

大黃이 뇌허혈 손상에 의한 뇌부종에 미치는 영향

강경화 · 손낙원¹ · 김범희*

동의대학교 한의과대학 한의학과 & 동의대학교 한의학연구소, 1: 경희대학교 동서의학대학원

Effect of Rhei Rhizoma on Brain Edema Induced by MCAO in Rats

Kyung Hwa Kang, Nak Won Sohn¹, Bum Hoi Kim*

Department of Oriental Medicine, Dong-Eui University Research Institute of Oriental Medicine, Dong-Eui University,
1: Graduate School of East-West Medicine, Kyung Hee University

Brain edema is a major importance in the pathophysiology of CNS injuries including stroke. Ischemic brain edema results from both cytotoxic edema, which is severe in astrocytes at early stage, and vasogenic edema caused by excessive blood-brain barrier (BBB) permeability. The present study was performed to determine the effect of Rhei Rhizoma on brain edema induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) in the rats. The neurological symptom, total infarct volume and edema index caused by MCAO were measured. The changes of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) immunoreactivities were also observed. We found that Rhei Rhizoma extract improved the neurological symptom and attenuated the total infarct volume and brain edema caused by ischemic insult. Rhei Rhizoma extract also attenuated the expression of MMP-9 and iNOS. This results suggest that Rhei Rhizoma has a protective effect on the brain edema caused by ischemic insult.

Key words : rhei rhizoma, brain edema, blood-brain barrier (BBB), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), inducible nitric oxide synthase (iNOS)

서 론

大黃(Rhei Rhizoma)은 마디풀과에 속한 다년생 草木의 뿌리 줄기로 清熱攻下, 瀉火解毒, 活血祛瘀 등의 효능이 있어서 大便秘結, 神昏譫語, 食積痞滿, 裏急後重 등의 증상을 치료하는데 이 용되며, 특히 임상적으로 다양한 처방을 통해 중풍급성기에 많이 활용되고 있다¹⁾. 大黃에 관한 실험적 연구로는 항이혈²⁾ 및 항혈전³⁾에 대한 효능, 혈중 지질⁴⁾ 및 관련 효소활성과 고지혈증⁵⁾에 대한 미치는 영향 등에 대한 연구결과가 있었으며 중풍 급성기의 뇌신경손상 보호 및 방어효능에 관한 연구로는 흰쥐에서 4-vessel occlusion으로 유발된 전뇌허혈에서의 신경세포 손상에 대한 방어작용⁶⁾과 gerbil의 전뇌허혈에서의 신경보호작용⁷⁾ 그리고 노령 흰쥐에서의 해마부위의 신경세포손상에 대한 보호작용⁸⁾이 보고되었다.

中風 등의 뇌허혈손상에 의해 과도한 뇌부종(brain edema)이 유발되는데, 뇌부종은 뇌조직 내 수분량이 증가하여 발생하는 합

병증으로 뇌허혈 발생 24~48시간 사이에 그 정도가 심각한 것으로 알려져 있다⁹⁾. 뇌부종은 크게 세포독성 뇌부종(cytotoxic edema)과 혈관성 뇌부종(vasogenic edema)으로 분류되는데¹⁰⁾, 세포독성 뇌부종은 저산소증에 의하여 뇌세포막의 에너지 의존성 이온펌프 장애를 초래하여 뇌세포 내 수분이 축적되는 반면 혈관성 뇌부종은 뇌-혈관장벽(Brain Blood Barrier : BBB)의 장애가 주된 원인이 된다. 실험적으로 일시적 뇌허혈 손상은 뇌-혈관장벽의 파괴로 인한 혈관성 뇌부종을 유발하는 것으로 알려져 있다^{11,12)}.

MMP-9(Matrix Metalloproteinase-9)은 뇌혈관 질환과 같은 병적인 상태에서는 조직손상과 염증반응을 유발하며, 특히 재관류에 의한 손상에 있어 기저판(basal lamina)의 파괴에 관여하여 뇌-혈관장벽의 붕괴를 일으켜 뇌부종을 유발한다¹³⁾. MMP-9은 뇌-혈관장벽의 파괴와 밀접한 관련이 있으며 신경세포사에도 관여하는데, 2시간의 일시적 뇌허혈 손상후 48시간에 발현히 급격히 상승하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾.

