大韓本草學會誌 제25권 제4호(2010년 12월)
Kor. J. Herbology 2010 ; 25(4) : 31-37

仙鶴草가 線條體內出血 흰쥐의 뇌조직 손상에 미치는 영향

최용석, 김연섭*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Neuroprotective Effects of Agrimoniae Herba against Intrastriatal Hemorrhage in Rats

Young-Seuk Choi, Youn-Sub Kim*

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

ABSTRACT

Objects : This study was performed in order to evaluate the effects of Agrimoniae herba (AH) ethanol extract on intrastriatal hemorrhage (ISH).

Method : ISH was induced by the stereotaxic intrastriatal injection of bacterial collagenase type IV in Sprague-Dawley rats. AH was orally given once a day for 3 days after ISH. Hematoma volume and percentage edema were examined. Immunohistochemistry was processed for iNOS, c-Fos, MMP-9, and MMP-12 expressions in the brain sections and each immuno-labeling were calculated with image analysis.

Results : results are as follows;

1. AH reduced the hematoma volume and percentage edema of the ISH-induced rat brain.
2. AH swollen apoptotic bodies and neurons in the peri-hematoma regions of the ISH-induced rat brain.
3. AH significantly reduced c-Fos, MMP-9 and MMP-12 positive cells in the peri-hematoma regions of the ISH-induced rat brain.
4. AH swollen iNOS expressions in the peri-hematoma regions of the ISH-induced rat brain.

Conclusion : These results suggest that AH plays an anti-apoptotic neuroprotective effect through control of ISH, suppression of c-Fos, and down-regulation of MMP-9 and MMP-12 expressions in the brain tissues.

Key words : Agrimoniae herba Hematoma, iNOS, c-Fos, MMP-9, MMP-12

서 론

중풍 즉, 뇌졸중은 뇌혈관의 폐쇄 또는 파열로 인해 뇌의 일부에 혈액이 제대로 공급되지 않아 발생되는 질환으로 악성 종양, 심장 질환과 함께 중요한 사망 원인 중 하나이다[1]. 뇌졸중은 운동 기능장애, 인지 기능장애 등을 수반하여 생존 하더라도 이들 중 40%는 중등도의 기능장애가 있는 상태로 살아가고, 15-30%는 심각한 장애인으로 살아가게 된다[2,3]. 중풍으로 인한 장애의 정도는 다른 장애유형보다 중증 비율이 더 높고, 심각한 후유장애로 인한 막대한 사회적 비용이 소요되며, 개인적인 삶의 질이 저하되는 등 심각한 사회문제로 대두되고 있다[4].

뇌졸중은 뇌경색과 뇌출혈로 구분된다. 최근 뇌혈관 폐쇄에서 오는 뇌경색의 발생빈도가 증가하고 있으나 상대적으로 회복기의 예후가 불량한 뇌조직 출혈에 대한 연구의 중요성 또한 증가하고 있는 추세이다[5,6]. 본 연구에서는 收斂止血 효능이 있어 신체 각부 출혈증에 광범위하게 응용되는 仙鶴草가 뇌조직 출혈에 의한 뇌조직 손상에 미치는 효능을 관찰하고자 하였다.

仙鶴草 (Agrimoniae Herba)는 일명 龍芽草라고도 불리며 장미과에 속하는 짚신나물 (*Agrimonia pilosa* Ledeb.)의 전초를 건조한 것으로 收斂止血, 截瘧止痢 하는 효능이 있다[7]. 실험연구를 통하여 仙鶴草에 항종양 성분이 있으며[8], 유방암 및 전립선암에 대해 효과가 있고[9], 혈전의 형성을 억제하고 출혈시간을 지연시키는 효과가 있다고 보고되었다[10-12]. 仙鶴草에 함유되어 있는 플라보노이드 성분에는 catechin, hyperoside, quercitrin, quercetin, rutin이 있는데[13,14], 이들 성분에는 항산화와 항염증 작용이 있으며[15,16], 뇌허혈 손상에

*교신저자 : 김연섭. 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실.
· Tel : 031-750-5420. · E-mail : ysk5708@hanmail.net.
· 접수 : 2010년 11월 15일 · 수정 : 2010년 12월 4일 · 채택 : 2010년 12월 15일

