

# 黃芪가 Intracerebral Hemorrhage 흰쥐의 腦浮腫에 미치는 영향

정형진 · 박완수<sup>1</sup> · 김연섭\*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실, 1: 병리학교실

## Effects of Astragali Radix on Brain Edema and Apoptosis in Intracerebral Hemorrhage of Rats

Hyung Jin Jung, Wansu Park<sup>1</sup>, Youn Sub Kim\*

Department of Anatomy-Pointlogy, 1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

This study aimed to evaluate the effects of Astragali radix on brain edema of intracerebral hemorrhage(ICH)-induced rats. Brain edema following ICH was induced via the stereotaxic intrastratial injection of bacterial collagenase type VII in Sprague-Dawley rats. Ethanol extract of Astragli radix was treated once a day for 3 days. Then brain hematoma volume and edema were examined. Immunohistochemistry was processed for iNOS, c-Fos, Bax, and HSP72 expressions in the brain sections and each immuno-labeling were calculated with image analysis. Ethanol extract of Astragli radix reduced hematoma volume(not significantly) and brain edema(significantly) ICH induced rats. Ethanol extract of Astragli radix reduced iNOS expressions, c-Fos, Bax and HSP72 positive cells significantly and reduced apoptotic bodies and swollen neurons in ICH induced rat brain. These results suggest that Astragli radix plays an inhibitory role in the hemorrhagic, inflammatory and apoptotic events induced by ICH. And it is supposed that neuroprotective effect of Astragli radix reveals by anti-apoptosis mechanism.

Key words : Astragali radix, iNOS, c-Fos, Bax, HSP72

### 서 론

黃芪는 豆科에 속한 황기 (Astragalus membranaceus)와 몽고황기(A. mongholicus)의 根으로써 性味는 甘溫하고, 脾經과 肺經으로 歸經하며, 補氣升陽 · 益衛固表 · 托毒生肌 · 利水退腫의 效능을 가지고 있으며<sup>1)</sup>, 中氣下陷證, 氣虛證, 自汗證, 癰疽, 虛證의 風濕水腫 등을 치료한다<sup>2)</sup>.

黃芪의 重要成分으로는 蔗糖, 葡萄糖, 澱粉, 粘液質, 樹膠, 纖維素, Vitamin B<sup>3,4)</sup>, Choline, Betaine, 2',4'-Dihydroxy-5,6-dimethoxy-isoflavone, Kumat akenin<sup>5,6)</sup>, 配糖體, 鞣酸, Alkaloid 반응물질<sup>7)</sup> 등이 확인되었다.

黃芪에 대한 연구들을 보면 黃芪는 면역력 증가와 항알레르기 효과가 우수하며<sup>8,9)</sup>, 면역세포의 자연사와 nitric oxide (NO) 생성억제 效능이 있으며<sup>10)</sup>, 뇌손상 또는 신경세포 손상에 대해 保護效능이 있다<sup>11,12)</sup>. 또한 黃芪가 MKP-1의 활성을 통한 항염증

작용과 인간의 양막에서 광범위한 항염증 효과를 가진다는 항염증 效능에 대한 보고도 있다<sup>13,14)</sup>.

뇌부종은 뇌조직출혈 (Intracerebral hemorrhage, ICH)을 포함한 다양한 뇌조직 손상상태에서 뇌혈관장벽 (Blood-Brain Barrier, BBB)의 손상<sup>15)</sup>과 뇌조직의 염증<sup>16,17)</sup>으로 인하여 발생한다. 특히 뇌조직출혈에서는 직접적인 뇌조직의 손상뿐만 아니라 이차적으로 발생하는 뇌부종이 임상증상을 악화시키는 주요 인자로 작용함으로<sup>18)</sup>, 뇌부종의 진행 상태가 환자의 예후판정에 중요한 지표가 된다<sup>19)</sup>. 이러한 뇌부종을 유발하는 매개물질들로는 glutamate와 lactate, nitric oxide, arachidonic acid, free oxygen radicals, histamine 등이 알려져 있으며<sup>20)</sup>, 특히 뇌조직의 염증반응이 뇌부종을 악화시키는 주요인자로 알려져 있다<sup>21,22)</sup>.

그러므로 利水消腫의 效능이 있어 면역조절과 항염증 효과가 있으며, 뇌손상과 신경세포 손상에 保護效능을 발휘하는 黃芪가 뇌부종에도 유의한 效능을 발휘할 것으로 판단되지만, 이에 대한 연구보고가 없었다.

이에 저자는 뇌조직출혈로 유발된 뇌부종에 미치는 黃芪의 效능을 연구하기 위해 흰쥐의 선조체 내에 콜라겐분해효소를 주

\* 교신저자 : 김연섭, 성남시 수정구 복정동 산 65, 경원대학교 한의과대학  
· E-mail : ysk5708@hanmail.net, · Tel : 031-750-5420  
· 접수 : 2010/10/06 · 수정 : 2010/11/25 · 채택 : 2010/12/06

입하여 뇌조직출혈과 뇌부종을 유발하고, 黃芪에탄올추출물을 3일간 경구 투여하였다. 이후 뇌조직출혈의 체적과 뇌부종을 측정하였으며, 신경세포의 변화를 조직학적으로 관찰하고, 뇌조직출혈 주변부에서 inducible nitric oxide synthase (iNOS), c-Fos, Bax 및 HSP72 발현을 면역조직화학염색을 통해 관찰한바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물 (Samtako, Korea)은 약 300 g 전후의 11주령, Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 (21-23 °C), 습도 (40-60 %), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료를 자유롭게 공급하며 사육되었고, 1주 이상 실험실 환경에 적응시킨 다음 사용하였다.