한편, 일시적 국소 뇌허혈은 뇌조직에서의 활성산소종(reactive oxygen species : ROS)과 산화질소(nitric oxide : NO)를 포함한 유리기(free radical)의 생성을 증가시킨다¹⁵⁾. ROS와 NO는 신경세포 손상을 일으키는데 특히, 뇌허혈 초기의 free radical

* 교신저자 : 김범희, 부산시 부산진구 양정2동 45-1 동의대학교 한의과대학
· E-mail : bume@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7411

· 접수 : 2009/06/25 · 수정 : 2009/08/09 · 채택 : 2009/08/09

과 ROS의 생성은 혈관내피세포의 파괴와 뇌-혈관장벽의 개방에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려졌다¹⁶⁾. NO는 불안정한 nitrogen radical로써 여러 형태의 산화질소합성효소(nitric oxide synthase : NOS)를 통해 생성되는데, NOS는 neuronal NOS(nNOS)와 endothelial NOS(eNOS) 그리고 inducible NOS(iNOS)의 3가지 isoform이 존재하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾.

NO의 과잉생성은 허혈성 뇌손상에 영향을 미치며, 특히 iNOS에 의해 생성된 NO는 뇌손상을 악화시키는 것으로 알려졌다¹⁸⁾. 국소뇌허혈 손상에 따른 뇌손상의 크기는 iNOS 활동과 관련이 있는 것으로 밝혀졌는데, 중대뇌동맥 폐쇄 후에 iNOS의 활성이 증가됨이 관찰되었으며¹⁹⁾, 뇌허혈 후의 iNOS 발현에 의해 생성된 NO가 허혈성 뇌손상 후기에 영향을 미치는 것으로 알려졌다²⁰⁾. 즉, iNOS에 의하여 생성된 NO는 비교적 장시간 분비되면서 세포내 칼슘이온 농도에 비의존적으로 NO를 생성하여 뇌허혈 손상에서 뇌경색 크기를 증가시키고, 뇌-혈관장벽의 투과성을 증가시켜 뇌부종을 악화시키는 것으로 밝혀졌다²¹⁾.

본 연구에서는 일시적 중대뇌동맥폐쇄의 동물모델을 이용하여 재관류 개시 후 3시간과 48시간에서의 大黃추출물이 뇌허혈에 의해 유발되는 뇌손상의 크기와 뇌부종에 미치는 영향을 관찰하였으며, 뇌-혈관장벽 관련 단백질인 MMP-9 및 iNOS 등의 발현에 미치는 영향을 관찰한 바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료 및 방법

1) 실험동물

샘타코(주)에서 구입한 9주령, 약 250 g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 21~23°C, 습도 40~60%, 조명 12시간 명/암이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약물의 조제 및 투여

大黃 200 g을 증류수 2 L와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과액을 감압농축하여 동결건조시켜 물추출액기스 38.2 g을 얻었다. 투여량은 흰쥐 체중 100 g 당 32.7 mg을 음용수에 녹여 중대뇌동맥 폐쇄 1시간 후와 4시간 후 1회씩 총 2회 경구투여 하였다.

3) 일시적 중대뇌동맥폐쇄 유발

혈관내 봉합사 삽입술²²⁾을 사용하여 우측 중대뇌동맥 폐쇄를 시행하였다. 흰쥐를 마취시킨 후 수술용 현미경 하에서 먼저 전경부의 근육을 정리하여 혈관을 노출시킨 후 외경동맥과 총경동맥을 잘 정리하였다. 후두동맥과 상갑상동맥은 전기소작기로 절단하였다. 외경동맥의 원위부는 결찰하고, 수술실 (5-0 silk suture)로 고정고리를 두 개 만들어 놓은 후, 내경동맥과 총경동맥을 수술실 (3-0 silk suture)과 clip을 사용하여 혈행을 완전히 차단하였다. 미세수술가위로 외경동맥의 혈관벽을 약간 절개 후 poly-L-lysine 용액으로 코팅한 봉합사 (4-0 nylon suture)을 18~

20 mm 정도 삽입하였다. 삽입후 내경동맥과 총경동맥을 다시 관류시키고, 외경동맥의 원위부를 절단하였다. 전경부를 피부를 봉합, 소독하고 마취에서 깨어난 후 자유롭게 움직이게 하였다. 재관류를 위해 폐쇄 2시간 후에 삽입하였던 수술실을 조심스럽게 제거하여 혈류가 다시 회복되도록 하였다.

