廣豆根 분획물이 中大腦動脈閉鎖에 의한 뇌허혈손상에 미치는 효과(II) -조직화학적 평가를 기준으로-

최문석 · 김연섭*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Effect of *Sophora Subprostrata* Fractions on Focal Ischemic Brain Damage Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats(II)

Moon-Seok Choi, Youn-Sub Kim*

Department of Anatomy-Pointology College of Oriental Medicine, Kyungwon University

This research was performed to investigate protective effect of *Sophora Subprostrata* fractions against focal ischemic brain damage after middle cerebral artery(MCA) occlusion using intraluminal suture. Rats were divided into six groups: MCA-occluded group(Control); each administered groups with *Sophora Subprostrata* total phase(Total), *Sophora Subprostrata* Aqueous phase (Aqueous), *Sophora Subprostrata* BuOH phase(BuOH), and *Sophora Subprostrata* Alkaloid phase(Alkaloid) after MCA-occlusion; sham-operated group(Sham). The right MCA was occluded by A poly-L-lysine coated 4-0 nylon suture thread through the internal carotid artery permanently. *Sophora Subprostrata* and fractions were administered orally(5㎎/㎖) for 7 days after MCA-occlusion. The brain tissue was stained with 2% triphenyl tetrazolium chloride on ischemic brain tissue(2㎜ section). The results showed that 1) *Sophora Subprostrata* total phase reduced infarct size and total infarct volume compared to the control group at 24 hours after MCA-occlusion, 2) *Sophora Subprostrata* Aqueous phase reduced infarct size and total infarct volume compared to the control group at 24 hours after MCA-occlusion, 3) *Sophora Subprostrata* Alkaloid phase reduced infarct size compared to the control group at 24 hours after MCA-occlusion, but 4) at 7 days after MCA-occlusion, *Sophora Subprostrata* did not show effective recovery compared with control group. *Sophora Subprostrata* has protective effects against brain damage at the early stage of focal cerebral ischemia. *Sophora Subprostrata* total and Aqueous phase produced more pronounced protective effect against focal ischemic brain damage.

Key words : Ischemia, Neuroprotection, MCA-occlusion, *Sophora Subprostrata*

서 론

뇌중풍은 특별한 전조증상 없이 갑자기 일어나므로 환자 대부분이 뇌신경세포손상을 막아내기 어려울 뿐만 아니라 손상된 뇌조직은 재생되지 않으므로 경색이나 출혈이 있었던 부위에 섬유교증반흔(fibrogliotic scar)을 남긴다[1,2]. 아울러 이미 손상된 뇌세포들은 뇌신경조직 특성상 원상회복에 한계성을 가지고 있어 재생시킬 수 있는 효과적 치료제도 아직 없는 실정이다. 하지만 세포자살(apoptosis)과 비슷한 양상으로 뇌허혈 뒤 약 5-7일 정도 나타나는 지연성 신경세포괴사(delayed neuronal cell death)[3,4]시기에 신경방어효과를 가진 약물에 의한 처치는 2차적 신경세포퇴화를 막을 수 있는데, 허혈 발생 뒤 처치가 빠를수록 더욱 높은 효과를 가질 수 있다[5]. 그러므로 뇌중풍은 예방과 더불어 발병 초기 뇌조직손상을 최대한 줄이는 것이 가장 좋은 치료방법이다[6,7].

廣豆根(*Sophora Subprostrata* Chun et T. Chen)은 콩과식물 갈잎떨기나무 越南槐(*Sophora tonkinensis* Gagnep.) 뿌리로 性寒味苦하여 淸熱解毒, 消腫止痛, 利咽하는 효능이 있어 咽喉腫痛, 齒齦腫痛, 肺熱咳嗽 등에 쓰이는 山豆根인데, 中國 廣西省에서 자란다[8]. 山豆根의 기원식물이 아직 정확히 밝혀지지 않아 S. subprostrata로 추정하는데, 일부에서는 식물분류, 성분 등에 있어

* 교신저자 : 김연섭, 경기도 성남시 수정구 복정동 경원대학교 한의과대학
· E-mail : ysk@kyungwon.ac.kr, · Tel : 031-750-5420

· 접수 : 2005/06/14 · 수정 : 2005/07/18 · 채택 : 2005/08/05

서 *S. subprostrata*와 다른 방기과식물 새모래덩굴(*Menispermum dahuricum* DC.), 콩과식물 비싸리(*Indigofera*) 등 뿌리를 山豆根으로 쓰기도 한다[8]. 山豆根에는 matrine이라는 alkaloids를 함유[9]하여 심혈관계에 작용하여 저혈압과 서맥증에 효능[10]이 있는 것으로 알려져 있고, matrine이 PKC(protein kinase C)를 억제하여 뇌허혈 때 발생하는 부종을 감소시킨다[11]는 보고가 있는데, 뇌부종은 뇌손상과 밀접한 관계가 있고[12,13], PKC는 세포내 신호전달계 중요요소로써 뇌허혈 세포사 기전에 중요한 역할을 하므로[14,15], 廣豆根이 뇌허혈손상에 보호효과를 미칠 것으로 생각한다. 특히, 廣豆根에 전뇌허혈 신경세포손상 방어효과가 있으며[16], 중대뇌동맥폐쇄로 뇌허혈을 유발한 쥐에게 廣豆根을 경구 투여하여 24시간 뒤 뇌허혈손상 부위 면적과 체적 감소, 대뇌피질에서 신경세포수감소 억제 및 신경세포위축 억제에 유의한 효과를 나타냈다[17]는 최근 실험보고도 있다.

