

補陽還五湯이 흰쥐 뇌출혈 손상에 미치는 영향에 대한 면역조직화학 연구

차재덕 · 이준석 · 신정원 · 김성준 · 강 희 · 손낙원*

경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공

Neuroprotective Effects of *Boyanghwano-tang* on Intracerebral Hemorrhage-Induced Rats Using Immunohistochemistry

Jae Deog Cha, Joon Suk Lee, Jung Won Shin, Seong Joon Kim, Hee Kang, Nak Won Sohn*

Division of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

This study was performed in order to evaluate the neuroprotective effect of *Boyanghwano-tang* (BYT) water extract on intracerebral hemorrhage (ICH). ICH was induced by the stereotaxic intrastriatal injection of bacterial collagenase type IV in Sprague-Dawley rats. BYT was orally given once a day for 3 days after ICH. Hematoma volume and percentage edema were examined. As inflammatory markers, myeloperoxidase (MPO)-positive neutrophils infiltration and iNOS expression in the peri-ICH regions were examined using immunohistochemistry. As cellular damage markers, c-Fos, Bax, and HSP72 positive cells in the peri-ICH regions were measured also. BYT significantly reduced the hematoma volume and percentage edema of the ICH-induced rat brain. In the peri-hematoma regions, BYT significantly reduced MPO-positive neutrophil infiltration and iNOS expression of the ICH-induced rat brain. Additionally, BYT significantly reduced c-Fos, Bax, and HSP72 positive cells in the peri-hematoma regions of the ICH-induced rat brain. These results suggest that BYT plays a neuroprotective role against ICH through suppression of inflammatory responses, apoptosis and cellular damage.

Key words : Intracerebral hemorrhage, *Boyanghwano-tang*, MPO-positive neutrophil, iNOS, c-Fos, Bax, HSP72.

서 론

補陽還五湯은 王清任의 「醫林改着」에서 처음 입방된 처방으로, 中風, 半身不隨, 偏枯, 筋肉 痙攣과 維縮의 元氣不足에 의한 瘀血증상에 적용하기 위해 立方되었다¹⁾. 이 처방은 補氣하는 黃芪와 活血祛瘀하는 當歸尾, 赤芍藥, 川芎, 桃仁, 紅花 및 通經活血하는 地龍으로 구성된다²⁾. 보양환오탕의 주 적응증인 中風은 허혈성 뇌졸중의 범주에 속하며, 현재의 각종 연구들은 보양환오탕의 뇌혈관질환에 대한 효과에 대해 여러 가지 성과들을 보고하고 있다. 보양환오탕은 뇌혈관 질환에 의한 편마비 환자에 유의한 효과가 있다고 하였고³⁾, 흰쥐에 일으킨 혈전증에 대해 혈액응고와 관련된 단백질이나 지표들을 감소시켰다^{4,5)}. 또한 동물실험

상 혈압과 국소 뇌혈류를 개선하는 효능이 있다⁶⁾고 보고되었으며 가역적 전뇌허혈 실험모델에서도 유의한 억제효과가 확인되었다⁷⁾. 보양환오탕의 뇌신경세포 보호에 대한 기전 연구로서, PC12 세포에 영양성분과 당을 제거하여 자연사 (apoptosis)를 유도했을 때 산화적 스트레스를 감소하여 세포사를 억제하는 것으로 보고되었다⁸⁾.

중풍, 즉 뇌졸중은 뇌출혈 또는 뇌허혈 등으로 인하여 운동 기능장애와 인지기능장애 등을 수반하는 질환으로 세계적으로 성인 사망의 3대 원인 중 하나일 뿐 아니라 국내에서는 수년간 전체 사망원인 중 악성신생물에 이어 두 번째로 사망율이 높은 질환이다⁹⁾. 뇌출혈은 뇌기질의 직접적인 출혈을 말하는 것으로 혈압 상승 등으로 인해 뇌동맥에 손상이 발생해 혈액이 누출된 상태를 일컫는다¹⁰⁾. 뇌졸중의 원인 중 뇌출혈이 서양에서는 전체 뇌졸중의 10-15%를 차지하지만 동양인에서는 30%이며 점차 감소되는 추세이기는 하지만 여전히 높은 비율로 발생하고 있다¹¹⁾. 또한 뇌출혈에 의한 회복은 비슷한 크기의 허혈성 뇌경색에 비

* 교신저자 : 손낙원, 경기도 용인시 기흥동 서전동, 경희대학교 전자정보관
· E-mail : sohnw@khu.ac.kr, · Tel : 031-201-2747
· 접수 : 2011/09/02 · 수정 : 2011/09/26 · 채택 : 2011/10/06

하면 회복기의 예후가 더욱 나쁜 것으로 알려져 있다¹²⁾.

뇌출혈로 인한 신경학적 손상 기전은 뇌조직의 물리적인 직접손상, 세포독성에 의한 자연사와 괴사, 뇌부종, 그리고 염증반응 등을 들 수 있다¹³⁾. 이중 뇌부종은 혈관성, 세포독성, 뇌수종성, 그리고 삼투압성 부종의 네 가지로 분류되는데, 뇌출혈에 동반되는 급성기 뇌부종은 대부분 혈관성부종에 의한 것으로 여겨지고 있다¹⁴⁾. 혈관성 부종은 뇌혈관의 상피세포가 파괴되어 blood-brain barrier (BBB)가 제기능을 수행하지 못하는 것과 깊은 관련이 있다. BBB는 혈관내피세포와 이를 에워싸는 성상아교세포, 혈관주위세포 및 기저막으로 구성되어 있으며, 혈관내피세포 간에는 창 (fenestra)이 없는 폐쇄막 (tight junction)으로 되어 있으므로 뇌조직과 혈액의 물질교환은 매우 제한적이며, 염증세포가 뇌조직 내로 침입하는 것을 막아준다^{15,16)}. 이러한 BBB가 파괴될 경우 혈장이 뇌조직 내로 쉽게 유입되고 아울러 호중구 (neutrophil)를 비롯한 여러 염증세포가 침범하면서 기저막을 분해하는 효소들이 분비되어 뇌손상은 더욱 악화된다¹⁷⁾.

