향을 보기 위하여 0분, 30분, 60분, 120분 간격으로 관찰한 결과, AGN1군에서는 약침 시술전 100%에 비하여 96.0± 2.13%, 97.75±4.47%, 95.8±4.36%, 97.7± 2.33%를 각각 나타내었고, AGN2군에서는 약침 시술전 100%에 비하여 96.9±2.85%, 96.1± 3.57%, 102.1± 1.64%, 110.5± 3.18%를 각각 나타내었고,

AGN3군에서는 약침 시술전 100%에 비하여 98.2±2.35%, 98.7± 2.64%, 102.4± 2.67%, 105.0± 2.90%를 각각 나타내었으며, AGN4군에서는 약침 시술전 100%에 비하여 93.2±2.69%, 96.1± 6.96%, 99.9± 3.51%, 101.7±4.24%를 나타내었다.

즉, AGN2군에서는 증가 경향을 보여 120분(P<0.05)에서 유의하게 증가하였으며, AGN1군에서는 감소경향을, AGN3군과 AGN4군에서는 약간의 증가 경향을 보였으나 유의하진 않았다(Fig. 5).

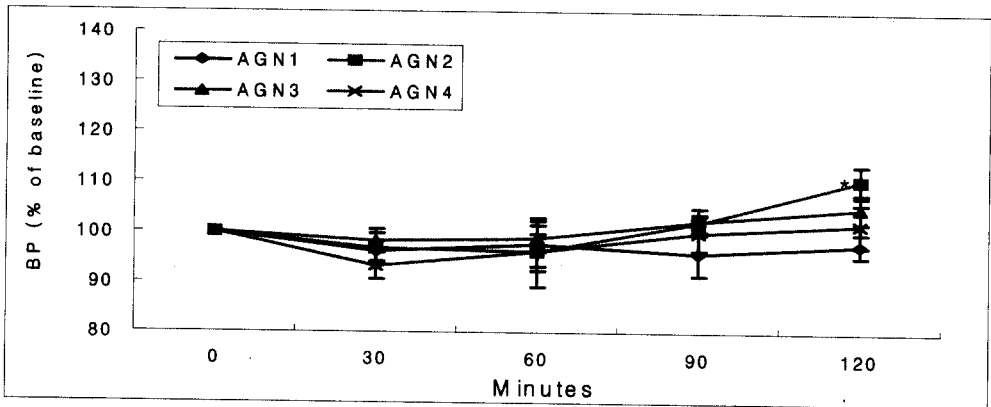


Fig. 5. Effect of administration according to AGN herbal acupuncture on BP in rats. The BP of Y-axis are an comparison values about before herbal acupuncture 100%. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. \*, Statistically different compared with before acupuncture( $P < 0.05$ )

5. Cresyl violet을 이용한 신경세포 손상 방어효과

각 군에서 hippocampal CA1 부위를 cresyl violet에 염색하여 신경세포의 손상방어 효과를 관찰한 결과 정상군은  $97.3 \pm 1.57$ , 대조군은  $47.8 \pm$

$2.9$ , AGN1군은  $89.25 \pm 1.02$ , AGN2군은  $58.5 \pm 7.42$ , AGN3군은  $94.0 \pm 4.20$ , AGN4군은  $68.8 \pm 3.10$  을 보였으며, 대조군에 비해 정상군, AGN1군, AGN3군, AGN4군 등이 유의하게 증가하였다 ( $P < 0.01$ )(Fig. 6).

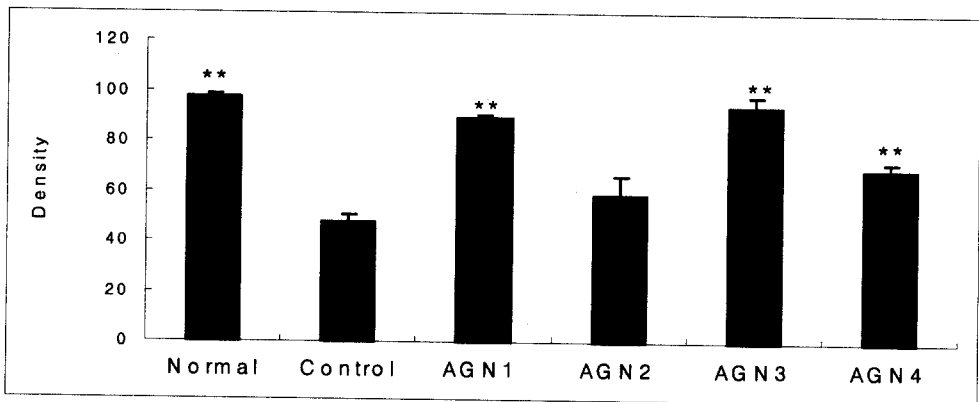


Fig. 6. The values of density of Cresyl violet-stained sections in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as mean±S.E \*\*,  $P < 0.01$ , as compared with the corresponding data of control group