### 2. 黃芪에탄올추출물 제조 및 투여

본 실험에 사용한 黃芪 (Astragali Radix)는 (주)허브메디에서 구입하였다. 세절한 黃芪 400 g에 40 % ethanol 3,000 ml를 넣어 실온에서 5일간 추출하였으며, 여과액을 회전증발기 (Eyela, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조 (Model104, ALPHA, W, Germany)하여 226.7 mg/g의 추출물을 얻었다 (수율은 22.7 %). 실험동물에 대한 1회 투여량은 흰쥐 체중 100 g 당 30.2 mg을 2 ml의 온수에 녹여 뇌조직출혈 유발 3시간 후부터 1일 1회 3일간 경구투여 하였다.

### 3. 실험동물의 분류

뇌조직출혈에 대한 黃芪의 효능을 관찰하기 위하여 실험동물을 다음과 같이 구분하였다. 마취와 두정부의 피부절개 및 두개골을 천공하였으나 뇌조직 내에 collagenase를 주입하지 않은 정상대조군 (Sham), 위의 과정과 같은 사전 수술에 이어 선조체에 collagenase를 주입하여 뇌조직출혈을 유발시킨 대조군 (Control) 및 대조군과 같이 뇌조직출혈을 유발한 다음 3일간 黃芪에탄올추출물을 경구 투여한 黃芪투여군 (Sample)으로 나누었다. 각 군의 실험동물은 12마리씩 총 36마리로, 뇌출혈과 뇌부종 측정 및 면역조직화학염색용으로 사용하였다.

### 4. 뇌조직출혈의 유발

뇌조직출혈 유발을 위한 수술과정은 electronic temperature controller (CMA150, CMA, Sweden)를 통하여 정상체온 (37±0.5 °C)이 유지되는 상태에서, 2 % isoflurane을 포함한 70 % N<sub>2</sub>O와 30 % O<sub>2</sub> gas의 흡입마취 하에서 이루어졌으며, 필요한 경우 추가적으로 pentobarbital sodium (50 mg/kg)을 복강주사 하였다. 수술과정을 간단히 서술하면 다음과 같다<sup>23)</sup>.

마취된 흰쥐의 머리를 뇌정위고정장치 (Stoelting, USA)에 고정한다 다음 두정부의 정중선을 따라 피부를 절개하고 두개골이 드러나게 하였다. 두개골의 bregma로부터 전방으로 0.2 mm, 우측으로 3.5 mm 위치에 전기드릴을 사용하여 약 1 mm 직경으로 두개

골을 천공하고, 뇌정위고정장치에 장착된 Hamilton 주사기 (26-gauge, 10 μl, Hamilton, USA)를 뇌경막 (dura mater)으로부터 5.5 mm 깊이로 선조체에 삽입하였다. 이어서 1 μl 내에 0.23 U의 bacterial collagenase type IV (C0773, Sigma-Aldrich, USA) 용액을 Hamilton 주사기에 연결된 micropump (Model 310, Kd Scientific Inc, USA)를 작동하여 0.1 μl/min의 속도로 주입하였다. Collagenase 용액의 주입이 끝난 후에도 약 10분간 Hamilton 주사기를 유지하여 collagenase 용액의 역류를 방지하였으며, 이후 Hamilton 주사기를 제거하고 두개골의 천공은 bone wax로 메운 다음 절개한 두정부의 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다.

### 5. 뇌출혈 체적 및 뇌부종의 측정

뇌조직출혈 유발 3일 후 실험동물을 과용량의 pentobarbital 복강주사로 희생시킨 후 즉시 단두하고 뇌를 적출한 다음 흰쥐용 brain matrix (ASI, USA)를 사용하여 1 mm 두께의 뇌 절편을, collagenase 주입 위치를 기준으로 하여 전후로, 총 6장의 절편을 만들었다. 염색 없이 즉시 뇌 절편을 digital camera로 촬영한 다음 ImageJ software (ver. 1.41)를 사용하여 각 뇌 절편 영상으로부터 정상측 대뇌반구 (intact hemisphere), collagenase 주입측 대뇌반구 (injected hemisphere) 및 뇌출혈 (hematoma)의 크기를 측정하고, 각 면적에 뇌 절편의 6장의 두께를 곱하여 체적을 계산하였다. 그러므로 제시된 대뇌반구의 체적은 좌우 대뇌반구의 총체적이 아니라 collagenase 주입 위치를 기준한 6장 뇌 절편의 대뇌반구 체적이다. 뇌부종은 정상측 대뇌반구 체적에 대한 collagenase 주입 측 대뇌반구 체적의 증가 비율로 계산하였다.

