

## 丹蔘이 뇌조직출혈 흰쥐의 혈액뇌관문 손상에 미치는 영향

박창훈<sup>#</sup>, 김연섭<sup>\*</sup>

가천대학교 한의과대학 해부경혈학교실

### Effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* on Blood-Brain Barrier Impairment of ICH-Induced Rats

Chang-Hoon Park<sup>#</sup>, Youn-Sub Kim<sup>\*</sup>

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

#### ABSTRACT

**Objectives** : This study was performed in order to evaluate the effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* (SMR) water extract against the cerebral hemorrhage and the blood-brain barrier (BBB) impairment in the intracerebral hemorrhage (ICH).

**Method** : ICH was induced by the stereotaxic intrastriatal injection of bacterial collagenase type IV in Sprague-Dawley rats. SMR was orally given three times every 20 hours during 3 days after the ICH induction. Hematoma volume, water content of brain tissue and volume of evans blue leakage were examined. Myeloperoxidase (MPO) positive neutrophils and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were observed with immunofluorescence labeling and confocal microscope.

**Results** : SMR significantly reduced the hematoma volume of the ICH-induced rat brain. SMR significantly reduced the water content of brain tissue of the ICH-induced rat brain. SMR reduced the percentage of the evans blue leakage around the hematoma on the caudate putamen compared to the ICH group, especially on the cerebral cortex. SMR significantly reduced the volume of the evans blue leakage level in the peri-hematoma regions of the ICH-induced rat brain. SMR significantly reduced MPO positive neutrophils in the peri-hematoma regions of the ICH-induced rat brain. SMR reduced the TNF- $\alpha$  expression in peri-hematoma regions of the ICH-induced rat brain. TNF- $\alpha$  immuno-labeled cells were coincided with MPO immuno-labeled neutrophils in peri-hematoma regions of the ICH-induced rat brain.

**Conclusion** : These results suggest that SMR plays a protective role against the blood-brain barrier impairment in the ICH through suppression of inflammation in the rat brain tissues.

**Key words** : *Salviae Miltiorrhizae Radix* (SMR), BBB, Evans blue, MPO, TNF- $\alpha$

#### 서론

뇌실질내출혈(Intracerebral hemorrhage, ICH)은 뇌졸중의 가장 위험한 질환 중 하나로, 발병 초기 높은 사망률을 가지고 있으며 사망에 이르지 않더라도 심각한 신경학적 장애를 남긴다<sup>1)</sup>. 뇌손상에서 예후를 악화시키는 기전 중 하나가 혈액뇌관문 (Blood-Brain Barrier, BBB)의 손상이다<sup>2)</sup>. 혈액뇌관

문의 손상은 염증반응이나 세포괴사에 의해서 일어나며<sup>3)</sup>, 손상으로 투과성이 증가되어 수분유입량이 증가하게 되면 뇌부종이 심해지고<sup>4)</sup>, 단핵백혈구와 대식세포가 유입이 되면 염증반응이 더욱 심화된다<sup>5)</sup>. 중성백혈구는 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증유발 cytokine와 protease의 분비를 통해 뇌출혈 이후 뇌손상에 영향을 주며, 중성백혈구의 감소는 뇌출혈 후 BBB의 붕괴, 축삭손상 및 염증을 감소시킨다<sup>6)</sup>. 그러므로 혈액뇌관문

\*교신저자 : 김연섭, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실  
· Tel : 031-750-5420 · E-mail : ysk5708@hanmail.net  
#제1저자 : 박창훈, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65, 경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실  
· Tel : 031-750-5427 · E-mail : omd1969@empal.com  
· 접수 : 2013년 12월 10일 · 수정 : 2014년 1월 16일 · 채택 : 2014년 1월 16일

손상의 억제가 뇌출혈 환자에서 이차적 손상을 완화시키는 좋은 치료법이 될 수 있다.

丹蔘 (*Salvia miltiorrhiza* BUNGE)은 脣形科(Labiatae, 꿀풀과)에 속한 多年生草木인 丹蔘의 根으로, 性은 微寒하고, 味는 苦하며 無毒하다. 心과 肝으로 歸經하며 活血祛瘀하는 效能이 있어 月經不調, 血滯經閉, 產後腹痛, 癥瘕積聚 등에 널리 사용되고 있으며 涼血消癰하는 效능으로 瘡癰腫痛, 胸脇疼痛, 風濕痺痛과 養血安神的 效능으로 心悸怔忡, 失眠 등의 病證을 치료한다<sup>7,8)</sup>.

丹蔘에 대한 실험적 연구로 항염증<sup>9)</sup>, 항혈전<sup>10)</sup>, 항산화<sup>11)</sup>, 항알레르기<sup>12)</sup>, 신경세포 자연사<sup>13)</sup> 및 뇌세포 보호 효과<sup>14)</sup>가 보고되었다. 또한 뇌출혈로 유발된 뇌부종에 유의한 효과가 있다<sup>15)</sup>고 하였다.