6. AchE 발현에 미치는 영향

각 군에서 hippocampal CA1 부위의 AchE 발현 정도를 관찰한 결과 정상군은 16.0±2.71, 대조군은 11.8±1.26, AGN1군은 12.8 ±1.54,

AGN2군은 12.8±1.17, AGN3군은 12.8±2.01, AGN4군은 15.3±1.07를 보였으며, 대조군에 비해 모든 군들이 증가하는 경향을 보였으나 유의하지 않았다(Fig. 7).

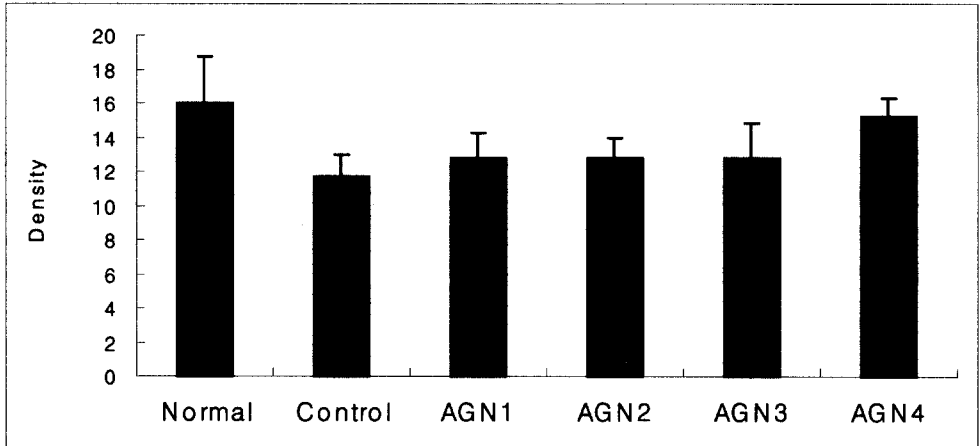


Fig. 7. The values of density of acetylcholinesterase(AchE) stained nuclei in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by

7. ChAT 발현에 미치는 영향

각 군에서 hippocampal CA1 부위의 ChAT 발현정도를 관찰한 결과 정상군은 28.8±3.15, 대조군은 17.8±1.58, AGN1군은 23.0±0.33,

AGN2군은 18.8±2.47, AGN3군은 25.4±3.68, AGN4군은 23.4±1.31을 보였으며, 대조군에 비해 정상군, AGN1군, AGN4군 등이 유의하게 증가하였다(P<0.05)(Fig. 8).

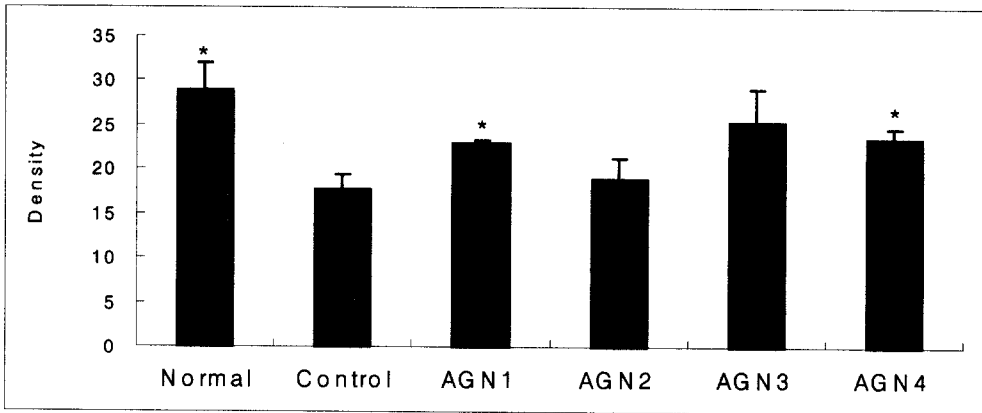


Fig. 8. The values of density of Choline acetyltransferase(ChAT) stained nuclei in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as mean±S.E. \*, P<0.05, as compared with the corresponding data of control group

#### 8. NGF 발현에 미치는 영향

각 군에서 hippocampal CA1 부위의 NGF 발현 정도를 관찰한 결과 정상군은 19.5±0.71, 대조군은 17.0±1.56, AGN1군은 14.6 ±0.22,

AGN2군은 20.0±0.50, AGN3군은 18.0±1.41, AGN4군은 24.8±2.15를 보였으며, 대조군에 비해 AGN4군만이 유의하게 증가하였다(P<0.05) (Fig. 9).