### 6. 뇌조직의 처리

뇌조직출혈 유발 3일 후 실험동물을 pentobarbital의 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05 M phosphate buffered saline (PBS)과 4 % paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출한 다음 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 담가 침전시켰다. 다음 뇌를 -40°C의 dry ice-isopentane 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80°C에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 20 μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

### 7. Cresyl violet 염색

신경세포의 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 cresyl violet 염색을 실시하였다. 뇌조직을 실온에서 1.0 % (w/v) cresyl violet acetate 용액에 2분간 염색하고, 농도별 ethanol 용액으로 탈수한 다음 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

### 8. 면역조직화학염색

뇌조직을 0.05 M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10분간 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10 % normal horse serum (Vectastain, USA)과 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시

간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후 primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 anti-c-Fos (1:500, ab7963, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-iNOS (1:200, 610297, BD, USA), anti-Bax (1:250, sc-7480, Santa Cruz Biotechnology, USA) 및 anti-HSP72 (1:200, HSP01, Calbiochem, USA)를 사용하였으며, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 반응시켰다. 다음 biotinylated anti-rabbit secondary antibody (1:200, Vector Laboratories, USA)에 실온에서 1시간동안 반응시키고, 조직을 PBS로 씻어낸 후 avidin-biotin immuno-peroxidase의 방법에 따라 각각 1시간씩 반응시켰다. 다음 0.05 % 3,3'-diamino-benzidine tetrachloride (DAB, Sigma-Aldrich, USA)에서 2분간 발색 반응시키고, 수세한 다음 탈수, 봉입하여 조직 표본을 제작하였다.

9. 면역조직화학염색 양성반응 세포의 관찰

면역조직화학법으로 염색된 c-Fos, Bax 및 HSP72 발현은 각각의 양성반응 세포 수를 관찰하였으며, iNOS 발현은 염색강도를 비교하였다. 양성반응 세포 수는 CCD카메라 (DP70, Olympus, Japan)가 장착된 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)을 사용하여 영상을 영상분석시스템에 저장하고, ImageJ software (ver. 1.41, NIH, USA)를 사용하여 hematoma 주변부를 중심으로 각 뇌 부위에서의 양성반응 세포 수를 측정하였으며, 동일한 일정면적 (105 μm<sup>2</sup>)으로 보정하여 자료로 사용하였다.

10. 통계처리

측정된 모든 자료는 Student's t-test를 사용하여 대조군과 黃芪투여군 사이에서 P<0.05의 유의수준으로 검증하였다.

결 과

1. 뇌출혈 체적의 변화

뇌조직출혈 흰쥐에 黃芪를 투여한 후 뇌출혈 체적을 측정한 결과, 대조군의 31.2±1.1 mm<sup>3</sup>에 비하여 黃芪투여군은 27.2±2.1 mm<sup>3</sup>로 약 12.7% 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 1).

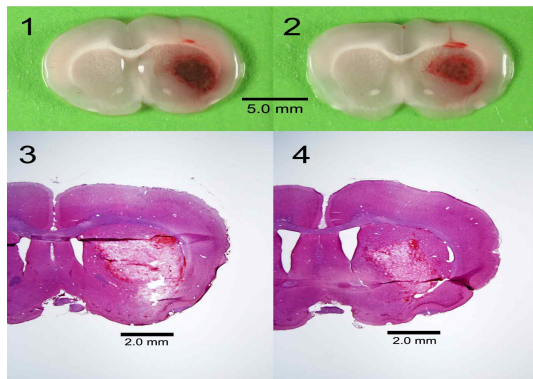


Fig. 1. Representative sections of the ICH-induced rat brain. Section 1 and 3 (H&E), Control group; Section 2 and 4 (H&E), Sample group. Sample (Astragalus radix) treated rats does not show a reduction in hematoma volume statistically compared to Control group.

2. 뇌부종 비율의 변화

뇌조직출혈 흰쥐에 黃芪를 투여한 후 정상측 대뇌반구 체적과 collagenase 주입측 대뇌반구 체적 및 체적 비율을 측정된 결과, 정상대조군은 각 대뇌반구 체적이 290.5±8.2 mm<sup>3</sup>와 295.4±8.4 mm<sup>3</sup>로 101.7±0.3 % 로 증가하였으나 별 차이가 없었으며, 대조군은 293.7±9.3 mm<sup>3</sup>와 348.2±10.2 mm<sup>3</sup>로 뇌조직출혈에 의해 118.6±1.1 % 로 체적이 증가하였다. 黃芪투여군은 289.8±8.9 mm<sup>3</sup>와 330.7±9.3 mm<sup>3</sup>로 체적이 114.1±1.0 % 로 증가하여 대조군에 비해 유의성 있는 뇌부종 비율의 감소를 나타내었다(Fig. 2).

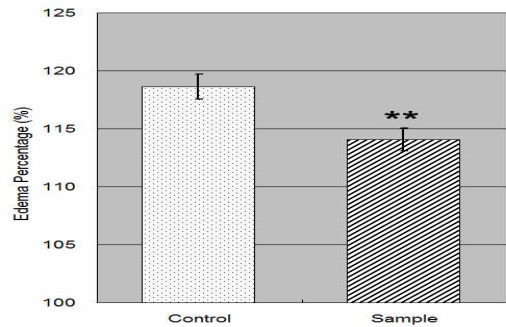


Fig. 2. Effect of Astragalus radix on the edema percentage of ICH-induced rats. \*\* represents p<0.01 compared to the edema percentage of the Control group (n=6).