丹蔘의 活血祛瘀하는 본초학적 效능, 항염증 작용 및 뇌신경세포 보호 效果에 대한 연구보고들을 감안하면 뇌출혈에 따른 혈액뇌관문의 손상에 대해서도 유의한 效果가 있을 것으로 생각된다.

이에 저자는 뇌출혈에 의한 혈액뇌관문 손상에 미치는 丹蔘의 效능을 관찰하기 위하여, 실험동물의 선조체 내에 콜라겐 분해효소 (collagenase)를 주입하여 선조체 내에 출혈을 유발시키고, 丹蔘 물 추출물을 3일간 경구 투여하였다. 이후 뇌출혈 부위의 크기와 뇌조직의 수분함량을 측정하고, 혈액뇌관문 손상을 관찰하고자 Evans blue 투과율과 투과량의 변화를 관찰하였으며, 염증반응을 살펴보고자 Myeloperoxidase (MPO)와 Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 동시 발현을 면역형광 방법으로 염색하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻어 이에 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 사육하였고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

### 2. 약물의 제조와 투여

본 실험에 사용한 丹蔘 (*Salviae Miltiorrhizae Radix*, SMR)은 (주)윌니허브(대구, 한국)에서 규격 포장한 중국산을 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 경구 투여 하였다.

### 3. 실험군의 구분

뇌조직출혈에 대한 丹蔘의 效능을 관찰하기 위하여 실험군은 다음과 같이 구분하였다. 마취와 두정부의 피부절개 및 두개골의 천공 과정은 시행하였으나 collagenase를 주입하지 않은 정상대조군 (Sham군), 두개골 천공 후 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 30마리씩 총 90마리를 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% N<sub>2</sub>O와 30% O<sub>2</sub> gas의 흡입마취 하에서 이루어졌으며, 필요한 경우 추가적으로 pentobarbital sodium (50 mg/kg)을 복강주사 하였다. 수술과정을 간단히 서술하면 다음과 같다<sup>16)</sup>.

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  $\mu$ l, Hamilton, USA)를 뇌경막 (dura mater)으로부터 5.5 mm 깊이로 선조체에 삽입하였다. 그리고 주입량 1  $\mu$ l 내에 0.23 U의 bacterial collagenase type IV (C0773, Sigma-Aldrich, USA) 용액을, micropump (Model 310, Kd Scientific Inc, USA)를 사용하여 0.1  $\mu$ l/min의 속도로 Hamilton 주사기를 통해 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 크기의 측정

뇌조직출혈 유발 48시간 후 실험동물을 150 mg/kg의 pentobarbital 복강주사로 희생시키고 즉시 단두하였다. 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 정상 측 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.

## 6. 뇌조직 수분함량의 측정

뇌조직출혈 유발 48시간 후 실험동물을 150 mg/kg의 pentobarbital 복강주사로 희생시키고 즉시 단두하였다. 뇌를 적출한 다음 소뇌와 뇌간을 제거하고 뇌를 정상측과 출혈측 대뇌반구로 이등분 하였다. 각 대뇌반구의 무게를 chemical balance (Mettler, AM100, Switzerland)로 측정된 다음 120°C의 dry oven (Daeil Engineering, DMC121, Korea)에서 48시간동안 건조하여 다시 무게를 측정하였다. 수분함량은 각 대뇌반구의 건조 전후 무게 차이를 비율로 계산하여 자료로 사용하였다.

## 7. 혈액뇌관문 투과율과 Evans blue 투과량의 측정

Evans blue (EB)의 형광을 이용한 혈액뇌관문 투과율의 관찰<sup>17)</sup>은 실험동물을 뇌조직출혈 유발 48시간 후 마취상태에서 대퇴정맥에 카테터를 삽입하고 2% Evans blue (EB) 용액을 4 ml/kg 용량으로 서서히 주입하여 30분간 순환시켰다. 다음 실험동물을 생리식염수로 심장관류하고 뇌를 적출한 다음 cryocut으로 50 µm 두께의 조직절편을 만들고, 별도의 염색 없이 confocal laser-scanning microscopy (LSM510 META, CarlZeiss, Germany)로 관찰하였다. 또한 EB 투과량의 측정을 위해서는, 뇌를 적출한 다음 뇌조직을 20% trichloroacetic acid에서 분쇄하여 EB를 추출 하고, 1500 g에서 15분간 원심 분리 하였다. 다음 fluorescence spectrophotometer (620 nm, Glomax20-20 Luminometer, Tuner Biosystems, USA)에서 EB 형광량을 측정하고 standard curve와 뇌조직 무게로 보정하여 투과량을 계산하였다.

