

원 저

廣豆根이 白鼠 中大腦動脈 閉鎖에 의한 局所腦虛血損傷에 미치는 效果

이현삼, 정혁상, 강철훈, 손낙원

경희대학교 동서의학대학원 신경과학전공

Effects of *Sophora Subprostrata* against Focal Cerebral Ischemic Damage by Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats

Hyun-Sam Lee, Hyuk-Sang Jung, Chul-Hun Kang, Nak-Won Sohn

Department of Neuroscience, Graduate School of East-west Medical Science, Kyunghee University

Objective : This research was performed to investigate protective effects of *Sophora subprostrata*, against ischemic brain damage after a middle cerebral artery(MCA) occlusion. The effect was estimated using histological test, neurobehavioural test, and biochemical test.

Methods : Rats(Sprague-Dawley) were divided into four groups: Sham operated group, MCA occluded group, *Sophora subprostrata* administrated group after MCA occlusion, and Normal group. The MCA was occluded by intraluminal method. *Sophora subprostrata* was administrated orally twice(1 and 4 hours) after middle cerebral artery occlusion. The neurobehavioural test was performed at 3 hours, 6 hours, 9 hours and 24 hours after the surgery by posture reflex test and swimming behavioural test. All groups were sacrificed at 24 hours after the surgery. The brain tissue was stained with 2% triphenyl tetrazolium chloride(TTC) or 1% cresyl violet solution, to examine effect of *Sophora subprostrata* on ischemic brain tissue. The blood samples were obtained from the heart of rats. Tumor necrosis factor- α level was measured from sera using Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay(ELISA).

Results : The results showed that (1) *Sophora subprostrata* reduced infarct size and total infarct volume by 54.8% compared to the control group, (2) that neuronal death, which was shown by decrease in cell number and size, was attenuated significantly in the boundary area of the infarction, (3) that serum TNF- α level was reduced significantly, and finally, there was significant recovery of motor deficit at 3 hours after MCA occluded by Swimming behavioural test.

Conclusions : In conclusion, *Sophora subprostrata* has protective effects against ischemic brain damage at the early stage of ischemia. (*J Korean Oriental Med* 2000;21(2):68-78)

Key Words: Ischemia, Middle cerebral artery(MCA) occlusion, *Sophora subprostrata*

서론

- 접수: 2000년 6월 24일 · 수정: 7월 28일 · 채택: 8월 4일
- 교신저자: 손낙원, 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1번지 경희대학교 동서의학대학원 (Tel. 031-201-2747, Fax. 031-201-2189, E-mail: sohnw@nms.kyunghee.ac.kr)
- 본 논문은 한국학술진흥재단 기초의학연구 지원사업(관리번호: 1988-021-F00355)의 지원으로 작성되었습니다.

중풍은 우리사회의 주요 사망원인 중의 하나이다. 중풍을 비롯한 뇌 질환에 대한 치료는 뇌신경세포의 재생이 어렵다는 조직학적 특성상 치료보다는 예방에 중점

을 두고 있다.

뇌허혈이 발생되면 신경세포의 탈분극이 일어나고 synaptic glutamate가 유리되어 세포 외 glutamate 농도가 증가한다¹⁾. 또한 ATP의 감소로 인한 능동수송의 역전은 세포 외 glutamate의 축적을 가속시킨다²⁾. 세포외 glutamate의 축적은 양이온의 세포 내 과유입을 초래하는데 Ca²⁺의 세포 내 유입이 증가하여 특히 Ca²⁺ 의존성 protease, lipase와 각종 modulator의 활동이 촉발된다. 결국 free radical이 생산되어 세포벽 등 세포 구조물을 파괴하여 신경세포가 죽게된다고 알려져 있다³⁾. 또한 뇌조직의 대사와 혈류의 조절인자이며, NMDA receptor-mediated 신경독성에도 관여하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO)가 뇌허혈에 중대한 영향을 미친다고 보고되었다^{4,5)}. Protein kinase C (PKC)는 세포 내 신호전달계의 중요한 요소의 하나로서 뇌허혈에 의한 세포사의 기전에서 중요한 역할을 한다고 보고되었으며^{6,7)} 저체온법에 의한 뇌신경세포 보호효과는 PKC의 활동의 억제와 연관되어 있을 가능성도 보고된 바 있다⁸⁾.

뇌허혈에 의한 신경세포의 손상을 줄이기 위해 세포 외로부터 Ca-influx를 줄여줌으로써 얻어지는 신경방어 효과에 관한 연구가 있어왔다^{9,10)}. ATP와 creatinine phosphate의 사용율을 감소시키는 calcium 길항제 (antagonist)들이나 calcium channel 차단제 (blocker)들, 신경세포 독성을 일으키는 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 또는 excitatory amino acid의 길항제들에 의한 뇌허혈 발생의 억제효과들도 예시되어왔다^{9,10,11)}.

廣豆根 (Sophora subprostrata)은 한의학에서 淸熱解毒, 消腫利咽의 효능으로 頭疹熱毒, 喉中發癰, 肺癌 등의 증상에 사용되어온 약물이며 최근의 연구에 의하면 항암작용도 밝혀져 많은 종류의 癌腫을 치료하며 早期의 咽頭癌과 肺癌에 일정한 치료효과가 보고되어 왔다^{12,13)}. 廣豆根의 성분 중 matrine은 안전한 눈 염증치료제이며¹⁴⁾ 진통제로도 효과가 있으며¹⁵⁾ 심혈관계에 작용하여 저혈압, 서맥증 및 부정맥에¹⁴⁾ 효과가 알려져 있다. 또한 Hu 등은¹⁶⁾ 廣豆根의 성분중 matrine이 PKC를 억제하여 뇌허혈시 발생하는 부종을 감소시킨다고 보고하였다. 뇌부종은 뇌손상과 밀접한 관계가 있기 때문에^{17,18)} 廣豆根은 뇌허혈로 인한 뇌손상에 보호효과를 미칠 것으로

생각되지만 구체적 동물 실험결과는 제시된 바 없다.