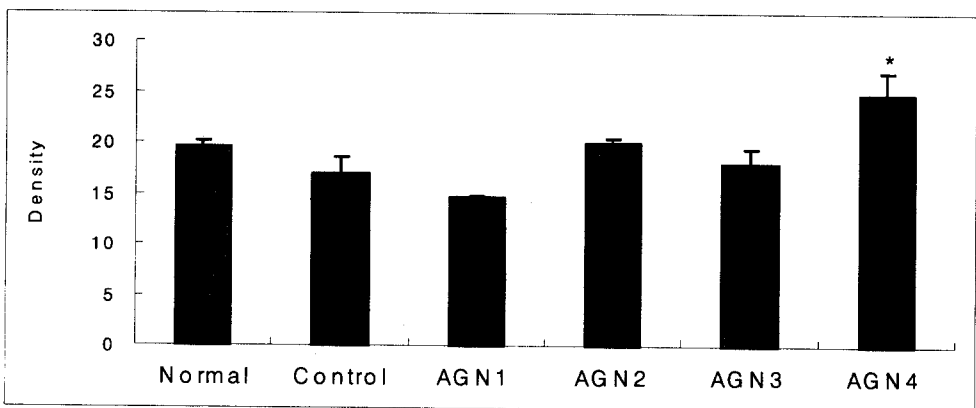


Fig. 9. The values of density of Nerve growth factor(NGF) stained nuclei in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as mean±S.E. \*, P<0.05, as compared with the corresponding data of control group

## IV. 考 察

허혈성 뇌손상을 포함한 뇌졸중은 2002년 통계청의 한국인 사망원인 통계 결과 사망률이 인구 10만명당 77.2명으로 암에 이어 두 번째였으며, 미국의 경우 뇌졸중의 80~85%가 허혈성이었고<sup>1)</sup>, 한국의 경우 사망률에 있어 뇌출혈, 뇌경색의 순서를 보이고 있다<sup>2)</sup>. 뇌혈관 폐색이 발생하면 비가역적인 중추신경계의 손상을 유발하여 뇌졸중 환자 73%에서 심각한 장애를 남기게 되는데, 신경세포의 손상은 허혈동안 뿐만 아니라 재관류가 이루어진 이후에도 일어나 환자들의 회복 지연 및 후유증 발생의 원인이 되고 있다. 신경손상의 많은 부분이 몇 시간에서부터 며칠에 이르기까지 점진적으로 진행되는데<sup>2)</sup>, 허혈로 인한 신경세포 손상을 차단하는 연구가 활발히 진행되고 있는 것은 뇌졸중 예방 및 치료에 있어 새로운 치료제 개발 가능성을 제시하고 있다.

經絡理論과 臟象論을 바탕으로 한 刺鍼療法은 氣血의 運行을 調整시키는 調氣作用과 調氣의 效果를 높이고 經絡의 氣血의 運行을 強化시키는 治神 作用을 통하여 인체의 氣血循環을 調整하기 위한 것<sup>27)</sup>으로, 藥鍼療法은 이러한 刺鍼療法의 원리에 약물의 효능을 가미하여 치료 효과를 증대시키고자 한 방법이다. 본 연구에서 사용된 뇌허혈 모델은 氣血이 不通하여 발생한 것으로, 윤<sup>8)</sup>은 竹瀝藥鍼을 사용해 通氣의 개념으로 고찰하였지만 본 실험에서는 補血, 調血에 중점을 두고 뇌세포에 대한 허혈상태를 개선하고자 血病을 다스리는 穴과 藥鍼療法을 사용하게 되었다.