## 8. 뇌조직의 처리

면역조직화학 및 면역형광 염색을 위해 뇌조직출혈 유발 48시간 후 실험동물을 150 mg/kg pentobarbital을 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°C의 dry ice-isophentane 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80°C에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 30 µm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

## 9. 면역조직화학 및 면역형광 염색

뇌조직을 0.05 M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10분간 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain, USA)과 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)을 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후 1차 항체를 처리하였다. TNF-α에 대해서 1차 항체는 anti-TNF-α (1:100, Sc-1349, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 사용하였으며, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으

로 희석한 후 4°C에서 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 발색시켰다. 호중성백혈구 관찰을 위해서는 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 사용하여 면역형광염색 하였다. 또한 MPO와 TNF-α의 double fluorescence labeling을 위해서는 위의 1차 항체를 이중으로 반응시키고, Cy3와 Cy5로 형광 염색하여 수세하고 탈수한 다음 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

## 10. 양성반응 세포의 관찰

DAB로 발색된 TNF-α 발현은 CCD카메라 (DP70, Olympus, Japan)가 장착된 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였으며, MPO 및 MPO와 TNF-α의 이중 형광 염색된 뇌조직은 confocal laser-scanning microscopy (LSM510 META, CarlZeiss, Germany)를 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 측정된 다음 일정면적 (105 µm<sup>2</sup>)으로 보정하여 자료로 사용하였다.

## 11. 통계 처리

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

# 결 과

## 1. 뇌출혈 크기의 변화

뇌조직출혈 흰쥐에 丹蔘을 투여한 후 뇌출혈 크기를 측정 한 결과, ICH군은 31.37±1.73 mm<sup>3</sup> 이었으며, 丹蔘을 투여한 ICH+SMR군은 22.74±1.06 mm<sup>3</sup>로 유의성(P<0.01) 있는 뇌출혈 크기의 감소를 나타내었다 (Fig. 1).



Fig. 1. Representative brain slices of ICH-induced rats. Red colored regions on slices indicate the hematoma induced by collagenase injection. SMR treated rat (ICH+SMR) shows a reduction in hematoma volume compared with ICH group.

### 2. 뇌조직 수분함량의 변화

뇌조직출혈 흰쥐에 丹蔘을 투여한 후 정상측 대뇌반구와 출혈측 대뇌반구의 뇌조직 수분함량을 측정된 결과, 정상측은 ICH군과 ICH+SMR군 사이에 변화가 없었으며, 출혈측 대뇌반구에서 ICH군은 81.13±0.38%의 수분함량을 보여 정상측에 비해서 약 3.8% 증가하였다. 丹蔘을 투여한 ICH+SMR군은 79.59±0.51%로 정상측에 비해서 약 2.1% 증가하였으며, ICH군에 비해서는 유의성( $P<0.05$ ) 있는 뇌조직 수분함량의 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

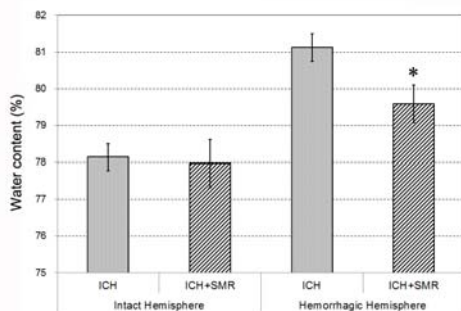


Fig. 2. Effect of Salviae Miltiorrhizae Radix (SMR) on water content of brain tissue in ICH-induced rats. SMR significantly reduces the water content of hemorrhagic hemisphere compared with ICH group (\*,  $P<0.05$ ; n=6).

### 3. 혈액뇌관문 투과율의 변화

Evans blue 투과에 의한 혈액뇌관문 투과율을 공초점현미경 영상으로 관찰한 결과, ICH군은 출혈측 대뇌반구에서 선조체의 출혈부위 주위 (Fig. 3, ICH x20)는 물론 대뇌피질 (Fig. 3, ICH x200)에서도 현저한 EB 누출이 관찰되었다. 丹蔘을 투여한 ICH+SMR군에서는 선조체의 출혈부위 주위 (Fig. 3, ICH+SMR x20)에서 EB 누출이 감소되었으며, 특히 대뇌피질 (Fig. 3, ICH+SMR x200)에서는 ICH군에 비해 EB 누출이 현저하게 감소된 것을 관찰할 수 있었다.

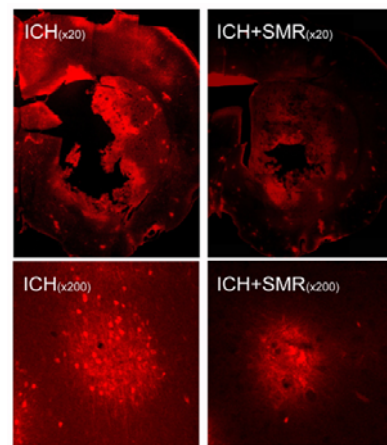


Fig. 3. Representative brain sections of Evans blue-fluorescence in ICH-induced rats. SMR treated rat (ICH+SMR) displayed weaker EB leakage around the hematoma on the caudate putamen (upper) compared to the ICH group, especially on the cerebral cortex (lower). In high power (x200), EB leakage is diminished also in ICH+SMR group compared with the ICH group.

