

腦挫傷에 丹蔘, 紅花, 石菖蒲가 미치는 影響

김행진, 전상윤, 김정상¹, 김경수², 홍 석
동신대학교 한의과대학 심계내과학교실, ¹해부학교실, ²가정의학교실

Abstract

The effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix*(SR), *Carthami Flos*(CF) and *Acori Graminei Rhizoma*(AR) to cerebral contusion

Haeng-Jin Kim, Sang-yun Jeon, Jung-Sang Kim¹, Kyoung-Soo Kim², Seok Hong
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine Dongshin University
¹Dept. of Anatomy, College of Oriental Medicine Dongshin University
²Dept. of Family Medicine, College of Oriental Medicine Dongshin University

This study was done to investigate effects of SR, CF and AR to angiogenesis of cerebral tissues, protecting damage of cerebral neurons and activating them in cerebral contusion-induced rats. I observed these conclusions as follows ;

1. Observation of VEGF-immunoreactive cells

: Groups of administered AR were not meaningful in increasing VEGF-immunoreactive cells for 3 days and 7 days, groups of administered SR meaningfully increased them to control groups in all groups, and groups of administered CF meaningfully increased

교신저자 : 홍 석

전남 순천시 조례동 1722-9번지 동신대학교 부속순천한방병원

Tel : 061-729-7280, 011-9450-9417 E-mail : tohj75@hanmail.net

접수 : 2003/11/18 수정 : 2003/11/27 채택 : 2003/12/12

them to control groups in all groups, too. interestingly, increased double to control group for 7 days.

2. Observation on cerebral neurons by Cresyl violet stain

: Dendrites and axons of groups of administered SR, AR for 3 days were clearly observed to control group. Cerebral neurons of groups of administered CF for 3days and 7 days were increased a little, but were not meaningful.

In conclusion, AR will be careful of being used in cerebral contusion. CF and SR were effective to activating cerebral hemokinesis by inducing angiogenesis in trauma of tissue, but weakly to protecting trauma of cerebral neurons and activating them. I think more studies will be done in these facts.

Key Word : Cerebral contusion, *Salviae Miltiorrhizae Radix*(SR), *Carthami Flos*(CF), *Acori Graminei Rhizoma*(AR).

I. 緒 論

뇌좌상은 손상에 의한 국소 뇌실질내 출혈과 뇌조직의 괴사가 발생한 상태로 뇌 신경 세포의 손상, 뇌에너지 대사의 장애, 뇌혈류 감소로 인하여 자가조절기능을 상실함으로써 미만성 뇌부종이 발생하고 그것으로 인해 두개강 내압이 항진되는 병변이다. 이러한 뇌손상은 뇌신경 세포의 활성화, 뇌에너지 대사의 장애개선, 뇌혈관 신생 등에 의해 뇌혈관계 자가조절기능을 활성화하여 회복시킬 수 있다¹⁻⁸⁾.

단蓼(*Salviae Miltiorrhizae Radix*)은活血祛瘀, 凉血消癰, 除煩安神하는 효능이 있어 月經不調, 經閉, 痛經, 癥瘕積聚, 胸腹刺痛, 心煩不眠, 瘡瘍腫痛 등을 치료하고, 紅花(*Carthami Flos*)는活血通經, 散瘀止痛하는 효능이 있어 經閉, 痛經, 惡露不行, 癥瘕痞塊, 跌撲損傷, 瘡瘍腫毒 등을 치료하며, 石菖蒲(*Acori Graminei Rhizoma*)는化

濕開胃, 開竅豁痰, 醒神益智하는 효능이 있어 神昏癲癇, 皖痞不飢, 噤口下痢, 健忘耳聾 등을 치료하는데 널리 이용되고 있다⁹⁻¹²⁾.