이에 저자는 뇌허혈손상에 대한 보호효과가 기대되는 廣豆根을 분획하여 허혈성 뇌손상 초기 · 졸중기에 나타나는 뇌조직 변화와 행동학적 결손에 미치는 효과를 관찰하고자, 중대뇌동맥(MCA, middle cerebral artery)을 폐쇄한 흰쥐에게 廣豆根 전층과 분획물들을 경구 투여한 다음 24시간과 7일 뒤에 뇌손상 부위 면적과 체적 변화를 비교 관찰한 바, 유의한 효능이 있어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로 Sprague-Dawley계(Charls River, U.S.A.) 체중 180±20g 수컷 흰쥐를 대한실험동물센터에서 구입 사용하였다. 물과 pellet사료(제일사료주식회사, 대전)를 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실 내 온도를 22.5±1.5℃, 습도를 50±10%로 유지하였고, 낮과 밤 주기를 각각 12시간으로 하였다. 실험실 환경에 2주간 적응시킨 다음 실험하였으며, 실험할 때 흰쥐 체중은 242±12g이었다.

2. 약물 조제와 투여

廣豆根 전층과 분획물 추출과정은 다음과 같다. 경희의료원에서 구입한 中國 廣西省産 廣豆根(*Sophora Subprostrata*) 500g을 round flask에 정제수 3,000㎖와 함께 넣고, 냉각기가 부착된 전탕기에서 2시간 동안 가열한 다음, 여과포로 여과한 여액을 감압농축하는 방법으로 2회 시행하여 廣豆根 1,000g에서 농축액 500㎖를 얻었다. 농축액 500㎖가운데 50㎖를 먼저 동결 건조해 분획 전 전층 15.6g을 얻고 나머지 농축액 450㎖를 분획하여 분획물을 얻었는데, 맨 처음 핵산층(hexane phase) 0.02g을 얻고, 다음 단계로 클로로포름층($CHCl_3$ phase) 1.04g, 알칼로이드층(alkaloid phase) 3.99g, 부탄올층(BuOH phase) 5.33g 및 분획 뒤 남은 물층(water phase) 46.12g 등을 순서대로 얻었다.

한약물 투여는 실험동물 체중 250g당 추출물 5㎎을 물 1㎖에 녹여, 24시간 실험의 경우 중대뇌동맥폐쇄시점으로부터 1시간과 4시간 뒤에 경구투여 하였으며, 7일 실험의 경우 추가로 24시간 뒤부터 희생시킬 때까지 날마다 1회 경구 투여하였다.

3. 뇌허혈손상 유발

중대뇌동맥폐쇄에 의한 뇌허혈손상 유발 방법 가운데 Longa 등[18]의 혈관내봉합사삽입술(intraluminal method)을 채택하였다. 모든 수술 과정은 그 방법에 따라 시행했지만, 보다 광범위하고 일정한 뇌허혈을 유발하기 위해 Belayev 등[19]이 사용한 poly-L-lysine coating method와 영구폐쇄방법을 시행하였다.

수술과정을 약술하면 다음과 같다. 건강한 체중 242±12g Sprague- Dawley계 흰쥐 복강에 chloral hydrate 350㎎/㎏을 주사하여 마취한 다음, 수술용 현미경(Carl Zeiss, Zeiss, Germany) 아래서 먼저 목에 있는 anterior triangle 부위 근육을 정리하여 혈관을 노출시킨 뒤, ECA (external carotid artery)와 CCA(common carotid artery)를 잘 정리하였다. Occipital artery와 superior thyroid artery를 electric coagulator (Ellman, Dento-Surg 90 FFP, U.S.A.)를 사용하여 cutting하였다. ECA distal part는 결찰하고, 수술실(5-0 silk suture)로 고정고리를 두 개 만들어 놓은 다음, ICA(internal carotid artery)와 CCA는 수술실(3-0 silk suture)과 artery clamp(micro-vascular clip)를 사용하여 혈행을 완전 차단하였다. Micro-dissecting Spring Scissor로 ECA 혈관벽을 약간 절개한 다음, poly-L-lysine용액(0.1% wt/vol in deionized water, Sigma Diagnostics, P8920, St. Louis, MO. U.S.A.)으로 coating한 끝이 둥근 봉합사(4-0 nylon suture, Ethilon, Brazil)를 18-20㎜정도 밀어 넣었다. 이때 lateral part로 분지하는 pterygopalatine artery로 봉합사가 들어가지 않도록 방향에 유의했다. Tip은 carotid bifurcation으로부터 흰쥐 크기에 따라 18-20㎜ 위치 right MCA origin에 오도록 하였으며, 삽입한 다음 ICA와 CCA를 다시 관류시키고, ECA distal part를 절단하였다. 목 앞 부위 피부를 봉합, 소독하고 마취에서 깨어난 뒤 자유롭게 움직이게 하였다. 실험군은 중대뇌동맥을 폐쇄한 대조군(Control), 폐쇄 뒤 廣豆根 전층 투여군(Total), 분획물 물층 투여군(Aqueous), 부탄올층 투여군(BuOH), 알칼로이드층 투여군(Alkaloid) 및 혈관내 봉합사 삽입과정만을 뺀 수술 시행 군(Sham) 등 6개 군(총 11개 군, 각 군 n=6)으로 나누어 시행하였다.