중대뇌동맥을 영구폐쇄한 동물모델에서 TTC 염색상 뇌허혈 손상 면적의 크기는 6시간에서 최대가 되고 9시간에서 24시간 사이에서는 변화가 없으며¹⁹⁾ 기저핵의 측면부가 대뇌피질보다 뇌혈류가 낮게 나타난다²⁰⁾. 대뇌피질의 신경세포가 유의하게 감소하는 시간은 뇌허혈 발생 후 3시간에서 6시간까지라고 하였다²¹⁾. 신경세포의 괴사는 선조체 부위에서 먼저 발생하고 대뇌피질로 퍼져나가며 뇌허혈 발생 후 첫 6시간동안은 위축과 부종과 같은 급성변화가 생기고 6시간에서 12시간에서 괴사와 같은 지발성 변화가 관찰된다²²⁾. 따라서 뇌신경세포의 손상을 효과적으로 억제하기 위해서는 뇌허혈 발생 초기 수 시간 내의 처치가 필요하다^{19,20,22)}.

TNF- α 는 뇌허혈이 발생 후에 내부염증반응에 관여하는 cytokine의 하나로서²³⁾ 뇌신경세포 손상을 가속화하는 염증세포의 침윤을 용이하게 하고²⁴⁾ 한편으로는 조직손상의 회복에도 관여하는 인자로 알려져 있다²⁵⁾. 최근 연구에 의하면 TNF- α 를 억제하면 뇌허혈 발생부위 면적이 줄어든다고 하여^{26,27,28)} TNF- α 억제가 뇌허혈의 처치에 중요한 관건이 된다고 하였다²⁹⁾.

뇌허혈 실험동물 모델을 사용한 새로운 약물의 평가에 있어 조직학적, 신경학적 및 행동학적 연구들이 상호 밀접한 연관성을 가지고 있기 때문에³⁰⁾ 본 연구는 흰쥐에 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈을 유발하고 광두근물추출물을 뇌허혈 초기에 경구 투여한 다음 뇌허혈 유발 24시간 후에 자세반사와 자유유영을 통한 운동기능실조의 양상을 관찰하였으며, 뇌조직에서 triphenyl tetrazolium chloride (TTC)염색에 의하여 뇌허혈 손상 면적을, cresyl violet 염색에 의하여 신경세포의 변화를 관찰하고, 혈중 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)량의 변화를 관찰한 바 뇌허혈 손상 초기에 광두근이 뇌신경세포 보호작용을 보이는 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

방 법

1. 동물

실험동물은 대한실험동물센터에서 구입한 체중 180g

전후의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 물과 펠릿사료 (제일사료 주식회사, 대전)는 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실 내의 온도는 21~24℃, 습도는 40~60%로 유지하였고 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다. 실험실 환경에 2주간 적응시킨 후 사용하였으며 실험시의 흰쥐 체중은 250~300g 이었다.

2. 약물의 조제 및 투여

廣豆根 (Sophora subprostrata) 600g을 5,000ml round flask에 넣고 3,000ml의 정제수를 가하여 냉각기가 부착된 전탕기에서 2시간 동안 가열한 후 여과포로 여과한 여액을 동결 건조하여 물추출물 98.0g을 얻었다. 약물의 투여는 실험동물의 체중 100g 당 광두근 10.9mg을 2ml의 물에 녹여, 중대뇌동맥 폐쇄시점으로부터 1시간과 4시간 후에 경구투여 하였다.

3. 뇌허혈 손상 유발

중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상 유발 방법 중 Zea Longa 등³⁰⁾의 혈관내봉합사삽입술 (intraluminal method)을 채택하였다. 수술의 모든 과정은 그 방법을 따랐으나, 보다 광범위하고 일정한 뇌허혈 유발을 위해 poly-L-lysine 코팅법과 영구폐쇄방법을 시행하였다.

수술과정을 요약하면 다음과 같다. 체중 250~300g 사이의 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 chloral hydrate 350mg/kg를 복강 주사하여 마취한 후 수술용 현미경 (Carl Zeiss, Zeiss, Germany)하에서 먼저 전경부의 근육을 정리하여 혈관을 노출시킨 후 외경동맥과 총경동맥을 잘 정리하였다. 후두동맥과 상갑상동맥을 electric coagulator (Ellman, Dento-Surg 90 FFP, USA)를 사용하여 절단하였다. 외경동맥의 원위부는 결찰하고, 수술실 (5-0 silk suture)로 고정고리를 두 개 만들어 놓은 후, 내경동맥과 총경동맥은 수술실 (3-0 silk suture)과 artery clamp (microvascular clip)를 사용하여 혈행을 완전 차단하였다. 미세수술가위 (Microdissecting Spring Scissor)로 외경동맥의 혈관벽을 약간 절개 후 poly-L-lysine 용액 (SIGMA Diagnostics, P8920, 0.1% w/v in water)로 코팅한 봉합사 (4-0 nylon suture, Ethilon, Brazil)을 18-20mm 정도 삽입하였다. 삽입후 내

경동맥과 총경동맥을 다시 관류시키고, 외경동맥의 원위부를 절단하였다. 전경부의 피부를 봉합, 소독하고 마취에서 깨어난 후 자유롭게 움직이게 하였다.

혈관내봉합사삽입술을 시행한 21마리 중 12마리는 대조군으로 하고, 9마리는 수술 후 1시간과 4시간에 광두근 물추출물을 경구 투여하였다. 또한 5마리는 위의 과정 중 혈관내봉합사 삽입과정만을 제외한 수술을 시행하여 sham군으로 하였으며, 모든 실험군에서 수술과 중대뇌동맥의 폐쇄는 우측만을 시행하였다.

