

川芎의 뇌조직출혈 흰쥐 항염증반응에 대한 연구

백동하^{1#}, 김도훈², 김연섭^{1*}

1 : 가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실, 2: 가천대학교 한의과대학 원전외사학교실

Anti-inflammatory Effects of Cnidium Rhizoma against Intracerebral Hemorrhage in Rats

Dong-Ha Baek^{1#}, Do-Hoon Kim², Youn-Sub Kim^{1*}

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

2 : Department of Oriental Medical Classics & History, Gachon University

ABSTRACT

Objectives : Inflammation is mediated by cellular components, such as leukocytes and microglia, and molecular components, including cytokines, extracellular proteases, and reactive oxygen species. Cnidium Rhizoma effects the anti-inflammatory, antioxidant, suppression of the microglia activation and protection of the nerve cell injury. For this reason, we investigated the anti-inflammatory effects of water extracts of Cnidium Rhizoma on intracerebral hemorrhage (ICH).

Method : ICH was induced by the stereotaxic intracerebral injection of bacterial collagenase type IV (0.23 U/ μ l, 0.1 μ l/min) in Sprague-Dawley rats. We orally administrated once 3 hours after ICH, then 2 times at 24-hour intervals the water extracts of Cnidium Rhizoma (500 mg/kg), myeloperoxidase (MPO) was observed by using immunofluorescence and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and microglia were observed by using immunohistochemistry.

Results : Infiltration of MPO expressing neutrophil, expression of iNOS and TNF- α and activated microglia were significantly reduced in peri-hematoma of the rats fed with water extracts of Cnidium Rhizoma.

Conclusion : These results demonstrated that water extracts of Cnidium Rhizoma suppressed an inflammatory reaction through inhibition of MPO, iNOS and TNF- α positive cell and activated microglia number in peri-hematoma of ICH-induced rats.

Key words : Cnidium Rhizoma (CR), MPO, iNOS, TNF- α , activated microglia, ICH

서론

뇌출혈(Intracerebral Hemorrhage, ICH)은 뇌혈관질환의 심각한 형태로서, 사망률이 50%에 이르며, 생존해도 이들 중 40%는 중등도의 기능장애가 있는 채로 살아가고, 15-30%는 심각한 후유증이 동반되는 등 심각한 신경학적 손상이 뒤따른다^{1,2)}. 뇌출혈은 전체 뇌졸중의 15-20%를 차지하며 미국에서는 매년 120,000명에게 뇌출혈이 발생하지만³⁾, 현재 뇌출혈에 대한 효과적인 치료법이 없는 실정이다.

뇌출혈로 인한 신경학적 손상에는 뇌출혈 후 발생하는 염증반응이 중요한 요인으로 보고된 바 있다⁴⁾.

뇌출혈 시 염증 초기 단계에서 myeloperoxidase (MPO)가 혈관 내피세포에 침윤되면 투과성을 증가시켜 뇌세포를 더욱 손상시키며, MPO는 산화제를 생성하는 반응 기전에 중요한 역할을 한다⁵⁾. iNOS는 염증 전 매개인자(proinflammatory mediators)의 역할을 하며⁶⁾, TNF- α 는 ICH 후 염증반응을 매개시키며^{7,8)}, 활성화된 미세아교세포는 ICH 후 발생하는 뇌조직의 염증반응을 더욱 증가시킨다⁹⁾. 따라서 ICH 후의 염증반응을 억제할 수 있다면 ICH로 인해서 오는 뇌조직의 손상을 줄여 신경학적 장애를 줄일 수 있을 것으로 보인다.

川芎(Cnidium Rhizoma, CR)은 『神農本草經』에 처음

*교신저자 : 김연섭, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실
· Tel : 031-750-5420 · E-mail : ysk5708@hanmail.net.
#제1저자 : 백동하, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실
· Tel : 031-750-5427 · E-mail : quebaek@hanmail.net
· 접수 : 2014년 2월 12일 · 수정 : 2014년 3월 13일 · 채택 : 2014년 3월 14일

기재된 이래 活血行氣, 祛風止痛하는 효능이 있어 血瘀頭痛, 中風, 癰疽, 婦人科 질환 등을 치료하는 걸로 알려져 있다¹⁰⁾. 川芎에 대한 실험적 연구에서 항산화 작용¹¹⁾, 항염 작용¹²⁾, 활성미세아교세포 생성에 대한 억제작용¹³⁾, 유리기 제거 작용¹⁴⁾, 뇌허혈에 있어서의 뇌신경세포 보호효과¹⁵⁾가 있다고 하였다. 川芎에 대한 연구들과 효능을 통해 뇌출혈 후 염증에 대해 川芎이 효과가 있을 것으로 생각된다.

