

石斛이 흰쥐의 뇌조직출혈에 미치는 영향

이정동, 김연섭*

가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Effects of *Dendrobii herba* against Intracerebral Hemorrhage in Rats

Jung-Dong Lee, Youn-Sub Kim*

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

ABSTRACT

Objects : This study was performed in order to observe the effects of water extract of *Dendrobii herba* on intracerebral hemorrhage(ICH),

Method : ICH was induced by the stereotaxic intrastriatal injection of bacterial collagenase type IV in Sprague-Dawley rats. After the water extracts of *Dendrobii herba* were administrated orally once a day for 3 days, hematoma volume, percentage of brain edema, expression of iNOS and MPO were observed using immunohistochemistry.

Results : Rats fed with water extracts of *Dendrobii herba* showed reduction of hematoma volume and percentage of brain edema compared with controls. In addition, Infiltration of myeloperoxidase (MPO) expressing neutrophil and expression of inducible nitric oxide synthetase(iNOS) were significantly reduced in rats fed with water extracts of *Dendrobii herba*.

Conclusion : These results demonstrated that water extracts of *Dendrobii herba* reduced brain damage of intracerebral hemorrhage(ICH) and subsequent ICH-induced cerebral edema, and inhibited neutrophil infiltration.

Key words : *Dendrobii herba*(DH), ICH, iNOS, MPO, Brain Edema.

서론

뇌출혈(intracerebral hemorrhage, ICH)은 뇌의 국소적인 부위에서 일어나고 지주막하출혈(subarachnoid hemorrhage)보다 두 배의 유병율을 보이고 있다.¹⁾ ICH로 인한 신경학적 손상은 물리적인 뇌조직의 직접손상, 세포독성에 의한 세포자연사(apoptosis)와 괴사(necrosis), 혈관성으로 생기는 뇌부종 및 염증반응 등을 들 수 있다.^{2,3)} 특히 뇌부종은 ICH를 포함한 여러 뇌조직 손상에서 뇌혈관장벽(Blood-Brain Barrier, BBB)의 손상과 뇌조직의 염증반응으로 인해 발생하는데,^{4,5)} 임상증상을 악화시키는 주요 인자일 뿐만 아니라 임상예후판단의 지표가 된다.⁶⁾ 뇌조직의 출혈은 살균성과 반응이 빠른 산화제(reactive oxidant)인 MPO-H₂O₂-Cl-system의 차아염소산(hypochlorous acid)과 차아염소산염(hypochlorite)을 생산하여 염증반응을 지속시키고 확장시키는 MPO를 특징적

으로 발현하는 중성백혈구의 침윤을 동반한다.^{7,8)} 또한 뇌조직의 출혈은 반응이 빠른 활성산소(reactive oxygen species), 단백질 분해 효소인 프로테아제(protease)와 같은 세포독성물질을 분비하여 뇌조직에 염증반응을 일으켜 이차적으로 BBB를 손상시키고 뇌조직손상을 악화시키는 요인이 된다.^{9,10)} 그리고 염증반응은 TNF- α 등의 작용을 통하여 iNOS 발현을 증가시켜 산화질소(nitric oxide, NO) 생성을 촉진한다.¹¹⁾

石斛(*Dendrobii herba*)은 난초과(蘭科; Orchidaceae)에 속한 多年生 附生 本草로 功效主治는 益胃生津, 滋陰清熱이고 熱病傷津, 口乾煩渴, 傷陰目暗등을 치료한다.¹²⁾

石斛에 관한 실험적 연구로 항산화 작용,¹³⁾ 골다공증 예방 효과,¹⁴⁾ 면역조절 효과,¹⁵⁾ 항염증 효과,¹⁶⁾ 신경계질환 예방효과¹⁷⁾ 및 신경세포 보호효과¹⁸⁾ 등이 보고되었다.

石斛은 治風劑로서 風痺를 治療하며 中風, 半身不隨 등에

*교신저자 : 김연섭, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실.
이 연구는 2012년도 가천대학교 지원(2012-R060)에 의한 결과임.
· Tel : 031-750-5420. · E-mail : ysk5708@hanmail.net
· 접수 : 2012년 4월 3일 · 수정 : 2012년 4월 24일 · 채택 : 2012년 4월 25일

응용할 수 있는데¹²⁾ 신경세포 보호효과와 항산화 작용 등을 통해 뇌출혈로 인한 뇌부종과 뇌조직 염증에 대한 억제 효과가 있을 것으로 생각된다.