3. iNOS 발현의 변화

면역조직화학염색을 통해 iNOS 발현을 관찰한 결과, 대조군에서는 뇌조직출혈이 유발된 조직과 그 주변부에서 강한 양성반응을 나타내었으며, 특히 뇌조직출혈의 중심부 (asterisk, \*)에서 보다는 주변부 (arrows)에서 더 강한 발현을 나타내었다(Fig. 3-1). 黃芪투여군에서는 뇌조직출혈의 중심부와 주변부 모두 대조군에 비하여 iNOS 발현 강도가 뚜렷하게 감소된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-2).

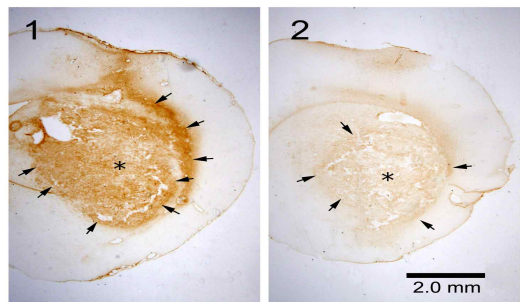


Fig. 3. iNOS immunolabeled representative sections of the ICH-induced rat brain. Section 1, Control; Section 2, Sample. iNOS expressed with strong intensity on the hematoma (asterisk, \*) and the peri-hematoma (arrows) in Control group. Sample (Astragalus radix) group show a reduction of iNOS labeled-intensity compared to Control group both on hematoma (asterisk) and peri-hematoma (arrows).

4. 신경세포의 조직학적 변화

Cresyl violet 염색을 통해 신경세포의 조직학적 변화를 관찰한 결과, 뇌조직출혈이 유발된 조직에서는 대조군(Fig. 4-1)과

黃芪투여군 (Fig. 4-2) 모두 정상적인 형태의 신경세포는 관찰할 수 없었고, 세포핵이 심하게 응축된 apoptotic body (arrows)가 다수 관찰되었다. 대조군(Fig. 4-3)은 뇌조직출혈 주변부에서 많은 수의 apoptotic body가 관찰되고 정상 신경세포 (arrow head)는 극히 일부만이 관찰되었다. 이에 비하여 黃芪투여군(Fig. 4-4)에서는 apoptotic body의 수가 대조군에 비해 감소하였으며, 정상 신경세포 (arrow head) 수는 증가한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4).

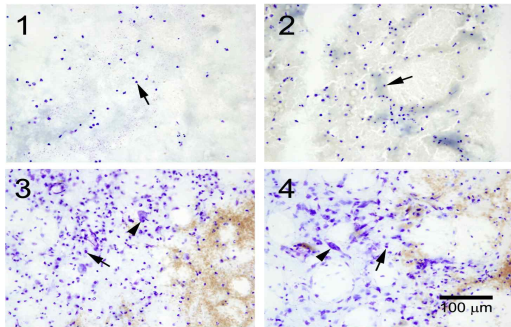


Fig. 4. Cresyl violet-stained representative sections of the ICH-induced rat brain. Section 1, Control hematoma; Section 2, Sample hematoma; Section 3, Control peri-hematoma; Section 4, Sample peri-hematoma. Apoptotic bodies (arrows) in the hematoma and the peri-hematoma are not different from Sample (Astragali radix) and Control groups. Sample treated rats show a reduction of apoptotic bodies (arrows) and an increase of neurons in the peri-hematoma (arrow heads) compared to Control group.

5. c-Fos 발현의 변화

면역조직화학염색을 통해 c-Fos 발현을 관찰한 결과, 뇌조직출혈의 주변부에서 대조군과 黃芪투여군 모두 강한 양성반응을 나타내는 세포 (arrows) 들이 다수 관찰되었다(Fig. 5). 일정면적 (10x5 μm<sup>2</sup>) 당 c-Fos 양성반응 세포 수를 측정된 결과, 대조군은 62.7±8.0 개 이었고, 黃芪투여군은 20.8±2.7 개로 대조군에 비해 유의성 있는 c-Fos 양성반응 세포 수의 감소가 관찰되었다.

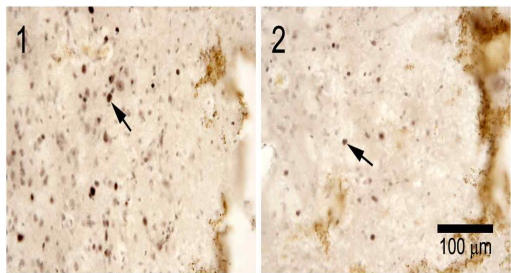


Fig. 5. c-Fos immuno-labeled representative sections of the ICH-induced rat brain. Section 1, Control; Section 2, Sample. Sample (Astragali radix) reduces the number of c-Fos positive cells (arrows) in peri-hematoma compared to the Control group.