대한 인지 기능 및 신경 보호 효능이 보고되었다[17-21]. 하지만 仙鶴草가 뇌조직 출혈에 미치는 영향에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 뇌조직 출혈과 이로 인한 뇌부종에 미치는 仙鶴草의 효능을 관찰하기 위하여, 실험동물의 선조체내에 콜라겐 분해효소(collagenase)를 주입하여 선조체내출혈을 유발하였으며, 仙鶴草 에탄올 추출물을 3일간 경구 투여하였다. 이후 뇌조직 출혈의 체적과 뇌부종을 측정하였으며, 신경세포의 조직학적 변화를 cresyl violet 염색 및 c-Fos 발현을 통하여 관찰하고, 뇌부종과 뇌혈관관문 손상에 관여하는 주요인자인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), matrix metalloproteinase (MMP)-9 과 MMP-12 발현을 면역조직화학염색하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 11주령, 약 300 g 전후의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐(Samtako, Korea)를 사용하였다. 흰쥐를 온도 (21-23 ℃), 습도 (40-60 %), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 동물실에서 무균 음수와 사료를 자유롭게 공급하며 키웠으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 仙鶴草 에탄올 추출물 제조 및 투여

본 실험에 사용한 仙鶴草 (Agrimoniae Herba)는 (주)허브메디에서 구입하였다. 세절한 仙鶴草 400 g에 40 % ethanol 3,000 ㎖를 가하여 실온에서 5일간 추출하였으며, 여과액을 회전증발기 (Eyela, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조 (Model 104, ALPHA, W, Germany)하여 140 ㎎/g의 추출물을 얻어 수율은 14.0 % 이었다. 실험동물의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100 g 당 18.7 ㎎을 2 ㎖의 온수에 녹여 선조체내출혈 유발 3시간 후부터 1일 1회 3일간 경구투여 하였다.

3. 실험군의 구분

선조체내출혈에 대한 仙鶴草의 효능을 관찰하기 위하여 실험군은 다음과 같이 구분하였다. 마취와 두정부의 피부절개 및 두개골의 천공 과정을 시행하였으나 뇌조직 내에 collagenase를 주입하지 않은 정상 대조군 (Sham)과 위의 과정과 같은 사전 준비 수술에 이어 線條體에 collagenase를 주입하여 선조체내출혈을 유발시킨 대조군 (Control) 및 대조군과 같이 선조체내출혈을 유발한 다음 3일간 仙鶴草 에탄올 추출물을 경구 투여한 仙鶴草 투여군 (Sample)으로 나누었다. 각 군의 실험동물은 12마리씩 총 36마리로, 뇌조직 출혈과 뇌부종 측정 및 면역조직 화학염색용으로 사용하였다.

4. 선조체내출혈의 유발

선조체내출혈 유발을 위한 수술과정은 electronic temperature controller (CMA150, CMA, Sweden)를 통하여 정상체온 (37±0.5 ℃)이 유지되는 상태에서, 2 % isoflurane을 포함한 70 % N_2O와 30 % O_2 gas의 흡입마취하에서 이루어졌으며, 필요한 경우 추가적으로 pentobarbital sodium (50 ㎎/㎏)을 복강주사 하였다. 수술과정을 간단히 서술하면 다음과 같다[22].

마취된 흰쥐의 머리를 뇌정위고정장치 (Stoelting, USA)에 고정한 다음 두정부의 정중선을 따라 피부를 절개하고 두개골이 드러나게 하였다. 두개골의 bregma로부터 전방으로 0.2 ㎜, 우측으로 3.5 ㎜ 위치에 전기드릴을 사용하여 약 1 ㎜ 직경의 두개골 천공을 만들고, 뇌정위고정장치에 장착된 hamilton 주사기 (26-gauge, 10 ㎕, hamilton, USA)를 뇌경막 (dura mater)으로부터 5.5 ㎜ 깊이로 선조체에 삽입하였다. 이어서 1 ㎕ 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 ㎕/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. 뇌조직 출혈 체적 및 뇌부종의 측정

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

6. 뇌조직의 처리

선조체내출혈 유발 3일 후 실험동물을 pentobarbital의 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05 M PBS와 4 % paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출한 다음 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 담궈 침전시켰다. 다음 뇌를 -40 ℃의 dry ice-isophentane 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80 ℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 20 ㎛ 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 조직 표본을 제작하였다.

8. 면역조직 화학염색

뇌조직을 0.05 M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1 % H_2O_2에서 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 1시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어낸 후 primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 anti-c-Fos (1:500, ab7963, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-iNOS (1:200, 610297, BD, USA), anti-MMP-9 (1:200, AB19016, Chemicon, USA) 및 anti-MMP-12 (1:20, MAB919, R&D, USA)를 사용하였으며, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 반응시켰다. 다음 biotinylated anti-rabbit secondary antibody (1:200, Vector Labolatories, USA)에 실온에서 1시간 동안 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 조직표본을 제작하였다.