### 4. Evans blue 투과량의 변화

뇌조직출혈 흰쥐에 丹蔘을 투여한 후 정상측 대뇌반구와 출혈측 대뇌반구의 EB 투과량을 측정된 결과 정상측은 ICH군과 ICH+SMR군 사이에 변화가 없었으며, 출혈측 대뇌반구에서는 ICH군은 5.48±0.78 mg/g brain tissue로 정상측에 비해서 약 85.8% 증가하였다. 丹蔘을 투여한 ICH+SMR군은 3.22±0.55 mg/g brain tissue로 정상측에 비해서 약 41.9% 증가하였으며, ICH군에 비해서는 유의성( $P<0.05$ ) 있는 EB 투과량의 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

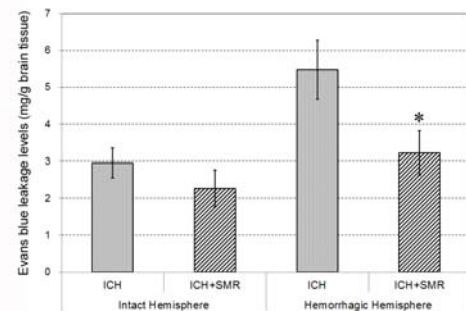


Fig. 4. Effect of Salviae Miltiorrhizae Radix (SMR) on Evans blue leakage level in the brain tissue of ICH-induced rats. SMR significantly reduces the Evans blue leakage level of hemorrhagic hemisphere compared with ICH group (\*,  $P<0.05$ ; n=6).

### 5. MPO 양성반응 중성백혈구 침착의 변화

뇌조직출혈 흰쥐에 丹蔘을 투여한 후 출혈 주변조직에서 MPO 양성반응의 중성백혈구 침착을 측정된 결과, 동일한 일정 면적에서 ICH군은 81.2±4.8 개가 관찰되었으며, 丹蔘을 투여한 ICH+SMR군은 67.5±3.6 개가 관찰되어 유의성( $P<0.05$ ) 있는 중성백혈구 침착의 감소를 나타내었다 (Fig. 5).

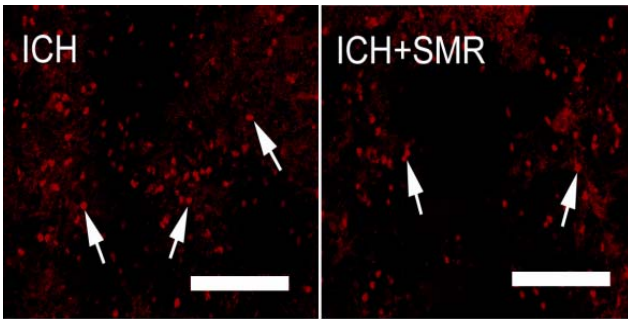


Fig. 5. Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* (SMR) on MPO positive cells in peri-hematoma of ICH-induced rats. (A) Representative sections of fluorescence MPO-labeled neutrophils in peri-hematoma. Arrows indicate MPO positive cells (scale bar, 100  $\mu$ m). (B) Number of MPO positive cells in peri-hematoma. SMR significantly reduces the MPO positive cells compared with ICH group (n=6).

### 6. TNF- $\alpha$ 발현의 변화

뇌조직출혈 흰쥐에 丹蔘을 투여한 후 출혈 주변조직에서 TNF- $\alpha$  발현을 면역조직화학염색으로 관찰한 결과, 丹蔘을 투여한 ICH+SMR군은 ICH군에 비해 TNF- $\alpha$  발현이 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6, arrows). 그러나 TNF- $\alpha$  발현이 출혈 주변조직의 일부에서만 관찰되어 양성반응 세포수를 측정하지는 못하였다.

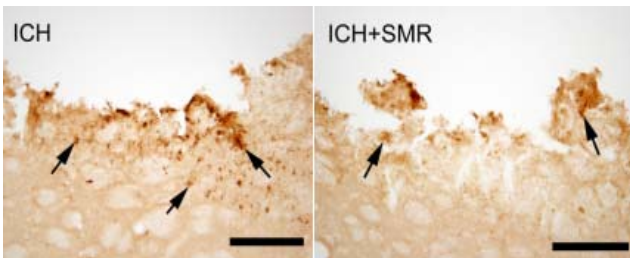


Fig. 6. Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* (SMR) on TNF- $\alpha$  expression in peri-hematoma of ICH-induced rats. SMR reduced the TNF- $\alpha$  expression in peri-hematoma compared with ICH group (arrows, scale bar; 200  $\mu$ m).

### 7. 중성백혈구 침착과 TNF- $\alpha$ 발현의 상관성

뇌조직출혈 주변부에서 MPO 양성반응의 중성백혈구와 TNF- $\alpha$  발현 세포가 일치하는가를 이중면역형광염색으로 관찰한 결과, MPO에 양성반응을 보이는 거의 대부분의 중성백혈구에서 TNF- $\alpha$ 가 발현되었으며 (Fig. 7, arrows), 일부 MPO 양성반응의 중성백혈구는 TNF- $\alpha$ 를 발현하지 않았다 (Fig. 7, arrowhead). 그러므로 출혈 주변부에서 발현된 TNF- $\alpha$ 는 중성백혈구에서 발현된 것으로 판단된다.