4. 뇌허혈손상 부위 해부조직학적 평가

1) 뇌허혈손상 부위 면적 측정

뇌허혈 유발 24시간과 7일 뒤에 20% chloral hydrate를 실험동물 복강내 주사하여 희생시키고 단두하였다. 곧 뇌를 적출 한 뒤 rat brain matrix(ASI, U.S.A.)를 이용하여 rat brain atlas[20]에 있는 interaural distance에 따라 2㎜ 두께로 뇌 절편 6개를 만들었다. 이 뇌 절편 6개를 2% TTC(triphenyl tetrazolium chloride, Sigma, U.S.A.)용액에 넣어 37℃ incubator(Dae-il lab, DMC121, Korea)에서 30분간 염색을 시행하였다. 염색이 끝난 뇌 절편 각각을 camera(Nikon, Japan)로 사진 찍은 다음, scanner(Epson, GT-9500, Japan)로 scan하여 컴퓨터(Macintosh, Power PC G3, U.S.A.)에 입력하고, 영상분석용 'NIH Image' software(NIH, Ver. 1.66, U.S.A.)를 사용하여 뇌 절편 각각에서 뇌허혈손상 부위 면적을 측정하였다. 뇌허혈손상 부위 면적(A)은 부종에 의하여 손상면적이 늘어난 것을 보정하기 위하여, 먼저 정상측 대뇌

반구(hemisphere) 면적(B)을 측정하고, 손상 측 대뇌반구 정상조직 면적(C)을 측정한 다음, 정상 측 대뇌반구 면적에서 손상 측 대뇌반구 정상조직 면적을 빼는 방법(A=B-C)으로 계산하였다[19]. Correct Infarct Area = Left hemisphere area - (Right hemisphere area - Measured infarct area)

2) 뇌허혈손상 부위 체적 측정

총 뇌허혈손상 부위 체적은 각 절편 면적을 가지고 아래와 같은 식으로 계산하였다.[21]

$$\text{Total Infarct Volume } (\text{㎣}) = \frac{\Sigma\text{area}(\text{㎟}) \text{ per side}}{\text{No. of sides analyzed}} \times 12\text{㎜}(\text{Max. extent of infarct})$$

6. Statistical Analysis

廣豆根과 분획물들의 효과를 판정하기 위하여 각 실험군을 대조군과 비교하는 Student's t-test[22]를 사용하였으며, $P<0.05$ 수준을 유의하다라고 인정하였다.

결 과

1. 폐쇄 24시간 뒤 뇌허혈손상 부위 면적 관찰

중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 뇌허혈손상 양상은 대조군에서는 interaural 12㎜에서 2㎜절편까지 모두에서 허혈성 뇌손상이 나타났으며, 뇌손상이 가장 큰 절편은 10㎜~8㎜절편이었다. 한약물을 투여한 모든 군에서도 허혈성 뇌손상이 나타나는 양상은 대조군과 동일한 경향을 보였다. 중대뇌동맥폐쇄 24시간 뒤 interaural 12㎜에서 2㎜절편까지 각각 2㎜간격 절편에서 뇌허혈손상 부위 면적이 대조군은 각각 29.35±4.99㎟, 46.01±4.39㎟, 40.46±6.25㎟, 24.88±7.91㎟, 10.07±2.51㎟ 및 3.22±2.35㎟를 나타냈다. 이에 비하여 廣豆根 전층 투여군은 각각 11.60±4.00㎟, 19.50±4.80㎟, 13.60±4.00㎟, 6.80±2.20㎟, 3.20±1.40㎟ 및 0.60±1.00㎟로 대조군과 비교하여 유의한(각각 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$ 및 $P<0.01$) 손상 부위 면적 감소가 있었다(Fig. 1).

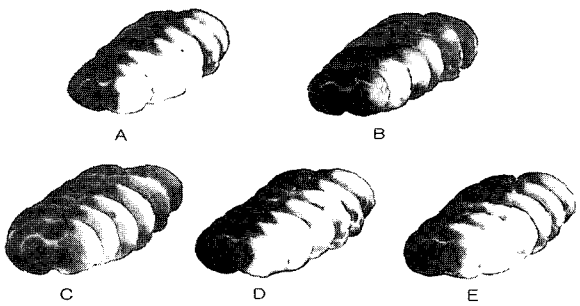

Fig. 1. Each Column Demonstrates the Series of Rat Brain Coronal Sections. Non-damaged normal area in brain section is dark-pink stained by TTC, and infarcted area is white. Column A, group of the MCA-occluded rats (n=6); Column B, group of the *Sophora Subprostrata* total phase was administered to MCA-occluded rats (n=6); Column C, group of the *Sophora Subprostrata* Aqueous phase was administered to MCA-occluded rats (n=6); Column D, group of the *Sophora Subprostrata* BuOH phase was administered to MCA-occluded rats (n=6); Column E, group of the *Sophora Subprostrata* alkaloid phase was administered to MCA-occluded rats (n=6). White infarcted areas in Column B and C are decreased in size with respect to corresponding areas in Column A. All sections are 2㎜ thickness coronal sections.

廣豆根 분획에 따른 물층 투여군의 경우 각각 22.79±3.56㎟, 33.92±2.93㎟, 26.34±3.50㎟, 11.16±2.28㎟, 5.92±1.40㎟ 및 1.10±1.94㎟, 부탄올층 투여군의 경우 각각 25.11±3.96㎟, 34.78±3.29㎟, 30.04±5.10㎟, 15.33±3.91㎟, 8.33±2.83㎟ 및 4.82±2.98㎟, 알칼로이드층 투여군의 경우 각각 20.64±4.39㎟, 28.37±4.96㎟, 28.43±5.86㎟, 11.26±3.52㎟, 4.17±1.74㎟ 및 3.61±1.73㎟를 나타내, 물층과 알칼로이드층 투여군의 interaural line 10㎜절편에서 대조군에 비해 유의한($P<0.05$) 감소 효과를 나타냈다(Fig. 2).

