大韓本草學會誌 제27권 제3호(2012년 5월)
Kor. J. Herbology 2012 ; 27(3) : 89-94
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2012.27.3.89

丹蔘이 뇌조직출혈 흰쥐의 신경세포 자연사에 미치는 영향

이흥기, 김연섭*

가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실

Effects of Salvia Miltriorrhiza Radix on Neuronal Apoptosis following Intracerebral Hemorrhage of Rats

Hung-Gi Lee, Youn-Sub Kim*

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

ABSTRACT

Objects : The purpose of this study was to observe the effect of Salviae Miltriorrhiza Radix(SMR) water-extract on intracerebral hemorrhage(ICH) and neuronal apoptosis in the injured areas.

Method : ICH was induced by the stereotaxic intrastriatal injection of bacterial collagenase type IV in Sprague-Dawley rats. The rats were givened oral SMR treatment once a day for three days after the ICH treatment. TUNEL positive cells in the affected regions were performed by TUNEL assay, Bax and Bcl-2 positive cells by immunohistochemistry and the Bax expression by western blotting method.

Results : The results are as follow;

1. SMR significantly reduced the number of TUNEL positive cells in the peri-hematoma reigions of ICH-induced rats.
2. SMR significantly reduced the number of Bax positive cells in the peri-hematoma regions of ICH-induced rats.
3. SMR did not affect the number of Bcl-2 positive cells in the peri-hematoma regions of ICH-induced rats.
4. SMR significantly reduced the Bax expressions compared with ICH group in hemorrhagic hemisphere of ICH-induced rats.

Conclusion : These results suggest that SMR is effective in reducing neuronal apoptosis.

Key words : Salvia Miltriorrhiza Radix(SMR), Collagenase, TUNEL, Bax, Bcl-2

서 론

2010년 한국인의 3대 사망원인은 암, 뇌혈관질환, 심장질환이다.[1)]

원발성 뇌출혈은 서양에서 전체 뇌졸중의 10-15% 정도지만[2)] 대만에서는 중풍환자 32%가 뇌출혈 환자였다.3) 뇌출혈 초기에 사망률이 높아서 단지 38%의 환자들만 1년 후에 생존했다는 보고가 있고[4)], 회복도 비슷한 크기의 뇌경색에 비하면 나쁜 것으로 알려져 있다.[5)]

뇌출혈시 급성신경학적 이상이 나타나는 기전은 뇌출혈로 인한 직접적인 뇌조직 손상, 혈종에서 나오는 독성성분에 의한 세포자연사 및 괴사, 혈종의 압박효과로 인한 허혈음형(Ischemic penumbra)의 가능성, 뇌부종, 염증반응을 들 수 있다.[6)] 또한 뇌조직출혈은 주변조직의 세포자연사와 염증반응에 의해 신경세포와 신경아교세포의 사망을 유도한다.[7)] Apoptosis는 개체의 발생 및 항상성을 유지하기 위하여 필요한 기전으로서 정상적인 세포 수의 조절이나 손상된 세포의 제거는 생체에 있어서 필수적인 과정이라고 할 수 있다.[8)] Apoptosis 유발에 관여하는 유전자 중 Apoptosis 기전을 억제하는 Bcl-2 단백질 및 기전을 촉진하는 Bax 단백질이 중요하다고 보고되었다.[9)]

Bcl-2는 세포고사 시에 발생하는 cytochrome C의 세포

*교신저자 : 김연섭. 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실.
이 연구는 2012년도 가천대학교 지원(2012-R059)에 의한 결과임.
· Tel : 031-750-5420. · E-mail : ysk5708@hanmail.net
· 접수 : 2012년 4월 3일 · 수정 : 2012년 4월 24일 · 채택 : 2012년 4월 25일

질 방출을 억제하여 세포의 수명을 연장시키고 세포의 자연사를 억제하며[10], Bax가 Bcl-2로부터 분리되면 직접적 혹은 Bcl-2의 다른 작용기전을 억제하는 간접적인 경로로 세포고사를 촉진하는 것으로 알려져 있다.[11]

이들 두 단백질은 서로 dimer(2분자체)를 형성하면서 cytochrome C와 같은 Apoptosis 유발에 관여하는 인자를 조절한다.[12]

丹蔘(Salvia Miltriorrhiza Radix, SMR)은 去瘀生新약으로 活血去瘀, 活血行血, 凉血養血, 安神의 효능이 있어 破宿血, 生新血, 風痺不隨한다.[13,14]

단삼에 대한 실험 연구로는 신경세포 보호효과[15,16], 뇌허혈[17-19], 뇌부종[20], 혈관신생 유도[21], 항염증[22,23], 고지혈증[24], 항혈전 및 항산화[25], 항암효과[26,27], 알츠하이머 치매억제효과[28]가 있다고 보고되었다.