4) 실험군의 분리와 약물의 투여

혈관내 봉합사 삽입술을 시행한 동물들은 무작위로 10마리씩 군을 나누어 재관류 직후 大黃 추출물을 경구투여한 Sample 군과 재관류 직후 동일량의 saline을 경구투여한 Control군으로 나누었다.

2. 측정 및 분석

1) 신경학적 증상의 측정

신경학적 증상은 자세반사로 측정하였다. 재관류 개시 3시간과 48시간 후에 각 군별로 시행하였는데, 흰쥐의 꼬리를 잡고 탁자 위 1 m정도로 올려 앞발의 모양을 살폈다. 양 앞발이 모두 앞으로 향하면 0점을 좌측 앞발이 앞으로 향하지 않고 구부러지면 1점을 주었다. 1점을 받은 흰쥐는 다시 탁자 위에 올려놓고 우측에서 좌측으로 밀어보아 저항감이 약하면 1점을 더해주어 2점이 되게 하고, 한쪽방향으로 계속 회전하는 경우는 1점을 추가로 더하여 총 3점이 되게 하였다²³⁾.

2) 뇌허혈 손상의 면적과 체적 및 뇌부종의 크기 측정

재관류 개시 3시간과 48시간 후에 각 군의 실험동물을 희생한 후, brain matrix (ASI, USA)를 이용하여 2 mm의 두께로 6개의 절편을 만들었다. 이 6개의 뇌절편을 2% TTC 용액에 넣어 37°C의 incubator에서 30분간 염색을 시행하였다. 뇌절편 사진촬영 후 영상분석용 "Axiovision LE" software (Carl Zeiss Vision, Ver.4.2, USA)를 사용하여 각 뇌절편에서 뇌허혈 손상 면적을 측정하였다. 뇌허혈 손상 면적은 부종에 의하여 손상면적이 늘어난 것을 보정하기 위하여, 먼저 정상측 대뇌반구의 면적(C)을 측정하고 손상측 대뇌반구 정상조직 면적(B)를 측정한 다음 정상측 대뇌반구 면적에서 손상측 대뇌반구의 정상조직 면적을 감하는 방법(C-B)으로 계산하였다. 측정된 각 절편의 면적을 아래와 같은 식을 이용하여 뇌허혈 손상 체적을 계산하였다²⁴⁾.

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

뇌부종의 크기는 TTC 사진상 손상받지 않은 측 대뇌반구 면적에 대한 손상측 반구 면적의 비율로 하였으며, 각각의 6개 뇌절편에 대한 평균값으로 계산하였다.

3) MMP-9와 iNOS의 면역조직화학염색과 결과의 관찰

20 μm의 두께로 냉동 절편한 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10~15분정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal goat serum과 bovine serum albumin을 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 anti-MMP-9(AB7299, 1:500 dilution, rabbit

polyclonal; ABCAM), anti-iNOS (610329, 1:500 dilution, mouse monoclonal; BD Bioscience.)으로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 12시간 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 1시간씩 반응시켰다. Diaminobenzidine tetrachloride (Sigma, USA) 용액에서 5~10분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2~3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다. 면역반응의 결과를 정량화 하기위해 뇌경색 경계부위에서 동일한 일정면적 내의 면역 양성반응 세포 수를 측정하고 100,000/μm² 당 세포 수로 계산하여 수치화하였다.

3. 통계처리

실험결과의 분석은 Student T-test를 이용하여 위험도 P<0.05 및 P<0.01로 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 신경학적 증상의 변화

재관류 이후 신경학적 증상의 변화는 재관류 개시 3시간에 Control군이 2.3±0.2, Sample군이 2.4±0.2이었으며, 48시간 후에는 Control군이 2.2±0.2, Sample군이 2.4±0.1로 Sample군이 재관류 개시 3시간과 48시간에서 Control군에 비해 약간의 개선을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다.

2. 뇌손상 면적과 체적에 미치는 영향

재관류 개시 48시간 후 Control군은 뇌조직 절편 6개에서의 뇌경색 면적이 각각 20.0±2.0 mm², 29.5±2.9 mm², 36.7±2.8 mm², 38.3±2.6 mm², 30.5±1.9 mm², 16.2±1.6 mm²였으며, Sample군에서는 18.7±2.5 mm², 29.1±2.7 mm², 33.0±2.3 mm², 30.2±2.0 mm², 22.8±2.6 mm², 13.0±1.6 mm²로 측정되어 전반적으로 Sample군이 Control군에 비해 뇌경색의 면적이 감소되었다. 특히 4번째와 5번째 뇌조직 절편에서 뇌경색 면적의 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 1. P<0.05). 뇌손상 체적의 비교에서도 Control군은 342.6±26.9mm³인데 반해 Sample군에서는 293.6±23.6mm³로 Control군에 비해 감소된 결과를 나타내었다. 하지만 통계적 유의성은 없었다.