뇌부종은 뇌허혈과 뇌출혈 등 모든 뇌혈관질환에서 임상증상과 예후를 악화시키는 주요 인자임에도 불구하고¹⁸⁾ 이에 대한 한의학적 접근은 매우 부족하다. 그러므로 본 연구에서는 보양환오탕이 뇌허혈 손상과 뇌신경세포 손상에 유효한 효과를 나타낸다는 이전 연구 결과에 근거하여, 뇌출혈 손상과 그에 따른 뇌부종에 미치는 영향을 관찰해보고자 하였다. 흰쥐의 대뇌 선조체에 콜라겐분해효소 (collagenase)를 주입하여 뇌출혈과 뇌부종을 유발시키고 보양환오탕 물추출물을 3일간 경구투여한 다음 뇌출혈 크기 및 뇌부종 비율을 관찰하였으며, 뇌출혈 주변부의 염증조건에서 나타나는 호중구 침윤과 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 신경세포 손상에서 나타나는 c-Fos, Bax 및 heat shock protein (HSP) 72 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료와 방법

1. 실험동물

실험동물은 샘타코 (Samtako, Korea)에서 구입한 11주령, 약 300 g 전후의 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, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물의 제조 및 투여

본 실험에 사용한 한약물은 보양환오탕 (Boyanghwano-tang, BYT)으로 처방 구성약물은 Table 1과 같으며, 각 한약제는 (주)허브메디에서 구입하였다. 보양환오탕 10첩 분량 700 g에 5,000 ml의 물을 가하여 전탕하고, 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조 하였다. 79.5 g의 추출물을 얻어 수율은 11.4% 이었으며, 1000 mg/kg을 실험동물의 1회 투여량으로 하여 뇌출혈 유발 3시간 후부터 1일 1회 3일

간 경구투여 하였다.

Table 1. Herbal Constitution of *Boyanghwano-tang*

Herbs		Weight(g)
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	40.0
當歸(尾)	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	8.0
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	6.0
蚯蚓	<i>Lumbricus</i>	4.0
川芎	<i>Conidii Rhizoma</i>	4.0
桃仁	<i>Percicae Semen</i>	4.0
紅花	<i>Carthami Flos</i>	4.0
Total		70.0

3. 실험군의 구분

뇌출혈에 대한 보양환오탕의 효능을 관찰하기 위하여 실험군은 다음과 같이 구분하였다. 마취와 두정부의 피부절개 및 두개골의 천공 과정은 시행하였으나 collagenase를 주입하지 않은 Sham군과 이러한 사전준비에 이어 선조체에 collagenase를 주입하여 뇌출혈을 유발시킨 대조군 (Control군) 및 대조군과 같이 뇌출혈을 유발한 다음 3일간 보양환오탕 물추출물을 경구투여한 보양환오탕투여군 (Sample군)으로 나누었다. 각 군의 실험동물은 12마리씩으로 구성되었고, Sham군의 조직은 염색과정 등에서 정상군으로 사용하였으며, 그 자료는 실험결과로 제시하지 않았다.

4. 뇌출혈의 유발

뇌출혈 유발을 위한 수술과정은 electronic temperature controller (CMA150, CMA, Sweden)를 통하여 정상체온 (37±0.5°C)이 유지되는 상태에서, 2% isoflurane을 포함한 70% N₂O와 30% O₂ gas의 흡입마취 하에서 이루어졌으며, 필요한 경우 추가적으로 pentobarbital sodium (50 mg/kg)을 복강주사 하였다. 수술과정을 간단히 서술하면 다음과 같다¹⁹⁾.

마취된 흰쥐의 머리를 뇌정위고정장치 (Stoelting, USA)에 고정된 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 직경의 구멍을 만들고, 뇌정위고정장치에 장착된 Hamilton 주사기 (26-gauge, 10 µl, Hamilton, USA)를 뇌경막 (dura mater)으로부터 5.5 mm 깊이로 선조체에 삽입하였다. 이어서 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 1 µl를 주입하였다. Collagenase 용액의 주입이 끝난 후에도 약 10분간 Hamilton 주사기를 유지하여 collagenase 용액의 역류를 방지하였으며, 이후 Hamilton 주사기를 제거하고 구멍은 bone wax로 메운 다음 절개한 두정부의 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다.

5. 뇌출혈 체적 및 뇌부종 비율의 측정

뇌출혈 유발 3일 후 실험동물을 과용량의 pentobarbital 복

강주사로 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, NIH)를 사용하여 각 뇌 절편 영상으로부터 정상측 대뇌반구 (intact hemisphere)와 출혈측 대뇌반구 (hemorrhagic hemisphere) 및 뇌출혈의 면적을 측정하고, 각각의 면적에 뇌 절편의 6장의 두께를 곱하여 체적을 계산하였다. 그러므로 실험결과 자료로 제시된 대뇌반구의 체적은 좌우 대뇌반구의 총체적이 아니라 collagenase 주입 위치를 기준한 6장 뇌 절편의 대뇌반구 체적이다. 뇌부종 비율은 정상측 대뇌반구 체적에 대한 출혈측 대뇌반구 체적의 증가 비율로 계산하였다.