血海(Sp10)는 ‘血’과 ‘海’가 조립되어 ‘血液이

모이는 곳’이란 뜻으로 주로 血病을 다스리다는 의미이고, 異名은 血郗, 白蟲窠이며 足太陰脾經의 經絡로 슬개골내측 상방 2寸에 위치한다. 穴性은 調血和營, 清瀉血熱, 宣通下焦, 健脾利濕 등이며, 主治는 子宮內膜炎, 帶下, 蕁麻疹, 皮膚瘙癢症, 丹毒 등의 血熱症, 貧血, 經閉, 血虛頭痛, 痺證 등의 血虛證, 月經困難, 月經痛 등의 血瘀證, 機能性子宮出血, 崩漏不止, 尿血, 痔出血 등의 出血證이다<sup>12-13)</sup>.

當歸(*Angelica gigas Nakai*)는 養血潤燥, 活血舒筋하는 기능을 가지며 一切의 血證에 대한 주치를 가지는데<sup>14)</sup>, 當歸藥鍼의 실험적 연구는 朴<sup>15)</sup>의 當歸藥鍼이 鎮痛效果에 미치는 影響, 黃<sup>16)</sup>의 當歸藥鍼이 免疫機能低下에 미치는 影響, 金<sup>17)</sup>은 急性 中毒性 肝炎에 대하여 當歸의 肝臟保護作用, 安<sup>18)</sup>은 當歸藥鍼液의 抗酸化效能, 李<sup>19)</sup>는 失血性 貧血에 對한 恢復效果 등을 보고하였다.

뇌혈관내 병변이 발생했을 때 중추신경계의 손상을 최소화할 수 있고, 회복시킬 수 있는 방법이 있다고 하면 그것은 가장 효과적인 뇌졸중 치료법이 될 것이다. 뇌허혈 상태는 한의 학적으로 瘀血, 虛血의 개념으로 접근할 수 있는데, 이에 저자는 혈해 당귀약침이 허혈성 뇌빈혈 상태를 개선시킬 수 있을 것으로 기대되어 백서에 유발된 뇌허혈 모델을 통한 신경방어효과와 혈류개선을 관찰하고자 본 실험을 실행하게 되었다.

뇌허혈을 유발하는 모델로는 전뇌 허혈을 유발하는 방법<sup>20-22)</sup>과 국소 뇌허혈을 유발하는 방법<sup>23)</sup>이 있는데, 본 실험에서는 국소 뇌허혈을 유발하는 방법을 사용하였다.

본 실험처럼 백서의 뇌에 공급되는 중대뇌동맥을 차단한 후 주위 혈관을 통해 재관류하게 되면 5~7일 경과 후 apoptosis와 비슷한

세포 손상과 인지 및 학습장애를 일으키게 되는데<sup>28)</sup>, 신경세포의 손상은 다른 부위에 비해 hippocampus의 CA1 pyramidal neuron들에서 선택적으로 발생 하게 되기 때문이다<sup>29)</sup>.

그 기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀지지 않았으나, 허혈 후 주어진 자극에 대한 예민성 증가로 인한 신경세포의 과활동, 칼슘을 매개로 하는 글루탐산 흥분독성, 미토콘드리아 손상과 단백질 합성의 장애, 유리산소기에 의한 손상, 에너지 대사와 뇌의 혈액순환 이상 등이 관여할 것으로 여겨지고 있다<sup>30)</sup>. Hippocampus는 medial septal nucleus에 위치한 세포체로부터 투사되는 choline성 신경전달경로로써<sup>31)</sup> 학습수행 및 기억력에 관여하는데, hippocampus의 손상은 방사형 미로와 같은 공간 기억과제를 학습하는 능력에 장애를 보이게 된다<sup>32)</sup>. 본 실험에서도 아무런 처치를 하지 않은 대조군의 경우 학습장애와 신경방어 작용이 현저히 낮아진 것으로 관찰되었다.

방사형 미로는 뇌에서 정보가 처리되고 있는 동안 그것을 유지하도록 하는 학습능력과 기억력을 알아보기 위한 장치로, 학습을 기억하는 시간범위, 기억의 저장작용을 매개하는 뇌 조직 및 약물이 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향<sup>33)</sup> 등에 주로 사용된다.

본 실험은 미로수행에 관여하여 공간 위치에 대한 단기기억을 중계하는 hippocampus에 대한 신경손상 방어 효과를 관찰해 보고자 하였다.

그 결과 오행로 선택수를 측정하는 획득시행에서 제 1일째는 유의성 없게 나타났으나, 학습이 진행됨에 따라 대조군에 비해 정상군은 2~6일째 유의성 있는 감소가 있었으며, AGN2군은 2~5일째에서, AGN3군은 2, 3일째에서, AGN4군에서는 3~6일째까지 유의성 있는 감

소가 있었고, 정행로 선택율을 측정하는 검사시행에서는 AGN1, AGN4에서 유의성 있는 증가가 있었다(Fig. 2, 3).