이와 같이 단삼이 去瘀生新하고 活血去瘀하는 효능이 있고 뇌손상에 효과가 있다는 연구 등으로 보아 뇌출혈로 인한 뇌조직 신경세포 자연사에 영향을 미칠 것이라 생각된다.

이에 저자는 뇌조직 출혈에 따른 주변조직의 신경세포사에 미치는 단삼의 효능을 관찰하기 위해서 흰쥐의 선조체 내에 콜라겐 분해효소를 주입하여 뇌출혈을 유발하고 단삼 물 추출물을 3일간 경구 투여 하였다. 뇌출혈 주변의 사망하는 세포로 판단되는 TUNEL 양성세포, 세포 사멸을 유도하는 단백질인 Bax양성 세포 및 세포의 사멸을 억제하는 단백질인 Bcl-2 양성세포를 면역조직 화학적 방법으로 염색하여 세포 수를 측정하였다. 또한 western blot으로 Bax 단백질의 발현을 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 나라바이오텍 (Nara Biotechnology, Korea)에서 구입한 11주령, 약 300 g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 (21-23℃), 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 丹蔘 (Salviae Miltiorrhizae Radix, SMR)은 (주)허브메디에서 구입하였다. 세절한 丹蔘 400 g에 3,000 ml의 물을 가하여 전탕하고, 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조 하였다. 152.0 g의 추출물을 얻어 수율은 38.0% 이었으며, 500 mg/kg을 실험동물의 1회 투여량으로 하여 뇌조직출혈 유발 3시간 후부터 약 20시간 간격으로 총 3회 경구투여 하였다.

3. 실험군의 구분

실험군은 다음과 같이 구분하였다. 마취와 두정부의 피부절개 및 두개골의 천공 과정은 시행하였으나 collagenase를 주입하지 않은 정상대조군 (Sham군)과 이러한 사전준비에 이어 선조체에 collagenase를 주입하여 뇌조직출혈을 유발시킨 대조군 (ICH군) 및 대조군과 같이 뇌조직출혈을 유발한 다음 丹蔘물 추출물을 경구 투여한 丹蔘투여군 (ICH+SMR군)으로 나누었다. 각 군의 실험동물은 12마리씩 총 36마리를 사용하였다.

4. 뇌조직출혈의 유발

뇌조직출혈 유발은 electronic temperature controller (CMA150, CMA, Sweden)로 정상체온 (37±0.5℃)이 유지되는 상태에서, 2% isoflurane을 포함한 70% N_2O와 30% O_2 gas의 흡입마취 하에서 이루어졌으며, 필요한 경우 추가적으로 pentobarbital sodium (50 mg/kg)을 복강주사 하였다. 수술과정을 간단히 서술하면 다음과 같다.29)

마취된 흰쥐의 머리를 뇌정위 고정장치 (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, 뇌정위 고정장치에 장착된 Hamilton 주사기 (26-gauge, 10μ l, Hamilton, USA)를 뇌경막 (dura mater)으로부터 5.5 mm 깊이로 선조체에 삽입하였다. 이어서 1 μ l 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 0.1μ l/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. 뇌조직의 처리

면역조직화학염색을 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℃의 dry ice-isophentane 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 30 μ m 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

6. TUNEL assay

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)를 사용하여 DNA절단의 세포자연사를 표식하는 ApopTag Apoptosis Detection Kit (S7101, Chemicon, USA)를 사용하였으며, 과정은 제조사가 제공하는 설명서에 따랐다. TdT enzyme을 37℃ 가습 인큐베이터에서 1시간 동안 반응시키고 PBS로 세척한 다음 anti-digoxigenin peroxidase conjugate에 30분간, peroxidase substrate에 약 5분간 반응시켜 발색시키고 증류수로 세척하였다. 다음 0.5% methyl green 용액으로 10분간 배경염색을 한 다음 탈수하고 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

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 1차 항체를 처리하였다. 1차 항체는 anti-Bax (AB7977, 1:500 dilution, rabbit polyclonal, Abcam, USA)와 anti-Bcl-2 (SC7382, 1:500 dilution, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 사용하였으며, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4℃에서 반응시켰다. 다음 biotinylated anti-rabbit secondary antibody (1:200, Vector Labolatories, 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 발색시키고, 수세하고 탈수한 다음 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

8. 양성반응 세포의 관찰

TUNEL 표지된 신경세포와 DAB로 발색된 Bax와 Bcl-2 발현을 CCD카메라 (DP70, Olympus, Japan)가 장착된 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였으며, 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 측정한 다음 일정면적 ($10^5\mu$ m^2)으로 보정하여 자료로 사용하였다.