6. 뇌조직의 처리

뇌출혈 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 담귀 침전시켰다. 다음 뇌를 -40℃의 dry ice-isophentane 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 20 μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

7. 면역조직화학염색

뇌조직을 0.05 M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 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 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후 1차항체를 처리하였다. 1차항체는 anti-iNOS (1:200, 610297, BD, USA), anti-c-Fos (1:500, ab7963, Santa Cruz Biotechnology, 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℃에서 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 조직표본을 제작하였다.

8. 면역형광염색

뇌조직 절편을 면역조직화학염색 과정과 동일하게 처리하였으며, 호중구를 관찰하기 위해서 호중구 표식자인 myeloperoxidase (MPO)에 대해서 1차항체는 anti-MPO (1:250, A-0398, DAKO, USA)를, 2차항체는 Cy5-conjugated goat

anti-rabbit (1:200, ab6564, Abcam, UK)를 사용하여 면역형광염색을 수행하였다.

9. 양성반응 세포의 관찰

면역조직화학법으로 염색된 iNOS, c-Fos, Bax 및 HSP72 발현은 CCD카메라 (DP70, Olympus, Japan)가 장착된 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였으며, MPO의 면역형광염색된 뇌조직은 confocal laser-scanning microscopy (LSM510 META, Carl Zeiss, Germany)를 사용하여 관찰하였다. 각 지표의 발현 정도는 양성반응 세포 수를 측정하여 비교하였다. 양성반응 세포 수 측정을 위해서 각각의 영상을 영상분석 시스템에 저장하고, ImageJ software (ver. 1.41, NIH, USA)를 사용하여 뇌출혈 주변부에서 양성반응 세포 수를 측정된 다음 일정면적 (10⁵ μm²)으로 보정하여 자료로 사용하였다.

10. 통계처리

측정된 모든 자료는 Student's t-test를 사용하여 대조군과 보양환오탕투여군 사이에서 p <0.05, p <0.01 및 p <0.001의 유의수준으로 검정하였다.

결 과

1. 뇌출혈 크기의 변화

뇌출혈을 유발한 흰쥐에 보양환오탕을 투여한 후 뇌출혈 크기를 측정된 결과, Control군은 30.2±1.5 mm³ 이었으며, 이에 비하여 보양환오탕투여군은 24.0±1.4 mm³로 뇌출혈 크기가 유의하게 (p <0.01) 감소하였다(Fig. 1, 2).

2. 뇌부종 비율의 변화

뇌출혈을 유발한 흰쥐에 보양환오탕을 투여한 후 정상측 대뇌반구와 출혈측 대뇌반구의 면적 (Table 2에 제시)으로부터 뇌부종 비율을 측정된 결과, Control군은 117.3±1.3%로 증가하였으며, 이에 비하여 보양환오탕을 투여한 군은 112.7±1.8%로 증가하여 뇌부종 비율이 유의성 (p <0.05) 있게 감소하였다(Table 2, Fig. 3).

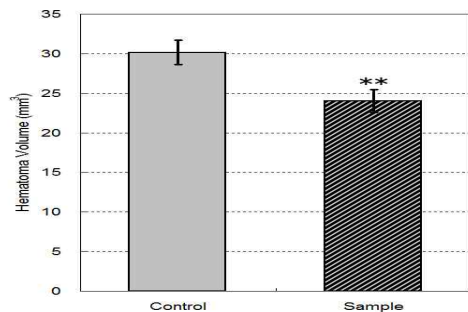


Fig. 1. Effect of *Boyanghwano-tang* (BYT) on the hematoma volume of Intracerebral hemorrhage (ICH)-induced rats. BYT (Sample) significantly reduces the hematoma volume of ICH-induced rats compared with Control group (**, p <0.01; n=6).

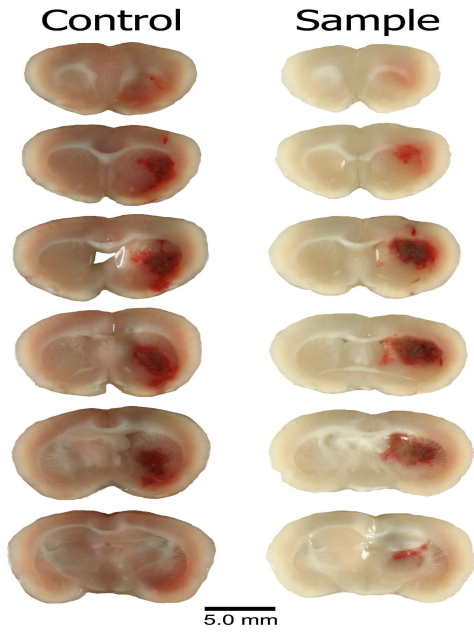


Fig. 2. Representative brain slices of ICH-induced rats. Red colored regions on slices indicate the hematoma induced by collagenase injection. BYT-treated rats (Sample) reduce hematoma volume compared with Control group.

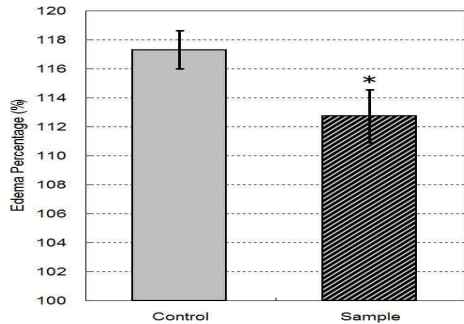


Fig. 3. Effect of BYT on percentage of brain edema in ICH-induced rats. BYT (Sample) significantly reduces the edema percentage of hemorrhagic hemisphere compared with Control group (*, $P < 0.05$; $n=6$).