이에 저자는 뇌출혈로 인한 염증 반응에 대해 川芎의 효과를 관찰하기 위해 흰쥐의 선조체 내에 콜라겐 분해효소 (collagenase)를 주입하여 출혈을 유발하였으며, 川芎 물추출물을 3일간 경구 투여하였다. 이후 염증과 관련된 MPO 양성 중성백혈구 수, iNOS, TNF- α 및 활성미세아교세포 수의 변화를 면역형광과 면역조직화학염색방법을 이용하여 측정하며, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

1) 시험약물

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

본 실험에 사용한 川芎(*Cnidium officinale* Makino)은 (주)허브메디에서 국내산을 구입하였다. 세절한 川芎 400 g에 3,000 mL의 물을 가하여 전탕하고, 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조 하였다. 136.0 g의 추출물을 얻어 수율은 34.0% 이었다.

3. 군구성 및 투여

뇌조직출혈에 대한 川芎의 효능을 관찰하기 위하여 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 川芎 물추출물을 경구 투여한 川芎투여군 (ICH+CR군)으로 나누었다. 각 군의 실험동물은 12마리씩 총 36마리를 사용하였다. Sham군의 조직은 염색과정 등에서 정상대조군으로 사용하였으며, 그 자료는 실험결과로 제시하지 않았다.

약물 500 mg/kg을 실험동물의 1회 투여량으로 하였다. 뇌조직출혈 유발 3시간 뒤에 한번 그리고 약물투여 후 약 24시간 간격으로 2회 총 3회 경구투여 하였다.

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 같다¹⁶⁾.

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 두개골 천공을 만들고, 뇌정위고정장치에 장착된 Hamilton 주사기 (26-gauge, 10 μ 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 0.1 μ 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

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-fixation 하고, sucrose 용액에 담귀 침전시켰다. 다음 뇌를 -40°C의 dry ice-isopentane 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80°C에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 30 μ m 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

6. 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 대해서 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. iNOS와 TNF- α 및 미세아교세포의 표식자인 OX-42는 각각 1차 항체를 anti-iNOS (1:200, #610297, BD Science, USA), anti-TNF- α (1:100, Sc-1349, SantaCruz Biotechnology, USA) 및 anti-OX-42 (1:250, MCA275EL, Serotec, 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 씻어

낸 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.

7. 양성반응 세포의 관찰

면역형광염색된 MPO 양성반응 세포는 confocal laser-scanning microscopy (LSM510 META, CarlZeiss, Germany)를 사용하여 관찰하였으며, DAB로 발색된 iNOS와 TNF- α 및 OX-42 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 ($10^5 \mu\text{m}^2$)으로 보정하여 자료로 사용하였다.

8. 통계처리

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

결 과

1. MPO 양성반응 중성백혈구 침착의 변화

뇌조직출혈 흰쥐의 출혈 주변조직에서 MPO 양성반응의 중성백혈구 침착을 동일한 일정면적에서 측정한 결과, ICH군은 103.2 ± 4.9 개였다. 川芎을 투여한 ICH+CR군은 78.0 ± 4.6 개로 $P < 0.01$ 의 유의성 있는 중성백혈구 침착의 감소를 나타내었다 (Fig. 1).

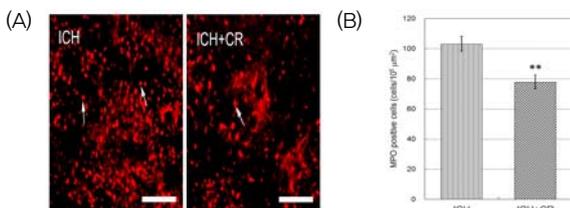


Fig. 1. Effect of Cnidium Rhizoma (CR, 500 mg/kg) on MPO positive cells in peri-hematoma of ICH-induced rats. (A) Representative sections of fluorescence MPO-labeled neutrophils in peri-hematoma. Arrows indicate MPO positive cells (scale bar, 100 μm). (B) Number of MPO positive cells in peri-hematoma. CR significantly reduces the MPO positive cells compared with ICH group (**, $P < 0.01$; $n=6$).