9. Bax protein 발현양의 western blotting 측정

뇌조직출혈 유발 48시간 후 실험동물을 과용량의 pentobarbital 복강주사로 희생시킨 후 즉시 단두하여 뇌를 적출한 다음 출혈 쪽 대뇌반구를 ice-cold lysis buffer로 단백질을 분리하고 정량하였다. 통상적인 western blotting 방법에 따랐으며, 7.5% polyacrylamide gels에서 110V, 2시간 동안 electrophoresis 하였다. 1차 항체는 anti-Bax (AB7977, 1:500 dilution, rabbit polyclonal, Abcam, USA)로 incubation하고, ECL Western detection reagents (Amersham Biosciences, USA)로 검출하였다. Internal control로 β-actin (1:5000, Sigma, USA)을 사용하였으며, Image J software (ver. 1.41, NIH, USA)를 사용하여 densitometry하고, Sham군의 수치에 비례한 발현증가 배율을 자료로 사용하였다.

10. 통계처리

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

결 과

1. TUNEL 표지세포의 변화

뇌조직출혈 흰쥐의 출혈 주변조직에서 세포자연사 지표인 TUNEL 표지세포를 동일한 일정면적에서 측정한 결과, Sham군은 1.3±0.9개, ICH군은 36.8±2.3개로 많은 증가를 나타내었다. 丹蔘을 투여한 ICH+SMR군은 28.5±2.7개로 ICH군에 비해 $P<0.05$의 유의성 있는 TUNEL 표지세포의 감소를 나타냈다 (Fig. 1).

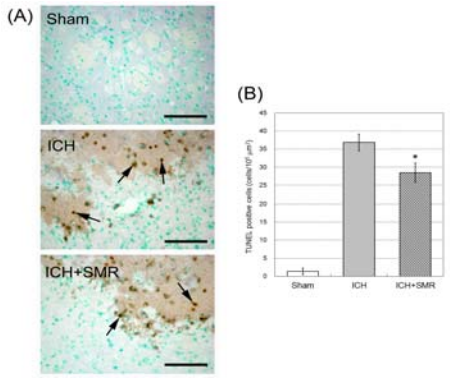

Fig. 1. Effect of Salviae Miltiorrhizae Radix (SMR) on TUNEL labeled cells in peri-hematoma of ICH-induced rats.
(A) Representative sections of TUNEL labeled cells in peri-hematoma (scale bar, 100 μ m). (B) Number of TUNEL labeled cells in peri-hematoma. SMR significantly reduces the TUNEL labeled cells compared with ICH group (*, $P<0.05$; n=6).

2. Bax 양성반응 세포의 변화

뇌조직출혈 흰쥐의 출혈 주변조직에서 Bax 양성반응 세포를 동일한 일정면적에서 측정한 결과, Sham군은 2.8±0.9개, ICH군은 46.5±4.7개로 많은 증가를 나타내었다. 丹蔘을 투여한 ICH+SMR군은 28.7±2.8개로 ICH군에 비해 $P<0.01$의 유의성 있는 Bax 양성반응 세포의 감소를 나타냈다 (Fig. 2).

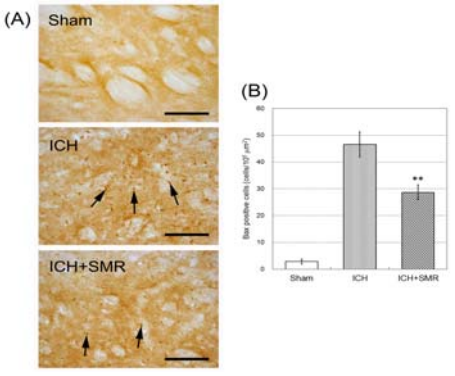

Fig. 2. Effect of Salviae Miltiorrhizae Radix (SMR) on Bax positive cells in peri-hematoma of ICH-induced rats.
(A) Representative sections of Bax positive cells in peri-hematoma (scale bar, 100 μ m). (B) Number of Bax positive cells in peri-hematoma. SMR significantly reduces the Bax positive cells compared with ICH group (*, $P<0.01$; n=6).