3. 뇌부종 크기에 미치는 영향

Control군과 Sample군에의 뇌부종의 크기를 비교해 본 결과, 재관류 개시 3시간후에 Control군이 1.1±0.05, Sample군이 1.06±0.06으로 Sample군이 Control군에 비해 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 하지만, 재관류 개시 48시간에서는 Control군이 1.3±0.08, Sample군이 1.17±0.05으로 Sample군이 Control군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2, P<0.05).

4. MMP-9의 면역조직화학염색

재관류 개시 3시간 후 MMP-9의 발현은 Control군의 경우

뇌허혈 손상측의 경계영역에서 신경세포와 혈관주위의 정상아교세포에서 면역반응이 관찰되었다. Sample군은 Control군에 비해 상대적으로 발현이 감소됨이 관찰되었다. 재관류 48시간에서는 Control군에서 MMP-9의 면역반응이 현저히 증가되었는데, Sample군에서는 Control군에 비해 발현이 상당히 감소되었음이 관찰되었다(Fig. 3).

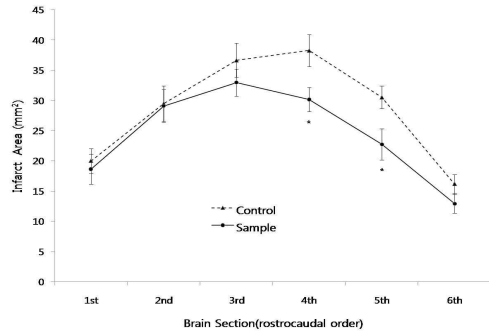


Fig. 1. Changes of total infarct volume in Control and Sample groups 48 hrs after reperfusion. Mean ± S.E. (*; P<0.05, n=5)

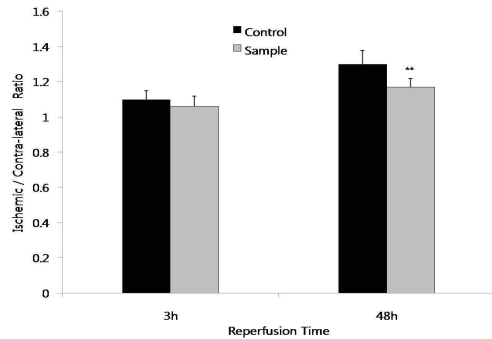


Fig. 2. Changes of edema indexes in Control and Sample groups 3 and 48 hrs after reperfusion. Mean ± S.E.(**; P<0.01, n=5)

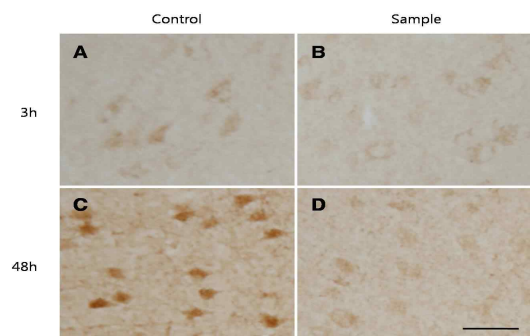


Fig. 3. Representative Photographs of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Immunoreactivity. MMP-9 were observed in Neuron and glial cell after 3 hrs reperfusion in Control group (A). MMP-9 immunoreactivities increased after 48 hrs reperfusion (C). Sample group showed the decrease of MMP-9 immunoreactivities as compared with Control group (B, D). Scale Bars = 25 μm

5. iNOS의 면역조직화학염색

재관류 개시 3시간 후에 iNOS의 발현은 Control군과 Sample군에서 모두 면역반응이 미약하게 관찰되어 Control군과 Sample군 간의 명확한 차이는 없었다. 그러나, 재관류 개시 48시

간에서 Control군에서 iNOS의 발현이 뇌손상 경계영역의 신경세포와 성상아교세포를 중심으로 증가되었음이 관찰되었다. 반면, Sample군의 경우는 Control군에 비해 발현의 정도가 감소되었다(Fig. 4). 재관류 개시 48시간에서의 뇌손상의 경계영역에서 일정 면적 내에 존재하는 iNOS 양성반응 세포수는 Control군의 경우 26.9 ± 1.48 개/100,000 μm^2 였으며, Sample군의 경우는 23.1 ± 0.84 개/100,000 μm^2 로 Control군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 5, $P < 0.05$).