2. iNOS 양성반응 세포의 변화

뇌조직출혈 흰쥐의 출혈 주변조직에서 iNOS 양성반응 세포를 동일한 일정면적에서 측정한 결과, ICH군은 24.8 ± 3.0 개였다. 川芎을 투여한 ICH+CR군은 17.3 ± 1.3 개로 $P < 0.05$ 의

유의성 있는 iNOS 양성반응 세포의 감소를 나타내었다. 또한 川芎을 투여한 ICH+CR군에서는 ICH군에 비해 내포 (internal capsule) 부위에서 iNOS 발현이 현저하게 억제되었다 (Fig. 2).

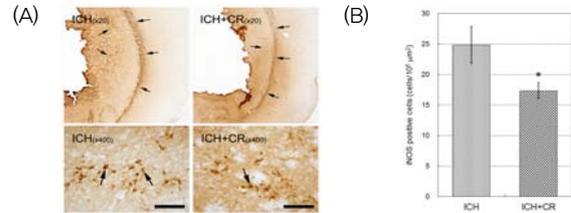


Fig. 2. Effect of Cnidium Rhizoma (CR, 500 mg/kg) on iNOS positive cells in peri-hematoma of ICH-induced rats. (A) Representative sections of iNOS positive cells in peri-hematoma and internal capsule. Arrows indicate MPO positive cells (scale bar, 100 μm). (B) Number of iNOS positive cells in peri-hematoma. CR significantly reduces the iNOS positive cells compared with ICH group (*, $P < 0.05$; $n=6$).

3. TNF- α 양성반응 세포의 변화

뇌조직출혈 흰쥐의 출혈 주변조직에서 TNF- α 양성반응 세포를 관찰한 결과, 川芎을 투여한 ICH+CR군은 ICH군에 비해 TNF- α 발현이 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 그러나 TNF- α 발현이 출혈 주변조직의 일부에서만 관찰되어 양성반응 세포 수를 측정하지는 못하였다.

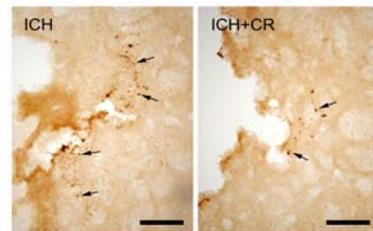


Fig. 3. Effect of Cnidium Rhizoma (CR, 500 mg/kg) on TNF- α positive cells in peri-hematoma of ICH-induced rats. CR reduced the TNF- α expression in peri-hematoma compared with ICH group. Arrows indicate TNF- α positive cells (scale bar; 200 μm).

4. 활성화미세아교세포의 변화

뇌조직출혈 흰쥐의 출혈 주변조직에서 OX42에 양성반응을 나타낸 활성화미세아교세포를 관찰한 결과, ICH군과 ICH+CR군은 모두 큰 세포체와 굵고 짧은 돌기들을 갖은 활성화된 미세아교세포들만이 관찰되었다. 활성화미세아교세포를 동일한 일정면적에서 측정한 결과, ICH군은 38.5 ± 2.7 개였으며, 川芎을 투여한 ICH+CR군은 30.7 ± 1.9 개로 $P < 0.05$ 의 유의성 있는 활성화미세아교세포의 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

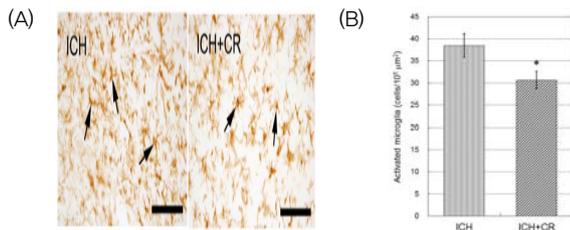


Fig. 4. Effect of Cnidium Rhizoma (CR, 500 mg/kg) on activated microglia in peri-hematoma of ICH-induced rats. (A) Representative sections of OX42 positive microglia in peri-hematoma. Arrows indicate activated microglia (scale bar, 100 μ m). (B) Number of activated microglia in peri-hematoma. CR significantly reduces the activated microglia compared with ICH group (*, $P < 0.05$; $n = 6$).

고찰

뇌출혈에서 뇌손상에 기여하는 주요한 기전들이 연구 중에 있는 가운데, 초기 염증 과정이 뇌출혈에서 뇌손상을 가중시킨다는 증거들이 제시되었고¹⁷⁾, 염증의 연쇄반응을 차단하는 것이 실험적 뇌졸중으로부터의 손상을 개선시킨다는 연구도 보고되었다¹⁸⁾.