9. 면역조직 화학염색 양성반응 세포의 관찰

면역조직 화학법으로 염색된 c-Fos, MMP-9 및 MMP-12 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, 일정 면적 (10^5 ㎛^{2})으로 보정하여 자료로 사용하였다.

10. 통계 처리

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

결 과

1. 뇌조직 출혈 체적의 변화

선조체내출혈 흰쥐에 仙鶴草를 투여한 후 뇌출혈 체적을 측정한 결과, 仙鶴草 투여군은 26.5±1.9 ㎣로 대조군의 30.8±1.1 ㎣에 비하여 유의성 있는 뇌출혈 체적의 감소를 나타내었다 (Fig. 1, 2).

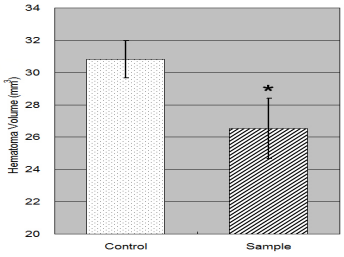

Fig. 1. Effect of Agrimoniae herba on the hematoma volume of ISH-induced rats. * represents $p<0.05$ compared to the hematoma volume of ISH-induced rats of the Control group (n=6).

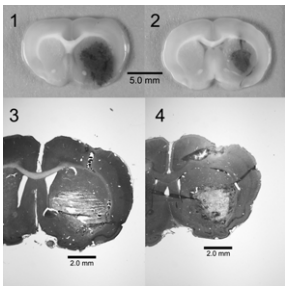

Fig. 2. Representative sections of the ISH-induced rat brain. Section 1 and 3 (hematoxylin and eosin; H&E), Control group; Section 2 and 4 (H&E), Sample group. Sample (Agrimoniae herba) treated rats show a reduction in hematoma volume and edema formation compared to Control group.

2. 뇌부종 비율의 변화

선조체내출혈 흰쥐에 仙鶴草를 투여한 후 정상 측 대뇌반구 체적과 collagenase 주입 측 대뇌반구 체적 및 체적 증가비율을 측정한 결과, Sham군은 각 대뇌반구 체적이 290.5±8.2 ㎣와 295.4±8.4 ㎣로 차이가 없었으며, 대조군은 297.0±10.8 ㎣와 347.5±10.7 ㎣로 선조체내출혈에 의해 117.2±1.4 %로 체적이 증가하였다. 仙鶴草 투여군은 296.2±9.4 ㎣와 335.1±9.2 ㎣로 체적이 113.9±0.7 %로 증가하여 대조군에 비하여 유의성 는 뇌부종 비율의 감소를 나타내었다 (Fig. 2, 3).

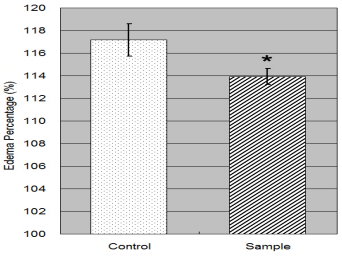

Fig. 3. Effect of Agrimoniae herba on the edema percentage of ISH-induced rats. * represents $p<0.05$ compared to the edema percentage of ISH-induced rats of the Control group (n=6).

3. 신경세포의 조직학적 변화

신경세포의 조직학적 변화를 Cresyl violet 염색을 통하여 관찰한 결과, 선조체내출혈이 유발된 조직에서는 대조군

(Fig. 4-1)과 仙鶴草 투여군 (Fig. 4-2) 모두 정상적인 형태의 신경세포는 관찰할 수 없었고, 세포핵이 심하게 응축된 apoptotic body (arrows)만이 다수 관찰되었다. 대조군 (Fig. 4-3)은 선조체내출혈 주변부에서 많은 수의 apoptotic body (arrow)가 관찰되고 정상적인 소견의 신경세포 (arrow head)는 극히 일부만이 관찰되었다. 이에 비하여 仙鶴草 투여군 (Fig. 4-4)에서는 apoptotic body (arrow)의 수는 대조군에 비해 감소하지 않았으나 정상적인 소견의 신경세포 (arrow head) 수가 증가한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4).

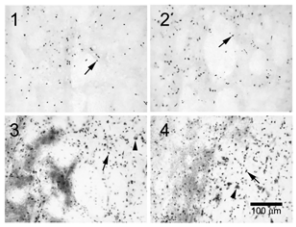

Fig. 4. Cresyl violet-stained representative sections of the ISH-induced rat brain. Section 1, Control hematoma; Section 2, Sample hematoma; Section 3, Control peri-hematoma; Section 4, Sample peri-hematoma. Apoptotic bodies (arrows) in the hematoma and the peri-hematoma are not different from Sample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

4. c-Fos 양성반응 세포 수의 변화

면역조직 화학염색을 통하여 c-Fos 발현을 관찰한 결과, 선조체내출혈의 주변부에서 대조군과 仙鶴草 투여군 모두 강한 양성반응을 나타내는 세포 (arrows) 들이 다수 관찰되었다 (Fig. 5). 일정 면적 (10^{x5} ㎛^{2}) 당 c-Fos 양성반응 세포 수를 측정한 결과, 대조군은 50.5±6.6 개 이었고, 仙鶴草 투여군은 33.5±4.5 개로 대조군에 비하여 유의성 있는 c-Fos 양성반응 세포 수의 감소가 관찰되었다 (Fig. 6).