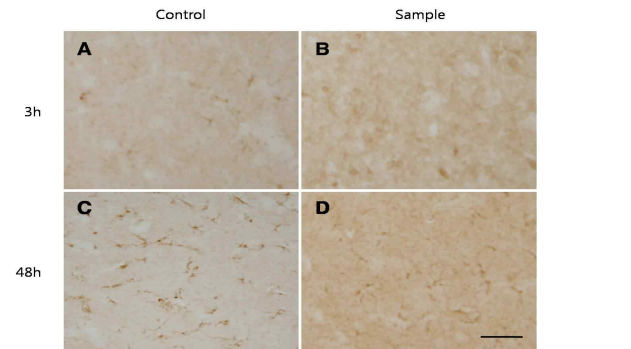


Fig. 4. Representative Photographs of inducible nitric oxide synthase(iNOS) Immunoreactivity. iNOS immunoreactivities were slightly observed after 3 hrs reperfusion in Control and Sample group (A, B). iNOS immunoreactivities increased after 48 hrs reperfusion in Control Group (C). Sample group showed the relative decrease of iNOS immunoreactivities as compared with Control group (D). Scale Bars = 100 μm .

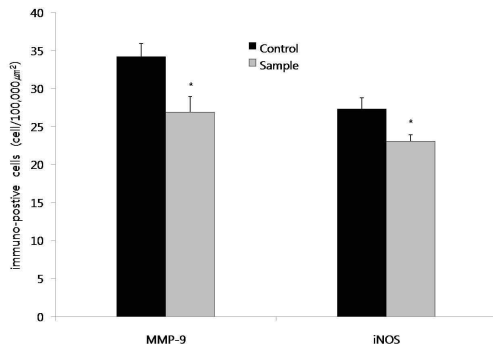


Fig. 5. Effect of Rhei Rhizoma on MMP-9 and iNOS positive cells in penumbra region after 48 hrs reperfusion in Control and Sample Group. Sample group demonstrated significant decrease of MMP-9 and iNOS positive cells as compared with Control Group. Mean \pm S.E. (*: $P < 0.05$.)

고찰

清熱攻河, 瀉火解毒, 活血祛瘀 등의 효능이 있는 大黃은 大便秘結, 神昏譫語, 食積痞滿, 裏急後重 등의 증상을 치료하는데 이용되며, 임상적으로 다양한 처방을 통해 중풍급성기에 많이 활용되고 있다¹⁾. 본 실험에서 일시적 중대뇌동맥 폐쇄 후 大黃 추출물이 뇌허혈 손상에 미치는 영향에 대해 관찰하였는데, 재관류 이후 신경학적 증상의 변화를 살펴본 결과 재관류 개시 후 3시간에서 Control군이 2.3 ± 0.2 , Sample군이 2.4 ± 0.2 이었으며, 48시간에는 Control군이 2.2 ± 0.2 , Sample군이 2.4 ± 0.1 로 Sample군이 재관류 개시 후 3시간과 48시간에서 모두 Control군에 비해 신경학

적 증상의 개선을 보였다. 또한, 뇌손상 면적에 미치는 영향을 살펴본 결과, 재관류 개시 후 48시간에 뇌조직 절편에서 전반적으로 Sample군이 Control군에 비해 뇌경색의 면적이 감소되었으며, 일부 뇌조직 절편에서는 뇌경색 면적의 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 1). 뇌손상 체적의 비교에서도 Control군은 342.6 ± 26.9 mm^3 인데 반해 Sample군에서는 293.6 ± 23.6 mm^3 로 Control군에 비해 감소된 결과를 나타내었다. 이로써 대황추출물이 뇌허혈 손상에 따른 신경학적 증상의 개선과 뇌손상 크기의 감소에 효과가 있는 것으로 판단할 수 있다.