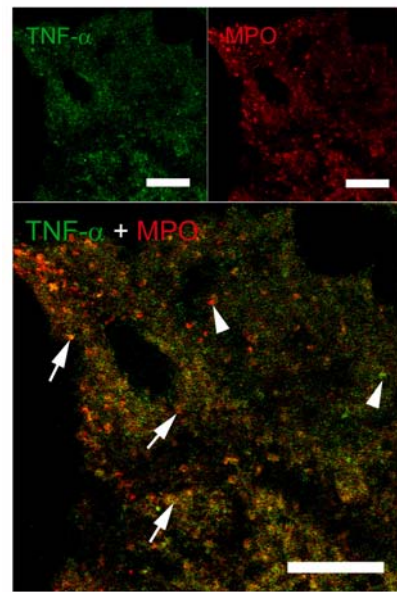


Fig. 7. Representative double-immunofluorescence section of TNF- $\alpha$  and MPO positive cells in peri-hematoma of ICH-induced rats. TNF- $\alpha$  immuno-labeled cells (green) were coincided with MPO immuno-labeled neutrophils (red) in the peri-hematoma (arrows) (scale bar, 100  $\mu$ m).

## 고찰

丹蔘은 心과 肝 2경의 血分에 들어가 苦味로 强行血하고 微寒으로 능히 血熱을 제거할 수 있으므로 活血祛瘀의 效가 있어 대개 血熱과 瘀血이 있는 모든 증에 응용할 수 있다<sup>18)</sup>. 丹蔘은 四物湯의 效能과도 같은데 이는 活血祛瘀하는 작용이 매우 좋을 뿐더러 養血의 작용도 비교적 微弱하지만 있기 때문이며, 또한 祛瘀, 除血熱하며 아울러 止痛하는 效가 있고, 血中の 熱을 除去하며 除煩安神의 效와 養血安神하는 效가 있다<sup>19)</sup>.

ICH는 서양에서 전체 뇌졸중 15%에 해당하며<sup>20)</sup>, 병원 통계상 30일 치사율이 35%에 이르는 치명적인 질환이다<sup>21)</sup>. 생존하더라도 이들 중 반 정도가 도움을 받아야 독립적으로 야외활동을 할 수 있으며, 환자의 20%는 6개월 동안 도움 없이는 생활이 불가능하다<sup>22)</sup>. 비슷한 크기의 허혈성 뇌경색에 비해 회복기 예후도 더 나쁜 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>. 또한 허혈성 뇌졸중의 15-43%가 hemorrhagic transformation을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>24)</sup>. 뇌출혈로 인한 급성 신경병리학적 손상은 출혈로 인한 물리적인 손상, 세포독성에 의한 세포자연사 및 괴사, 혈종의 압박효과로 인한 허혈음영 (ischemic penumbra)의 가능성, 뇌부종, 그리고 염증 반응 등에 의해 발생한다<sup>25)</sup>.

혈액뇌관문이란 모세혈관과 뇌조직 사이의 투과성이 낮은 막을 말하는 것으로, 중추신경계에서 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다<sup>26)</sup>. 물리적인 혈액뇌관문은 뇌 모세관 내피세포 사이의 천공 부족과 인접한 내피세포 사이의 접착결합 (Adherens Junction, AJ)과 밀착연접 (Tight Junction, TJ)의 존재, 그리고 세포 간 확산의 부족의 결과에 기인하며, 특히 TJ는 혈액 뇌관문에 걸친 이온 유입의 방지를 위해 필요하다<sup>27)</sup>.

뇌졸중, 당뇨병, 알츠하이머병, 다발성경화증, 염증성 통증을 포함한 병리학적 조건에서 혈액뇌관문의 이온 항상성유지



와 운반 기능에 장애가 발생한다<sup>28-31</sup>). 혈액뇌관문의 손상은 뇌출혈 이후 뇌손상의 결정적 증거가 된다. 혈액뇌관문의 손상으로 뇌부종, 백혈구의 유입, 잠재적 신경자극 요소의 침입이 혈종주변의 뇌조직에서 일어나며, 이러한 변화가 뇌조직 손상을 일으킨다. 잠재적 신경자극 요소로는 Cytokines와 Chemokines 같은 염증 매개물, Thrombin, Hemoglobin breakdown products, 산화 스트레스 (Oxidative stress), 보체 (Complement), Matrix metalloproteinases (MMPs) 등이 있고, 이 매개물 일부 간의 상호 작용이 있지만, 여러 경로를 차단하거나 일반적인 최종 경로를 차단하는 방법을 통해 뇌출혈로 유발된 혈액뇌관문의 손상을 예방할 수 있다<sup>32</sup>).