이에 본인은 뇌부종과 뇌조직 염증반응에 미치는 石斛의 효능을 관찰하기 위하여 흰쥐의 선조체 내에 콜라겐 분해효소 (collagenase)를 주입하여 출혈을 유발하였으며, 石斛 열수추출물을 3일간 경구 투여하였다. 이후 뇌조직출혈 부위의 크기와 뇌부종의 비율을 측정하고, 뇌출혈 주변부에서 MPO를 특징적으로 발현하는 중성백혈구의 침착과 iNOS 양성반응 세포의 변화를 면역형광과 면역조직화학염색으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 나라바이오테크 (Nara Biotechnology, 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 石斛 (Dendrobii Herba, DH)은 (주)허브메디에서 구입하였다. 작게 자른 石斛 400 g에 3,000 ml의 물을 가하여 전탕하고, 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조 하였다. 120.0 g의 추출물을 얻어 수율은 30.0% 였으며, 500 mg/kg을 실험동물의 1회 투여량으로 하여 뇌조직출혈 유발 3시간 후부터 약 20시간 간격으로 총 3회 경구 투여 하였다.

3. 실험군의 구분

뇌조직출혈에 대한 石斛의 효능을 관찰하기 위하여 실험군은 다음과 같이 구분하였다. 마취와 두정부의 피부절개 및 두개골의 천공 과정을 시행하였으나 collagenase를 주입하지 않은 정상대조군 (Sham군)과 두개골천공 후 선조체에 collagenase를 주입하여 뇌조직출혈을 유발시킨 대조군 (ICH군) 및 대조군과 같이 뇌조직출혈을 유발한 다음 石斛 열수추출물을 경구 투여한 石斛 투여군(ICH+DH군)으로 나누었다. 각 군의 실험동물은 18마리씩 총 54마리를 사용하였다. Sham군의 조직은 염색과정 등에서 정상대조군으로 사용하였으며, 그 자료는 실험결과로 제시하지 않았다.

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% 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

고정한 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 두개골 천공을 만들고, 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 크기 및 뇌부종 비율의 측정

뇌조직출혈 유발 48시간 후 실험동물을 과용량의 pentobarbital 복강주사로 희생시킨 후 즉시 단두하고 뇌를 적출한 다음 흰 쥐용 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 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

면역조직화학 및 면역형광 염색을 위해 뇌조직출혈 유발 48시간 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 담궈 침전시켰다. 다음 뇌를 -40°C의 dry ice-isophentane 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80°C에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 30 µm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

7. 면역형광 및 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 1차 항체를 처리하였다. 중성백혈구 표식자인 myeloperoxidase (MPO)에 대해

서 1차 항체는 anti-MPO (1:250, A-0398, DAKO, USA)를, 2차 항체는 Cy5-conjugated goat anti-rabbit (1:200, ab6564, Abcam, UK)를 사용하였다. iNOS는 1차 항체를 anti-iNOS (1:200, #610297, BD Science, 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 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 발색시키고 수세하고 탈수한 다음 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

8. 양성반응 세포의 관찰

면역형광염색된 MPO 양성반응 세포는 confocal laser-scanning microscopy (LSM510 META, CarlZeiss, Germany)를 사용하여 관찰하였으며, DAB로 발색된 iNOS 발현은 CCD카메라 (DP70, Olympus, Japan)가 장착된 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 각 지표의 발현 정도는 양성반응 세포 수를 측정하여 비교하였다. 양성반응 세포 수 측정을 위해서 각각의 영상을 영상분석시스템에 저장하고, ImageJ software (ver. 1.41, NIH, USA)를 사용하여 뇌출혈 주변부에서 양성반응 세포 수를 측정한 다음 일정면적 (10⁵ μm²)으로 보정하여 자료로 사용하였다.

9. 통계처리

측정된 모든 자료는 student's t-test를 사용하여 ICH군과 ICH+DH군 사이에서 P<0.05의 유의수준으로 검증하였다.