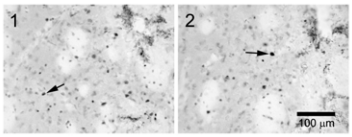

Fig. 5. c-Fos immuno-labeled representative sections of the ISH-induced rat brain. Section 1, Control; Section 2, Sample. Sample (Agrimoniae herba) reduces the number of c-Fos positive cells (arrows) in peri-hematoma compared to the Control group.

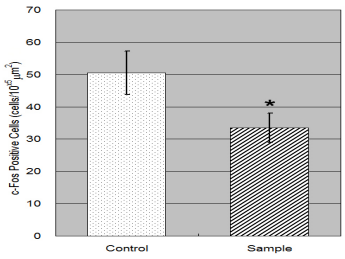

Fig. 6. Effect of Agrimoniae herba on c-Fos positive cells of ISH-induced rats. * represents p<0.05 compared to the number of c-Fos positive cells in peri-hematoma of the Control group (n=6).

5. iNOS 발현의 변화

면역조직 화학염색을 통하여 iNOS 발현을 관찰한 결과, 대조군에서는 선조체내출혈이 유발된 조직과 그 주변부에서 강한 양성반응을 나타내었으며, 특히 선조체내출혈의 중심부 (asterisk)에서 보다는 주변부 (arrows)에서 더 강한 발현을 나타내었다 (Fig. 7-1). 仙鶴草 투여군에서도 역시 뇌선조체 출혈의 중심부와 주변부에서 iNOS의 강한 양성반응이 나타났으며, 그 발현 양상은 대조군과 큰 차이가 없었으나 선조체내 출혈 면적의 감소에 따라 iNOS가 발현된 면적 역시 감소된 것이 관찰되었다 (Fig. 7-2).

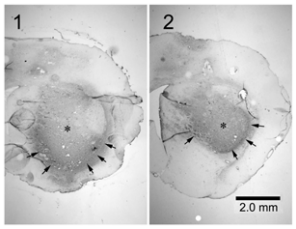

Fig. 7. iNOS immuno-labeled representative sections of the ISH-induced rat brain. Section 1, Control; Section 2, Sample. iNOS expressed with strong intensity on the hematoma (asterisk) and the peri-hematoma (arrows) in both Control and Sample (Agrimoniae herba) groups. Sample group show a reduction of iNOS labeled-area compared to Control group corresponding with reduction of the hematoma area.

6. MMP-9 양성반응 세포 수의 변화

면역조직 화학염색을 통하여 MMP-9 발현을 관찰한 결과, 선조체내출혈의 주변부에서 대조군과 仙鶴草 투여군 모두 강한 양성반응을 나타내는 세포 (arrows) 들이 다수 관찰되었다 (Fig. 8). 일정면적 (10^{x5} ㎛^{2}) 당 MMP-9 양성반응 세포 수를 측정한 결과, 대조군은 40.3±4.0 개 이었고, 仙鶴草 투여군은 24.7±2.4 개로 대조군에 비하여 유의성 있는 MMP-9 양성반응 세포 수의 감소가 관찰되었다.

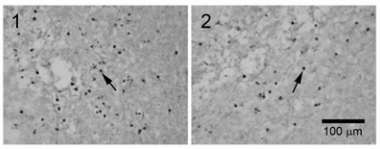

Fig. 8. MMP-9 immuno-labeled representative sections of the ISH-induced rat brain. Section 1, Control; Section 2, Sample. Sample (Agrimoniae herba) reduces the number of MMP-9 positive cells (arrows) in peri-hematoma compared to the Control group.

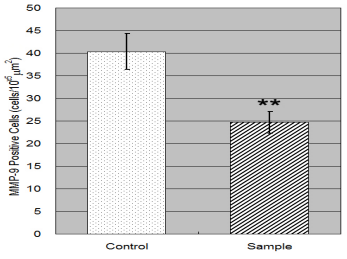

Fig. 9. Effect of Agrimoniae herba on MMP-9 positive cells of ISH-induced rats. ** represents p<0.01 compared to the number of MMP-9 positive cells in peri-hematoma of the Control group (n=6).