4. 뇌허혈 손상의 해부조직학적 평가

1) 뇌허혈 손상 면적 및 체적의 측정

뇌허혈 유발 24시간 후에 실험동물에 20% chloral hydrate을 복강내 주사하여 희생하여 단두하였다. 곧 뇌를 적출한 후 rat brain matrix (ASI, USA)를 이용하여 rat brain atlas³²⁾의 interaural distance에 따라 2mm 두께 6개의 뇌절편을 만들었다. 이 6개의 뇌절편을 2% TTC(Sigma, USA)용액에 넣어 37℃의 incubator (대일랩, DMC121, 한국)에서 30분간 염색을 시행하였다. 염색이 끝난 각각의 뇌절편은 camera (Nikon, Japan)로 사진촬영을 한 후 scanner (Epson, GT-9500, Japan)로 scan하여 컴퓨터 (Macintosh, Power PC G3, USA)에 입력한 다음 영상분석용 "NIH Image" software (NIH, Ver. 1.66, USA)를 사용하여 각 뇌절편에서 뇌허혈 손상 면적을 측정하였다. 뇌허혈 손상 면적 (A)은 부종에 의하여 손상면적이 늘어난 것을 보정하기 위하여, 먼저 정상측 대뇌반구의 면적 (B)을 측정하고 손상 측 대뇌반구 정상조직 면적 (C)을 측정한 다음 정상 측 대뇌반구 면적에서 손상 측 대뇌반구의 정상조직 면적을 감하는 방법 (A=B-C)으로 계산하였다. 총뇌허혈 손상 체적은 다음과 같이 계산하였다³³⁾.

Total Infarct Volume (mm³)=

$$\frac{\sum \text{area}(\text{mm}^2) \text{ per side}}{\text{No. of sides analyzed}} \times 12\text{mm}(\text{Max. extent of infarct})$$

2) 뇌허혈 손상 부위 신경세포의 관찰 및 측정

TTC염색된 각각의 뇌절편은 Carnoy's 용액에 40분

간 고정하고 80% ethanol에서 TTC를 제거한 후 탈수, 투영을 거쳐 paraffin 포매하여 8 μ m 두께의 조직절편을 제작하여 1%의 cresyl violet 용액에 25분간 염색하였다. 각각의 조직절편은 광학현미경 (Olympus, VANOX AHBS-3, JAPAN)으로 200배율 하에서 뇌허혈 손상부위에 나타나는 조직학적 변화를 관찰하면서 컴퓨터 (Macintosh, Power PC G3, USA)에 영상을 입력하였다. 입력된 영상을 "NIH Image" software (NIH, Ver. 1.66, USA)를 사용하여 interaural 6mm 절편 중 대뇌피질 부위의 일정 면적 (320 μ m \times 466 μ m)내에서 20 μ m² 이상의 크기를 갖는 신경세포의 수와 크기를 측정하였다(Fig. 1).

5. 뇌허혈 손상의 행동생리학적 평가

1) 자유유영 양상의 관찰 및 측정

뇌허혈 손상이 유발된 실험동물에 대한 행동생리학적 평가는 Morris water maze를 응용하였다³⁹⁾. 원형수조 (직경 1.32m, 높이 50cm)에 높이 42cm로 물을 채우고 1kg의 탈지분유를 풀어 수조 내의 색깔을 동일하게 하였으며, 실험기간 동안 물의 온도는 22 \pm 2 $^{\circ}$ C로 유지하였다.

실험의 과정은 중대뇌동맥 폐쇄 후 3시간, 6시간, 9시간 및 24시간에 각각 1회 자유유영을 시행하면서 운동 기능 실조 및 행동특징 등을 관찰하였다. 각 동물들은 유영직전 두정부에 인식 스티커를 부착하고 일정한 방향을 향하여 60초 동안 자유유영을 시키면서 CCD camera로 추적하여 computer에 저장하였다. 저장된 60초간의 유영자료는 polytrack (San Diego instrument, USA)를 이용하여 60초간의 총유영거리 (total path length), 좌측회전각도 (percentage of left turning angle),

좌측방향전환횟수 (percentage of number of left turns)를 측정하였다.

Percentage of Left Turning Angles (%)=

$$\frac{\text{좌측유영각도}}{\text{좌측유영각도} + \text{우측유영각도}} \times 100$$

Percentage of Number of Left Turns (%)=

$$\frac{\text{좌측유영횟수}}{\text{좌측유영횟수} + \text{직선유영횟수} + \text{우측유영횟수}} \times 100$$

2) 자세반사 측정³⁴⁾

자세반사 측정은 중대뇌동맥 폐쇄 시점으로부터 3시간, 6시간, 9시간 및 24시간에 각각 1회 시행하였다. 측정방법은 다음과 같이 하였다. 흰쥐의 꼬리를 잡고 탁자 위 1m정도로 올려 앞발의 모양을 살폈다. 양 앞발이 모두 앞으로 향하면 0점을 주고 좌측 앞발이 앞으로 향하지 않고 구부러지면 1점을 주었다. 1점을 받은 흰쥐는 다시 탁자 위에 올려놓고 우측에서 좌측으로 밀어보아 저항감이 있으면 0점을 주어 총 1점이 되고 저항감이 약하면 1점을 더해 주어 총 2점이 되게 하였다.