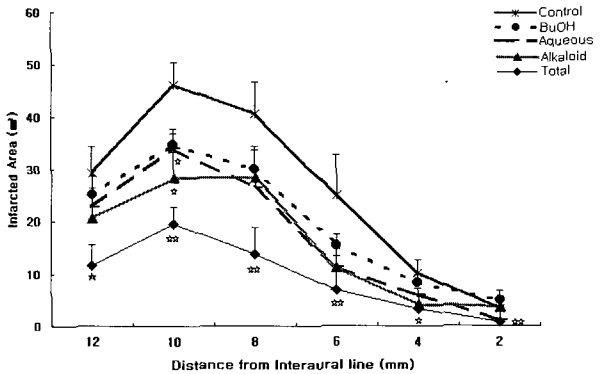

Fig. 2. Infarcted Areas at Brain Section 2 to 12㎜ from Interaural Line 24 hours after MCA-occlusion. Statistical significance compared to the value for control group (☆: $P<0.05$, ☆☆: $P<0.01$). Control, group of the MCA-occluded rats (n=6); Total, group of the *Sophora Subprostrata* total phase was administered to MCA-occluded rats (n=6); Aqueous, group of the *Sophora Subprostrata* Aqueous phase was administered to MCA-occluded rats (n=6); BuOH, group of the *Sophora Subprostrata* BuOH phase was administered to MCA-occluded rats (n=6); Alkaloid, group of the *Sophora Subprostrata* alkaloid phase was administered to MCA-occluded rats (n=6). Data are presented as the mean ± SEM.

2. 폐쇄 7일 뒤 뇌허혈손상 부위 면적 관찰

중대뇌동맥폐쇄 7일 뒤, 뇌허혈손상 부위 면적을 조사한 결과, interaural 12㎜에서 2㎜절편까지 2㎜간격으로 대조군에서는 각각 28.02±6.82㎟, 38.01±5.29㎟, 34.31±5.81㎟, 22.48±6.85㎟, 11.60±3.46㎟ 및 4.15±2.59㎟를 나타냈고, 廣豆根 전층 투여군에서는 각각 30.28±1.89㎟, 39.05±2.29㎟, 39.74±2.98㎟, 23.13±2.72㎟, 17.68±3.19㎟ 및 8.93±4.26㎟를 보여 대조군에 비해 유의한 차이를 나타나지 못했다(Fig. 3).

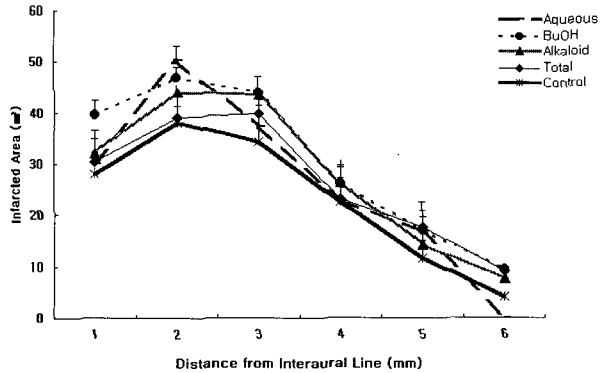

Fig. 3. Infarcted Areas at Brain Section 2 to 12㎜ from Interaural Line 7 days after MCA-occlusion.

또한, 廣豆根 분획물 투여군의 경우에 있어서도 물층 투여군에서는 각각 29.95±6.60㎟, 50.23±2.83㎟, 37.30±4.21㎟, 22.76±4.51

㎟, 16.82±5.61㎟ 및 0.00±0.00㎟, 부탄올층 투여군에서는 각각 39.62±2.73㎟, 46.83±2.02㎟, 43.93± 3.06㎟, 25.99±3.70㎟, 17.07±2.64 ㎟ 및 9.36±3.39㎟, 알칼로이드층 투여군에서는 각각 32.08±2.19 ㎟, 44.13±1.47㎟, 43.51±2.77㎟, 26.23±4.55㎟, 14.32±2.72㎟ 및 7.64± 2.08㎟로 나타나, 모두 대조군에 비해 별다른 유의성을 나타내지 못했다(Fig. 3).

3. 뇌허혈손상 부위 체적 관찰

중대뇌동맥폐쇄 24시간 뒤, 뇌허혈손상 부위 체적을 관찰한 결과, 대조군은 307.97±38.73㎟이었다. 廣豆根 전층 투여군의 경우 110.64±30.60㎟, 분획물 물층 투여군의 경우 202.48±21.78㎟로 대조군에 비해 유의하게(각각 P<0.01, P<0.03) 감소하였다. 그러나 부탄올층(236.81±33.34㎟)과 알칼로이드층(242.42±15.38㎟) 투여군은 대조군에 비해 감소 경향은 있었으나 유의성이 없었다(Fig. 4).

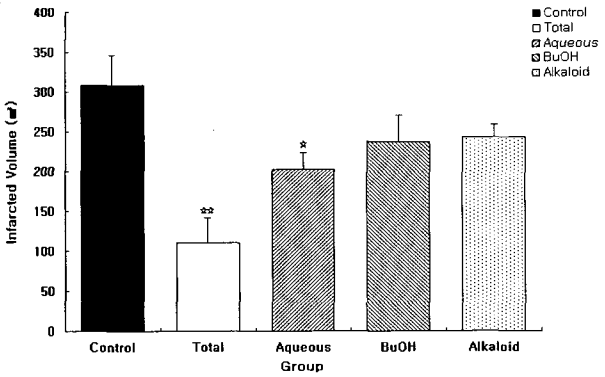

Fig. 4. Infarcted Volume at 24 hours after MCA-occlusion over Groups. Statistical significance compared to the value for control group (☆; P<0.03, ☆☆; P<0.01).