6. Bax 발현의 변화

면역조직화학염색을 통해 Bax 단백질의 발현을 관찰한 결과, 뇌조직출혈의 주변부에서 대조군과 黃芪투여군 모두 강한 양성반응을 나타내는 세포 (arrows) 들이 다수 관찰되었다(Fig. 6).

일정면적 (10x5 μm<sup>2</sup>) 당 Bax 양성반응 세포 수를 측정된 결과, 대조군은 34.3±2.7 개 이었고, 黃芪투여군은 19.2±3.1 개로 대조군에 비해 유의성 있게 Bax 양성반응 세포 수가 감소하였다.

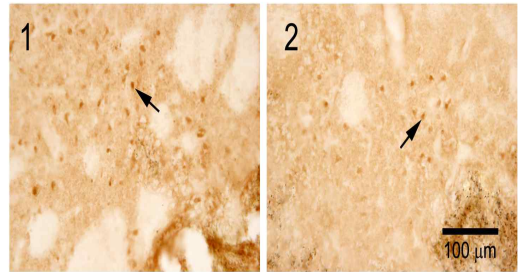


Fig. 6. Bax immuno-labeled representative sections of the ICH-induced rat brain. Section 1, Control; Section 2, Sample. Sample (Astragali radix) reduces the number of Bax positive cells (arrows) in peri-hematoma compared to the Control group.

7. HSP72 발현의 변화

면역조직화학염색을 통해 HSP72 발현을 관찰한 결과, 뇌조직출혈의 주변부에서 대조군과 黃芪투여군 모두 강한 양성반응을 나타내는 세포 (arrows) 들이 다수 관찰되었다(Fig. 7). 일정면적 (10x5 μm<sup>2</sup>) 당 HSP72 양성반응 세포 수를 측정된 결과, 대조군은 14.5±1.3 개 이었고, 黃芪투여군은 9.5±1.6 개로 대조군에 비해 유의성 있게 HSP72 양성반응 세포 수가 감소하였다.

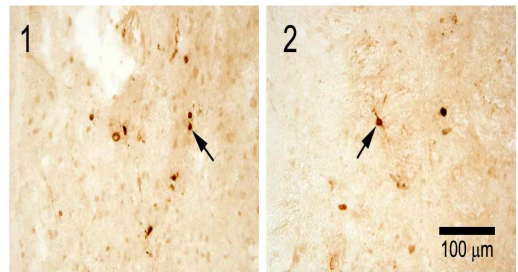


Fig. 7. HSP72 immuno-labeled representative sections of the ICH-induced rat brain. Section 1, Control; Section 2, Sample. Sample (Astragali radix) reduces the number of HSP72 positive cells (arrows) in peri-hematoma compared to the Control group.

고찰

黃芪는 〈神農本草經〉<sup>24)</sup>에 “黃耆味甘微溫無毒。主癰疽久敗瘡 排膿止痛 大風癰疾 五痔鼠瘻 補虛 小兒百病。”이라고 최초로 수록되어 있으며, 〈醫學入門〉<sup>25)</sup>에는 “黃耆 甘溫性無毒。補益三焦呼羊肉。內托癰疽外斂汗。生津退熱效尤速。黃, 色, 耆老也, 服之延年。又名氣耆, 底也, 補下元也。可升可降, 陰中之陽也.”라고 설명되어 있으며, 〈東醫寶鑑〉湯液篇<sup>26)</sup>에는 “性微溫味甘無毒。主虛損羸瘦, 益氣長肉, 止寒熱, 療腎衰耳聾, 治癰疽久敗瘡, 排膿止痛。又治小兒百病, 婦人崩漏 帶下諸疾.”이라고 黃芪의 性味와 效能, 主治에 대해서 기술되어 있다.

黃芪는 임상에서 氣虛로 인한 慢性 白血球 減少症과 氣管支

喘息, 慢性 氣管支炎, 感氣 등 呼吸器 疾患, 慢性 腎炎, 慢性 腎盂 腎炎 등 泌尿器系 疾患, 萎縮性 胃炎, 胃十二指腸潰瘍, 小兒 腸吸 收 障礙 등 胃腸管 疾患, 腦血管 障礙 後遺症 등에 다양하게 활 용되고 있다<sup>27,28)</sup>.

黃芪에 대한 실험연구 보고들을 살펴보면, 면역세포의 자연 사와 nitric oxide 생성억제 효능이 있다는 보고들과 함께<sup>9)</sup>, 黃芪 藥鍼은 methotrexate로 유발된 면역기능저하를 억제한다는 보고 가 있다<sup>14)</sup>. 또한 黃芪가 p38, Erk의 감소와 동반되는 MKP-1의 활성을 통해 항염증 작용을 나타내고<sup>12)</sup>, 인간 양막의 LTC(4) 생 산에 있어 IL-1beta의 효과를 차단함으로써 항염증 효과를 가진 다는<sup>13)</sup> 항염증 효과와 그 기전에 대한 연구들이 보고되고 있다. 최근에는 黃芪가 뇌손상 또는 신경세포 손상에 대해 보호 효능 이 있다는 연구들이 보고되고 있다<sup>10,11)</sup>.