결 과

1. 뇌출혈 크기의 변화

뇌출혈 흰쥐의 뇌출혈 크기를 측정한 결과, ICH군의 출혈 부위 크기는 31.37±1.73 mm³였으며, 石斛 열수추출물을 투여한 ICH+DH군은 23.25±2.41 mm³로 ICH군에 비해 유의하게 (p<0.05) 감소하였다 (Fig. 1, 2).

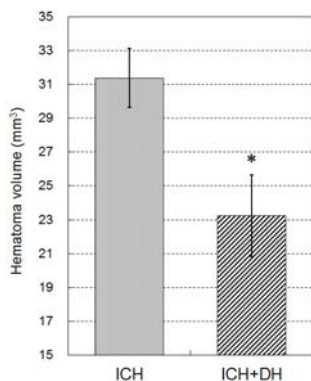


Fig. 1. Effect of Dendrobii herba (DH) on the hematoma volume of ICH-induced rats. DH significantly reduces the hematoma volume compared with ICH group (*, P<0.05; n=6).

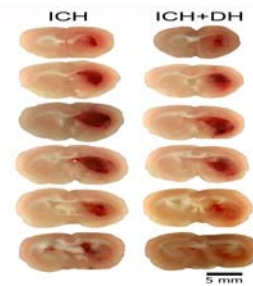


Fig. 2. Representative brain slices of ICH-induced rats. Red colored regions on slices indicate the hematoma induced by collagenase injection. DH treated rat (ICH+DH) shows a reduction in hematoma volume compared with ICH group.

2. 뇌부종 비율의 변화

뇌출혈 흰쥐의 뇌부종 비율을 측정한 결과, ICH군의 뇌부종 비율은 117.7±0.7% 였으며, 石斛 열수추출물을 투여한 ICH+DH군의 뇌부종 비율은 114.9±0.8%로 ICH군에 비해 유의한 감소(p<0.05)를 나타내었다 (Fig. 2, 3).

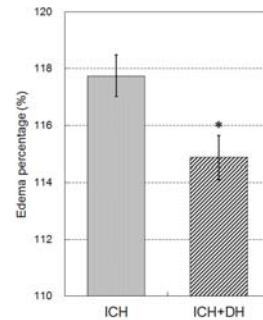


Fig. 3. Effect of Dendrobii herba (DH) on percentage of brain edema in ICH-induced rats. DH significantly reduces the edema percentage of hemorrhagic hemisphere compared with ICH group (*, P<0.05; n=6).

3. MPO 양성반응 중성백혈구 침착의 변화

뇌출혈 흰쥐의 MPO 양성반응 중성백혈구 침윤에 미치는 영향을 측정한 결과, ICH군에 MPO 양성반응을 보이는 중성백혈구 침착 개수는 86.5±6.9 cell/10⁵ μm²였으며, 石斛 열수추출물을 투여한 ICH+DH군의 MPO 양성반응을 보이는 중성백혈구 침착 개수는 67.8±3.9 cell/10⁵ μm²로 ICH군에 비해 유의한 감소(p<0.05)를 나타내었다 (Fig. 4).

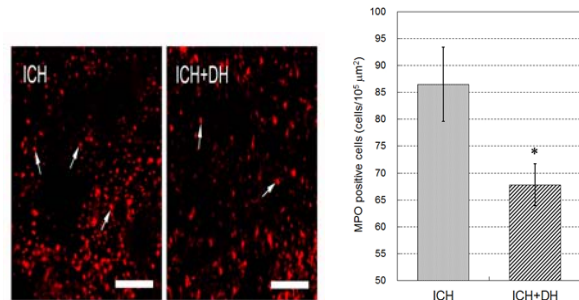


Fig. 4. Effect of Dendrobii herba (DH) on MPO positive cells in peri-hematoma of ICH-induced rats. (Left) Representative sections of fluorescence MPO-labeled neutrophils in peri-hematoma. Arrows indicate MPO positive cells (scale bar, 100 μm). (Right) Number of MPO positive cells in peri-hematoma. DH significantly reduces the MPO positive cells compared with ICH group (*, P<0.05; n=6).