이와 같은 결과로 뇌허혈성 모델에서 당귀약침 시술이 학습장애 및 기억력 회복 효과를 나타냄을 알 수 있었는데 특히 정상군보다 성적이 뛰어난 흥미로운 일이며, 특히 AGN4군에서는 오행로 선택수, 정행로 선택율에서 모두 유의성 있는 변화가 있어 다른 군에 비해 우수함을 알 수 있었다. 실험이 진행되는 동안 백서의 오행로 선택수가 감소하는 것과 정행로 선택율이 증가하는 상관성이 있음을 알 수 있었는데, 윤<sup>8)</sup>의 죽력약침 보고에도 학습장애 및 기억력 회복효과가 있으면서 오행로 선택수 감소와 정행로 선택을 증가는 일정한 상관성을 보이고 있다.

뇌혈류는 자동조절(auto-regulation)기능에 의하여 비교적 일정하게 유지되는데, 즉 혈압이 상승하면 뇌동맥은 수축하고 혈압이 하강하면 동맥은 확장되면서 뇌혈류를 일정하게 유지한다<sup>34)</sup>.

뇌혈류량의 변화는 AGN1군에서는 60분, AGN3군에서는 30분, 60분, AGN4군의 경우는 30분, 90분, 120분에서 유의한 증가를 보였으며, 혈압의 변화는 AGN2군에서 증가경향을 보여 120분에서 유의성 있는 증가가 있었으나, AGN1군에서 감소경향을, AGN3군, AGN4군의 경우 약간 증가하는 경향이 있었으나 유의성은 없었다(Fig. 4, 5).

혈관이 막히게 되면 혈류량을 일정하게 유지하기 위하여 혈압이 상승하는 결과를 보이게 되는데, 본 실험의 결과는 뇌에 공급되는 혈류량은 AGN1군, AGN3군, AGN4군에서 유의성 있는 증가를 보였지만, 혈압이 정상 범주를 크게 벗어나지 않은 것은 바람직한 결과라고 하

졌다. 따라서 당귀약침의 경우 기준시점보다 혈압이 낮아지거나 높아지는 경향은 있었으나 시간이 흐를수록 안정을 찾아가는 결과를 보임으로써, 혈압이 증가함으로써 나타나는 뇌출혈과 같은 부작용은 나타나지 않을 것으로 생각할 수 있다.

방사형 미로에서 나타난 효과를 조직학적으로 평가하기 위해 hippocampus CA1 부위의 cresyl violet 염색과 AchE, ChAT의 발현 정도를 관찰한 결과, 신경세포의 손상 정도를 관찰하는 cresyl violet 염색에서는 대조군에 비해서 정상군, AGN1군, AGN3군, AGN4군에서 유의성 있는 증가를 보였는데(Fig. 6), 이는 혈해 당귀약침이 뇌허혈로 유발된 hippocampus 신경세포의 손실을 방어하였음을 보여주고 있으며, 윤<sup>8)</sup>의 죽력약침에서도 비슷한 결과를 나타내고 있다.

Cholinergic system은 신경전달물질인 acetylcholine(Ach), Ach의 합성효소인 ChAT, Ach을 분해하는 분해효소인 AchE 및 Ach 전달물질의 수용체가 포함된다. 그 중 cholinergic synapse에 존재하는 AchE는 신경전달 물질인 Ach을 choline과 acetic acid로 가수분해 시키는데<sup>36)</sup>, post-synaptic membrane 수용체의 정상적인 기능을 유지시키고, Ach의 생합성에 필요한 choline을 공급함으로써, 신경계가 원활하게 작용하는데 매우 중요한 역할을 하게 된다. 특히 hippocampus는 기억장애에 관계되는 구심성 및 원심성 신경섬유가 가장 많이 연결되는 부위이다. hippocampus와 신피질로 투사하는 기저전 choline계 신경단위의 상실 즉, medial septum, diagonal band, nucleus basalis of Meynert에 있는 choline계 신경단위의 상실로 인해 투사 부위인 대뇌피질 및 hippocampus 부위에서 pre-synaptic choline계 지표가 극도

로 감소하게 되며<sup>36)</sup>, 이와 같이 hippocampus에서의 cholinergic receptors의 밀도 변화는 헌팅톤무도병, 알츠하이머병과 같은 질환처럼 기억력 및 여러 학습능력 저하와 집중력의 이상을 유발하게 된다<sup>37)</sup>.