뇌부종은 뇌조직출혈로 인한 BBB의 손상<sup>15)</sup>과 뇌조직의 염증 <sup>16,17)</sup>으로 인하여 발생하며, 뇌부종의 진행 상태가 환자의 예후관 정에 중요한 지표로 작용한다<sup>19)</sup>.

그러므로 利水消腫의 효능이 있으며, 면역조절과 항염증 효 과 및 뇌손상과 신경세포 손상에 보호 효과를 발휘하는 黃芪가 뇌조직출혈에 따른 뇌부종에 미치는 효과를 연구하고자, 흰쥐의 선조체 내에 콜라겐분해효소를 주사하여 뇌조직출혈과 뇌부종을 유발하고, 黃芪에탄올추출물을 3일간 경구 투여한 후 뇌출혈의 체적과 뇌부종 비율을 측정하였다. 그 결과 黃芪투여군은 대조군 에 비하여 뇌출혈 체적을 약 12.7% 감소시켰으나 통계적 유의성 은 없었으며, 뇌부종 비율은 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 黃芪가 뇌조직출혈을 직접적으로 억제하는 효과는 미약하지 만, 출혈에 따른 이차적인 뇌부종을 억제하는 효능은 확실하며, 이러한 뇌부종의 억제효과는 黃芪의 항염증 작용에 의한 것으로 추측할 수 있다.

뇌조직출혈로 인해 유발되는 뇌조직의 염증반응은 TNF-α 등의 작용을 통하여 iNOS 발현을 증가시켜 nitric oxide (NO) 생 성을 촉진하며<sup>29)</sup>, 이때 iNOS에 의하여 생성된 NO는 peroxynitrite와 hydroxyl radicals를 생성하므로 BBB를 손상시키 고 뇌부종을 유발하는데 중요한 역할을 한다<sup>30-33)</sup>.

그러므로 본 실험에서 iNOS 발현을 면역조직화학염색을 통 하여 관찰한 결과 대조군은 뇌조직출혈이 유발된 부위와 그 주 변부에서 강한 양성반응을 나타내는 것에 비하여, 黃芪투여군은 모든 부위에서 미약한 양성반응을 나타내어 iNOS 발현 억제 효 능이 있는 것으로 나타났다. 이러한 黃芪의 iNOS 발현 억제 효 능은 기존 연구보고들과도 일치하는 결과이며<sup>9,12)</sup>, iNOS 발현 억 제에 의하여 항염증 작용과 함께 뇌부종을 억제하는 효능을 발 휘하는 것으로 생각된다.

또한 뇌조직출혈 주변부에서 신경세포의 변화를 조직학적으로 관찰한 결과 黃芪는 apoptotic body의 증가를 억제하였으며, 정상적 소견의 신경세포 수가 감소되는 것을 억제하는 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 黃芪가 뇌조직출혈 주변부의 신경세 포 손상과 사망에 유의한 효능을 미치는 것을 보여주는 것이라고 생각된다.

이차적으로 黃芪의 신경세포 손상에 대한 보호 효능을 관찰

하기 위하여 뇌조직출혈 주변부에서 c-Fos와 Bax 및 HSP72 발현 을 면역조직화학염색으로 관찰하였다.

c-Fos는 세포에 가해지는 자극에 의하여 즉시적으로 반응을 나타내는 immediate early genes (IEGs)의 일종으로 직접적으로 손상 받은 부위에서 뿐만 아니라 손상부위 바깥영역에서도 발현 된다. 실험연구에 따르면 뇌허혈에 가장 민감한 뇌부위에서 IEGs 발현이 가장 많은 것으로 보고되어 있다<sup>30,31)</sup>.

본 실험에서 면역조직화학염색을 통해 c-Fos 발현을 관찰한 결과, 뇌조직출혈의 주변부에서 대조군과 黃芪투여군 모두 강한 양성반응을 나타내는 세포들이 다수 관찰되었다. 일정면적 당 c-Fos 양성반응 세포 수를 측정한 결과, 黃芪투여군이 대조군에 비해 유의성 있는 c-Fos 양성반응 세포 수의 감소가 관찰되었다. 이러한 실험 결과로 볼 때 黃芪는 뇌출혈로 인한 뇌신경세포의 손상을 억제하는 효능이 있다고 판단된다.

Bax는 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)와 함께 모두 Bcl-2계열의 단백질들로 신경세포가 미토콘드리아의 손상에 의하여 DNA절 단으로 사망하는 자연사기전에 관여하는 주요인자이다<sup>32,33)</sup>. Bax 는 뇌허혈과 같은 다양한 세포 외부로부터의 유해자극에 대하여 신경세포의 손상여부를 결정하거나, 자연사가 일어나는 신경세 포에서 신경세포의 사멸 가능성을 판별할 수 있는 중요한 지표 로 사용되고 있다<sup>34)</sup>.