뇌부종은 세포독성 뇌부종과 혈관성 뇌부종으로 분류되며¹⁰⁾, 실험적으로 일시적 뇌허혈 손상은 혈관성 뇌부종과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 혈관성 뇌부종은 뇌-혈관장벽의 파괴가 주된 원인인 것으로 밝혀졌는데^{11,12)}, 뇌-혈관장벽은 신경조직의 모세혈관이 다른 조직에 비해 혈관투과성이 낮기 때문에 형성된 구조로, 특정한 물질들이 혈관으로부터 신경조직으로 이동하는 것을 막아주는 일종의 장벽 역할을 한다²⁵⁾. 이러한 뇌-혈관장벽을 이루는 주된 구조는 모세혈관 내피세포에 있는 폐쇄연접(tight junction)과 기능적인 신경혈관단위(neurovascular unit)로 알려져 있다²⁶⁾. 실험동물에서의 일시적 중대뇌동맥 폐쇄에 있어 재관류는 뇌부종의 형성에 뇌-혈관장벽의 이중개방(biphasic opening)을 유발하는 것으로 밝혀졌는데²⁷⁾, 중대뇌동맥의 폐쇄 시간이 길수록, 초기 뇌-혈관장벽이 누출되기까지 시간이 짧아지는 것으로 알려졌다. 예를 들어, 흰쥐에서 2시간동안의 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류 하였을 때, 3시간 후에 1차 뇌-혈관장벽의 누출이 발생하고, 48시간에 2차적인 뇌-혈관장벽의 누출이 일어나는 것으로 보고되었다²⁷⁾. 본 실험에서 大黃이 일시적 중대뇌동맥 폐쇄로 인한 뇌부종 미치는 영향을 재관류 개시 후 3시간과 48시간에서 관찰한 결과, 3시간과 48시간에서 모두 Sample군이 Control군에 비해 뇌부종의 크기가 감소되었다. 특히 48시간에서 Control군의 경우 뇌부종의 크기가 상당히 증가한 반면, Sample군은 Control군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 2). 위의 결과로 대황추출물이 뇌허혈 손상에 의한 뇌부종의 크기를 감소시키는 효능이 있는 것으로 생각된다.

기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinases : MMPs)는 23 zinc dependent protease의 집단으로 세포외기질(extra-cellular matrix : ECM)의 거의 모든 구성요소들을 분해하는 작용을 한다²⁸⁾. MMP는 뇌혈관 질환과 같은 병적인 상태에서는 조직손상과 염증반응을 유발하며, 특히 재관류에 의한 손상에 있어 기저판의 파괴에 관여하여 뇌-혈관장벽의 붕괴를 일으켜 뇌부종을 유발하는 것으로 알려졌다¹³⁾. 뇌허혈 유발 수시간 내에 내피세포와 염증세포들이 뇌허혈에 반응하여 MMP-2과 MMP-9를 분비하고 기저판을 분해하여 결국 뇌-혈관장벽의 약화를 유발하고 뇌부종을 일으킨다^{29,30)}. 이처럼 MMP-9는 뇌-혈관장벽의 파괴와 밀접한 관련이 있으며 신경세포사에도 관여하게 된다. 흰쥐를 이용한 동물실험에서 일시적 뇌허혈 손상 후 MMP-9의 발현이 증가한다는 보고가 있었으며³¹⁾, MMP-9의 실험적 저해는 뇌부종의 형성을 감소시키고 중풍의 증상들을 개선시키는 것으로 밝혀졌다³²⁾. 이전 연구결과에 따르면, 흰쥐에서의 2시간의 중