3. Bcl-2 양성반응 세포의 변화

뇌조직출혈 흰쥐의 출혈 주변조직에서 Bcl-2 양성반응 세포를 동일한 일정면적에서 측정한 결과, Sham군은 1.2±0.7개, ICH군은 18.3±1.8개로 많은 증가를 나타내었다. 丹蔘을 투여한 ICH+SMR군은 20.5±1.2개로 ICH군에 비해 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 3).

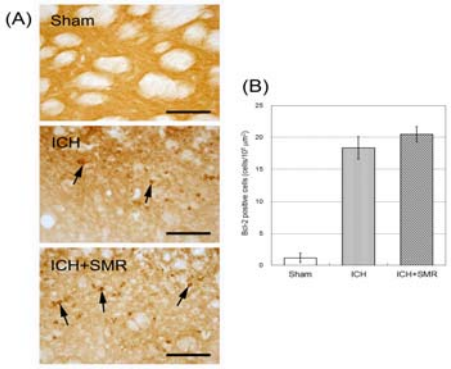

Fig. 3. Effect of Salviae Miltiorrhizae Radix (SMR) on Bcl-2 positive cells in peri-hematoma of ICH-induced rats.
(A) Representative sections of Bcl-2 positive cells in peri-hematoma (scale bar, 100 μm). (B) Number of Bcl-2 positive cells in peri-hematoma. ICH+SMR group shows a increase of the Bax positive cells, but it is not significant statistically compared with ICH group.

4. Bax 발현양의 변화

뇌조직출혈 흰쥐의 출혈측 대뇌반구에서 Bax 발현양을 측정한 결과, Sham군에 비하여 ICH군은 3.4±0.1배 증가하였다. 丹蔘을 투여한 ICH+SMR군은 2.2±0.2배로 ICH군에 비해 P<0.001의 매우 유의성 있는 Bax 발현양의 감소를 나타냈다 (Fig. 4).

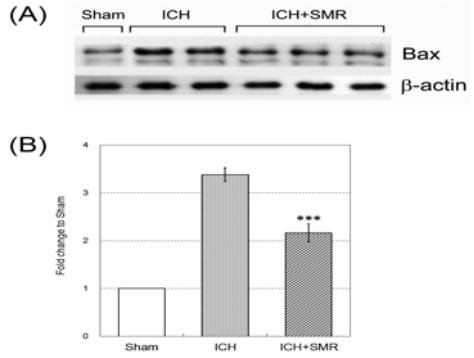

Fig. 4. Effect of Salviae Miltiorrhizae Radix (SMR) on Bax expression in hemorrhagic hemisphere of ICH-induced rats.
(A) Representative western blotting image of Bax expressions in hemorrhagic hemisphere. (B) Fold changes to Sham data of Bax expression. SMR significantly reduces the Bax expression compared with ICH group (*, P<0.001; n=6).

고 찰

丹蔘(Salvia Miltriorrhiza Radix)은 꿀풀과에 속한 다년생 초본인 丹蔘의 뿌리다. 去瘀生新약으로 活血去瘀, 活血行血의 약효가 있어 破宿血, 新生血, 風痺不隨 한다.[13,14]

단삼에 대한 실험 연구로는 신경세포 보호효과[15,16], 뇌허혈[17-19], 뇌부종[20], 혈관신생유도[21], 항염증[22,23], 고지혈증[24], 항혈전 및 항산화[25], 항암 효과[26,27], 알츠하이머 치매억제[28]에 효과가 있다고 보고되었다.