중대뇌동맥을 폐쇄한 7일 뒤, 뇌허혈손상 부위 체적을 관찰한 결과, 대조군은 277.14±52.12㎟, 廣豆根 전층 투여군의 경우 317.63±20.30㎟, 분획물 물층 투여군의 경우 314.13±43.24㎟, 부탄올층 투여군의 경우 365.60±22.67㎟, 알칼로이드층 투여군의 경우 335.80±25.12㎟로 한약물 투여군 모두 대조군에 비해 오히려 체적이 약간 늘어나는 경향을 보였다(Fig. 5).

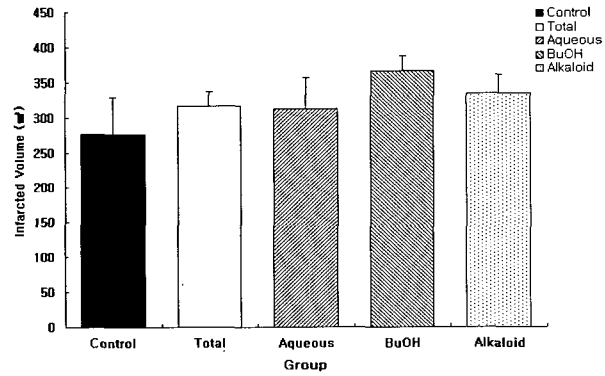

Fig. 5. Infarcted Volume at 7days after MCA-occlusion over Groups.

4. 뇌허혈손상에 따른 생존률 비교

뇌허혈손상 뒤 중대뇌동맥폐쇄군과 廣豆根 전층 및 분획물 투여군의 생존률을 관찰한 결과, 폐쇄 24시간 뒤 생존율은 대조군과 廣豆根 전층, 분획물 물층, 부탄올층 및 알칼로이드층 투여군의 경우 각각 60%와 80%, 80%, 80% 및 80%이었으며(Fig. 6), 7일 뒤 생존율은 각각 50%와 78%, 56%, 43% 및 62%로 나타나 시일이 경과함에 따라 뇌허혈손상에 따른 사망이 증가하였으며, 특히, 대조군의 경우 한약물 투여군보다 높은 치사율을 보였다(Fig. 7).

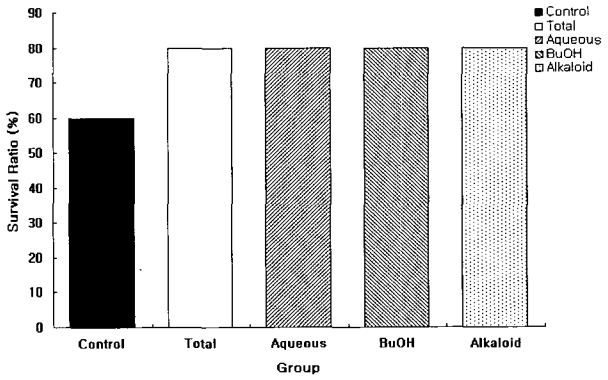

Fig. 6. Survival Ratio at 24 hours after MCA-occlusion over Groups.

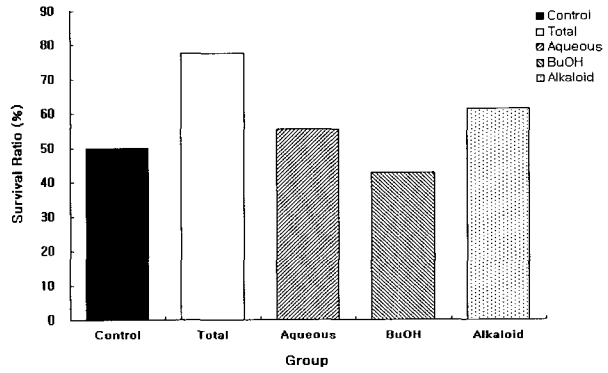

Fig. 7. Survival Ratio at 7 days after MCA-occlusion over Groups.

고 찰

한약물이 중풍에 미치는 영향에 관한 기존 연구들은 주로 뇌손상 뒤 회복기에 미치는 영향들에 중점을 둔 임상연구나 재활요법 및 부차적 장애 해소를 위한 연구들을 주로 시행하고 있어 뇌중풍 초기와 졸중기(7-14일) 약제개발 필요성이 제기 되고 있는데[23,24], 최근 廣豆根[16,17]이 뇌허혈손상에 미치는 신경보호효과를 실험한 연구보고가 있다.

이러한 한약물이 중풍 초기 · 졸중기에 뇌손상을 줄여 줄 수 있다는 직접적인 연구결과를 얻는다면 한의학 임상에 매우 유용한 연구가 될 것으로 생각하며, 본 연구에서는 廣豆根 전층과 분획물들이 뇌허혈에 미치는 효과를 관찰하고자 뇌허혈을 유발한 실험동물의 뇌손상 크기에 대한 효능 검증을 목표로 실험하였다.

본 연구에서 사용한 뇌허혈 동물모델 유발 방법인 intraluminal method와 poly-L-Lysine coating method는 비교적 일정한 부위에 뇌허혈를 유발시킬 수 있으며, 대뇌피질 뿐만 아니라 기저핵 부분에도 광범위하게 뇌허혈이 발생하여[18,25,26] 해부

조직학적 평가는 물론 행동생리학적 평가를 하려는 본 연구 목적에 적합하여 채택하였다.