4. iNOS 양성반응 세포의 변화

뇌출혈 흰쥐의 혈종 주변부 iNOS 양성반응 세포에 미치는 영향을 측정된 결과, ICH군의 iNOS 양성반응 세포 수는 $29.8 \pm 3.8 \text{ cell}/10^5 \mu\text{m}^2$ 였으며, 石斛 열수추출물을 투여한 ICH+DH군의 iNOS 양성반응 세포 수는 $18.7 \pm 2.2 \text{ cell}/10^5 \mu\text{m}^2$ 로 ICH군에 비해 유의한 감소($p < 0.05$)를 나타내었다 (Fig. 5).

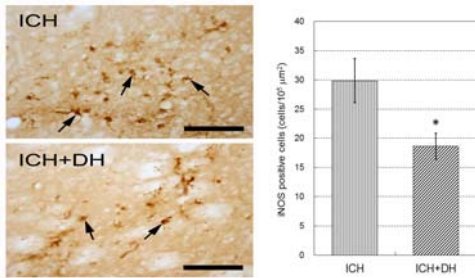


Fig. 5. Effect of Dendrobii herba (DH) on iNOS positive cells in peri-hematoma of ICH-induced rats. (Left) Representative sections of iNOS positive cells in peri-hematoma. Arrows indicate iNOS positive cells (scale bar, 100 μm). (Right) Number of iNOS positive cells in peri-hematoma. DH significantly reduces the iNOS positive cells compared with ICH group (*, P(0.05; n=6).

고찰

石斛(Dendrobii herba)은 난초과(蘭科; Orchidaceae)에 속한 多年生 附生 本草인 環草石斛, 馬鞭石斛, 鐵皮石斛, 金釵石斛 또는 기타 동속근연식물의 지상부를 건조한 것으로 性은 甘하며 胃 肺 腎으로 歸經한다. 功效主治는 益胃生津, 滋陰清熱하여 熱病傷津, 口乾煩渴, 傷陰目暗을 치료하는데 治風癱로서 風痺를 治療하므로 中風, 半身不隨 등에 응용할 수 있다.¹²⁾

石斛에 관한 실험적 연구로는 항산화 작용,¹³⁾ 골다공증 예방 효과,¹⁴⁾ 면역조절 효과,¹⁵⁾ 항염증 효과,¹⁶⁾ 신경계질환 예방 효과¹⁷⁾ 신경세포 보호효과¹⁸⁾ 및 신경세포 독성 차단효과²⁰⁾ 등이 보고되었다. 그러나 石斛이 허혈성 뇌경색(cerebral infarction)이나 뇌조직출혈(intracerebral hemorrhage, ICH)등 뇌질환의 임상증상의 예방판단에 중요한 뇌부종에 관한 연구는 없었다. 이에 治風癱로서 風痺를 治療를 치료하고, 강력한 신경세포 보호효과, 신경세포 독성을 차단하여 이차적인 신경손상을 억제하는 선행연구와 연관지어 石斛이 뇌출혈로 인한 염증반응과 뇌부종의 경감에 미치는 영향을 관찰하였다.

뇌조직출혈은 혈종 형성, 혈종 확장, 뇌부종 형성의 3단계를 거친 다음 이차적이고 만성적인 병태생리화적인 기전이 시작된다.²¹⁾ 또한 뇌조직출혈은 주변조직의 세포자연사와 염증반응에 의해 신경세포와 신경아교세포의 사망을 유도하고, 혈관성 부종과 혈액뇌관문의 파괴를 유발시킨다.²²⁾ 뇌출혈 주변부에는 IL-6와 IL-10이 분비되며, 이들은 직간접적인 백혈구의 활성화와 호르몬 물질인 prostaglandin과 leukotrien을 생산하여 조직손상을 악화시킨다.²³⁾ 특히 뇌출혈 후 24시간 내에 일어나는 IL-6와 TNF-α와 같은 염증유발물질들의 급격한 증가 이후 혈액뇌관문(Blood-Brain Barrier, BBB)을 손상시켜 뇌출혈 주변부의 혈관성 부종을 유발시킨다.^{24,25)} 혈액뇌관문은 뇌의 정상적인 기능과 항상성을 유지하는데 필수