6. 뇌허혈 손상의 생화학적 평가

1) 효소결합면역측정법에 의한 혈중 TNF- α 량의 측정
 효소결합면역측정법 (Enzyme-Linked immunoabsorbent assay)에는 ELISA kit (R&D Systems, USA)을 사용하여 샌드위치 분석법을 이용하였다. 이 실험에 사용된 모든 재료는 kit에 포함된 것을 사용하였다. 실험 과정을 요약하면 다음과 같다. 중대뇌동맥 폐쇄 24시간 후에 각각의 실험동물 심장으로부터 약 1ml의 혈액을 채취하여 2000 \times g에서 1분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 실온에서 2시간 보관하여 혈장을 응고시켰다. 응고된 혈장을 2000 \times g에서 다시 20분간 원심분리하여 혈청을 얻고 실험에 사용되기 전까지 -80 $^{\circ}$ C 냉동실에 보관하였다. 이를 2배로 희석된 혈장 50 μ l로 만들고 TNF- α 의 단일클론 항체 (monoclonal antibody)가 코팅된 microplate에 옮겨 혈장내의 TNF- α 가 microplate에 코팅된 단일클론항체와 결합되게 한 후 wash buffer로 충분히 세척하여 반응된 TNF- α 의 항원들을 제거하였

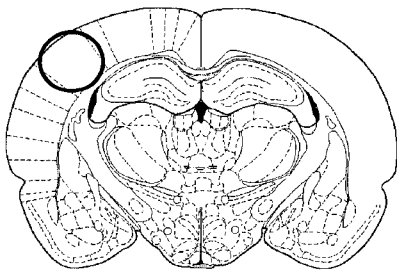


Fig. 1. Schematic representation of coronal section of rat brain. Cell number and the size on the circle were evaluated with microscopy (X200).

다. 다시 TNF- α 의 효소결합 다클론 항체 (enzyme-linked polyclonal antibody)를 첨가하여 항원항체결합체와 결합되게 한 후 wash buffer로 충분히 세척하고 기질용액을 첨가하였다. 이 효소반응으로 TNF- α 와 결합된 곳은 파란색으로 되며, 이 파란색은 정지용액을 첨가하면 노란색으로 변한다. 이렇게 발색된 용액의 농도를 분광광도계로 측정하여 standard curve를 이용하여 결합된 TNF- α 양을 구하였다.

결 과

본 실험에서는 poly-L-lysine coating을 이용한 중대뇌동맥 근위부 영구폐쇄를 시행한 결과 TTC 염색상 뇌허혈 손상 체적이 $244.3 \pm 21.8 \text{mm}^2$ 으로 국소 뇌허혈에 의한 평균 손상 면적의 변동계수는 30.8%로 얻어졌다. 이 수치는 중대뇌동맥 근위부 영구폐쇄의 경우 봉합사에 코팅을 안한 경우의 뇌허혈 손상 면적의 변동계수가 21.9%~76.0%이고 코팅을 한 경우는 6.6%~26.7%인 기존의 연구결과³⁵⁾를 고려하면 본 실험에서의 뇌허혈 모델은 신뢰성 있게 수행되었음을 알려준다.

1. 뇌허혈 손상 면적 및 체적 관찰

중대뇌동맥을 폐쇄한 대조군에서는 뇌허혈 손상이

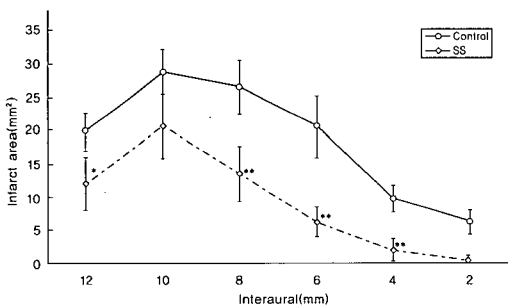


Fig. 2. Infarct areas in brain section 2mm to 12mm from interaural line. Control group is MCA occluded rats. SS group is *Sophora subprostrata* administrated rats after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean. Statistical significance of SS compared to the value of control group(*; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$).

interaural 12mm에서 2mm 절편까지 모두에서 나타났으며, 가장 뇌손상이 큰 절편은 10mm~8mm 절편이었다. 약물을 투여한 모든 군에서도 뇌허혈 손상이 나타나는 양상은 대조군과 동일한 경향을 보였다(Fig. 2). TTC 염색된 조직에서 붉게 보이는 부위는 정상조직이며 희게 보이는 부위는 뇌허혈이 생긴 조직이다(Fig. 3). 대조군에서는 뇌허혈 손상 면적이 interaural 12mm에서 2mm 절편까지 각각 2mm 간격 절편에서 $19.9 \pm 3.0 \text{mm}^2$, $28.8 \pm 3.3 \text{mm}^2$, $26.6 \pm 3.9 \text{mm}^2$, $20.7 \pm 4.7 \text{mm}^2$, $9.7 \pm 2.1 \text{mm}^2$ 및 $6.3 \pm 1.8 \text{mm}^2$ 을 나타내었으며, 광두근투여군은 각각 $11.9 \pm 4.1 \text{mm}^2$, $20.7 \pm 4.8 \text{mm}^2$, $13.5 \pm 4.1 \text{mm}^2$, $6.3 \pm 2.2 \text{mm}^2$, $2.1 \pm 1.7 \text{mm}^2$ 및 $0.3 \pm 0.9 \text{mm}^2$ 로 유의성 ($P < 0.05$ 또는 $P < 0.01$)있는 뇌허혈 발생의 억제를 나타내었다. Interaural 10mm에서는 뇌허혈 손상 면적이 28.1%감소하였으나 유의한 차이를 나타내지 못하였다. 중대뇌동맥 근위부가 폐쇄되는 경우 중심영역은 somatosensory cortex의 내측 일부와 somatosensory cortex로 쌓여있는 기저핵의 외측부가 된다^{27,36)}. 이 부위가 대조군에서도 뇌허혈이 가장 많이 생긴 곳으로 기저핵이 대부분을 차지한다. 중대뇌동맥 폐쇄시 이 곳의 세포가 먼저 손상되어 뇌허혈이 발생하는 부위인 중심영역이 많이 포함된 부위로 볼 수 있다. 약물의 효과가 중심영역보다 경계영역에 더 효과적임을 감안하면 이 부



Fig. 3. Infarct areas in TTC stained brain section. Each column demonstrates the series of rat brain coronal sections. Non-damaged normal area in brain section is dark-pink stained by TTC, and infarcted area is white. Column A shows 2mm thickness coronal sections of the brain in the MCA occlusion control group. Column B shows 2mm thickness coronal sections of the brain in the *Sophora subprostrata* administrated group. White infarct areas in the column B are decreased in size with respect to corresponding areas in the column A.