본 실험에서 면역조직화학염색을 통해 Bax 발현을 관찰한 결과, 뇌조직출혈 주변부에서 대조군과 黃芪투여군 모두 강한 양성반응을 나타내는 세포들이 다수 관찰되었다. 일정면적 당 Bax 양성반응 세포 수를 측정한 결과, 黃芪투여군은 대조군에 비해 유의성 있는 Bax 양성반응 세포 수의 감소가 관찰되었다. 이러한 실험 결과로 볼 때 黃芪는 Bax 발현을 억제함으로써 뇌조직출혈 주변부에서 일어나는 세포 자연사기전을 억제하여 뇌신경세포 손상을 보호하는 효능이 있는 것으로 판단된다.

최근 연구에 의하면 HSP72의 발현은 세포피사 및 세포자연 사를 유발하는 손상으로부터 뇌세포 보호 효과가 있으며, 뇌허혈 이나 amyloid toxicity에 대하여 손상억제 효과가 있다고 보고되 었다<sup>35-37)</sup>.

본 실험에서 면역조직화학염색을 통해 HSP72 발현을 관찰 한 결과, 뇌조직출혈의 주변부에서 대조군과 黃芪투여군 모두 강 한 양성반응을 나타내는 세포들이 다수 관찰되었다. 일정면적 당 HSP72 양성반응 세포 수를 측정한 결과, 黃芪투여군은 대조군에 비해 유의성 있는 HSP72 양성반응 세포 수의 감소가 관찰되었 다. 이러한 실험 결과로 볼 때 黃芪는 HSP72 발현을 억제함으로 써 뇌출혈로 인한 세포 자연사기전을 억제하여 뇌신경세포 손상 을 보호하는 효능이 있는 것으로 판단된다.

최근의 연구보고에 의하면 黃芪는 물론 黃芪의 유효성분 중 하나인 astragaloside가 뇌허혈 손상과 신경세포 손상에 대해 보 호 효능을 발휘한다고 보고되었다<sup>38)</sup>. 그러므로 이러한 기존의 연구보고와 본 실험에서 黃芪가 뇌조직출혈 주변부에서 c-Fos와 Bax 및 HSP72 양성반응 세포를 유의하게 억제하는 작용을 볼 때 黃芪가 신경세포 손상에 대해 보호 효능이 있는 것으로 판단 된다.



본 연구의 결과, 黃芪는 뇌조직출혈을 억제하지는 못하였지만, iNOS 발현을 억제하는 작용에 의하여 뇌조직출혈 후에 이차적으로 유발되는 뇌부종을 억제하는 효능을 발휘하였다. 또한 뇌조직출혈 주변부에서 c-Fos, Bax 및 HSP72 발현의 억제를 통하여 세포자연사를 억제함으로써 신경세포 손상을 보호하는 효능이 있는 것으로 판단된다.

## 결 론

黃芪가 뇌조직출혈에 따른 뇌부종에 미치는 영향을 관찰하고자, 흰쥐의 선조체 내에 콜라겐분해효소를 주사하여 뇌조직출혈과 뇌부종을 유발하고, 黃芪 에탄올추출물을 3일간 경구 투여한 후 뇌출혈의 체적과 뇌부종 비율, 신경세포의 조직학적 변화와 함께 뇌조직에서 iNOS, c-Fos, Bax 및 HSP72 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

黃芪는 대조군에 비해 뇌조직출혈 체적을 유의하게 감소시키지 못하였다. 黃芪는 뇌조직출혈에 의한 뇌부종 비율을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다. 黃芪는 대조군에 비해 뇌조직출혈 부위에서 iNOS 발현, c-Fos, Bax 및 HSP72 양성반응 세포수를 억제하였다. 黃芪는 대조군에 비해 뇌조직출혈 주변부에서 apoptotic body의 증가와 신경세포의 감소를 모두 억제하였다.

이상의 결과로 보아, 黃芪는 뇌조직출혈을 직접적으로 억제하지는 못하지만, iNOS 발현 억제를 통하여 뇌부종을 억제하며, 또한 뇌조직출혈 주변부에서 세포자연사기전 억제를 통하여 신경세포 손상을 보호하는 효능이 있는 것으로 판단된다.

## 감사의 글

이 연구는 2010년도 경원대학교 지원에 의한 결과임.