7. MMP-12 양성반응 세포 수의 변화

면역조직 화학염색을 통하여 MMP-12 발현을 관찰한 결

과, 선조체내출혈의 주변부에서 대조군과 仙鶴草 투여군 모두 강한 양성반응을 나타내는 세포 (arrows) 들이 다수 관찰되었다 (Fig. 10). 일정 면적 (10^{x5} ㎛^{2}) 당 MMP-12 양성반응 세포 수를 측정한 결과, 대조군은 31.3±2.6 개 였고, 仙鶴草 투여군은 25.2±2.0 개로 대조군에 비하여 유의성 있는 MMP-12 양성반응 세포 수의 감소가 관찰되었다 (Fig. 11).

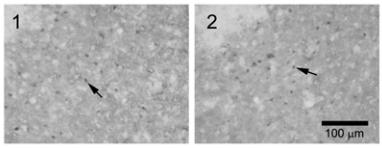

Fig. 10. MMP-12 immuno-labeled representative sections of the ISH-induced rat brain. Section 1, Control; Section 2, Sample. Sample (Agrimoniae herba) reduces the number of MMP-12 positive cells (arrows) in peri-hematoma compared to the Control group.

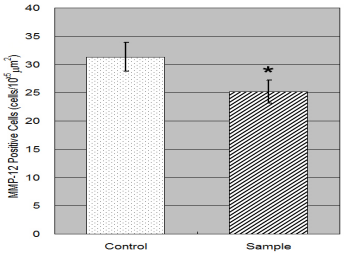

Fig. 11. Effect of Agrimoniae herba on MMP-12 positive cells of ISH-induced rats. * represents p<0.05 compared to the number of MMP-12 positive cells in peri-hematoma of the Control group (n=6).

고 찰

仙鶴草는 catechin, hyperoside, quercitrin, quercetin, rutin 등 5종 이상의 플라보노이드 성분을 함유하고 있다고 보고되고 있다[13,14]. 특히 이 성분들은 항암 및 항종양작용[9,23], 항스트레스[24], 항염증작용[16], oxygen free radical 생성의 억제와 항산화작용이 있어[20] 뇌허혈 손상에 대한 신경세포 보호 효과가 있음도 보고되었다[15,17]. 이러한 연구 보고들을 종합할 때 仙鶴草에 뇌조직 출혈과 이에 따른 신경세포손상을 방지하거나 회복시키는 효능이 있을 것으로 생각되어 연구에 착수하였다.

뇌조직 출혈은 일반적으로 腦出血이라 하며, 허혈성 뇌경색이나 지주막하출혈에 비해 더 높은 사망률과 심각한 장애를 수반하는 것으로 알려져 있으며[3,25] 서양에 비하여 국내의 뇌조직 출혈의 발생빈도는 여전히 높은 수준이다[6].

뇌조직 출혈은 뇌혈관관문의 손상을 초래하여 뇌부종을 유발한다[3]. BBB는 뇌조직 모세혈관의 내피세포들이 폐쇄연접으로 결합되어 구성된 '물리적 장벽' 으로, BBB는 신경세포의 적절한 기능수행을 위한 주변의 미세 환경을 유지하고 조절하는데 중요한 역할을 한다[26,27]. 또한 모세혈관의 내피세포와 모세혈관 주위를 감싸고 있는 성상아교세포 및 신경세포들은 기능적으로 서로 밀접한 관련성을 가지며, 이러한 BBB는 다양한 생리 · 병리적 기전에 관여하고 있다[28,29].

뇌조직의 염증은 histamine과 bradykinin의 분비와 cytokine들의 발현을 통하여 BBB의 폐쇄연접을 느슨하게 만들고 투과성을 증가시켜 뇌부종을 유발한다[30,31]. 이러한 BBB 손상과 투과성 증가에 의한 뇌부종을 혈관성 뇌부종이라 하고, BBB의 손상과 관계없이 세포막에서 Na^+과 K^+의 투과성 증가, 에너지 고갈에 따른 Na^+/ K^+ ion-pump의 장애, 삼투성 용해질의 지속적인 유입 등의 기전에 의하여 세포 내부에 다량의 수분이 유입되어 일어나는 부종은 세포독성 뇌부종으로 분류한다[32,33].

뇌조직 출혈이 유발된 후 일정 시간이 지난 다음 혈종의 성장이 멈추거나 흡수가 시작된다 하더라도, BBB의 투과성 항진과 손상에 의한 혈관성 부종은 지속된다[33]. 그러므로 뇌조직 출혈로 인한 임상증상은 출혈에 의한 직접적인 뇌조직 손상뿐만 아니라 이차적으로 발생하는 뇌부종이 임상증상과 예후를 악화시키는 주요 인자이다[34].