뇌출혈시 급성신경학적 이상이 나타나는 기전은 뇌출혈로 인한 직접적인 뇌조직 손상, 혈종에서 나오는 독성성분에 의한 세포자연사 및 괴사, 혈종의 압박효과로 인한 허혈음형의 가능성, 뇌부종, 염증반응을 들 수 있다.[6] 또한 뇌조직 출혈은 주변조직의 세포자연사와 염증반응에 의해 신경세포와 신경아교세포의 사망을 유도한다.[7]

세포자연사의 특징적 현상으로는 빠른 세포탈수에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질내의 칼슘농도 증가, 염색사 응축, 핵의 분절, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절 형성, transglutaminase의 활성화 및 세포자연사 소체 형성 등이 알려져 있다.[30]

세포에서 자연사가 유도될 때에는 여러 가지 형태학적 변화와 생화학적 변화를 수반한다. 염색체 응축, 미토콘드리아에서 cytochrome C의 방출이 일어나며, bcl-2와 같은 유전자들의 발현이 증감된다.[31]

세포자연사에서 TUNEL 양성세포는 세포의 손상 또는 퇴행을 보여주는 지표이다.[32]

Bax와 Bcl-2는 모두 Bcl-2 계열의 단백질들로, caspase 계열 단백질과 함께 신경세포가 미토콘드리아 손상에 의하여 DNA 절단으로 사망하는 자연사 기전에 관여하는 주요 인자이다.[33,34]

단삼이 去瘀生新하고 活血去瘀하는 효능이 있어 風痺不隨에도 치료하고 뇌손상에 효과가 있다는 연구 등으로 보아 뇌출혈로 인한 뇌조직 신경세포 자연사에 영향을 미칠 것이라고 생각된다.

이에 뇌출혈에 대한 단삼의 뇌세포 자연사에 미치는 영향에 대해서 관찰하기 위해 흰쥐의 선조체에 콜라겐 분해효소를 주입하여 뇌조직 출혈을 유발하였다. 단삼 물 추출물을 3일간 경구 투여하고 뇌출혈 주변의 사망하는 세포로 판단되는 TUNEL 양성세포, 세포사멸을 억제하는 단백질인 Bcl-2 양성세포 및 세포사멸을 유도하는 단백질인 Bax 양성세포를 면역조직화학적 방법으로 염색하여 세포수를 측정 하였다. 또한 western blot으로 Bax 단백질의 발현을 관찰 하였다.

TUNEL assay에서 형태학적으로 염색질의 응축으로 짙게 염색되는 세포에 TUNEL세포가 동시에 관찰될 때 그 세포는 자연사 기전에 의해 사망하는 세포로 판단할 수 있다.[35]

TUNEL 양성세포는 보호기전에 관여하는 단백질을 상향조정함으로써 신경을 복구하는 작용과 신경퇴행 사이의 경쟁관계를 나타내는 것일 수도 있다.[36]

본 실험에서 뇌조직출혈 주변부 TUNEL 양성반응 세포 수를 측정한 결과, 대조군에 비하여 단삼 추출물을 투여한 군은 TUNEL 양성반응 신경세포 수를 유의하게 감소시켰다.

자연사유발에 관여하는 유전자 중 자연사 기전을 억제하는 Bcl-2 단백질 및 자연사를 촉진하는 Bax 단백질이 중요하다고 보고되었다.[9] Bcl-2 family에 속하는 대표적인 단백질인 이들 중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apototic 분자로 apoptosis의 유발관계가 있다. 두 단백질의 상대적인 발현의 양적차이가 apotosis 유발에 가장 중요한 요인으로 작용한다.[37]

항세포사멸성 단백질 Bcl-2와 친세포사멸성 단백질 Bax 사이의 상호작용은 세포자멸신호를 활성화 시키는데 핵심적인 역할을 한다.[38]

이들 중 Bax는 신경세포의 자연사를 유도하는 pro-apoptotic molecule로 작용하며, Bcl-2는 anti -apoptotic molecule로 발현 감소와 증가 등 매우 다양한 양상을 나타낸다.[39,40]

Bcl-2는 세포고사 시 발생하는 cytochrome C의 세포질 방출을 억제하여 세포의 수명을 연장시키고 세포의 자연사를

억제한다.[10)]

본 실험에서 뇌조직출혈 주변부 Bcl-2 양성반응 세포수를 측정한 결과, 대조군에 비하여 단삼 물추출물을 투여한 군은 Bcl-2 양성반응 세포수를 증가 시켰으나 유의성은 없었다.

Bax는 Bcl-2와 heterodimer를 형성하고 있어 상호간에 서로의 기능을 억제하는데, Bax가 Bcl-2로부터 분리되면 직접적 혹은 Bcl-2의 다른 기전을 억제하는 간접적인 경로로 세포 고사를 촉진하는 것으로 알려져 있다.[11)]

본 실험에서 뇌조직출혈 주변부 Bax 양성반응 세포수를 측정한 결과, 대조군에 비하여 단삼 물추출물을 투여한 군은 Bax 양성반응 세포수가 유의하게 억제되었다.