위에서 유의하게 뇌허혈 면적이 감소하지 않은 것은 약물이 중심영역에서는 유의하게 효과를 나타내지 못했음을 의미한다고 볼 수 있다. 중대뇌동맥을 폐쇄한 대조군의 뇌허혈 손상 체적은 $244.3 \pm 21.8 \text{mm}^3$ 이었다. 광두근을 투여한 군은 뇌허혈 손상 체적이 $110.4 \pm 28.7 \text{mm}^3$ 으로 대조군에 대하여 약 54.8% 감소하는 매우 유의한($P < 0.01$) 결과를 얻었다(Fig. 4). 이 결과는 중대뇌동맥 영구폐쇄의 국소 뇌허혈 모델에 효과를 나타낸다고 알려져 있는 NMDA antagonist, nNOS inhibitor, PAF antagonist 및 TNF- α antagonist 가 45%~75% 정도의 효과를 나타낸 것과 비교해 보면 광두근은 뇌신경세포 보호효과가 매우 높음을 지적하는 것이지만 광두근에서 분리된 물질 중 뇌허혈과 연관된 효과를 가지는 *matrine*이¹⁶⁾ 이러한

효과를 보이는지 혹은 다른 보호효과를 가지는 물질이 함유되어 있는지의 여부는 차후 지속적인 연구가 필요하다.

2. 신경세포 수 및 위축정도 관찰

뇌허혈 손상을 입지 않은 정상적인 대뇌피질에서 나타나는 신경세포 수는 204 ± 2.1 개였고 그 크기는 $75.2 \pm 1.1 \mu\text{m}^2$ 였다(Fig. 5 section A). 중대뇌동맥을 폐쇄한 대조군에서의 신경세포 수는 105.6 ± 17.4 개로 51.4% 감소하였고 그 크기는 $34.3 \pm 2.1 \mu\text{m}^2$ 로 55.6% 위축되었다. 이는 정상부위의 신경세포 수와 크기를 비교하면 현저한 감소를 하였다(Fig. 5 section B). 광두근투여군에서의 신경세포 수는 201.5 ± 12.3 개로 7.2% 정도만 감소하였고 그 크기는 $56.3 \pm 3.4 \mu\text{m}^2$ 로 27.0% 정도만 위축되어 신경세포의 손상이 각각 유의하게($P < 0.01$, $P < 0.001$) 억제되었다(Fig. 5).

3. 자유유영 양상의 관찰 및 측정

학습과 인지기능을 평가하는 Morris Water Maze¹¹⁾를 이용하여 자유유영상태에서 관찰한 결과 정상군과 sham 군의 경우 실험 동물이 주로 수조의 벽면을 타고 움직이거나 반대측 벽면을 향하여 직진하는 성향을 가진 반면 중대뇌동맥을 폐쇄한 대조군은 좌측으로 작은 동심원을 그리며 회전하는 행동양상을 보였다(Fig. 6). 유영 총거리에서는 시간이 경과함에 따라 총거리가 모든 군에서 증가하는 양상을 나타내었으나, 모든 군에서 각 군간의 차이가 없었다(Fig. 7).

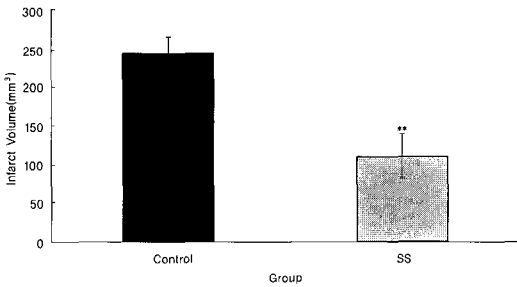


Fig. 4. Total infarct volume each group. Sham group is sham-operated rats. Control group is MCA occluded rats. SS group is *Sophora subprostrata* administrated rats after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean. Statistical significance of SS compared to the value for control group (**; $P < 0.01$).

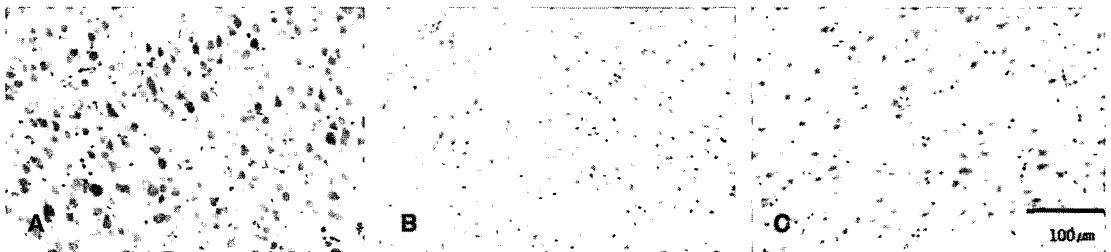


Fig. 5. Neuron cells in the cerebral cortex over groups. Each section demonstrates the MCA occluded cerebral cortex stained with cresyl violet(X200). Section A shows the neuron cells in the normal cerebral cortex. Section B shows the cerebral cortex of the MCA occluded control group. Section C shows *Sophora subprostrata* administrated group. Neuron cells in section B revealed profound hypertrophy and cell loss with respect to section A. Neuron cells in section C are increased in cell size and cell number with respect to that in section B.