본 실험에서는 hippocampal CA1 부위의 AchE 발현 정도가 대조군에 비해 다른 모든 군에서 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었고, 다만 정상군과 AGN4군에서는 통계적 유의성 기준점에 거의 근접함을 알 수 있었다(Fig. 7).

AchE의 발현 증가는 Ach의 증가를 의미하며 학습장애 및 기억력 회복 효과의 증가를 의미하는데, 본 실험에서 학습장애 및 기억력 회복 효과가 개선되었음에도 AchE의 발현 정도는 유의성을 나타내지 못한 것은 다소 의외라고 할 수 있다. 다만 AchE의 밀도가 증가하고 있음을 고려할 때 실험 개체가 증가된다면 유의성이 증명될 것으로 사료된다. 윤<sup>8)</sup>의 죽력약침의 경우 AchE의 발현은 실험군에서 유의성이 나타나고 있다.

본 실험에서 hippocampal CA1 부위의 ChAT 발현 정도를 살펴본 결과는 정상군과 AGN1군, AGN4군에서 유의성 있는 증가가 있었다(Fig. 8).

AchE와 ChAT 발현 정도가 증가하는 것은 기억력 및 학습능력 저하가 회복되고 있음을 의미하는데, 본 실험에서 AchE와 ChAT 발현 정도가 증가한 것은 혈해 당귀약침이 기억력 및 학습능력 저하가 회복되었음을 증명하고 있다. 윤<sup>8)</sup>의 죽력약침의 경우도 동일한 실험 결과를 나타내고 있다.

Nerve growth factor(NGF)는 1950년대 Levi-Montalcini가 mouse sarcoma에서 분리한 27kD의 단백질로 교감성 말초신경 세포와 감



각신경 세포에서 신경영양물질로서 작용 한다<sup>38)</sup>. NGF는 신경계에서 광범위하게 분포되어 있으며, 특히 NGF receptor에 대한 면역조직화학 연구에 의하면 NGF가 MS, DBB, NBM등에 많이 존재하며 choline성 신경세포와 공존함<sup>39)</sup>이 밝혀졌다. 이러한 NGF가 해마에 注入되면 역행성 축삭 이동에 의해 MS-DBB complex의 choline성 신경세포에까지 전달된다<sup>40)</sup>. 또한 NGF는 Ach 합성 효소인 choline acetyl transferase(ChAT)의 합성과 방출을 증가시켜 choline성 신경세포의 재생 및 변성방지 역할을 하고<sup>41)</sup>, 그 외의 중추신경계와 말초신경계에도 중요한 영향을 미친다<sup>42)</sup>. 최근 배양된 pheochromo -cytoma(PCI2)세포에서 NGF는 ChAT<sup>43)</sup>와 galanin<sup>44)</sup>의 발현을 유도한다는 보고도 있다.

본 실험에서 hippocampal CA1 부위의 NGF 발현 정도를 살펴본 결과 AGN4군에서 유의성 있는 증가가 나타났다(Fig. 9).

NGF 발현의 유의성 있는 증가는 AchE, ChAT의 발현정도가 증가하는 것과 일관성이 있으며 결국 혈해 당귀약침이 신경세포의 재생 및 변성방지 역할에 일정한 효과가 있음을 증명하고 있다.

당귀약침과 죽력약침의 실험적 결과를 비교 분석 해보면 당귀약침의 경우 행동학적 변화에 있어 학습능력 및 기억측정에서 보다 우수한 효과를 나타내고 있고, 죽력약침의 경우 AchE 발현에서 당귀약침 보다 우수한 효과를 나타내고 있다.

이상과 같이 백서의 중대뇌동맥을 폐색시켜 유발된 허혈성 뇌손상 모델에 대한 혈해 당귀약침 실험 결과 방사형 미로를 이용한 행동학적 변화에 있어 공간 학습능력 및 기억측정에서 유효한 회복이 관찰되었고, 혈압 자체의 커

다란 변화 없이 혈류량이 증가하는 것을 알 수 있었으며, 신경화학적 변화에 있어서도 hippocampal CA1에서 choline성 뉴런의 보호 작용에 일정한 효과를 관찰하였는데, 특히 AGN4군(0.5g/kg)의 경우 행동학적 변화와 혈류량, 신경화학적 변화에 있어 모두 유의성을 보임으로써 당귀약침의 경우 농도도 실험 결과에 상당한 영향을 미쳤음을 증명하고 있다.