한편 川芎(Cnidium Rhizoma)은 미나리과에 속하는 다년 생 풀인 궁궁이(Ligusticum officinale Kitag)나 산궁궁이(Ligusticum jeholense Nakai) 또는 川芎(川芎: Ligusticum chuanxiong Hort.)의 뿌리 줄기를 말린 것이다. 神農本草經에 처음 기재된 이래 活血行氣, 祛風止痛하는 효능이 있어 血瘀頭痛, 中風, 癱瘓, 婦人科 질환 등을 치료하는 걸로 알려져 있다¹⁵⁾. 이런 효능으로 인해 川芎은 小續命湯, 烏藥順氣散 등 중풍의 초기상황, 재활치료에 쓰이는 처방들에 포함돼 있기도 하다.

川芎에 대한 실험적 연구에서 항산화 작용¹⁰⁾, 항염 작용¹¹⁾, 활성미세아교세포 생성에 대한 억제작용¹²⁾, 유리기 제거 작용¹³⁾, 뇌허혈에 있어서의 뇌신경세포보호효과¹⁴⁾가 있다 하였다.

川芎에 대한 연구들과 효능을 통해 뇌출혈 후 염증에 대해 川芎이 효과가 있을 것으로 생각되어 이에 대한 연구에 착수 하였다.

뇌출혈이 발생하면 혈종이 생기며 혈종 주위 지역에서 혈액 뇌장벽(Blood Brain Barrier, BBB)이 일시적으로 중간정도로 열리고, 손상 후 수시간 내에 중성백혈구의 투과와 미세아교세포의 활성화가 일어나면서 염증반응이 발전하게 된다¹⁹⁾.

염증세포인 중성백혈구는 손상된 조직으로 이동해 축적되고²⁰⁾, 염증 반응을 더욱 가중시키는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS), 염증유발성의 프로테아제(pro-inflammatory proteases)를 생성함으로써 조직 파괴 작용을 일으킨다²¹⁾.

또한 이 과정에서 중성백혈구 내에 있는 효소인 myeloperoxidase(MPO)가 BBB 파괴와 염증세포의 투과에 여러 가지 기전으로 참여한다. MPO는 haem peroxidase-cyclooxygenase superfamily의 한 종류이며, 중성백혈구에서 가장 많이 발현되며, 단핵세포들과 특정 타입의 대식세포에서도 일부 발현된다. MPO에서 나온 산화제는 조직 손상을 유발하며 급성과 만성 혈관성 염증질환의 시작과 확산에 관여한다²²⁾. MPO는 염증질환의 진행을 판별하는 지

표로 사용되며, 중성백혈구의 면역염색 표식자로 활용되고 있다. 뇌출혈 주변조직에서 MPO 양성반응을 보이는 중성백혈구의 침윤에 대한 天芎의 영향을 관찰한 결과 川芎을 투여한 ICH+CR군이 대조군인 ICH군보다 MPO에 양성반응으로 보이는 중성백혈구 침착수를 유의하게 억제하여 뇌조직의 염증 반응을 억제하는 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

Nitric oxide(NO)는 다양한 염증과 감염 문제에서 주요한 역할을 한다. nitric oxide synthases(NOS)에는 3개의 isoform이 있는데 그 중 inducible NOS(iNOS)는 특히 염증세포와 관련된다²³⁾. iNOS에 의하여 생성된 NO는 주요한 최종산물인 nitrite(NO²⁻)를 형성하며 이는 중성백혈구 MPO 의존 경로를 통해 DNA 손상을 일으키는 활성질소종(reactive nitrogen species)인 NO₂Cl 생성을 촉진해 염증반응을 일으킨다²⁴⁾.

또한 ICH 동안 손상된 환경은 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)에 의해 깊은 영향을 받는다¹⁶⁾. 이들 사이토카인 중 TNF- α , IL-1, IL-6과 IL-10 등은 염증반응에 직접적으로 관여하며, 특히 TNF- α 는 뇌조직 손상 후 급격히 증가해 신경세포의 괴사, 염증반응 확산 등 다양한 병리기전에 개입한다^{25,26)}. ICH를 유발한 동물실험에서 TNF- α 를 억제하는 약물을 주사하였더니, 혈종 주변 조직에서 TNF- α 생성이 감소되었고, ICH 주위 세포 괴사와 신경학적 결손이 현저히 줄어들은 결과가 보고됐다²⁷⁾. 따라서 뇌혈관질환에서 TNF- α 의 발현을 억제하는 것이 뇌조직 손상을 억제할 수 있다. 염증반응의 기전과 관련하여 川芎이 TNF- α 발현과 iNOS 발현에 미치는 영향을 면역조직화학 염색을 통하여 관찰한 결과 川芎은 출혈 주변조직에서 TNF- α 와 iNOS의 발현 증가를 유의하게 억제하는 것을 확인했다.