대뇌동맥 폐쇄 후 3, 6, 15, 24, 48시간에 MMP-9의 발현을 관찰한 결과, 15시간까지는 MMP-9의 증가가 뚜렷하지 않았으나 48시간에 발현이 급격히 상승한 후 이후 감소하는 것으로 보고되었다¹⁴⁾. 본 실험에서 2시간동안의 중대뇌동맥 폐쇄 이후 재판류 개시 후 3시간과 48시간에 MMP-9의 발현을 관찰한 결과, 재판류 개시 후 3시간과 48시간에서 MMP-9의 발현은 Control군의 경우 뇌허혈 손상측의 경계영역(penumbra region)에서 신경세포(neuron)와 혈관주위의 성상아교세포(astrocyte)를 중심으로 면역반응이 관찰되었으나, Sample군은 Control군에 비해 상대적으로 발현이 감소됨이 관찰되었다(Fig. 3). 특히, 재판류 48시간에서는 Control군에서 MMP-9의 면역반응이 현저히 증가되었는데, Sample군에서는 Control군에 비해 발현이 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Fig. 5). 이러한 결과를 통해 大黃 추출물이 일시적 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 MMP-9 단백질의 발현을 감소시킴으로써 뇌-혈관장벽의 손상을 막아 뇌부종의 크기를 감소시킨 것으로 생각할 수 있다. 일시적 국소 뇌허혈은 뇌조직에서의 NO(nitric oxide)를 포함한 free radical의 생성을 증가시키며, 특히 iNOS(inducible nitric oxide synthase)에 의해 생성된 NO는 뇌손상을 악화시키는 것으로 알려졌다¹⁸⁾. MCAO 후의 iNOS의 활성이 증가됨이 관찰되었으며¹⁹⁾, 뇌허혈 후의 iNOS 발현에 의해 생성된 NO가 허혈성 뇌손상의 후기에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다²⁰⁾. 본 연구에서 면역화학염색법을 이용하여 뇌허혈 손상 이후 재판류 개시후 3시간과 48시간에서 iNOS 단백질의 발현을 관찰한 결과, 재판류 후 3시간에 iNOS의 발현은 Control군과 Sample군에서 모두 면역반응이 미약하여 Control군과 Sample군 간의 명확한 차이는 없었으나, 재판류 개시 48시간에서 Control군의 경우 iNOS의 발현이 뇌손상경계영역의 신경세포와 성상아교세포들을 중심으로 현저히 증가되었음이 관찰되었다. 반면, Sample군의 경우는 Control군에 비해 발현의 정도가 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5).

위의 결과들을 종합하면 大黃이 뇌허혈 손상에 따른 뇌부종을 감소시키는 효능은 MMP-9와 iNOS의 발현을 감소시킴으로써 뇌-혈관장벽의 손상을 방어해주는 것으로 생각할 수 있다. 재판류 개시 후 3시간에서는 Control군과 Sample군 간의 MMP-9와 iNOS의 발현이 모두 확연한 차이를 보이지 않는 반면, 48시간에서는 Sample군이 Control군에 비해 현저한 발현감소를 나타낸 것으로 보아(Fig. 5), 大黃의 이러한 뇌부종 감소효과는 일시적 뇌허혈손상에 의해 2차적인 뇌-혈관장벽의 누출이 발생하는 뇌허혈 후기에 더욱 뚜렷이 나타나는 것으로 판단된다.

결 론

大黃이 뇌허혈 손상에 따른 뇌부종에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐의 중대뇌동맥을 2시간동안 일시적으로 폐쇄한 후 大黃 물추출 엑기스를 투여하고 신경학적 행동지표와 뇌경색 및 뇌부종의 크기에 미치는 영향과 뇌-혈관장벽 관련 단백질인 MMP-9와 iNOS의 발현을 면역조직화학적 방법으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

흰쥐에 일시적 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상을 일으킨 후, 신경학적 행동증상을 관찰한 결과, 大黃 추출물을 투여한 실험군이 대조군에 비해 신경학적 증상이 개선되었다. 뇌허혈 손상에 따른 뇌경색 면적 크기를 관찰한 결과에서는 실험군이 대조군에 비해 뇌경색 면적이 전반적으로 감소되었으며, 일부 절편에서는 통계학적으로 유의성 있는 감소를 나타내었다. 뇌경색 체적과 뇌부종의 크기를 관찰한 결과에서도 실험군이 대조군에 비해 유의하게 감소되었다. 면역조직화학염색법을 통해 뇌경색 경계부위통해 뇌MMP-9와 iNOS의 발현을 관찰한 결과에서는 大黃 추출물을 투여한 실험군이 대조군에 비해 발현이 유의하게 감소되었음이 확인되었다.

이상의 결과로 大黃이 뇌허혈손상에 의한 신경세포 자연사기전을 억제하고, 뇌-혈관장벽과 신경혈관단위구조의 조절을 통하여 뇌부종을 억제하는 효능이 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2008학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음.