Table 2. Effect of BYT on Percentage of Brain Edema in ICH-Induced Rats

	Volume of Intact Hemisphere (mm ³)	Volume of Hemorrhagic Hemisphere (mm ³)	Edema Percentage (%)
Control	298.7 ± 11.3	349.8 ± 10.9	117.3 ± 1.3
Sample	309.1 ± 8.1	339.4 ± 6.5	112.7 ± 1.8*

Control: intracerebral hemorrhage (ICH)-induced group. Sample: BYT administrated group after ICH. Data represent mean ± S.E. ($n=6$). *, $p < 0.05$ versus Control group (Student's t-test)

3. 호중구 침윤의 변화

뇌출혈 주변조직에서 호중구 침윤을 관찰하기 위해 동일한 일정면적의 조직에서 MPO의 형광염색에 양성반응을 보이는 세포 수를 측정된 결과, Control군은 64.3 ± 7.2 개가 관찰되었으며 이에 비하여 보양환오탕 투여군은 45.2 ± 4.9 개가 관찰되어 호중구 침윤이 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다(Fig. 4).

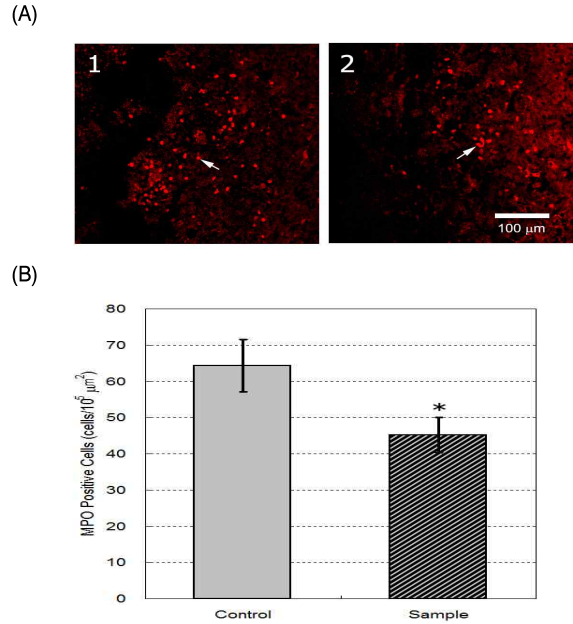


Fig. 4. Effect of BYT on MPO positive cells in the peri-hematoma of ICH-induced rats. (A) Representative sections of fluorescence MPO-labeled neutrophils in peri-hematoma. Arrows indicate MPO positive cells (1: Control group 2: BYT group). (B) The number of MPO positive cells in peri-hematoma. BYT (Sample) significantly reduces the number of MPO positive cells compared with Control group (*, $p < 0.05$; $n=6$).

4. iNOS 발현의 변화

뇌출혈을 유발한 흰쥐에 보양환오탕을 투여한 후 출혈측 대뇌반구에서 iNOS 발현을 관찰한 결과, Control군은 선조체내 collagenase 주입에 의하여 조직이 손상되고 출혈이 일어난 부위에서 높은 강도의 iNOS 발현이 관찰되었으며 (Fig. 5-1), 보양환오탕을 투여한 군은 Control군에 비해 iNOS 발현 면적이 감소한 경향을 나타내었으나 염색강도는 변화가 없었다(Fig. 5-2).

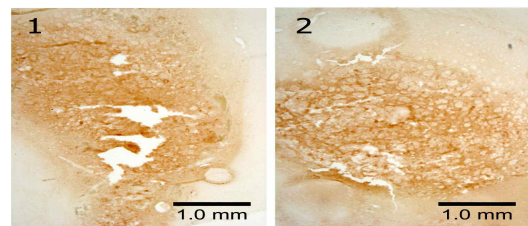


Fig. 5. Effect of BYT on iNOS expression in the hemorrhagic hemisphere of ICH-induced rats. Brown colored regions indicate iNOS positive region (1: Control group 2: BYT group). BYT reduces the area of iNOS expression in hemorrhagic hemisphere compared with Control group, but there is no difference in the intensity of iNOS expression between two groups.

5. c-Fos 발현의 변화

뇌출혈을 유발한 흰쥐에 보양환오탕을 투여한 후 출혈측 대뇌반구 뇌출혈 주변부 일정면적에서 c-Fos 면역염색에 양성반응을 나타낸 세포 수를 측정된 결과 Control군은 42.5 ± 4.1 개가 관찰되었으며, 이에 비하여 보양환오탕을 투여한 군은 20.2 ± 2.2 개가 관찰되어 매우 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 6-A-1, 6-A-2, 6-B). 또한 출혈이 유발된 대뇌반구의 선조

체 주변 대뇌피질에서도 c-Fos 양성반응 세포의 변화가 관찰되었으며, 그 수를 측정할 때 Control군은 33.5±4.0 개, 보양환오당을 투여한 군은 21.7±2.7 개로 역시 유의성 ($p < 0.05$) 있는 감소가 관찰되었다(Fig. 6-A-3, 6-A-4, Fig. 6-B).