기존의 연구에서 뇌출혈에 따른 뇌부종 억제 효과와 함염증 작용이 있다고 보고된 丹蔘이 혈액뇌관문의 손상에도 효과가 있으리라 유추하여 연구를 시작하였다. 본 연구에서는 丹蔘의 뇌출혈에 의한 혈액뇌관문 손상에 미치는 丹蔘의 효능을 관찰하기 위하여, 실험동물의 선조체 내에 콜라겐 분해효소 (collagenase)를 주입하여 출혈을 유발시키고, 丹蔘 물 추출물을 3일간 경구 투여하여 뇌출혈 흰쥐의 뇌출혈 크기를 측정하였다. 그 결과 뇌출혈 크기는 ICH군에 비해 丹蔘추출물을 투여한 ICH+SMR군이 유의하게 감소하였다. 이로서 丹蔘이 직접적으로 뇌출혈을 억제하는데 유의한 효과가 있음을 알 수 있었다.

혈액뇌관문의 손상은 뇌부종의 결과를 가져오는데, 뇌부종을 측정하기 위해 뇌수분함량을 측정하였다. 뇌부종에는 혈액뇌관문의 역할에 따라 세포 외액 (extracellular fluid)의 축적과 혈액뇌관문의 손상이 특징인 혈관성 부종 (vasogenic edema)과 혈액뇌관문의 손상 없이 세포내 수분유입의 증가에 의해 유발되는 세포독성 부종 (cytotoxic edema)이 있다<sup>33</sup>. 본 연구에서 뇌출혈 흰쥐의 출혈측 대뇌반구의 뇌조직 수분함량을 측정한 결과, 출혈측 대뇌반구에서 ICH군에 비해 丹蔘 물 추출물을 투여한 ICH+SMR군이 유의하게 감소한 것으로 관찰되었다. 이는 丹蔘이 혈액뇌관문 손상을 완화하여 뇌실질로의 수분유입을 억제한 것으로 추측된다.

혈액뇌관문의 투과성을 살펴보기 위해, 정상적인 경우 혈액뇌관문을 통과할 수 없는 Evans blue를 이용하여 투과실험을 실시하였다. Evans blue는 혈액뇌관문이 손상되면 albumin과 결합하여 뇌실질로 유입되므로, Evans blue의 투과 측정은 혈액뇌관문의 손상 여부를 알아보는 방법이 된다<sup>34</sup>. 뇌출혈 흰쥐의 출혈측 대뇌반구에서 EB 투과에 의한 혈액뇌관문 투과성 변화를 관찰한 결과, ICH군은 뇌출혈이 유발된 대뇌반구의 선조체 전체에서 EB의 붉은 형광발산을 광범위하게 관찰할 수 있었으며, 특히 내포 (internal capsule)를 따라 강한 붉은 형광발산이 관찰되었다. ICH+SMR군에서는 뇌출혈 주변의 선조체와 내포 모두에서 ICH군에 비하여 EB의 붉은 형광발산이 현저하게 감소되어 있었다. 이러한 EB 투과는 고배율의 관찰에서도 ICH군에 비하여 ICH+SMR군에서 현저하게 감소하였다. 또한 뇌출혈 흰쥐의 출혈측 대뇌반구에서 EB 투과량을 관찰한 결과 ICH+SMR군이 ICH군에 비해 유의성 있는 EB 투과량의 감소를 나타내었다. 이로부터 丹蔘이 혈액뇌관문의 손상 억제에 유의한 효과가 있다고 추측할 수 있다.

뇌출혈은 대식세포의 축적에 따른 중성백혈구의 초기 침윤을 포함한 강한 염증반응이 동반 한다<sup>35</sup>). MPO 양성반응 중

성백혈구로부터의 oxidant 발생증가는 염증 유발에 영향을 미치게 됨<sup>36</sup>)으로 MPO에 기원한 chlorinated compounds의 정량은 염증질환의 진행을 판별하는 지표로 사용된다<sup>37</sup>). 뇌조직 출혈 흰쥐의 출혈측 대뇌반구 뇌출혈 주변부에서 MPO에 양성반응을 보이는 중성백혈구 침착을 관찰한 결과, MPO 양성반응 세포가 ICH군에 비해 丹蔘 물 추출물을 투여한 ICH+SMR군이 유의하게 감소하였다.

TNF- $\alpha$ 는 염증반응의 주요 증개자로, IL-6 (interleukin-6) 같은 다른 전염증성 cytokine의 증가 시킨다<sup>38</sup>). 정상적인 조건하에서 TNF- $\alpha$ 는 mRNA의 전환에 의해 엄격하게 조절되고 있다<sup>39</sup>). 그러나 뇌에 염증이 일어나면 macrophages와 microglia가 TNF- $\alpha$ 를 활성화하고 생산성을 높게 된다<sup>40</sup>). 뇌조직 출혈 흰쥐의 출혈측 대뇌반구 뇌출혈 주변부에서 TNF- $\alpha$  발현을 면역조직화학염색으로 관찰한 결과, ICH군에 비해 丹蔘 물 추출물을 투여한 ICH+SMR군이 감소하였다. 이를 볼 때 丹蔘이 뇌출혈 이후의 뇌조직의 염증반응을 억제하는 데에 효과가 있다고 볼 수 있다.