적인 작용을 하고 있으며, 모세혈관과 뇌조직 사이의 투과성이 낮은 막을 일컫는다.²⁶⁾ 뇌조직의 모세혈관은 혈관에 존재하는 수용성 물질과 500 dalton 이상의 크기를 가진 물질은 뇌조직으로 들어가기 어려운 물리적 장벽을 유지하며, 신경세포의 적절한 기능수행을 위한 주변의 미세 환경을 유지하고 조절하는데 중요한 역할을 한다.^{27,28)} 그러나 병리적인 상황에서는 혈액뇌관문이 비교적 빠른 시간에 파괴되어 신경세포 손상을 촉진한다. 실험에 의하면 뇌허혈이 생기기 2시간 만에 내피세포 기저층의 퇴화가 시작되고 혈액뇌관문의 투과성이 급격하게 증가하였다고 보고되었다.²⁹⁾ 이에 뇌조직출혈 크기를 측정하기 위하여 흰쥐의 선조체내에 콜라겐 분해효소(collagenase)를 주입하여 출혈을 유발하였으며, 石斛 열수추출물을 3일간 경구 투여하였다. 그 후 뇌 절편 영상으로 ICH군과 ICH+DH군의 대뇌반구 뇌출혈 면적의 증가비율을 비교하여 관찰한 결과 뇌조직출혈 크기가 石斛 열수추출물을 투여한 ICH+DH군에서 유의하게 감소된 것으로 관찰되었다.

부종은 조직의 내용물 증가로 조직용적이 증가하는 것을 말하는데³⁰⁾ 대부분의 뇌질환에서 뇌부종이 나타난다. 뇌실질 내로의 수분유입은 혈액뇌관문의 역할에 의해 혈관성 부종(vasogenic edema)과 세포독성 부종(cytotoxic edema)으로 구분된다.^{31,32)} 뇌부종을 악화시키는 주요 인자 중 하나는 뇌조직의 염증반응이며, 뇌조직의 염증은 histamine과 bradykinin의 분비와 면역세포가 분비하는 단백질의 총칭(cytokines)의 발현을 통하여 뇌혈액관문의 폐쇄연접을 느슨하게 만들고 투과성을 증가시켜 뇌부종을 유발한다.^{5,33)} 뇌부종의 정도를 측정하기 위하여 뇌 절편 영상으로 ICH군과 ICH+DH군의 대뇌반구 뇌출혈 면적과 체적의 증가비율을 비교하여 관찰한 결과 뇌조직 뇌부종 비율이 石斛 열수추출물을 투여한 ICH+DH군에서 유의하게 감소된 것으로 관찰되었다.

중성백혈구는 백혈구 중 가장 많은 비율을 차지하는 세포로서 손상이나 감염 부위에 침착하여 면역 방어기능을 수행한다. 그러나 과도하거나 조정되지 못하는 중성백혈구의 활성화는 급만성 염증반응 모두에서 ROS와 protease(단백질 분해효소) 같은 세포독성 산물을 분비하므로 조직손상을 악화시키는 요인으로 작용한다.^{9,10)} 그러므로 염증반응의 완화 방법은 일차적으로 중성백혈구의 침착을 억제하거나 침착된 중성백혈구를 빠르게 제거하는 것이다.^{34,35)} 특히 뇌조직출혈에서는 출혈 주변부의 중성백혈구의 침착이 염증반응을 지속시키고 확장시키는 요인이다.³⁶⁾ 또한 중성백혈구는 MPO를 발현하며, MPO가 살균성 민감한 산화제(reactive oxidant)인 MPO-H₂O₂-Cl-system의 차아염소산(hypochlorous acid)과 차아염소산염(hypochlorite)를 생산하여 염증반응을 지속시키고 확장시킨다.⁷⁾ 그러므로 뇌조직출혈 주변부에서 MPO에 양성반응을 보이는 중성백혈구를 면역형광염색으로 관찰하였다. 그 결과 石斛 열수추출물을 투여한 ICH+DH군에서는 뇌조직출혈 주변부에 침착된 중성백혈구의 수가 ICH군에 비해 유의하게 감소된 것으로 관찰되었다.