또한 western blot으로 Bax 단백질 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 단삼 물추출물을 투여한 군은 Bax 단백질의 발현이 유의하게 억제되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 단삼은 TUNEL 양성반응 세포수와 Bax 양성반응 세포수의 감소와 Bcl-2 양성반응 세포수를 증가시켜 신경세포의 자연사를 억제하는 것으로 판단된다.

결 론

丹蔘이 뇌조직출혈에서 신경세포 자연사에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐의 선조체에 콜라겐 분해효소를 주입하여 출혈을 유발한 다음 丹蔘 물추출물을 경구 투여하였다. 그 후 출혈 주변부에서 세포자연사 지표인 TUNEL 표지세포와 세포자연사 조절인자인 Bax와 Bcl-2를 면역조직 화학염색과 western blotting방법으로 관찰한 바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 丹蔘 투여군에서 뇌출혈 주변부의 TUNEL 표지세포 수가 ICH군에 비해 유의하게 감소하였다.
2. 丹蔘 투여군에서 뇌출혈 주변부의 Bax 양성반응 세포 수가 ICH군에 비해 유의하게 감소하였다.
3. 丹蔘 투여군에서 뇌출혈 주변부의 Bcl-2 양성반응 세포 수가 ICH군에 비해 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다.
4. 丹蔘 투여군에서 출혈측 대뇌반구의 Bax 발현양이 ICH군에 비해 매우 유의하게 감소하였다.

이상의 결과들로 보아 신경세포의 자연사를 억제하는 효능이 있는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Statistics Korea. ANNUAL REPORT ON THE CAUSE OF DEATH STATISTICS. Dae Jeon: Statistics Korea. 2010 ; National volume : 9.
2. Qureshi AI, Tuhrim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracebral hemorrhage. N Engl J Med. 2001 ; 344 : 1450-60.
3. Lo YK, Yiu CH, Hu HH, Su MS, Laeuchli SC. Freqency and characteristic of early seizures in Chinese acute stroke. Acta Neurol Scand. 1994; 90 : 83-5.
4. Cho KH. Medical Management of spontaneous Intracebral Hemorrhage. Kor J Stroke. 2003 ; 5 : 26-9.
5. Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Intracerebral hemorrhage versus infarction :stroke severity,risk factor,and prognosis. Ann Neurol. 1995 ; 38 : 45-50.
6. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanism of brain injury after intracebral haemorrhage. Lancet Neurol. 2006 ; 5 : 53-63.
7. 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 : 1482-89.
8. Johson, EM Jr, Deckwerth, TL. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. Annu Rev Neuro Sci. 1993 ; 16 : 31-46.
9. Jugensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredensen D, Reed JC. Bax directly induced release of cytochrome c from isolated mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA. 1998 ; 95(9) : 4997-5002.
10. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. CMLS. 1998 ; 54 : 427-45.
11. Kroemer G, Dallaportra B, Resche-rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. Nature Med. 1998 ; 6 : 614-20.
12. Lenaz G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G. Mitochondria oxidative stress and antioxident defences. Acta Biochim Pol. 1999 ; 46(1) : 1-21.
13. Kang S. new medicalcenter volume. China Medicinal Herbs Grand Dictionary. HongKong: Shanghai science publishing company. 1997 ; 478- 482.
14. Lee SI. Medicinal Herbs. Seoul : Suseowon. 1975 ; 428-9.
15. Shim HN, Seong KM, Moon SJ, Lee SH, Yang JH, Song BK. The Effect of the Salvia miltiorrhiza on Axon Regeneration Following Central Nervous System Injury. J Korean Oriental Med. 2008 ; 29(2) : 47-59.
16. Park YK, Son HY. Neuroprotective effect of modified Boyanghwano- Tang and major medicinal plants, Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix on ischemic stroke in rats. Kor J Herbology. 2010 ; 25(2) : 71-79.
17. Yoon YK. The neuroprotective effect of cryptotanshinone from Salvia miltiorrhiza root extract and its water extract on ischemic brains in transient focal ischemic rats and SNP-induced cell apoptosis in N2a neuronal cells. Graduate school of Dong -Guk University. 2011.
18. Kim BO, Kim JS, Kim KS, Jeon SY, Hong S. The Effects of Salviae miltiorrhizae Radix,Carthami