뇌출혈에 대한 丹蔘의 이전 연구에서 MPO와 TNF- $\alpha$  발현에 대한 각각의 효과는 발표된 것은 있었으나 이들의 일치성에 대한 연구는 없었다. 그래서 본 연구에서는 뇌출혈 흰쥐의 출혈측 대뇌반구 뇌출혈 주변부에서 MPO 양성반응의 중성백혈구와 TNF- $\alpha$  발현 세포가 일치하는가를 이중면역형광염색으로 관찰하였다. 그 결과 일부 세포를 제외하고 거의 대부분의 중성백혈구에서 TNF- $\alpha$ 가 발현되는 것으로 관찰되었다. 이로 볼 때 중성백혈구와 TNF- $\alpha$ 를 줄이면서 혈액뇌관문 손상을 억제한다고 볼 수 있다.

종합적으로 연구 결과를 살펴보면 뇌출혈 이후 丹蔘을 투여한 군에서 투여하지 않은 군에 비해 뇌출혈 크기와 뇌수분함량이나 혈액뇌관문의 투과성, Evans blue 투과율과 투과량 및 MPO와 TNF- $\alpha$  발현의 상관성에서 유의한 효과를 나타내었다.

이상의 결과들로 보아 丹蔘은 출혈 주변 조직에서 혈액뇌관문 투과성 향진을 억제하여 뇌출혈에 대해 유의한 효능을 발휘하는 것으로 생각된다.

## 결론

丹蔘이 뇌조직출혈에서 혈액뇌관문 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐의 선조체에 콜라겐분해효소를 주입하여 출혈을 유발한 다음 丹蔘 물 추출물을 경구 투여하였다. 출혈 유발 48시간 후에 뇌출혈 크기와 뇌조직 수분함량을 측정하고, Evans blue의 혈액뇌관문 투과를 관찰하였으며, MPO 양성반응의 중성백혈구 침착과 TNF- $\alpha$  발현을 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 뇌출혈 크기는 丹蔘투여군이 ICH군에 비해 유의하게 감소하였다.
2. 뇌조직 수분함량은 출혈측 대뇌반구에서 丹蔘투여군이 ICH군에 비해 유의하게 감소하였다.
3. Evans blue의 혈액뇌관문 투과율은 丹蔘투여군이 ICH군에 비해 감소하였으며, Evans blue 투과량은 출혈측

대뇌반구에서 丹蔘투여군이 ICH군에 비해 유의하게 감소하였다.

4. 출혈 주변부에서 MPO에 양성반응을 보이는 중성백혈구 침윤은 丹蔘투여군이 ICH군에 비해 유의하게 감소하였다.
5. 출혈 주변부에서 TNF- $\alpha$  발현은 丹蔘투여군이 ICH군에 비해 감소하였다.
6. 출혈 주변부에서 MPO와 TNF- $\alpha$  발현을 이중면역형광 염색으로 관찰한 결과 TNF- $\alpha$  는 MPO 양성반응의 중성백혈구에서 발현되는 것으로 관찰되었다.

이상의 결과들로 보아 丹蔘은 출혈 주변조직에서 염증을 억제하는 기전을 통해 혈액뇌관문 투과성 향진을 억제하며, 뇌조직출혈에 대해 유의한 효능을 발휘하는 것으로 생각된다.