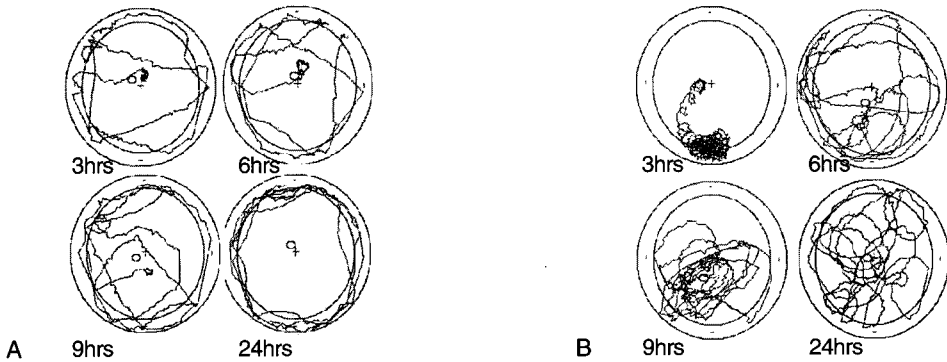


Fig. 6. Swimming patterns of rats in water bath each group. A show swimming patterns of normal group. B show that of control group. Control group swim turning left continuously. + indicates the starting point of swimming.

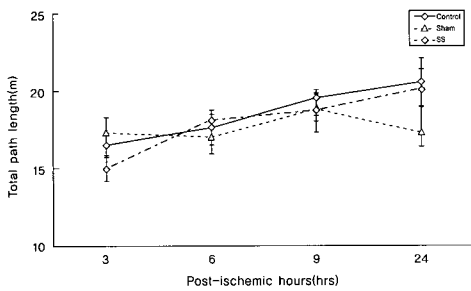


Fig. 7. Time-course of the total path length over groups in water bath. Sham group is sham-operated rats. Control group is MCA occluded rats. SS group is *Sophora subprostrata* administrated rats after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean.

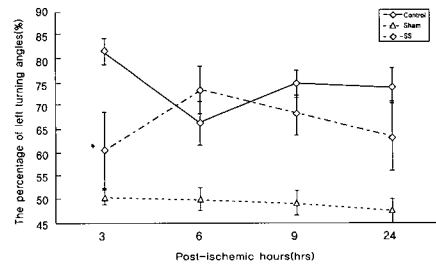


Fig. 8. Time-course of the percentage of left turning angles over groups in water bath. Sham group is sham-operated rats. Control group is MCA occluded rats. SS group is *Sophora subprostrata* administrated rats after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean. Statistical significance of SS compared to the value for control group(*; $P < 0.05$).

좌측회전각도(Left turning angle)는 중대뇌동맥을 폐쇄한 대조군이 3시간, 6시간, 9시간 및 24시간에서 sham 군에 비해 각각 31.2%, 16.2%, 25.6% 및 26.2%로 증가하는 양상을 나타내어 유의한($P < 0.05$ 또는 $P < 0.01$)차이를 나타내었다. 광두근투여군은 대조군에 대하여 3시간에서 좌측회전각도가 21.1% 감소하여 유의한 효과($P < 0.05$)를 나타내었다(Fig. 8).

좌측회전수 (Left Turns)는 중대뇌동맥을 폐쇄한 대조군에서는 3시간, 6시간, 및 9시간에서 sham 군에 비해 각각 37.8%, 17.9% 및 20.2%로 증가하는 양상을 나타내어 유의한 차이를 나타내었고($P < 0.01$) 광두근투여군이 3시간에서 대조군에 대하여 20.0%감소하여 유의

한 차이($P < 0.05$)를 나타내었으며 9시간에서는 10.2% 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 9).

뇌허혈 부위의 면적과 행동학적 상관성에 대해서는 아직도 명확하지 않다. Wahl 등³⁰⁾은 신경학적 결손과 뇌허혈의 크기 사이에 관련성이 없다고 하였으며, Bederson 등은 뇌허혈의 크기와 신경학적 결손이 유의하게 연관된다고 하였다³⁷⁾. 본 실험에서 행동자료가 유의하게 변하지 않은 것은 TTC 염색상에서 interaural 10 mm에서 뇌허혈 면적이 중대뇌동맥을 폐쇄한 대조군과 광두근투여군에서 유의하게 변화하지 않은 것과 연관이 있을 것으로 생각된다. 이 부위는 운동과 직접 관련된 선조체 부위가 대부분을 차지하고 있기 때문에 이

부위의 뇌허혈 면적이 감소되지 않은 것은 이와 관련된 운동기능이 호전될 가능성이 적다고 볼 수 있다. 하지만 중대뇌동맥 폐쇄 후 3시간에서의 행동평가에서 유의한 변화를 관찰할 수 있었다. 이것은 TTC 염색에 의한 뇌허혈 면적이나 혈액 내 TNF- α 의 측정은 단지 그 시간대에서의 해부조직학적, 생화학적 지표만으로 뇌허혈 발생 후부터 24시간내의 모든 상황을 예측할 수 없음을 감안하면 광두근이 뇌허혈 발생초기에 손상된 뇌신경세포에 대해 긍정적인 효과를 나타냈을 것이라는 예측이 가능하다.

4. 자세반사 측정

중대뇌동맥을 폐쇄한 실험군의 경우 sham군에 비해 전 시간에 걸쳐 유의하게 나타났다($P<0.01$). 광두근투여군은 중대뇌동맥을 폐쇄한 대조군에 비해 회복되는 경향을 나타내었으나 유의하지는 않았다(Fig. 10).

국소 뇌허혈은 감각운동 기능장애를 특징으로 하는

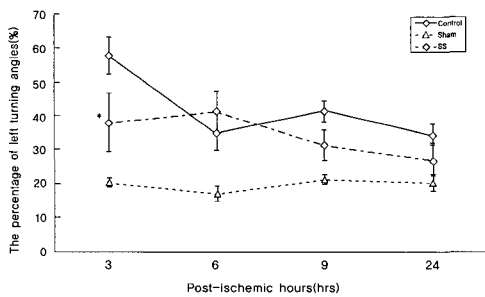


Fig. 9. Time-course of the percentage of number of left turns over groups. Sham group is sham-operated rats. Control group is MCA occluded rats. SS group is *Sophora subprostrata* administrated rats after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean. Statistical significance of SS compared to the value for control group(*; $P<0.05$).