## V. 結 論

혈해 당귀약침이 Intraluminal Filament 삽입술에 의해 유발된 백서 hippocampal CA1 부위의 뇌손상에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 방사형 미로 학습에서 오행로 선택수는 대조군에 비해 AGN2군은 1~5일, AGN3군은 1~3일, AGN4군은 1일, 3~6일째까지 유의하게 감소되었다.
2. 방사형 미로 학습에서 정행로 선택율은 대조군에 비해 AGN1군, AGN4군이 유의성하게 증가하였다.
3. 뇌혈류량은 AGN1군에서는 60분, AGN3군에서는 30분, 60분, AGN4군에서는 30분, 90분, 120분에서 유의하게 증가하였다.
4. 혈압은 AGN2군에서 120분에 유의하게 증가하였다.
5. Cresyl violet 염색을 통한 신경세포 손상 방어 효과는 대조군에 비해 AGN1군, AGN3군, AGN4군이 유의하게 증가하였다.
6. AchE 발현정도는 대조군에 비해 모든 군

에서 증가하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았다

7. ChAT 발현정도는 대조군에 비해 AGN1군, AGN4군이 유의하게 증가하였다.
8. NGF 발현정도는 대조군에 비해 AGN4군이 유의하게 증가하였다.

이상으로 血海 當歸藥鍼이 백서의 뇌허혈 상태를 개선함을 알 수 있었는데, 본 실험으로 볼 때 농도가 치료효과의 중요한 변수가 되고 있음을 알 수 있었으며, 이러한 결과가 향후 임상에서 당귀약침으로 뇌허혈 상태를 치료하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

## VI. 參考文獻

1. 윤여규. 응급의학. 서울 : 의학문화사. 2002. 197-8.
2. Graham DI. The pathology of brain ischemia and possibilities for therapeutic intervention, Br J Anaesth. 1985. 57 : 3-17.
3. 서정규. 뇌혈관질환의 진단과 치료방침. 대한의학협회지. 1990 ; 33(8) : 850-8.
4. 김명호. 신경계 질환의 최신지견. 대한의학협회지. 1995 ; 38(5) : 613-26.
5. 김혜규, 김인세, 성시찬, 심문섭. 백서에서 전뇌 허혈시 Calcium Channel Blocker, Barbiturate, Steroid의 뇌허혈 보호작용에 대한 연구. 대한구급의학회지. 1992 ; 7(1) : 27-33.
6. 안덕균, 김호철. 천마의 4-Vessel Occlusion 으로 유발한 흰쥐 전뇌허혈에 대한 신경보호 효과. 대한본초학회지. 1999 ; 14(1) : 12-9.
7. 임강현. 다엽의 4-VO로 유발한 흰쥐 뇌허혈의 신경방어효과. 대한본초학회지. 2001 ; 16(1) : 129-38.
8. 윤대환. 족삼리의 죽력약침이 Intraluminal Filament 삽입술에 의하여 유발된 백서의 허혈성 국소 뇌손상에 미치는 영향. 동신대석사학위논문. 2003.
9. 이원철, 신길조, 정승현. 육일순기탕 추출물이 생쥐의 전뇌허혈에 미치는 영향. 동국한의학연구소논문집. 1999 ; 7(2) : 149-54.
10. 이원철, 이경애, 신길조. 소속명탕 유출물이 전뇌허혈 및 국소뇌허혈에 미치는 영향. 동국한의학연구소논문집. 1999 ; 8(1) : 107-16.
11. 이봄비, 정진용, 김선녀, 김호철 외. 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕이 국소 전뇌허혈에 의한 학습과 기억에 미치는 효과. 대한경락경혈학회지. 2002 ; 19(2) : 63-78.
12. 안영기. 경혈학총서. 서울 : 성보사. 1995 : 236-7.
13. 임종국. 침구치료학. 서울 : 집문당. 1983 : 320.
14. 이상인. 본초학. 서울 : 수서원. 1981 : 101-2.
15. 박쾌환. 당귀수침이 진통효과에 미치는 영향에 관한 연구. 경희대석사학위논문. 1984.
16. 황현서, 안병철, 박동석. 농도별 당귀약침이 방사선 피폭에 의한 면역기능저하에 미치는 영향 I 대한침구학회지. 1994 ; 11(1) : 113-29.
17. 김경식, 송영준. 당귀 및 황기약침이 간손상된 백서의 혈액에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1996 ; 13(1) : 1-10.
18. 안준철, 문진영, 임종국. 당귀약침액의 항산화 효능에 관한 연구. 대한침구학회지. 1996 ; 13(2) : 254-62.
19. 이종석. 단삼 및 당귀수침이 급성실혈성빈