## References

1. Manaenko A, Chen H, Kammer J, Zhang JH, Tang J. Comparison Evans blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. *J Neurosci Methods*. 2011 ; 195(2) : 206-10.
2. Claassen J, Carhuapoma JR, Kreiter KT, Du EY, Connolly ES, Mayer SA. Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome. *Stroke*. 2002 ; 33 : 1225-32.
3. Abbott NJ. Inflammatory Mediators and Modulation of Blood-Brain Barrier Permeability. *Cell Mol Neurobiol*. 2000 ; 20(2) : 131-47.
4. Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V. Brain oedema in focal ischaemia : molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol*. 2007 ; 6 : 258-68.
5. Alvarez-Diaz A, Hilario E, de Cerio FG, Valls-i-Soler A, Alvarez-Diaz FJ. Hypoxic-ischemic injury in the immature brain-key vascular and cellular players. *Neonatology*. 2007 ; 92 : 227-35.
6. Moxon-Emre I, Schlichter LC. Neutrophil depletion reduces blood-brain barrier breakdown, axon injury, and inflammation after intracerebral hemorrhage. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011 ; 70(3) : 218-35.
7. Kim HC. *Herbal Pharmacology*. Seoul : Jipmundang. 2001 : 332-4.
8. *Herbology department of all-korea oriental medicine colleges*. *Herbology*. Seoul : Youngrimsa. 1995 : 419-20.
9. Yun HJ, Heo SK, Yun HJ, Park WH, Park SD. Anti-inflammatory effect *Salviae Miltiorrhizae Radix*. *Kor J Herbology*. 2007 ; 22(4) : 65-73.
10. Im NK. Antioxidative and antithrombotic effect of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and it's bioactive components. Keimyung University Graduate School. 2008.
11. Yang SA, Im NK, Lee IS. Effect of Methanolic Extract from *Salviae Miltiorrhiza* Bunge on in vitro Antithrombotic and Antioxidative Activities. *K J Food Sci Technol*. 2007 ; 39 : 83-7.
12. Fana GW, Gaoa XM, Hong WG, Yan Z, Ju Z, Hua LM, Sua YF, Kanga LY, Zhanga BL. The anti-inflammatory activities of Tanshinone IIA, an active component of TCM, are mediated by estrogen receptor activation and inhibition of iNOS. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009 ; 113(3-5) : 275-80.
13. Lee HG, Kim YS. Effects of *Salvia Miltiorrhiza Radix* on Neuronal Apoptosis following Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27(3) : 89-94.
14. Shim HN, Seong KM, Moon SJ, Lee SH. The Effect of the *Salvia miltiorrhiza* on Axon Regeneration Following Central Nervous System Injury. *J Korean Oriental Med* 2008 ; 29(2) : 47-59.
15. Song JH. Effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* on Brain Edema and iNOS Expression of ICH-Induced Rats. *Kyunghee University East-West Medicine Graduate School*. 2010.
16. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*. 1990 ; 21 : 801-7.
17. Del VJ, Camins A, Pallàs M, Vilaplana J, Pelegrí C. A new method for determining blood-brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans blue-Hoechst cocktail. *J Neurosci Methods*. 2008 ; 174(1) : 42-9.
18. Sin MG. *Clinical Herbalogy*. Seoul : Younlim Publishers. 1989 ; 372-4.
19. Lee SG, An DK, Sin MG, No SG, Lee YJ, Kim SH. *Herbal Clinical application*. Seoul : Sungbosa. 1990 ; 269-71.
20. Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med*. 2001 ; 344 : 1450-60.
21. Norrving B. Cerebral hemorrhage. *Cerebrovascular Disease: Pathophysiology Diagnosis and Management*. Malden Mass : Blackwell Science. 1998 : 56.
22. Fogelholm R, Nuutila M, Vuorela AL. Primary intracerebral haemorrhage in the Jyvaskyla region, central Finland, 1985-89: incidence, case fatality rate, and functional outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992 ; 55 : 546-52.
23. Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Intracerebral hemorrhage versus infarction:

- stroke severity, risk factors, and prognosis. *Ann Neurol*. 1995 ; 38 : 45–50.
24. Lyden PD, Zivin JA. Hemorrhagic transformation after cerebral ischemia: mechanisms and incidence. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1993 ; 5 : 1–16.
  25. Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med*. 2001 ; 344(19) : 1450–60.
  26. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*. 1967 ; 34 : 207–17.
  27. Brown RC, Davis TP. Calcium Modulation of Adherens and Tight Junction Function : A Potential Mechanism for Blood–Brain Barrier Disruption After Stroke. *Stroke* 2002 ; 33 : 1706–11.
  28. Abbruscato TJ, Davis TP. Combination of hypoxia/aglycemia compromises in vitro blood–brain barrier integrity. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 ; 289 : 668–75.
  29. Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ. Effect of diabetes mellitus on the permeability of the blood–brain barrier to insulin. *Peptides*. 1997 ; 18 : 1577–84.
  30. Kalaria RN. The blood–brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 ; 893 : 113–25.
  31. Huber JD, Witt KA, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP. Inflammatory pain alters blood–brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol*. 2001 ; 280 : H1241–8.
  32. Keep RF, Xiang J, Ennis SR, Andjelkovic A, Hua Y, Xi G, Hoff JT. Blood–brain barrier function in intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 2008 ; 105 : 73–7.
  33. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Pathophysiology of brain edema formation. *Neurosurg Clin N Am*. 2002 ; 13 : 371–83.
  34. Manaenko A, Chen H, Kammer J, Zhang JH, Tang J. Comparison Evans blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood–brain barrier in a mice hemorrhage model. *J Neurosci Methods*. 2011 ; 195(2) : 206–10.
  35. Filep JG, El Kebir D. Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *J Cell Biochem*. 2009 ; 108(5) : 1039–46.
  36. Malle E, Furtmuller PG, Sattler W, Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development?. *Br J Pharmacol*. 2007 ; 152(6) : 838–54.
  37. Matsubara T, Pararajasegaram G, Wu GS, Rao NA. Retinal microglia differentially express phenotypic markers of antigen–pre–senting cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 ; 40 : 3186–93.
  38. Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996 ; 20 : 445–52.
  39. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL. Processing of tumour necrosis factor–alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*. 1994 ; 370 : 555–7.
  40. Bethea JR, Gillespie GY, Chung IY, Benveniste EN. Tumor necrosis factor production and receptor expression by a human malignant glioma cell line, D54–MG. *J Neuroimmunol*. 1990 ; 30 : 1–13.