참고문헌

1. 전국한의과대학 본초학 교수. 본초학. 서울, 영림사, pp 242-243, 1995.
2. 김도완, 박창국. 전탕시간에 따른 생대황 및 주대황이 어혈병태모형에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 19(1):114-133, 1998.
3. Park, E.K., Choo, M.K., Yoon, H.K., Kim, D.H. Antithrombotic and antiallergic activities of rhaponticin from Rhei Rhizoma are activated by human intestinal bacteria. Arch Pharm Res., 25(4):528-533, 2002.
4. 이영종. 대황 전탕액 분획이 고지사료 투여 흰쥐의 혈중 지질 함량에 미치는 영향. 대한본초학회지 15(2):87-93, 2000.
5. 손영중, 김윤상, 이영중. 대황이 고지혈증 흰쥐의 혈중지질 및 효소활성에 미치는 영향. 대한본초학회지 14(1):61-68, 1999.
6. 안덕균, 원도희, 김종호. 4-vessel occlusion으로 유발한 흰쥐 전뇌허혈의 신경세포 손상에 대한 대황의 방어효과. 대한본초학회지 14(1):111-120, 1999.
7. 김범희. Neuroprotective effect of Rhei Rhizoma on transient global ischemia in Gerbil. 경희대학교대학원, 2002.
8. 백진원, 김주원, 정승현, 신길조, 이원철. 대황이 뇌허혈 유발 노령 흰쥐의 해마 c-fos 및 c-jun 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 25(3):473-481, 2004.
9. 김영석. 임상중풍학. 서울, 서원당, pp 380-381. 1997.
10. Fishman, R.A. Brain edema. N Engl J Med., 293(14):706-711, 1975.
11. Nordborg, C., Sokrab, T.E., Johansson, B.B. Oedema-related tissue damage after temporary and permanent occlusion of the middle cerebral artery. Neuropathol Appl Neurobiol,

- 20: 56-65, 1994.
12. Yang, G.Y., Betz, A.L. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 25(8):1658-1664, 1994.
 13. Burggraf, D., Martens, H.K., Dichgans, M., Hamann, G.F. Matrix metalloproteinase (MMP) induction and inhibition at different doses of recombinant tissue plasminogen activator following experimental stroke. *Thromb Haemost.* 98(5):963-969, 2007.
 14. Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y., Dencoff, J.E. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*, 29(10):2189-2195, 1998.
 15. Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22(9):391-397, 1999.
 16. Kondo, T., Reaume, A.G., Huang, T.T., Carlson, E., Murakami, K., Chen, S.F., Hoffman, E.K., Scott, R.W., Epstein, C.J., Chan, P.H. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci.*, 17(11):4180-4189, 1997.
 17. Knowles, R.G., Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298: 249-258, 1994.
 18. Bolaños, J.P., Almeida, A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta.* 1411(2-3):415-436, 1999.
 19. Iadecola, C., Zhang, F., Xu, S., Casey, R., Ross, M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15(3):378-384, 1995.
 20. Cash, D., Beech, J.S., Rayne, R.C., Bath, P.M., Meldrum, B.S., Williams, S.C. Neuroprotective effect of aminoguanidine on transient focal ischaemia in the rat brain. *Brain Res.* 905(1-2):91-103, 2001.
 21. Zhu, D.Y., Deng, Q., Yao, H.H., Wang, D.C., Deng, Y., Liu, G.Q. Inducible nitric oxide synthase expression in the ischemic core and penumbra after transient focal cerebral ischemia in mice. *Life Sci.*, 71(17):1985-1996, 2002.
 22. 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.
 23. Bederson, J.B., Pitts, L.H., Tsuji, M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., Bartkowski, H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17(3):472-476, 1986.
 24. Siesjö, B.K., Bengtsson, F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 9(2):127-140, 1989.
 25. Brightman, M.W., Reese, T.S. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol.* 40(3):648-677, 1969.
 26. Hawkins, B.T., Davis, T.P. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol Rev.* 57(2):173-185, 2005.
 27. Kuroiwa, T., Ting, P., Martinez, H., Klatzo, I. The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol.* 68(2):122-129, 1985.
 28. Nagase, H., Woessner, J.F. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274(31):21491-21494, 1999.
 29. Hamann, G.F., Okada, Y., Fitridge, R., del Zoppo, G.J. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*, 26(11):2120-2126, 1995.
 30. Rosenberg, G.A., Yang, Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus*, 22(5):E4, 2007.
 31. Heo, J.H., Lucero, J., Abumiya, T., Koizol, J.A., Copeland, B.R., del Zoppo, G.J. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 19: 624-633, 1999.
 32. Asahi, M., Asahi, K., Jung, J., del Zoppo, G.J., Fini, E., Lo, E.H. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: Effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20: 1681-1689, 2000.