뇌조직의 염증반응에 관여하는 가장 주요한 세포로 미세아교세포가 있다. 정상 상태에서 휴지기의 수지상 미세아교세포(ramified microglia)는 중추신경계의 신경아교세포 중 약 5-20%를 차지한다²⁸⁾. 뇌손상 후 미세아교세포는 활성화되면서 세포체의 크기가 더욱 커지고 짧고 굵은 돌기를 가진 형태로 변하고, 특수 유전자 및 단백질의 상향조절, 이주성과 증식 반응 그리고 식작용이 있게 된다²⁹⁾.

비록 ICH 후의 미세아교세포 활성화의 주요 역할이 혈종을 제거하는 것이지만 이 활성미세아교세포는 또한 여러 사이토카인, ROS, NO와 다른 독성 요소들을 발현시켜³⁰⁾, ICH가 유도된 초기 뇌조직에 염증 작용을 하는 것으로 알려졌다³¹⁾.

ICH 주변조직에서 활성미세아교세포를 관찰한 결과 본 연구의 결과에서도 뇌출혈 조직 및 주변 조직에서 활성미세아교세포들이 관찰되었다. 川芎을 투여한 ICH+CR군은 ICH군에 비교하여 뇌출혈 조직에서 나타난 활성미세아교세포들이 감소하였음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과들을 종합하면, 川芎이 MPO 양성반응 중성백혈구, iNOS, TNF- α 및 활성미세아교세포 발현을 억제하여 뇌조직 출혈 주변부의 염증을 억제하는 것으로 판단된다.

결론

뇌출혈로 인한 염증 반응에 대해 川芎의 효과를 관찰하기 위해 흰쥐의 선조체내에 콜라겐 분해효소(collagenase)를 주입하여 출혈을 유발하였으며, 川芎 물추출물을 3일간 경구 투

여하였다. 이후 염증과 관련된 MPO 양성반응의 중성백혈구 침착을 면역형광염색과 iNOS, TNF- α 및 활성미세아교 양성 반응 세포를 면역조직화학염색으로 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 川芎은 뇌출혈 주변부에서 MPO 양성반응의 중성백혈구 침착을 ICH군에 비해 유의하게 감소시켰다.
2. 川芎은 뇌출혈 주변부에서 iNOS 양성반응 세포를 ICH 군에 비해 유의하게 감소시켰다.
3. 川芎은 뇌출혈 주변부에서 TNF- α 발현을 ICH군에 비해 감소시켰다.
4. 川芎은 뇌출혈 주변부에서 활성미세아교세포 수를 ICH 군에 비해 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 川芎은 뇌출혈 주변조직에서 염증반응을 억제하는 효능이 있는 것으로 판단된다.