이러한 뇌조직 출혈에 미치는 仙鶴草의 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐의 뇌線條體에 콜라겐 분해효소를 주입하여 선조체내출혈을 유발하고 仙鶴草 에탄올추출물을 3일간 경구 투여하였다. 뇌조직 출혈의 체적과 뇌부종 비율을 측정한 결과 仙鶴草 투여군은 대조군에 비하여 뇌조직 출혈 체적이 유의하게 감소되었으며 뇌부종 역시 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이로 볼 때 仙鶴草가 뇌조직 출혈에 대하여 일정의 억제 효능이 있는 것으로 판단할 수 있다.

또한 신경세포 손상에 대한 영향을 조직학적으로 관찰한 결과 仙鶴草 투여군은 뇌조직 출혈 주변부에서 신경세포 수의 감소를 억제하는 경향을 나타내었으나 증가된 apoptotic body 수를 유의하게 억제하지는 못하였다. 이러한 결과는 仙鶴草가 뇌조직의 출혈은 억제하는 효능이 있지만 신경세포 손상과 사망에는 유의한 효능을 발휘하지 못한다는 것을 의미하는 결과로 해석된다. 한편, 다양한 생리적 및 병리적 자극에 의하여 중추 신경계에서 발현되는 immediate early genes (IEGs)의 일종으로 직접적으로 손상 받은 부위에서 뿐만 아니라 손상부위 바깥영역에서도 발현되며, 실험연구에 따르면 뇌허혈에 가장 민감한 뇌부위에서 IEGs 발현이 가장 많은 것으로 보고되는[35] c-Fos발현을 관찰한 결과 仙鶴草 투여군은 선조체내출혈 주변부에서 c-Fos 양성반응 세포 수를 유의하게 억제하였다. 그러므로 仙鶴草의 신경세포 손상 보호 효능에 대해서는 좀 더 구체적이고 세밀한 실험연구가 필요할 것으로 생각된다.

다양한 뇌손상 상태에서 iNOS에 의하여 생성되는 nitric oxide (NO)는 peroxynitrite와 hydroxyl radicals를 생성하므로 뇌조직 출혈 상태에서 BBB의 손상과 뇌부종 형성에 밀접한 관련이 있다[3,28,31,36]. 또한 NO와 free radicals는 MMPs를 활성화시켜 뇌조직과 BBB의 손상은 물론 신경세포 사망에도 관련 되어 있다[37]. 실험을 통하여 iNOS의 발현을 면역조직화학적 방법으로 관찰한 결과, 仙鶴草 투여군은 선조체내출혈이 유발된 조직과 그 주변부에서 강한 양성반응을 나타내는 것은 대조군과 차이가 없었으나 선조체내출혈 면적의 감소에 따라 iNOS가 발현된 면적이 감소된 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 仙鶴草가 뇌조직 출혈을 억제한 것에 따라 iNOS가 발현된 면적이 감소하기는 하였으나 발현의 강도는 차이가 없는 것으로 보아 仙鶴草의 iNOS발현 억제 효능은 명확하지 못한 것으로 생각된다.

한편으로 뇌조직과 BBB의 손상에 직접적으로 관련된 MMPs의 발현을 관찰하였다. MMP-9은 뇌조직 손상 상태에서 성상아교세포와 미교세포에서 발현이 증가하여 세포외기질

과 BBB를 손상시키며, 이는 IEGs, free radicals와 cytokine들을 활성화 시키고, 활성화된 cytokine들이 다시 MMP-9 발현을 더욱 증가시켜 이차적인 혈관 손상을 유발시키며 신경세포의 사망을 유도하므로 손상이 더욱 악화되는 상태를 만든다[38]. 그러므로 MMP-9 발현을 조절하는 것이 각종 뇌질환의 치료에 매우 도움이 된다. MMP-12 역시 hematoma 주변의 손상된 혈관에서 발현이 증가하며, 이는 중성 백혈구로부터 TNF-α 의 자극에 의하여 증가하는 것으로 혈관의 손상과 부종의 형성에 관여한다고 하였다[39].