Flos on Brain Ischemia Experimentally Induced from the Occulusion of Left Common Carotid Artery in Rats. KOR J OF ORIEN MED PRES. 2003 ; 11(2) : 173-184.
19. Son HY, Park YK. Neuroprotective effect of modified Boyanghwano-Tang and the major medicinal plants, Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix on ischemic stroke in rats. Kor J Herbology. 2010 ; 25(2) : 71-9.
20. Song JH. Effect of Salviae Miltiorrhiza Radix on Brain Edema and iNOS Expression of ICH-Induced Rats. Graduate school of Kyung-Hee University. 2010.
21. Kim HJ, Jeon SY, Kim JS, Kim KS, Hong S. The effects of Salviae Miltiorrhizae Radix(SR) Carthami Flos(CF) and Acori Graminei Rhizoma(AR) to cerebrral contusion. THE KOR J OF ORIEN MED PRES. 2003 ; 11(2) : 159-171.
22. Yoon HJ. Anti-inflammatory effect of Salviae Miltiorrhizae Radix. Graduate school of Dong-Guk University. 2008.
23. Kim HE, Min SY, Kim JH. In Vitro of Anti-inflammatory and Analgestic Effects of Salvia Miltorrhiza Extracts Using Luciferase Reporter Gene Assay. J Korean Oriental Med. 2008 ; 29(3) : 88-99.
24. Kim HC, Kim YW, Cho SI, Kim YS, Lee JS, Kwon JN, Kim YG. Effects of Salviae miltiorrhizae Radix (SMR) on Serum Lipid Level in Hyperlipidemic rats. Kor J Herbology. 2007 ; 22(4) : 239-245.
25. Yang SH, Im NK, Lee IS. Effects of Methanolic Extract From Salvia miltiorrhiza Bunge on in vitro Antithrombotic and Antioxidative Activities. Kor J Food Sci Thechnol. 2007 ; 39(1) : 83-7.
26. Cheng GC, Lee JY, Kim DC, Suh SO, Hwang WI. Inhibitory Effect of Salvia miltiorrhiza Extract on Growth of Some Cancer Cells. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2000 ; 29(4) : 726-731.
27. Choi SM, Choi SH, Ahn KS. Study on Antitumor and Apoptosis-Inducing Effects of Salviae miltiorrhizae Radix. Korean J Oriental Medical Pathology. 2000 ; 14(2) : 22-47.
28. Kim HS. Dementia inhibitory effects of extracts and its constituents of salvia miltiorrhiza root on alzheimer's disease model related to amyloid-beta protein. Graduate school of Chung-Ang University. 2010.
29. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats. Stroke. 1990 ; 21 : 801-807.
30. Jellinger KA. Challenge in neuronal apoptosis. Curr Alzheimer Res. 2006 ; 3(4) : 251-306.
31. Lim, M. L, M. G. Lum, T. M. Hansen, X. Roucou, and P. Nagley. On the release of cytochrome c from mitochondria durning cell death signalling. J Biomed. Sci. 2002 ; 9 : 288-506.
32. Troncoso JC. Insitu labeling of dying disease progression. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 1996 ; 55 : 1134-1142.
33. Putcha GV, Deshmukh M, Johnson EM Jr. BAX translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, Bcl-2, and caspases. J Neurosci. 1999 ; 19 : 7476-85.
34. Name SJ, Rubin LL, Philpott KL. Blocking cytochrome c activity within intact neurons inhibits apoptosis. J Cell Biol. 1998 ; 142 : 1583-93.
35. Li Y, Powers C, Jiang N, Chopp M. Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in rat. J Neurol Sci. 1998 ; 156(2) : 119-132.
36. Cotman CW, Su JH. Mechanism of neuronal death in Alzheimer's disease. Brain Pathol. 1996 ; 6(4) : 493-506.
37. Yin VM, Oltivai ZN, Korsemeyer SJ. BH1 and BH2 domains of bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax. Nature. 1994 ; 369 : 321-3. ain Pathology. 1996 ; 6 : 493- 433.
38. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyrer SJ. Bcl-2 heterodimerlizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell. 1993 ; 74 : 609-619.
39. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 familly members and the mitochondria in apoptosis. Genes Develop. 1999 ; 13 : 1899-1911.
40. Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikoeska M, Mossakowski MJ, Reed JC. Upregulation of Bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. J Neurosci. 1995 ; 15 : 6364-76.