廣豆根 전층과 분획물들을 투여하는 시간은 최근에 연구된 뇌허혈 기전을 참조하여 결정하였는데, Bederson 등[27]은 TTC염색 때 동맥 폐쇄 뒤 5-6시간 초기에는 사립체 저산소-허혈증에 대한 내성으로 뇌경색 범위가 다소 줄어들어 보이지만 24시간이 지나면 조직학적 검사 결과와 거의 같다고 하였으나, Aronowsk 등28)은 TTC 염색상 뇌허혈 크기는 중대뇌동맥을 영구폐쇄한 동물모델에서 6시간째에 최대이며 9-24시간사이에는 더 이상 증가하지 않으며, 특히, 경계영역에서 광범위한 뇌조직 손상은 9시간 이내에는 일어나지 않는다고 하였다. Nagasawa 등[29]은 뇌허혈 발생 뒤 3-6시간까지 뇌혈류가 1시간 이내보다 더 나쁘고 전체적으로 대뇌피질보다 기저핵 부위 뇌혈류가 낮게 나타난다고 하였다. Garcia 등[5]은 뇌허혈 발생 뒤 뇌세포의 비가역적 변화는 먼저 기저핵 부위에서 발생하고 점차 대뇌피질부위로 진행하며 첫 6시간 동안은 위축과 부종 같은 초기 변화(acute change)가 생기고, 괴사와 같은 후기 변화(delayed change)는 6-12시간에 많은 수의 신경세포에 영향을 미치므로 1-2시간 이내 처치가 조직학적 반응을 변화시킬 수 있을 것이라고 하였다.

한편, 뇌경색으로 인한 뇌부종을 예측하기는 불가능하나, 뇌동맥 폐쇄 지속시간 또는 조직 괴사 정도에 따라 변화를 보이는데, 동맥폐쇄 3-4시간 뒤부터 뇌부종이 시작되어 8-24시간 사이에 뚜렷해지며, 3-4일에 정점에 이르고 7-14일 뒤에 사라지는데, 이러한 뇌경색에 따른 뇌부종은 뇌동맥을 폐쇄한 뒤 몇 분에서 약 4시간까지 지속하는 세포독성부종(cytotoxic edema)과 그 뒤 일어나는 혈성부종(vasogenic edema)으로 나눌 수 있다[1].

이와 같은 뇌허혈 기전을 바탕으로 뇌허혈이 유발된 뇌세포에 대하여 약물이 최대한 치료효과를 발휘할 수 있도록 뇌세포가 본격 괴사되기 시작하는 뇌허혈 발생 3시간 앞뒤를 한약물 경구투여 시간으로 결정하였다. 따라서 한약물 투여군 모두 뇌허혈 유발 1시간과 4시간 뒤에 한약물을 경구 투여하였으며, 7일 실험의 경우 추가로 24시간 뒤부터 희생시킬 때까지 날마다 1회 한약물을 경구 투여하였다.

TTC는 사립체호흡효소의 조직학적지표로 1980년대부터 뇌경색에 널리 사용[30,31]하고 있다. Liszcazk 등[32]은 뇌허혈 2.5시간이 지나면 TTC염색으로 뇌경색 부위와 정상 부위를 조직학상 구별할 수 있는데, TTC 염색으로 측정한 뇌경색 크기와 조직학적 검사 결과가 93%이상 일치한다고 보고하였다. 정상 뇌 조직에서는 사립체(mitocondria) 내에 존재하는 탈수소효소(dehydogenase)와 TTC 용액이 반응하여 formazan이 형성되어 붉은 색으로 나타나고, 뇌경색이 발생한 부위는 세포내 사립체의 비가역적 손상으로 탈수소효소가 소실되어 백색으로 남게 되므로 병변 부위를 알 수 있다[33]. 그러므로 시간 경과에 따른 뇌경색 변화에 대한 TTC 염색을 통한 관찰은 동맥 폐쇄 뒤 탈수소효소 감소 정도에 따라 영향을 받으며, 병변이 진행함에 따라 감소 정도가 심하여진다 34)고 알려져 있다. 따라서 TTC염색 때 나타나는 병변 크기가 조직의 비가역적 손상 정도와 비례하므로 시간 흐름에 따른 뇌경색 발생 위치와 크기를 알 수 있다.

본 실험에서 poly-L-lysine coating을 이용한 중대뇌동맥 근위부 영구폐쇄를 시행한 결과, TTC 염색상 대조군의 뇌허혈손상 부위 체적이 24시간 뒤 307.97±38.73㎟와 7일 뒤 277.14±52.12㎟로 변동계수(coefficient of variation)는 12.6%와 18.8%를 얻었다. 이 수치는 중대뇌동맥 근위부 영구폐쇄 때, 봉합사에 coating을 한 경우 기존 연구결과가 16.2%~22.7%35)임을 고려하면, 본 실험에서 뇌허혈 모델 유발을 신뢰성 있게 수행하였음을 알려준다. 중대뇌동맥을 폐쇄한 24시간 뒤, 한약물이 뇌허혈손상에 미치는 보호효과를 관찰한 결과 廣豆根 전층 투여군은 뇌허혈손상 부위 체적이 110.64±30.60㎟로 대조군 대비 약 64.1% 감소하여 유의한 ($P<0.01$) 감소효과를 나타냈으며, 이를 부위별로 살펴보면 interural 12㎜에서 2㎜까지 뇌허혈손상 부위 면적이 대조군은 각각 29.35±4.99㎟, 46.01±4.39㎟, 40.46±6.25㎟, 24.88±7.91㎟, 10.07±2.51㎟ 및 3.22±2.35㎟이었는데, 廣豆根 전층 투여군은 각각 11.60±4.00㎟, 19.50±4.80㎟, 13.60±4.00㎟, 6.80±2.20㎟, 3.20±1.40㎟ 및 0.60±1.00㎟로 대조군에 비해 각각 60.5%, 57.6%, 66.4%, 72.7%, 68.2% 및 84.4% 감소하였다. 이 결과는 중대뇌동맥 영구폐쇄에 따른 국소 뇌허혈 모델에 효과를 나타낸다고 알려져 있는 NMDA antagonist, nNOS inhibitor, PAF antagonist 및 TNF-α antagonist가 45%~75%정도 효과[36]를 나타낸 것과 비교해 보면 廣豆根이 뇌신경세포 보호에 미치는 효과가 매우 높음을 보여 준다.