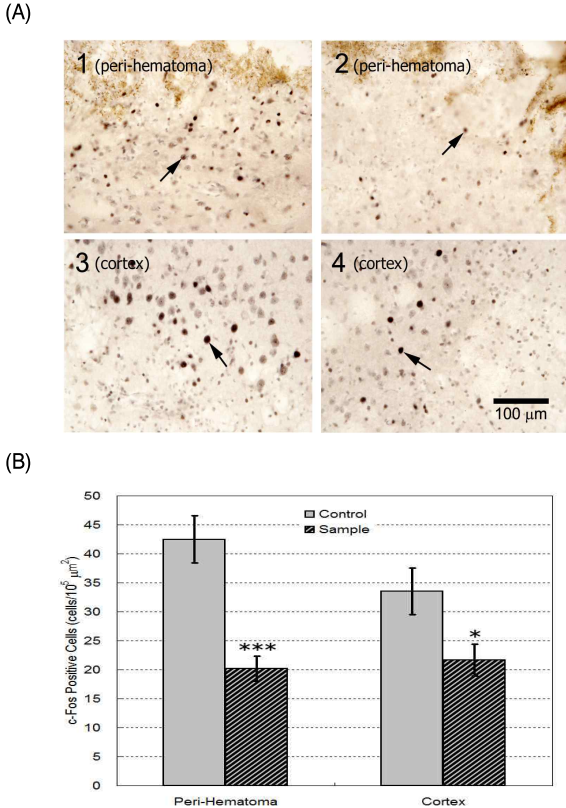


Fig. 6. Effect of BYT on c-Fos expression in hemorrhagic hemisphere of ICH-induced rats. (A) Representative sections of c-Fos immuno-labeled cells in the peri-hematoma and the cortex. Arrows indicate c-Fos positive cells (1, 3: Control group, 2, 4: BYT group). (B) The number of c-Fos positive cells in the peri-hematoma and the cortex. BYT (Sample) significantly reduces the number of c-Fos positive cells in both the peri-hematoma and the cortex compared with Control group (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; $n=6$).

6. Bax 발현의 변화

뇌출혈 주변조직에서 Bax 발현의 변화를 관찰하기 위해 동일한 일정면적의 조직에서 Bax의 면역조직화학염색에 양성반응을 보이는 세포 수를 측정할 결과, Control군은 24.0±2.3 개가 관찰되었으며, 이에 비하여 보양환오당을 투여한 Sample군은 14.5±2.1 개가 관찰되어 유의성 ($p < 0.01$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 7-A, 7-B).

7. HSP-72 발현의 변화

뇌출혈 주변조직에서 HSP-72 발현의 변화를 관찰하기 위해 동일한 일정면적의(10⁵ μm²) 조직에서 HSP-72의 면역조직화학염색에 양성반응을 보이는 세포 수를 측정할 결과, Control군은 21.3±1.2 개가 관찰되었으며, 이에 비하여 보양환오당을 투여한 군은 12.0±1.5 개가 관찰되어 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 8-A, 8-B).

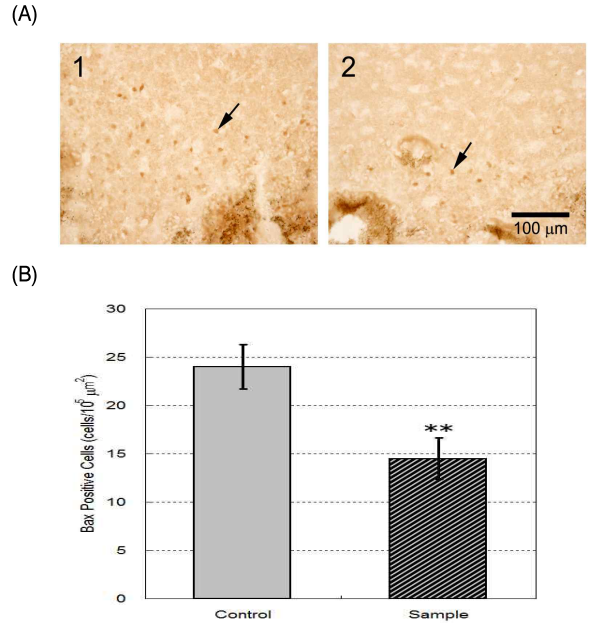


Fig. 7. Effect of BYT on Bax positive cells in the peri-hematoma of ICH-induced rats. (A) Representative sections of Bax immuno-labeled cells in peri-hematoma. Arrows indicate Bax positive cells (1: Control group 2: BYT group). (B) The number of Bax positive cells in the peri-hematoma. BYT (Sample) significantly reduces the number of Bax positive cells compared with Control group (**, $p < 0.01$; $n=6$).

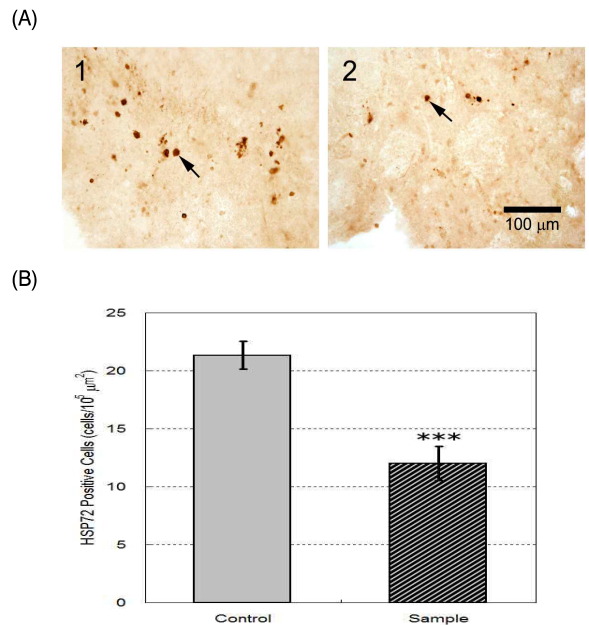


Fig. 8. Effect of BYT on HSP-72 positive cells in the peri-hematoma of ICH-induced rats. (A) Representative sections of HSP-72 immuno-labeled cells in peri-hematoma. Arrows indicate HSP-72 positive cells (1: Control group 2: Sample group). (B) The number of HSP-72 positive cells in the peri-hematoma. BYT (Sample) significantly reduces the number of HSP-72 positive cells compared with Control group (***, $p < 0.001$; $n=6$).