Referenses

1. Badjatia N, Rosand J. Intracerebral hemorrhage. *Neurologist*. 2005 ; 11 (6) : 311-24.
2. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol*. 2006 ; 5(1) : 53-63.
3. Broderick JP, Adams HP Jr, Barsan W, Feinberg W, Feldmann E, Grotta J, Kase C, Krieger D, Mayberg M, Tilley B, Zabramski JM, Zuccarello M. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage—a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*. 1999 ; 30 : 905-15.
4. Aronowski J, Hall CE. New horizons for primary intracerebral hemorrhage treatment—experience from preclinical studies. *Neurol Res*. 2005 ; 27 : 268-79.
5. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van d V. Formation of nitricoxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 1998 ; 391 : 393-7.
6. Zhao X, Zhang Y, Strong R, Zhang J, Grotta JC, Aronowski J. Distinct patterns of intracerebral hemorrhage-induced alterations in NF- κ B subunit, iNOS, and COX-2 expression. *J Neurochem*. 2007 ; 101 : 652-63.
7. Yang GY, Betz, Chenevert TI, Brunberg JA, Hoff JT. Experimental Intracerebral hemorrhage relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats. *J Neurosurg*. 1994 ; 81 : 93-102.
8. Lu A, Tang Y, Ran R, Ardizzone TL, Wagner KR, Sharp FR. Brain genomics of intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006 ; 26 : 230-52.
9. Wagner KR, Xi G, Hua Y. Lobar Intracerebral hemorrhage model in pigs: rapid edema development in perihematomal white matter. *Stroke*. 1996 ; 27 : 490-7.
10. Kang BS, Ko WC, Kim KY, Kim SH, No SH, Park YK, Seo BI, Seo YB, Song SJ, Sin MK, An DK, Lee SI, LeeYJ, Lee KH, Joo YS, Choi HY. Herbal Medicine. Seoul : Younglimsa. 1999 : 409-10.
11. Jeong JB, Ju SY, Park JH, Lee JR, Yun KW, Kwon ST, Lim JH, Chung GY, Jeong HJ. Antioxidant activity in essential oils of *Cnidium officinale* makino and *Ligusticum chuanxiong* Hort and their inhibitory effects on DNA damage and apoptosis induced by ultraviolet B in mammalian cell. *Cancer Epidemiol*. 2009 ; 33(1) : 41-6.
12. Cheng CY, Ho TY, Lee EJ, Su SY, Tang NY, Hsieh CL. Ferulic acid reduces cerebral infarct through its antioxidative and anti-inflammatory effects following transient focal cerebral ischemia in rats. *Am J Chin Med*. 2008 ; 36(6) : 1105-19.
13. Or TC, Yang CL, Law AH, Li JC, Lau AS. Isolation and identification of anti-inflammatory constituents from *Ligusticum chuanxiong* and their underlying mechanisms of action on microglia. *Neuropharmacology*. 2011 ; 60(6) : 823-31.
14. Mahesh R, Park YK. Free radical scavenging activities of *Cnidium officinale* Makino and *Ligusticum chuanxiong* Hort. methanolic extracts. *Pharmacogn Mag*. 2010 ; 6(24) : 323-30.
15. Baek IS, Park CS, Park CG. The Effects of *Cnidium Officinale* extract on the Ischemic Stroke and Oxidative Neural Damage in Rats Brain. *Kor J Herbology*. 2003 ; 18(4) : 37-46.
16. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*. 1990 ; 21 : 801-7.
17. Wang J, Doré S. Inflammation after intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 ; 27 : 894-908.
18. Han HS, Yenari MA. Cellular targets of brain inflammation in stroke. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003 ; 4 : 522-9.
19. Wasserman JK, Yang H, Schlichter LC. Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs. aged rats. *Eur J Neurosci*. 2008 ; 28 : 1316-28.
20. Lampl Y, Shmuilovich O, Lockman J, Sadeh M, Lorberboym M. Prognostic significance of blood brain barrier permeability in acute hemorrhagic

- stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2005 ; 20 : 433-7.
21. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 1989 ; 320 : 365-76.
 22. Malle E, Furtmüller PG, Sattler W, Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol*. 2007 ; 152(6) : 838-54.
 23. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 2007 ; 184(1-2) : 53-68.
 24. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 1998 ; 391(6665) : 393-7.
 25. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke*. 1994 ; 25 : 1481-8.
 26. Murakami Y, Saito K, Hara A, Zhu Y, Sudo K, Niwa M, Fujii H, Wada H, Ishiguro H, Mori H, Seishima M. Increases in tumor necrosis factor- α following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. *J Neurochem*. 2005 ; 93 : 1616-22.
 27. Mayne M, Ni W, Yan HJ, Xue M, Johnston JB, Del Bigio MR, Peeling J, Power C. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor- α expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2001 ; 32 : 240-8.
 28. Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1992 ; 48 : 405-15.
 29. Wang J, Tsirka SE. Contribution of extracellular proteolysis and microglia to intracerebral hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2005 ; 3 : 77-85.
 30. Stoll G, Schroeter M, Jander S, Siebert H, Wollrath A, Kleinschnitz C, Bruck W. Lesion-associated expression of transforming growth factor- β -2 in the rat nervous system: evidence for down-regulating the phagocytic activity of microglia and macrophages. *Brain Pathol*. 2004 ; 14 : 51-8.
 31. Wang J, Rogove AD, Tsirka AE, Tsirka SE. Protective role of tuftsin fragment 1-3 in an animal model of intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol*. 2003 ; 54 : 655-64.