그러므로 본 연구에서 仙鶴草가 선조체내출혈로 인한 뇌조직 출혈 체적과 뇌부종을 억제하는 효능이 MMPs 발현을 조절하는 작용에 의한 것인지를 관찰하기 위해서 仙鶴草가 MMP-9과 MMP-12 발현에 미치는 영향을 면역조직화학염색을 통하여 관찰하였다. 그 결과, 仙鶴草 투여군은 선조체내출혈 주변부에서 MMP-9과 MMP-12 양성반응 세포 수를 유의하게 억제하였다. 이것은 仙鶴草의 성분인 quercetin이 MMPs 발현을 억제하여 항암작용을 한다는 보고와[9] MMP-9 발현을 억제함으로써 국소 뇌허혈의 뇌조직 손상을 억제한다는 연구보고와[23] 일치되는 결과이다. 그러므로 仙鶴草의 뇌조직 출혈과 뇌부종의 억제효능은 iNOS 발현 억제보다는 MMPs 발현 억제를 통하여 나타나는 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 종합하면, 仙鶴草는 뇌조직 출혈과 이에 따른 뇌부종을 억제하는 효능이 있으며, 이러한 효능은 仙鶴草가 MMP-9과 MMP-12의 발현을 억제하여 뇌조직 출혈 주변부의 뇌조직 손상을 보호하는 기전에 의한 것으로 판단된다.

결 론

뇌조직 출혈에 대한 仙鶴草의 효과를 연구하고자, 흰쥐의 線條體 내에 콜라겐분해효소를 주사하여 선조체내출혈을 유발시켰다. 仙鶴草 에탄올 추출물을 3일간 경구투여한 후 뇌조직 출혈의 체적과 뇌부종 비율, 신경세포의 변화를 조직학적 변화와 c-Fos 발현을 통해 관찰하였으며, 뇌조직 손상과 관련된 iNOS, MMP-9 및 MMP-12 발현을 면역조직 화학염색을 통하여 관찰한 바 아래와 같은 결론를 얻었다.

1. 仙鶴草는 뇌출혈 체적과 뇌부종 비율을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다.

2. 仙鶴草는 선조체내출혈 주변부에서 apoptotic body의 증가를 억제하지 못하였으나 신경세포의 감소를 억제하였다.

3. 仙鶴草는 선조체내출혈 주변부에서 c-Fos 양성세포 수를 대조군에 비해 유의하게 억제하였다.

4. 선조체내출혈 부위에서 仙鶴草의 iNOS 발현 양상은 대조군에 비해 차이가 없었다.

5. 仙鶴草는 선조체내출혈 주변부에서 MMP-9 양성세포 수를 대조군에 비해 유의하게 억제하였다.

6. 仙鶴草는 선조체내출혈 주변부에서 MMP-12 양성세포 수를 대조군에 비해 유의하게 억제하였다.

이상의 결과로 보아, 仙鶴草는 뇌조직 출혈과 이에 따른 뇌부종을 억제하는 효능이 있다.

감사의 말씀

이 연구는 2010년도 경원대학교 지원에 의한 결과임.

참고문헌

1. 김영석. 중풍의 병인병리, 변증 및 치료. 한방성인병학회지. 1995;1:113-140.
2. Badjatia N, Rosand J. Intracerebral hemorr- hage. Neurologist. 2005;11 (6):311-324.
3. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. Lancet Neurol. 2006;5(1):53-63.
4. Grant JS, Elliott TR, Weaver M, Glandon GL, Raper JL, Giger JN. Social support, social proble-msolving abilities, and adjustment of family care-givers of stroke survivors. Arch Phys Med Reha-bil. 2006;87(3): 343-350.
5. 명호진, 이상복, 노재규, 윤병우, 이원용, 권오상. 최근 국내 뇌졸중의 역학적 동향에 대한 연구. 대한신 경과학회지. 1989;7:179-187.
6. 이병철, 유경호. 국내 뇌졸중의 역학. 대한의사협 회지. 2002;45:1415-1421.
7. 강병수, 고운채, 김선희, 노승현, 송승준, 신민교, 안덕균, 이상인, 이영종, 이강희, 주영승. 본초학. 서울 : 영림사. 1991: 384-386.
8. Koshiura R, Miyamoto K, Ikeya Y, Taguchi H. Antitumor activity of methanol extract from roots of Agrimonia pilosa Ledeb. Jpn J Pharmacol. 1985 May;38(1):9-16.
9. Vijayababu MR, Arunkumar A, Kanagaraj P, Venkataraman P, Krishnamoorthy G,Arunakaran J. Quercetin downregulates matrix metalloprotei nases 2 and 9 proteins expression in prostatic cansar cells(PC-3). Mol Cell Biochem. 2006 Jul; 287(1-2):109-16. Epub 2006 Apr 28.
10. Hsu MF, Young JH, Wang JP, Teng CM. Effect of hsien-ho-t'sao (Agrimonia pilosa) on experi-mental thrombosis in mice. Am J Chin Med. 1987 ;15(1-2):43-51.
11. Wang JP, Hsu MF, Teng CM. Antiplatelet effect of hsien-ho-t'sao (Agrimonia pilosa). Am J Chin Med. 1985;13(1-4):109-18.
12. Wang JP, Hsu MF, Teng CM. Antihemostatic effect of Hsien-Ho-T' sao (Agrimonia pilosa). Am J Chin Med. 1984 Summer;12(1-4):116-23.
13. Xu X, Qi X, Wang W, Chen G. Separation and determination of flavonoids in Agrimonia pilosa Ledeb. by capillary electrophoresis with elect-