고찰

한의학에서 중풍은 風, 火熱, 氣血虛, 濕痰, 瘀血 등의 원인

으로 발병되며, 祛風通絡, 清熱, 補氣血, 除濕化痰, 活血祛瘀 등의 처방을 사용한다^{20,21}). 중풍에 대한 한의학의 처방과 한약물의 효능을 관찰한 기존의 실험연구들은 주로 허혈성 뇌경색에 대한 접근들이 많았으며 뇌출혈에 대한 자료는 매우 부족하다. 그러므로 본 연구에서는 중풍과 반신불수에 사용되는 처방 중 기존 연구를 통하여 뇌허혈 손상과 뇌신경세포 손상에 대해 보호효능이 있는 것으로 보고된 보양환오당을^{3,7,8}) 선정하여 뇌출혈에 대한 효능을 관찰하였다.

뇌출혈 실험모델은 흰쥐의 선조체에 콜라겐분해효소를 주입하여 유발하였다. 콜라겐분해효소는 세포외기질과 혈관의 기저막을 분해하므로 혈관이 파열되어 뇌조직 출혈이 일어나고 동시에 출혈 주변부의 BBB를 파괴하고 뇌부종을 유발한다¹⁹). 이러한 콜라겐분해효소에 의한 뇌출혈 유발 후 3일간 보양환오당을 투여하고 뇌출혈 크기를 측정된 결과, 보양환오당을 투여한 군은 Control군에 비해 뇌출혈 크기가 유의성 있게 감소하였다. 또한 뇌출혈 후 바로 발생하는 뇌부종은 뇌압을 증가시키고 뇌조직의 herniation을 유발하여 사망을 초래할 수 있다²²). 보양환오당이 뇌출혈에 의한 뇌부종에 미치는 영향을 관찰한 바 Control군에 비해 뇌부종 비율이 유의성 있게 감소하였다. 이러한 결과들을 보건대 보양환오당이 뇌출혈에 의한 직접적인 손상과 BBB 파괴로 인한 뇌부종을 억제하는 효능이 있다고 사료된다.

뇌출혈에 의한 이차손상은 출혈이 일어난 주변조직의 염증반응과 신경세포와 신경아교세포의 세포사멸, 혈관성 부종, BBB의 파괴에 의하여 유발된다²³). 특히 호중구 침윤과 interleukin (IL)-6와 tumor necrosis factor (TNF)- α 와 같은 cytokine에 의한 뇌조직의 염증반응은 뇌부종의 생성과 악화에 주된 요인이 된다¹⁸). 염증세포 뿐만 아니라 혈관세포나 뇌실질조직에서도 cytokine을 분비하여 호중구가 혈관 밖으로 이동하는 것을 용이하게 하는데 이렇게 혈관 밖으로 나온 호중구는 기저막을 분해할 수 있는 여러 가지 protease나 oxygen radical을 분비하여 BBB를 계속 파괴함으로써 뇌부종이 가속화 된다²³⁻²⁵). 그러므로 뇌조직 손상에서 호중구 침윤을 억제하는 것이 뇌부종과 뇌신경세포의 손상을 억제하는 중요한 기전이 된다^{26,27}). 본 연구에서는 뇌출혈 유도 후 출혈주변조직의 호중구 활성을 확인하기 위해 MPO 항체를 이용하여 면역형광염색을 수행하였다. MPO는 H₂O₂와 반응하여 강력한 살균작용을 발휘하며^{28,29}) 주로 호중구에서 발견되므로 호중구의 면역염색 표식자로 활용되고 있다. 이러한 MPO에 양성반응을 나타내는 호중구의 침윤을 뇌출혈 주변조직에서 관찰한 결과, 보양환오당은 호중구의 침윤을 유의하게 감소시켰다. 보양환오당이 뇌출혈 주변조직에서 MPO 활성을 억제하는 항염증 작용이 뇌출혈에 따른 뇌부종을 억제하는 작용기전으로 사료된다.

뇌조직의 염증반응과 뇌부종에 관련된 또 하나의 인자가 iNOS이다. 뇌부종과 iNOS와의 직접적인 상관관계는 아직 밝혀지지 않았으나 iNOS는 nitric oxide (NO)를 합성하는데 필요한 효소이며 이때 생성된 NO는 peroxynitrite를 생성하여 세포독성으로 작용함과 동시에 호중구의 MPO 작용을 통하여 reactive oxidant를 생성하여 염증반응의 촉진과 조직손상에 관여한다³⁰).

본 연구에서 뇌출혈 부위와 그 주변부의 iNOS 발현을 관찰한 결과, 보양환오당을 투여한 군은 Control군에 비해 염색강도는 변화가 없었으나 iNOS 발현 면적은 감소한 경향을 나타내었다. 이러한 결과로 보건대 보양환오당이 뇌출혈 부위뿐만 아니라 출혈이 발생한 조직의 호중구나 다른 염증세포의 활동을 억제하는 작용이 있는 것으로 사료된다.