## 참고문헌

1. 金載益. 臨床本草學講座. 서울, 대성의학사, pp 65-72, 2000.
2. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울, 永林出版社, pp 169-171, 1989.
3. 申吉求. 申氏本草學. 서울, 壽文社, pp 9-12, 80-84, 1982.
4. 李尙仁. 本草學. 서울, 醫藥社, pp 53-55, 100, 1975.
5. 唐愼微. 重修政和經史證類備用本草. 臺北, 大星文化社, p 199, 376, 377, 1983.
6. 李中梓. 醫宗必讀. 臺北, 大方出版社. 卷三, p 76, 79, 1978.
7. 赤松金芳. 新訂和韓藥. 東京, 醫齒出版株式會社, p 183, 184, 317, 318, 1970.
8. 徐富一, 金先熙, 朴淳達, 李克魯. 白朮, 黃芪, 龍葵의 免役調節作用 및 알레르기 低減化에 관한 研究. 方劑學會誌 5(1):184-202, 1997.
9. 朴鎭雄, 高炯均, 金昌煥. 濃度差에 따른 黃芪藥鉞이 Methotrexate를 투여한 생쥐의 면역반응에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 11(1):49-66, 1994.
10. Lee, Y.S., Han, O.K., Park, C.W., Yang, C.H., Jeon, T.W., Yoo, W.K., Kim, S.H., Kim, H.J. Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extracted Astragali radix in RAW 264.7 macrophage cells. J Ethnopharmacol. 100(3):289-294, 2005.
11. He, X., Li, C., Yu, S. Protective effects of radix astragali against anoxic damages to in vitro cultured neurons. J Tongji Med Univ. 20(2):126-127, 2000.
12. Jia, R.Z., Jiang, L., Qiao, L.X. Study on effect of Astragali radix in injury of cerebral cortex in neonatal rats after hypoxia/ischemia brain damage. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 25(1):54-57, 2005.
13. Ryu, M., Kim, E.H., Chun, M., Kang, S., Shim, B., Yu, Y.B., Jeong, G., Lee, J.S. Astragali Radix elicits anti-inflammation via activation of MKP-1, concomitant with attenuation of p38 and Erk. J Ethnopharmacol. 115(2):184-193, 2008.
14. Shon, Y.H., Nam, K.S. Protective effect of Astragali radix extract on interleukin 1beta-induced inflammation in human amnion. Phytother Res. 17(9):1016-1020, 2003.
15. Xi, G., Keep, R.F., Hoff, J.T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. Lancet Neurol. 5(1):53-63, 2006.
16. Feuerstein, G.Z., Wang, X., Barone, F.C. The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. Neuroimmunomodulation. 5(3-4):143-159, 1998.
17. Abbott, N.J. Inflammatory mediators and modulation of blood - brain barrier permeability. Cell Mol Neurobiol. 20: 131-147, 2000.
18. Ropper, A.H. Lateral displacement of the brain and level of consciousness in patients with an acute hemispherical mass. N Engl J Med. 314: 953-958, 1986.
19. Unterberg, A.W., Stover, J., Kress, B., Kiening, K.L. Edema and brain trauma. Neuroscience. 129(4):1021-1029, 2004.
20. Schilling, L., Wahl, M. Mediators of cerebral edema. Adv Exp Med Biol. 474: 123-141, 1999.
21. Stamatovic, S.M., Dimitrijevic, O.B., Keep, R.F., Andjelkovic, A.V. Inflammation and brain edema: new insights into the role of chemokines and their receptors. Acta Neurochir Suppl. 96: 444-450, 2006.
22. Stanimirovic, D., Satoh, K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. Brain Pathol. 10(1):113-126, 2000.
23. Rosenberg, G.A., Mun-Bryce, S., Wesley, M., Kornfeld, M. Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats. Stroke. 21: 801-807, 1990.
24. 著者未詳. 神農本草學. 서울, 翰林社, 卷一 p 26, 卷二 p 8, 1976.
25. 李 梴. 編註醫學入門. 서울, 大星文化社. 內集卷二 pp 157-158, 1990.

26. 許 浚. 對譯東醫寶鑑. 서울, 法仁文化社, p 1924, 2002.
27. 丁宗鐵. 免役と漢方. 東京, 谷口書店. pp 6-16, 1988.
28. 王浴生等. 中藥藥理與應用. 北京, 人民衛生出版社, pp 983-991, 1983.
29. Karupiah, G., Xie, Q.W., Buller, R.M., Nathan, C., Duarte, C., MacMicking, J.D. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science*. 261(5127):1445-1448, 1993.
30. Neumann-Haefelin, T., Wiessner, C., Vogel, P., Back, T., Hossmann, K.A. Differential expression of the immediate early genes c-fos, c-jun, junB, and NGFI-B in the rat brain following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 14: 206-216, 1994.
31. Onodera, H., Kogure, K., Ono, Y., Igarashi, K., Kiyota, Y., Nagaoka, A. Proto-oncogene c-fos is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. *Neurosci Lett*. 98: 101-104, 1989.
32. Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Develop* 13: 1899-1911, 1999.
33. Krajewski, S., Mai, J.K., Krajewska, M., Sikorska, M., Mossakowski, M.J., Reed, J.C. Upregulation of Bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J. Neurosci* 15:6364-6376, 1995.
34. Hara, A., Iwai, T., Niwa, M. Immunohistochemical detection of Bax and Bcl-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 711: 249-253, 1996.
35. Lowenstein, D.H., Chan, P.H., Miles, M.F. The stress protein response in cultured neurons: characterization and evidence for a protective role in excitotoxicity. *Neuron* 7: 1053-1060, 1991.
36. Khomenko, I.P., Bakhtina, L.Y., Zelenina, O.M., Kruglov, S.V., Manukhina, E.B., Bayda, L.A., Malyshev, I.Y. Role of heat shock proteins HSP70 and HSP32 in the protective effect of adaptation of cultured HT22 hippocampal cells to oxidative stress. *Bull Exp Biol Med* 144(2):174-177, 2007.
37. Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., Garrido, C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 12(3):743-761, 2008.
38. Luo, Y., Qin, Z., Hong, Z., Zhang, X., Ding, D., Fu, J.H., Zhang, W.D., Chen, J. Astragaloside IV protects against ischemic brain injury in a murine model of transient focal ischemia. *Neurosci Lett*. 17;363(3):218-223, 2004.