廣豆根 분획물 투여군에서 뇌허혈손상 부위 체적은 물층 투여군만 202.48±21.78㎟로 대조군과 비교하여 유의한($P<0.03$) 감소효과를 나타냈을 뿐, 부탄올층과 알칼로이드층 투여군에서는 대조군에 비해 별다른 효과를 나타내지 못하였으며, 뇌허혈손상 부위 면적에 있어서는 廣豆根 분획물 물층과 알칼로이드층 투여군의 경우 각각 interaural line 10㎜절편에서 33.92±2.93㎟와 28.37±4.96㎟로 대조군에 비해 유의한($P<0.05$) 감소 효과를 나타냈다. 또한, 유의한 효과를 보인 廣豆根 전층과 분획물 물층 투여군에서 뇌손상 부위 TTC 염색 사진을 보면 뇌허혈 발생 부위와 정상 부위 경계가 불확실하게 나타나 보임에 따라 뇌허혈 치료 때 관건이 되는 경계영역이 감소함을 알 수 있다(Fig. 1). 중대뇌동맥폐쇄 7일 뒤, 廣豆根 전층과 분획물 투여군 모두 뇌허혈손상 부위 면적과 체적에서 대조군에 비해 유의한 결과를 얻지 못했다. 뇌허혈 유발 24시간 뒤 조직학적 검사결과와 달리 7일간 한약물 투여에도 불구하고 뇌허혈손상 부위 면적과 체적에서 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 못한 것은 중대뇌동맥 영구폐쇄 1-2일에 일어난 실험동물사망 때문이기도 하다. 실제 7일 뒤까지 각 군 생존율을 살펴보면 중대뇌동맥폐쇄 24시간 뒤 대조군과 廣豆根 전층, 분획물 물층, 부탄올층 및 알칼로이드층 투여군의 경우 각각 60%와 80%, 80%, 80% 및 80%이었으며, 7일 뒤 생존율은 각각 50%와 78%, 56%, 43% 및 62%로 나타나 시일이 경과함에 따라 뇌허혈에 따른 사망이 증가하였다. 특히, 대조군의 경우 한약물 투여군보다 높은 치사율을 보여 일정 이상 치사를 유발할 수 있는 뇌허혈손상에서 한약물이 방어효과를 보인 것으로 생각한다. 아울러, 廣豆根 전층 투여군의 경우 중대뇌동맥폐쇄 24시간 뒤 대조군에 비해 조직학상 유의한($P<0.01$) 효과를 보였고, 7일 뒤 생존율에서도 대조군에 비해 높게 지속되는

것으로 보아, 廣豆根 투여효능이 허혈성 뇌손상 초기 24시간 이내에 두드러졌음을 알 수 있지만, 그 뒤 허혈 진행과정에서 뇌허혈손상 부위 면적과 체적 증가를 막지는 못해, 廣豆根 투여가 7일 뒤 조직학상 큰 효과를 보이지 못했음을 알 수 있다.

결론은 본 연구에서 중대뇌동맥폐쇄에 의한 뇌허혈손상 초기(24시간) · 졸중기(7일)에 미치는 廣豆根 분획물들의 보호효과를 실험으로 검증하였으며, 廣豆根 전층과 분획물에 있어서는 물층이 다른 부탄올층과 알칼로이드층에 비해 높은 보호효과를 가지고 있음이 밝혀졌다. 이러한 결과는 앞으로 뇌허혈손상 초기 · 졸중기 치료제 개발로써 한약물을 연구하고 발전시킬 필요성을 제기하며, 신약 개발 연구성과로써도 그 의의를 가질 것으로 기대한다.

결 론

廣豆根 전층과 분획물들이 허혈성 뇌손상 초기(24시간) · 졸중기(7일)에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 한약물을 경구투여하여 뇌허혈손상 부위 면적을 비교 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

중대뇌동맥폐쇄 24시간 뒤에 뇌허혈손상 부위 체적을 관찰한 결과, 廣豆根 전층 투여군이 대조군에 비해 유의한(각각 $P<0.01$) 감소를 나타냈다. 중대뇌동맥폐쇄 24시간 뒤에 뇌허혈손상 부위 체적을 관찰한 결과, 廣豆根 물층 투여군이 대조군에 비해 유의한(각각 $P<0.03$) 감소를 나타냈다. 廣豆根 알칼로이드층 투여군은 대조군에 비해 중대뇌동맥폐쇄 24시간 뒤, interaural line 10mm 절편에서 뇌허혈손상 부위 면적이 유의한(각각 $P<0.01$) 감소를 나타냈다. 중대뇌동맥폐쇄 7일 뒤에 뇌허혈손상 부위 면적과 체적을 관찰한 결과, 廣豆根 전층과 분획물 투여군 모두 대조군에 비해 유의한 결과를 얻지 못했다.

이러한 관찰 결과로 중대뇌동맥폐쇄에 의하여 발생하는 초기(24시간) 허혈성 뇌손상 억제효과가 廣豆根에 있는 것으로 생각하며, 특히, 허혈성 뇌손상 방어효과는 廣豆根 전층과 분획물 물층이 가장 큰 것으로 생각한다.