신경학적 결손을 유발하는 것으로 알려져 있다³⁴). 신경학적 결손에 의한 행동을 연구하는 것은 뇌허혈 초기의 단순 반응과 운동기능 검사가 많이 시행된다^{38,39}). 본 실험에서 감각운동 장애에 대한 평가인 자세반사검사에서는 대조군은 뇌허혈 유발 3시간, 6시간, 12시간, 24시간에서 sham군에 비해 유의한 결과를 나타내었다. 이는 Bederson 등³⁴)의 연구와도 일치한다.

5. 혈액내 TNF- α 의 관찰

혈액 중 순환하는 mature 형태의 TNF- α 의 량을 효소 결합면역측정법으로 측정한 결과, Sham 군은 $28.4 \pm 1.8 \text{ pg/ml}$ 로 정상군과의 차이가 없었다. 중대뇌동맥을 폐쇄한 대조군은 $34.9 \pm 4.6 \text{ pg/ml}$ 로 정상군의 $28.6 \pm 2.4 \text{ pg/ml}$ 에 비하여 약 22%로 유의하게 ($P<0.005$) 증가되었다. 광두근투여군은 $27.8 \pm 1.8 \text{ pg/ml}$ 로 대조군에 비하여 20.3% 유의하게 ($P<0.005$) 감소하여 정상군의 수치와 비슷한 수준으로 되었음을 보여주고 있다. 이 결과

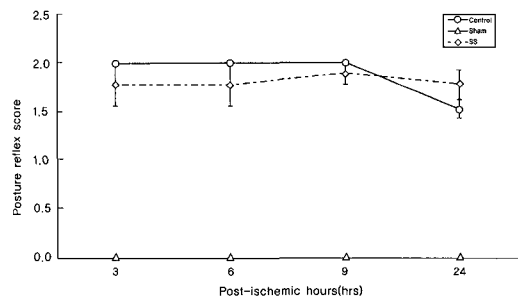


Fig. 10. Time-course of the posture reflex score over groups. Sham group is sham-operated rats. Control group is MCA occluded rats. SS group is *Sophora subprostrata* administrated rats after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean.

Table 1. The Effects of *Sophora Subprostrata* on the Level of Serum TNF- α of the MCA Occluded Rats

Group Name	TNF- α Level in Serum (pg/ml)	Number of Samples
Normal	28.6 ± 2.4	6
Sham	28.4 ± 1.8	5
Control	34.9 ± 4.6	12
SS	$27.8 \pm 1.8^*$	9

Normal group is rats without any treatment. Sham group is sham-operated rats. Control group is MCA occluded rats. SS group is *Sophora subprostrata* administrated rats after MCA occlusion. The number are shown as mean \pm standard error. Statistical significance of SS compared to that for control group(*; $P<0.005$).

로 광두근이 중대뇌동맥폐쇄로 유발된 TNF- α 의 증가를 유의하게 억제하였음을 알 수 있다(Table 1). 본 실험에서 다른 문헌과¹⁵⁾ 비교하여 비교적 TNF- α 가 적게 검출되었는데 TNF- α 의 양은 뇌허혈 유발 후 6시간 내지 12시간 사이에 최대치가 되고 24 시간에는 급격한 일시적 감소를 보여 거의 정상치에 이르는 진행양상을 보이는 것이 일반적이다¹⁶⁾. 따라서 본 연구에서 보이는 낮은 수치는 중대뇌동맥 폐쇄 후 24시간 후에 혈액을 채취하였기 때문이라고 생각된다. 그럼에도 불구하고 광두근투여군이 대조군에 비하여 유의하게 감소된 본 연구의 결과는 국소 뇌허혈 모델에서 광두근이 가지는 뇌신경세포 손상 보호효과가 TNF- α 의 억제와 밀접한 관련이 있음을 시사하고 있다. 광두근의 투여에 의한 TNF- α 의 효과는 해부조직학적 평가의 결과와 일치하였으나 이러한 혈액 내의 TNF- α 량의 유의한 감소에도 불구하고 선조체 부위에서 뇌허혈 면적이 유의한 감소를 나타내지 못하였다. 이로보아 광두근이 뇌허혈이 발생한 대뇌피질과 선조체 부위에서 TNF- α 가 어떠한 양상을 보이는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

결론

광두근이 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상 초기에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐를 사용하여 혈관내봉합사삽입술(intraluminal method)로 중대뇌동맥을 폐쇄하고 광두근을 경구 투여한 다음 24시간 후에 그 효능을 해부조직학적, 행동생리학적 및 생화학적방법으로 평가한 바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 뇌허혈 유발 24시간에서 뇌허혈 손상 부위의 면적 및 체적을 유의하게 감소시켰다.
2. 뇌허혈 유발 24시간에서 대뇌피질에서 신경세포수의 손상을 유의하게 억제하였으며, 신경세포의 위축 또한 유의하게 억제하는 효과를 나타내었다.
3. 뇌허혈 유발 3시간에서 좌측회전횟수와 좌측회전 각도가 유의하게 회복되었다. 자세반사 측정에서는 회복되는 경향을 보였으나 유의성은 없었다.
4. 뇌허혈 유발 24시간에서 혈액내 TNF- α 의 수치들

유의하게 감소시켰다.