염증질환에서 염증반응은 TNF-α 등의 면역세포가 분비하는 단백질의 총칭인 cytokines 작용을 통하여 iNOS 발현을 증가시켜 일산화질소(NO) 생성을 촉진한다.¹¹⁾ iNOS에 의하여 생성된 NO는 중성백혈구의 MPO 또는 차아염소산(hypochlorous acid)과의 상호작용으로 NO₂Cl 생성을 촉진하여 염증반응을 유발한다. 그러므로 중성백혈구의 iNOS 발

현이 질화(nitration)와 염소화(chlorination)를 촉진하며, NO의 최종산물인 NO₂ 이온이 염증부위에서 대식세포에 의한 산화의 반작용(oxidative reaction)에 중요한 역할을 한다.³⁷⁾ 이러한 염증반응 기전을 참고하여 뇌조직출혈 주변부에 iNOS 발현의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 石斛 열수추출물을 투여한 ICH+DH군은 뇌조직출혈 부위에서 iNOS 발현 강도가 감소하였으며, 주변조직에서 iNOS 양성반응 세포 수가 유의하게 감소하였다.

이러한 결과들을 총괄하면, 石斛은 뇌조직출혈 주변조직에서 MPO 양성반응의 중성백혈구의 침윤을 억제하고, iNOS 발현을 억제하여 뇌조직 염증을 감소시켜 뇌출혈의 크기와 뇌부종을 감소시키는 것으로 판단된다.

결론

石斛이 뇌조직출혈에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐의 선조체에 콜라겐분해효소를 주입하여 출혈을 유발한 다음 石斛 열수추출물을 경구 투여하였다. 그 후 뇌출혈 크기와 뇌부종 비율의 변화를 관찰하였으며, 출혈 주변부에서 MPO 양성반응의 중성백혈구 침착과 iNOS 양성반응 세포의 변화를 면역형광과 면역조직화학염색으로 관찰한 바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 石斛은 뇌출혈의 크기를 ICH군에 비해 유의하게 감소시켰다.
2. 石斛은 뇌부종 비율을 ICH군에 비해 유의하게 감소시켰다.
3. 石斛은 뇌출혈 주변부에서 MPO 양성반응의 중성백혈구 침착을 ICH군에 비해 유의하게 감소시켰다.
4. 石斛은 뇌출혈 주변부에서 iNOS 양성반응 세포를 ICH군에 비해 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과들로 보아 石斛은 뇌출혈 부위에서 염증을 억제하여 뇌출혈 크기와 뇌부종을 감소시키는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Intracerebral hemorrhage versus infarction: stroke severity, risk factors, and prognosis. *Ann Neurol*. 1995 ; 38(1) : 45-50.
2. Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med*. 2001 ; 344(19) : 1450-60.
3. Juvela S. Risk factors for impaired outcome after spontaneous intercerebral hemorrhage. *Arch Neurol*. 1995 ; 52(12) : 1193-1200.
4. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intercerebral hemorrhage. *Lancet Neurol*. 2006 ; 5(1) : 53-63.
5. Abbott NJ. Inflammatory mediators and modulation

- of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol*. 2000 ; 20 : 131-47.
6. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience*. 2004 ; 129 : 1019-27.
7. Malle E, Furtmuller PG, Sattler W, Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol*. 2007 ; 152(6) : 838-54.
8. Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim SJ, Kim DH, Kang KM. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in hemorrhagic stroke. *Brain*. 2008 ; 131(Pt3) : 616-29.
9. Nathan C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006 ; 6(3) : 173-82.
10. Filep JG, El Kebir D. Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *J Cell Biochem*. 2009 ; 108(5) : 1039-46.
11. Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science*. 1993 ; 261(5127) : 1445-8.
12. Herbology department of all-korea oriental medicine colleges. *Herbology*. Seoul : Younggrimsa, 2004 : 647-9.
13. Kim YG, Yang GH, Cho SI. Anti-oxidative Effects of Dendrobii Herba on Toxic Agent Induced Kidney Cell Injury. *Kor J Herbology*. 2005 ; 20(4) : 53-60.
14. Han HJ, Kim JH, Cho HB, Choi GS. Effects of HerbaDendrobii on the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Oriental Gynecology*. 2000 ; 13(2) : 120-35.
15. Park SD, Lee GH, Lee YS, Kwun YK, Park JH, Choi SM, Shin SW. Comparison of Immunomodulatory Effects of Water-extracted Adenophorae Radix, Liriopis Tuber, Dendrobii Herba, Polygonati Odorati Rhizoma and Polygonati Rhizoma. *Kor J Orient Physiol & Pathol*. 2007 ; 21(2) : 414-24.
16. Min HB, Roh SS, Seo HS. Effects of Dendrobii herba and Punica granatum Extract on the Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Anti-wrinkle and Whitening. *Kor J Orient Med Ophthalmol & Otolaryngol & Dermatol*. 2010 ; 23(3) : 11-32.
17. Mizue O, Wenzhe F, Koji H, Quanbo X, Yasuhiro T, Katsuko K, Tsuneo N, Tomohiro S, Kenji T, and Shigetoshi K. Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing-tonic herbal medicines and active constituents of Rhodiola sacra. *J Ethnopharmacol*. 1999 ; 67 : 111-9.
18. Yoon MY, kim JY, Hwang JH, Cha MR, Lee MR, Jo KJ, Park HR. Protective Effect of Extracts from Dendrobium nobile Lindl. on H₂O₂-induced Neurotoxicity in PC12 cells. *Kor J Soc Appl Biol Chem*. 2007 ;