참고문헌

1. 大韓病理學會 編. 病理學. 4판. 서울, 高文社. pp 1065-1073, 2000.
2. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심병리학. 서울, 고려의학. pp 809-811, 1998.
3. Du, C., Hu, R., Csernansky, C.A., Hsu, C.Y., Choi, D.W. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? J cereb Blood Flow Metab 16(2):195-201, 1996.
4. Kirino, T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res 239(1):57-69, 1982.
5. Garcia, J.H., Liu, K.F., Ho, K.L. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. Stroke 26(4):636-642, 1995.
6. 김종열. 허혈성 뇌졸중의 치료. 2000년도 대한응급의학회 춘계학술대회 및 연수강좌. pp 99-122, 2000.
7. 김영석. 임상중풍학, 서울, 서원당. pp 303-308, 317-329, 1997.
8. 문관심. 약초의 성분과 리용. 평양, 과학 · 백과사전출판사. pp 52, 301, 307-308, 408-411, 1984.
9. Ku, Y.R., Chang, L.Y., Lin, J.H., Ho, L.K. Determination of matrine and oxymatrine in Sophora subprostata by CE. J Pharm Biomed Anal 28(5):1005-1010, 2002.
10. Wei, J.W., Liao, J.F., Chuang, C.Y., Chen, C.F., Han, P.W. Cardiovascular effects of matrine isolated from the Chinese herb Shan-dou-gen. Proc Natl Sci Counc Repub China B 9(3):215-219, 1985.
11. Hu, Z.L., Tan, Y.X., Zhang, J.P., Qian, D.H. Effects of inhibitor of protein kinase C on brain edema formation evoked by experimental cerebral ischemia in gerbils and rats. Yao Hsueh Hsueh Pao 31(12):886-890, 1996.
12. Betz, A.L., Keep, R.F., Beer, M.E., Ren, X.D. Blood-brain barrier permeability and brain concentration of sodium, potassium, and chloride during focal ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 14(1):29-37, 1994.
13. Karibe, H., Zarow, G.J., Graham, S.H., Weinstein, P.R. Mild intraischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab 14(4):620-627, 1994.
14. Tohyama, Y., Sako, K., Yonemasu, Y. Protein kinase C in focal ischemic rat brain:dual autoradiographic analysis of [14C]idoantipyrine(IAP) and [3H]phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu). Brain Res 750(1-2):155-160, 1997.
15. Bartus, R.T., Dean, R.L., Cavanaugh, K., Eveleth, D., Carriero, D.L., Lynch, G. Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion:Implacations for therapeutic intervention and the role of calpain. J Cereb Blood Flow Metab 15(6):967-979, 1995.
16. 閔弘圭. Gerbil의 全腦虛血에 대한 廣豆根의 신경손상방어효능 연구. 慶熙大學校大學院 碩士學位論文. 2002.
17. 이현삼, 정혁상, 강철훈, 손낙원. 廣豆根이 白鼠 中大腦動脈閉鎖에 의한 局所腦虛血損傷에 미치는 保護 效果. 대한한의학회지 21(2):68-78, 2000.
18. Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 20(1):84-91, 1989.
19. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal sutrue. Stroke 27(9):1616-1623, 1996,
20. Paxnos, G., Watson, C. Rat brain atlas, Academic Press. 1997.

21. Swanson, R.A., Morton, M.T., Tsao-Wu, G., Salvalos, R.A., Davidson, C., Sharp, F.R. A Semiantomated method for measuring brain infarct volume. J Cereb Blood Flow Metab 10(2):290-293, 1990.
22. Dinal, W.W. A foundation for analysis in the health science. Bioststisstics 3, 136-146, 1983.
23. 김영석. 중풍환자의 임상진료지침. 대한중풍학회 제1회연수강좌 및 학술논문집. pp 9-20, 2000.
24. 이미화, 박형숙, 최원철. 뇌졸중 치료제인 한약의 효과. 재활간호학회지 3(2):169-180, 2000.
25. Belayev, L., Busto, R., Zhao, W., Fernandez, G., Ginsberg, M.D. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. Brain Res 833(2):181-190, 1999.
26. Belayev, L., Alonso, O.F., Busto, R., Zhao, W., Ginsberg, M.D. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. Stroke 27(9):1616-1622, 1996.
27. Bederson, J.B., Pitts, L.H., Germano, S.M. Evaluation of 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride as a strain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. Stroke 17(6):1304-1308, 1986.
28. Aronowski, J., Cho, K.H., Storng, R., Grotta, J. Neuroflament proteolysis after focal ischemia When docells die after experimental stroke? Journal cerebral blood flow and metabolism June. 19(6):652-660, 1999.
29. Nagasawa, H., Kogure, K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. Stroke 20(8):1037-1043, 1989.
30. Bose, L.B., Osterholm, J.L., Berry, R. A reproducible experimental model of focal cerebral ischemia in the cat. Brain Res 311(2):385-391, 1984.
31. Han, D., Zervas, N.T., Geyer, R.P. Can perfluorochemicals reduce cerebral ischemia? In Reivich M, Hurting HI(eds). Cerebrovascular diseases. New York, Raven Press. pp 409-419, 1983.
32. Liszczak, T.M., Hedley-Whyte, E.T., Adams, J.F., Han, D.H., Kolluri, V.S., Vacanti, F.X., Heros, R.C., Zervas, N.T. Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain. Acta Neuropathol(Berl) 65(2):150-157, 1984.
33. Nachals, M.M., Tson, K.C., Souza, E.D., Cheng, C.S., Seligman, A.M. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J Histochem Cytochem 5, 420-436, 1963.
34. Fine, G., Morales, A., Scerpella, J.R.. Experimental myocardial infarction. A histochemical study. Arch Pathol 82(1):4-8, 1966.
35. Takano, K., Tatlisumak, T., Bergmann, A.G., Gibson, D.G. 3rd, Fisher, M. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated sutre(Koizumi) in rats. J Neuro Sci 153(1):8-11, 1997.
36. Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev, 79(4):1431-1568, 1999.