이러한 관찰 결과 광두근은 중대뇌동맥 폐쇄에 의하여 발생하는 초기의 뇌허혈 손상을 억제하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Drejer J, Benveiste H, Diemer NH, Schousboe A. Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J Neurochem.* 1985;45:145-51.
2. Szatkowski M, Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurol Sci.* 1994;17:359-65.
3. Hock, Nanette H, MSN, RN, CNRN. Neuroprotective agents in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Nurs.* 1998;13(1):17-25.
5. Hamada J, Greenberg JH, Croul S, Dawson TM, and Reivich M : Effects of central inhibition of nitric oxide synthase on focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:779-86.
6. Bartus RT, Dean RL, Cavabaugh K, Evelth D, Carriero DL, Lynch G. Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion. Implications for therapeutic intervention and the role of calpain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995;15:969-79.
7. Tohyama Y, Sako K, Yonemasu Y. Protein kinase C in focal ischemic rat brain: dual autoradiographic analysis of [14C]iodoantipyrine(IAP) and [3H]phorbol-12,13-dibutyrate(PDBu). *Brain Res.* 1997;750:155-60.
8. Tohyama Y, Sako K, Yonemasu Y. Hypothermia attenuates the activation of protein kinase C in focal ischemic rat brain: dual autoradiographic study of [3H]phorbol-12,13 and iodo[14c]antipyrine. *Brain Res.* 1998;782:348-51.
9. Sauter a, Rudin M, and Wiederhold KH. Reduction of neural damage in irreversible cerebral ischemia by calcium antagonists. *Neurochemistry.* 1988;9:211-36.
10. Seubert P, Lee K, and Lynch G. Ischemia triggers NMDA receptor-linked cytoskeletal proteolysis in hippocampus. *Brain Res.* 1989;492:366-70.

11. Obana, W.G., Pitts, L.H. and Nishimura, M.C. Effect of opiate antagonists on middle cerebral artery occlusion infarct in the rat. *J. Neurosurg.* 1988;69:98-103.
12. Bensky D, Gamble A. Chinese herbal medicine. Seattle:Eastland Press. 1986:147-8.
13. Kojima R, Fukushima S, Ueno A, Saiki Y, Antitumor activity of leguminosae plants constituents. 1. Antitumor Activity of constituents of Sophora subprostrata. *Chempharm Bull(tokyo).* 1970;18:2555-63.
14. Chuang CY, Xaio JG, Chiou GC. Ocular anti-inflammatory action of matrine. *J Ocul Pharmacol.* 1987;3:129-34.
15. Kamei J, Xiao P, Ohsawa M, Kubo H, Higashiyama K, Takahashi H, Li J, Nagase H, Ohmiya S. Antinociceptive effects of (+)-matrine in mice. *Eur J Pharmacol.* 1997;337:223-6.
16. Hu ZL, Tan YX, Zhang JP, Qian DH. Effects of inhibitor of protein kinase C on brain edema formation evoked by experimental cerebral ischemia in gerbils and rats. *Yao Hsueh Hsueh Pao.* 1996;31:886-90.
17. Betz AL, Keep RF, Beer ME, Ren XD. Blood-brain barrier permeability and brain concentration of sodium, potassium, and chloride during focal ischemia. *J Cereb Blood Metab.* 1994;14:29-37.
18. Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR. Mild intraischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoerfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994;14:620-7.
19. Aronowski J, Cho KH, Storng R, Grotta J. Neurofilament proteolysis after focal ischemia When do cells die after experimental stroke? *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(6):652-60.
20. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1989;20:1037-43.
21. Nakane H, Yao H, Ibayashi S, Kitazono T, Ooboshi H, Uchimura H, Fujishima M. Protein kinase C modulates ischemia-induced amino acids release in the striatum of hypertensive rats. *Brain Res.* 1998;782:290-6.
23. Buttini M, Appel K, Sauter A, Gebicke -Haerter PJ, Boddeke HW. Expression of tumor necrosis factor alpha focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience.* 1996;71(1):1-16.
24. 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.
25. Barger SQ, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegelstein J, Mattson M. Tumor necrosis factors α and β protect neurons against amyloid β -peptide toxicity: evidence for involvement of a κ B-binding factor and attenuation of peroxide Ca^{2+} accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:9328-32.
26. Nawashiro H, Martin D, Hallenbeck JM. Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17(2):229-32.
27. Meistrell ME 3rd, Botchkina GI, Wang H, Di Santo E, Cockrott KM, Bloom O, Vishubhakat M, Ghezzi P, Tracey KJ. Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock.* 1997;8(5):341-8.
28. Yang GY, Gong C, Qin Z, Ye W, Mzo Y, Bertz AL. Inhibition of TNF-alpha attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. *Neuroreport.* 1988; 9(9):2131-4.
29. Barone FC, Arvin B, White F, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. Tumor Necrosis Factor- α : A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke.* 1997;28:1233-44.
30. Wahl F, Allix M, Plotkine M, Boulu RG. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 1992;23:267-72.
31. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20:84-91.
32. Mandelkow E, Mandelkow EM. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7:72-81.
33. Siesjo BK and Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb blood Metab.* 1989;9:127-

- 40.
34. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion. Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17:472-6.
35. Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, Gibson DG3rd, Fisher M. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture(Koizumi) in rats. *J Neuro Sci*. 1997;153:8-11.
36. Bolander HG, Persson L, Hilleres L, d'Argy R, Ponten U, DiSSon Y. Regional cerebral blood flow and histopathologic changes after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1989;20:930-7.
37. Grabowski M, Brundin P, Johansson BB. Paw-reaching, sensorimotor, and rotational behavior after brain infarction in rats. *Stroke*. 1993;24:889-95.
38. Germano, I.M., Bartkowski, H.M., Cassel, M.E, Pitts, L.H. The therapeutic value of nimodipine in experimental focal cerebral ischemia, *J. Neurosurg.* 1987;67:81-7.
39. Harada SA, Handa: Focal brain ischemia model in rats. an experimental study. *Surg. Neurol.* 1989;31:203-8.
40. Pan W, Kastin AJ, Bell RL, Olson RD. Upregulation of tumor necrosis factor alpha transport across the blood-brain barrier after acute compressive spinal cord injury. *J Neurosci.* 1999;19(9):3649-55.