- 50(1) : 63–7.
19. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*. 1990 ; 21 : 801–7.
 20. Wang X, Mori T, Sumii T, Lo EH. Hemoglobin-induced cytotoxicity in rat cerebral cortical neurons: caspase activation and oxidative stress. *Stroke*. 2002 ; 33 : 1882–8.
 21. Ricon F, Mayer S. Novel therapies for Intracerebral Hemorrhage. *Curr Opin Crit Care*. 2004 ; 10 : 94–100.
 22. Qureshi A, Ali Z, Suri M, Shuaib A, Baker G, Todd K, Guterman L, Hopkins L. Extracellular glutamate and other amino acids in experimental Intracerebral Hemorrhage: an in vivo microdialysis study. *Crit Care Med*. 2003 ; 31 : 1482–9.
 23. Dziedzic T, Bartus S, Klimkiewicz A, Motyl M, Slowik A, Szczudlik A. Intracerebral Hemorrhage triggers interleukin-6 and interleukin-10 release in blood. *Stroke*. 2002 ; 33 : 2334–5.
 24. Castillo J, Dávalos A, Alvarez-Sabin J, Pumar J, Leira R, Silva Y, Montaner J, Kase C. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2002 ; 58 : 624–9.
 25. Megyeri P, Abrahám C, Temesvári P, Kovács J, Vas T, Speer C. Recombinant human tumor necrosis factor alpha constricts pial arterioles and increases blood-brain barrier permeability in newborn piglets. *Neurosci Lett*. 1992 ; 148 : 137–40.
 26. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*. 1967 ; 34 : 207–17.
 27. Brightman MW. The anatomic basis of the blood-brain barrier, in ; Implication of blood-brain barrier and its manipulation. Plenum Press NY. 1989 ; 1 : 53–83.
 28. Bundgaard M. Pathways across the vertebrate blood-brain barrier ; Morphological view points. *Ann NY Acad Sci*. 1986 ; 481 : 7–18.
 29. Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice : a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999 ; 19 : 1020–8.
 30. Pappius HM. Effects of steroids on cold injury edema, in Reulen HJ, Schürmann K(eds). *Steroids and Brain Edema* Berlin Springer Verlag. 1972 : 57–63.
 31. Zurch KJ. Neuropathological aspects and histological criteria of brain edema and brain swelling. *Brain Edema* Springer New York, 2009 : 95–116.
 32. Koltz I. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1967 ; 26 : 1–14.
 33. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation*. 1988 ; 5(3–4) : 143–59.
 34. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2002 ; 2 : 965–75.
 35. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: New opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 ; 3 : 401–16.
 36. Bowes M, Rothlein R, Fagan S, Zivin J. Monoclonal antibodies preventing leukocyte activation reduce experimental neurologic injury and enhance efficacy of thrombolytic therapy. *Neurology*. 1995 ; 45 : 815–9.
 37. Eiserich J, Hristova M, Cross C, Jones A, Freeman B, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 1998 ; 391 : 393–7.