이어서 뇌출혈 주변조직에서 신경세포 사멸에 대한 보양환오당의 작용을 관찰하기 위하여 c-Fos와 Bax에 양성반응을 나타내는 세포들을 면역조직화학염색을 통하여 관찰하였다. c-Fos는 immediate early genes (IEGs)에 의하여 발현되는 전사인자 단백질들의 하나로 여러 가지 자극에 대해 중추신경계에서 c-Fos가 발현된다³¹). 생리적인 자극일 경우에는 기능적으로 관련된 뇌부위에서만 c-Fos와 같은 IEGs 발현의 증가가 나타나지만 경련이나 허혈, 출혈과 같은 병리적 상태에서는 중추신경계의 광범위한 부위에서 c-Fos의 발현이 증가한다³²). 또한 직접적인 손상 부위는 물론 손상 주변부에서도 c-Fos가 발현되며, 뇌손상에 따른 세포사멸에도 관여하는 것으로 알려져 있다³³). Bax는 Bcl-2와 함께 세포자연사 기전을 조절하는 인자로서 Bax는 세포자연사 유도인자, Bcl-2는 세포자연사 억제인자로 알려져 있다³⁴). Bax가 과도하게 발현될 경우 미토콘드리아로부터 cytochrome C를 분비하게 하여 세포자연사가 유발되므로³⁵) 신경세포의 사멸을 판별할 수 있는 중요한 지표로 사용된다. 뇌출혈 주변조직에서 이러한 c-Fos와 Bax 양성반응 세포에 대한 영향을 관찰한바, 보양환오당을 투여한 군은 Control군에 비하여 c-Fos 발현이 매우 유의하게 감소하였으며, 뇌출혈이 유발된 대뇌반구의 선조체 주변 대뇌피질에서도 c-Fos 양성반응 세포가 유의하게 감소하였다. 또한 보양환오당을 투여한 군의 뇌출혈 주변조직에서 Bax 양성반응 세포 역시 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 보양환오당이 뇌출혈 주변조직에서 세포자연사 억제 기전을 통해 신경세포 손상을 보호하는 효능이 있음을 간접적으로 보여주는 것이다.

HSP72은 세포내에서 protein misfolding이나 protein aggregation이 일어나지 않도록 folding이 제대로 되지 않는 단백질에 결합하는 chaperon역할을 수행하고 있으며 c-Fos, Bax와 더불어 스트레스에 의해 발현되는 단백질이다³⁶⁻³⁸). 동물실험상 뇌경색이 발생한 주변부에서 HSP72 mRNA와 단백질 발현이 증가하여 신경세포의 스트레스 손상을 판별하는 지표로 사용된다^{39,40}). 이러한 HSP72 양성반응 세포를 면역조직화학염색으로 뇌출혈 주변조직에서 관찰한 결과, 보양환오당을 투여한 군은 Control군에 비하여 매우 유의성 있는 감소를 나타내어 보양환오당이 뇌출혈에 의한 신경세포 손상을 억제하는 효능이 있음을 유추할 수 있었다.

본 실험의 결과들을 종합하면, 보양환오당은 콜라겐분해효소에 의한 뇌출혈과 그에 따른 뇌부종을 억제하는 효능이 있었으며, 호중구의 활성을 감소시켜 뇌출혈로 인한 염증반응을 억제하며 c-Fos와 Bax 및 HSP72 발현을 억제하여 뇌출혈에 따른 주변조직의 신경세포 사멸을 억제하는 효능이 있는 것으로 사료된다.

결 론

보양환오탕이 뇌출혈 손상과 그에 따른 뇌부종에 미치는 영향을 관찰하기 위해 흰쥐의 선조체에 콜라겐분해효소를 주입하여 뇌출혈과 뇌부종을 유발시키고 보양환오탕 물추출물을 3일간 경구투여한 다음 뇌출혈 크기와 뇌부종 비율을 관찰하였으며, 뇌출혈 주변부에서 MPO 양성반응의 호중구 침윤과 iNOS, c-Fos, Bax 및 HSP72 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

보양환오탕은 뇌출혈 크기를 대조군에 비해서 유의하게 감소시켰으며, 뇌출혈에 의한 뇌부종 또한 대조군에 비해서 유의하게 감소시켰다. 뇌출혈 주변부에서 보양환오탕은 MPO 양성반응 호중구 침윤을 유의하게 억제하였으며, iNOS 발현을 감소시켰다. 이외에도 보양환오탕은 뇌출혈 주변부와 대뇌피질의 c-Fos 양성반응 세포 증가를 유의하게 억제하였으며, 뇌출혈 주변부에서 Bax 양성반응과 HSP72 양성반응 세포 증가를 대조군에 비해서 유의하게 억제하였다.