- 혈을 유발시킨 흰쥐의 회복효과에 미치는 영향. 경희대석사학위논문. 1990.
20. Pulsinelli WA and Brierley JB. A new method of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*. 1979 ; 10 : 267-72.
  21. Smith ML, Bendek G, et al. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat, 2. A 2-vessel occlusion model, *Acta Neural Scand*. 1984 ; 69 : 385.
  22. Ogata J, Fujishima M, Tamaki K, et al. An ultra-structural study of developing cerebral infarction following bilateral carotid artery occlusion in spontaneously hypertensive rats, *Act Neuropath*. 1977 ; 40 : 171-7.
  23. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Summins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, *Stroke*. 1989 ; 20 : 84-91.
  24. 김인세, 박두진, 권재영, 김해규 외. 백서의 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 허혈성 뇌손상 모델에서 Dexamethasone과 MK-801이 뇌부종 형성에 미치는 영향. *대한마취과학회지*. 1999 ; 37 : 327-33.
  25. 정영해. 통계분석과 실습. 광주 : 도서출판 월산. 1997 : 159-90.
  26. 김진호, 한태균. 재활의학. 서울 : 군자출판사. 2003 : 349-53.
  27. 전국한외과대학 침구경혈학교실. 침구학(하). 서울 : 집문당. 1993 : 1017-993.
  28. Buchan AM, Pulsinelli WA. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci*. 1990 ; 11 : 1049-50.
  29. Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, et al. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology*. 1987 ; 37 : 1281-6.
  30. Fujusawa A, Matsumoto M, Matsuyama T, et al. The effect of the calcium antagonist nimodipine on the gerbil model of experimental cerebral ischemia, *Stroke*. 1986 ; 17 : 748-752.
  31. Johnston M, Mckinney M, Coyle J. Evidence for a cholinergic projection to neocortex from neurons in basal forebrain. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1979 ; 76 : 5392-6.
  32. Sutherland RJ, Rodriguez AJ. The role of the fomic /fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. *Behavioral Brain Research*. 1989 ; 32 : 265-77.
  33. Miyagawa M, Honma T, Sato M. Effect of subchronic exposure to toluene and reference memory in rats. *Neurotoxicol Teratol*. 1995 ; 17(6) : 657-64.
  34. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울 : 진수출판사. 1994 : 303-4.
  35. 허인회 외. 신경전달물질 기초와 임상. 서울 : 신일상사. 1996 : 242-3, 337.
  36. Coly JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease. a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*. 1983 ; 219 : 423-38.
  37. 고창순 편저. 핵의학. 서울 : 고려의학. 1995 : 211-2, 751.

38. Levi-Montalcine R and Angeletti PU. The nerve growth factor. *Physiol Res.* 1968 ; 8 : 534-59.
39. Kordower JH, Bartus RT, Bothwell M, et al. Nerve growth factor immunoreactivity in the nonhuman primate (*Cebus apella*) ; distribution, morphology, and colocalization with cholinergic enzymes. *J Comp Neurol.* 1988 ; 277 : 465-86.
40. Schwab ME, Otten U, and Agid Y. Nerve growth factor(NGF) in the rat CNS. *Brain Res.* 1979 ; 168 : 473-83.
41. Gage FH, Armstrong DM, Williams LR, et al. Morphological responses of axotomized septal neurons to nerve growth factor. *J Comp Neurol.* 1988 ; 269 : 147-55.
42. Hefti F, Hartikka J, Eckenstein F, et al. Nerve growth factor increases choline acetyltransferase but not survival of fiber outgrowth of cultured fetal septal cholinergic neurons. *Neuroscience.* 1985 ; 14 : 55-68.
43. Heumann RM, Schwab R, and Thoenen H. Nerve growth factor mediated induction of choline acetyltransferase in PC12 cells ; Evaluation of the site of action of nerve growth factor and the involvement of lysosomal degradation products of nerve growth factor. *J Neurosci.* 1984 ; 4 : 3039-50.
44. Kaplan LM, Hooi SC, Abracinkas DR, et al. Neuroendocrine regulation of galanin expression. New York : MacMillan. 1991 : 43-65.