rochemical detection. J Sep Sci. 2005 May;28 (7) :647-52.
14. Pan Y, Liu HX, Zhuang YL, Ding LQ, Chen LX, Qiu F. [Studies on isolation and identification of flavonoids in herbs of Agrimonia pilosa][Article in Chinese]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2008 Dec;33 (24):2925-8.
15. Kumar A, Sehgal N, Kumar P, Padi SS, Naidu PS. Protective effect of quercetin against ICV colchicine-induced cognitive dysfunctions and oxidative damage in rats. Phytother Res. 2008 Dec;22(12):1563-9.
16. Rezai-Zadeh K, Ehrhart J, Bai Y, Sanberg PR, Bickford P, Tan J, Shytle RD. Apigenin and lute- olin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. J Neuroinf -lammation. 2008 Sep;25;5:41.
17. Zhong Yao Cai. Neuroprotective effects of apigenin on acute transient focal cerebral ische- mia-reperfusion injury in rats. 2008 Jun;31(6): 870-3.
18. Yao Y, Han DD, Zhang T, Yang Z. [Epub ahe- ad of print] Quercetin improves cognitive deficits in rats with chronic cerebral ischemia and inhibi- ts voltage-dependent sodium channels in hippo- campal CA1 pyramidal neurons. Phyto -ther Res. 2009 Aug 17.
19. Ossola B, Kääriäinen TM, Männistö PT. The multiple faces of quercetin in neuroprotection. Ex pert Opin Drug Saf. 2009 Jul;8(4):397-409.
20. Ansari MA, Abdul HM, Joshi G, Opii WO, But- terfield DA. Epub 2008 Jul 7. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42) : relevance to Alzheimer's disease. J Nutr Bioc- hem. 2009 Apr;20 (4):269-75.
21. Silva B, Oliveira PJ, Dias A, Malva JO. Quer- cetin, kaempferol and biapigenin from Hypericum perforatum are neuroprotective against excitot- oxic insults. Neurotox Res. 2008 May-Jun;13 (3- 4):265-79.
22. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats. Stroke. 1990;21:801-807.
23. Cho JY, Kim IS, Jang YH, Kim AR, Lee SR. Epub 2006 Jun 27. Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. Neurosci Lett. 2006 Sep 1;404(3):330-5.
24. Kumar A, Goyal R. Quercetin protects agai- nst acute immobilization stress-induced behavi- ors and biochemical alterations in mice. J Med Food. 2008 Sep;11(3):469-73.
25. J ø rgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Intracerebral hemorrhage versus infarction: stroke severity, risk factors, and prognosis. Ann Neurol. 1995;38:45-50.
26. Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. Prog Drug Res. 2003;61:39-78.
27. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. Vascul Pharmacol. 2002; 38(6): 323-337.
28. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astro- cyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci. 2006;7(1):41-53.
29. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain bar- rier/neurovascular unit in health and disease. P- harmacol Rev. 2005;57(2):173-185.
30. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. Neuroimmunomodulation. 1998;5(3 -4):143-159.
31. Abbott NJ. Inflammatory mediators and mod- ulation of blood-brain barrier permeability. Cell Mol Neurobiol. 2000;20:131-147.
32. Unterberg AW, Stover J, Kress B, KieningKL. Edema and brain trauma. Neuroscience. 2004; 129 (4):1021-1029.
33. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Pathophysiology of brain edema formation. Neurosurg Clin N Am. 2002;13:371-383.
34. Ropper AH. Lateral displacement of the brain and level of consciousness in patients with an acute hemispheral mass. N Engl J Med. 1986;314 : 953- 958.
35. 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. 1989; 98:101-104.
36. Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. Free Radic Biol Med. 2005;39(1):51-70.
37. Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, Sato Y, Hiraga N, Adachi N, Yoshino T, Nishibori M. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain inf- arction induced by transient ischemia in rats. FA -SEB J. 2007;21(14):3904-3916.
38. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metall- oproteinases in cerebrovascular disease. J Cereb Blood Flow Metab. 1998;18:1163-1172.
39. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. Nat Rev Neurosci. 2001;2: 502-511.