이러한 결과로 보아, 보양환오탕은 뇌출혈과 그에 따른 뇌부종을 감소시키는 효능이 있으며, 이는 뇌출혈 주변부의 호중구 침윤 억제를 통한 항염증 작용과 세포자연사 억제를 통한 신경세포 보호 기전에 의한 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 王清任. 醫林改着. 서울, 의성당. pp 84-86, 1994.
2. 王懷義. 醫林改着發揮. 山西省, 山西科學技術出版社. pp 92-94, 1999.
3. 정용준, 김동웅. 뇌혈관 질환에 의한 편마비 환자에서 보양환오탕의 효과. 대한동의병리학회지 13(2):54-58, 1999.
4. 전영수, 김성훈. 보양환오탕과 가미보양환오탕이 Edotoxin으로 유발된 백서의 혈전증에 미치는 영향. 동의병리학회지 8: 157-176, 1993.
5. 김광덕, 송효정. 혈전증 및 고집도혈증에 관한 보양환오탕의 실험적 연구. 대한동의병리학회지 3: 30-46, 1988.
6. 김남용. 보양환오탕이 혈압 및 국소뇌혈류량에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 15(5):682-686, 2001.
7. 최은정. Mongolian Gerbil의 Reversible forebrain ischemia모델에 미치는 보양환오탕의 효과. 대한한의학회지 43: 88-98, 2000.
8. 김종길. 보양환오탕이 영양혈청결핍에 의한 PC12 세포의 고사에 미치는 영향. 대한한의학회지 24(2):179-192, 2003.
9. 이병철, 유경호. 국내 뇌졸중의 역학. 대한의사협회지 45: 1415-1421, 2002.
10. Ribo, M., Grotta, J.C. Latest advances in intracerebral hemorrhage. Curr Neurol Neurosci Rep. 6(1):17-22, 2006.
11. Badjatia, N., Rosand, J. Intracerebral hemorrhage. Neurologist. 11(6):311-324, 2005.
12. Anderson, K.K., Olsen, T.S., Dehlendorff, C., Kammersgaard,

- L.P. Hemorrhagic and ischemic strokes compared: Stroke severity, mortality and risk factors. Stroke. 40: 2068-2072, 2009.
13. Xi, G., Fewel, M.E., Hua, Y., Thompson, B.G. Jr, Hoff, J.T., Keep, R.F. Intracerebral hemorrhage: pathophysiology and therapy. Neurocrit Care. 1(1):5-18, 2004.
14. Nag, S., Manias, J.L., Stewart, D.J. Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema, Acta neuropathol. 118: 197-217, 2009.
15. Engelhardt, B., Sorokin, L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. Semin Immunopathol. 31: 497-511, 2009.
16. Scholz, M., Cinatl, J., Schädel-Höpfner, M., Windolf, J. Neutrophils and the blood-brain barrier dysfunction after trauma. Med Res Rev. 27(3):401-416, 2007.
17. Xi, G., Keep, R.F., Hoff, J.T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. Lancet Neurol. 5: 53-63, 2006.
18. Schilling, L., Wahl, M. Mediators of cerebral edema. Adv Exp Med Biol. 474: 123-141, 1999.
19. Rosenberg, G.A., Mun-Bryce, S., Wesley, M., Kornfeld, M. Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats. Stroke. 21: 801-807, 1990.
20. 허준. 동의보감. 서울, 남산당, pp 509-519, 1998.
21. 김영석. 중풍의 병인병리, 변증 및 치료. 한방성인병학회지 1(1):113-140, 1995.
22. Zazulia, A.R., Diringer, M.N., Derdeyn, C.P., Powers, W.J. Progression of mass effect after intracerebral hemorrhage. Stroke. 30: 1167-1173, 1999.
23. Stanimirovic, D., Satoh, K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. Brain Pathol. 10: 113-126, 2000.
24. Beneviste, E. Inflammatory cytokines within the central nervous systems: Sources, function and mechanism of action. Am J Physiol. 263: 1-16, 1992.
25. Allport, J.R., Ding, H., Collins, T., Gerritsen, M.E., Luscinskas, F.W. Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. J Exp Med. 186: 517-627, 1997.
26. Bowes, M.P., Rothlein, R., Fagan, S.C., Zivin, J.A. Monoclonal antibodies preventing leukocyte activation reduce experimental neurologic injury and enhance efficacy of thrombolytic therapy. Neurology. 45: 815-819, 1995.
27. Yenari, M.A., Kunis, D., Sun, G.H., Onley, D., Watson, L., Turner, S., Whitaker, S., Steinberg, G.K. Hu23F2G, an

- antibody recognizing the leukocyte CD11/CD18 integrin, reduces injury in a rabbit model of transient focal cerebral ischemia. *Exp Neurol.* 153: 223-233, 1998.
28. Koeffler, H.P., Ranyard, J., Pertcheck, M. Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation. *Blood.* 65: 484-491, 1985.
 29. Malle, E., Furtmüller, P.G., Sattler, W., Obinger, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol.* 152: 838-854, 2007.
 30. Eiserich, J.P., Hristova, M., Cross, C.E., Jones, A.D., Freeman, B.A., Halliwell, B., van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature.* 391: 393-397, 1998.
 31. Sheng, M., Greenberg, M.E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 4: 477-485, 1990.
 32. Morgan, J.I., Curran, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci.* 14: 421-451, 1991.
 33. Akins, P.T., Liu, P.K., Hsu, C.Y. Immediate Early Gene Expression in Response to Cerebral Ischemia; Friend or Foe? *Stroke.* 27: 1682-1687, 1996.
 34. Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Develop.* 13: 1899-1911, 1999.
 35. 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.
 36. Hendrick, J.P., Hartl, F.U. Molecular chaperon functions of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 349-384, 1993.
 37. Ma, Y., Hendershot, L.M. The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell.* 107: 827-830, 2001.
 38. Welch, W.J. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 339: 327-333, 1993.
 39. Kinouchi, H., Sharp, F.R., Koistinaho, J., Hicks, K., Kamii, H., Chan, P.H. Induction of heat shock hsp70 mRNA and HSP70 kDa protein in neurons in the 'penumbra' following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 619: 334-338, 1993.