단蓼의 抗癌活性和 apoptosis에 미치는 영향과 藥針으로써 鎮痛 및 血壓降下에 대한 研究¹³⁻¹⁶⁾, 紅花 藥針이 急性毒性, 腦部位別 Catecholamine含量, 腦血流力學 變動, 鎮痛 및 抗血栓에 미치는 영향에 대한 研究¹⁷⁻²⁰⁾, 石菖蒲가 腦虛血로 인한 神經細胞 損傷에 대한 방어효과에 관한 研究가 있다²¹⁾. 그리고, 六味地黃湯이 腦挫傷 恢復에 미치는 영향에 대한 研究가 있었지만²²⁾, 單味之劑로서 단蓼, 紅花, 石菖蒲가 腦挫傷에 미치는 영향에 대한 研究는 아직까지 없었다.

이에 著者는 단蓼, 紅花, 石菖蒲를 투여하여 물리적인 충격으로 腦挫傷을 유발시킨 흰쥐의 손상된 뇌의 모세혈관 재생, 뇌신경 세포 손상보호 및 활성화를 관찰하여 有意한 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 동물

체중 250g 내외의 웅성 흰쥐(Sprague dawley strain)를 다물사이언스(주)로부터 구입한 후 한의과대학 동물사육실에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 약물

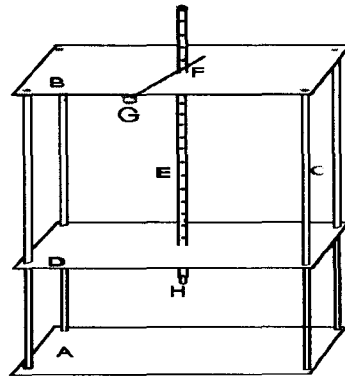
본 실험에 사용한 단삼, 홍화, 석창포는 동신대학교 한방병원에서 구입하여 사용하였다. 단삼, 홍화, 석창포를 60g씩 증류수 1200ml와 함께 각각의 약탕기에 넣고 3시간 동안 煎湯하였다. 煎湯液만을 취하여 고속원심분리기(Centricon T-42K, Kontron)로 원심분리(5,000 rpm)하여 침전물을 제거한 후 rotatory evaporator (Buchi, Netheland)를 사용하여 농축하였다. 농축 후 동결 건조하여 단삼 35g, 홍화 78.4mg, 석창포 6.8g을 얻었다.

3. 뇌좌상 유발

뇌좌상을 유발시키기 위해 drop device를 Shapira 등²³⁾이 사용하였던 것을 다음과 같은 형태로 제작하였으며, 흰쥐를 ether로 마취시킨 다음 Drop device로 좌측 두정골 부위를 타격하였다. 스테인레스로 제작한 플랫폼 [A], [B], [D]와 이를 지탱하는 bar[C]를 기본 형태로 하여 1.6kg의 무게를 지닌 metal bar[E]에 1cm 간격으로 구멍으로 뚫고 [H]부위는 실리콘으로 코팅하였다.

Metal bar의 실리콘 코팅 부분[H]가 매번 정확하게 동일한 부위를 가격하게 하기

위하여 입체정위교정기(Narishige, Japan)를 [A]플랫폼에 고정시키고 흰쥐를 교정기를 이용하여 고정시켰다. 그리고 Metal bar[F]의 고정장치[G]를 잡아당기면 metal bar가 밑으로 떨어지면서 실리콘으로 코팅된 부위[H]가 동일 부위의 두개골을 가격하게 되며, 가격 후 즉시 두피 절개부위를 봉합하고 소독하였다 <Scheme 1> .



< Scheme 1 > Weight-drop device was used in this study to produce closed headtrauma in rat.

4. 약물의 투여 및 실험군 분류

뇌좌상을 유발시킨 다음 대조군과 실험군은 통상적인 식이를 하도록 하였다. 단삼 추출액 1g/kg, 석창포 추출액 0.45g/kg, 홍화 추출액 2.8mg/kg을 매일 1회 3일간(단삼·석창포·홍화 3일군)과 7일간(단삼·석창포·홍화 7일군) 투여한 군으로 분류하였다.

5. VEGF-면역반응성 세포의 현미경적 관찰

흰쥐의 뇌조직에서 VEGF를 관찰하기 위해 심장을 통하여 PBS(phosphate buffer saline) (0.9 % NaCl)를 관류하여

혈액을 제거한 다음 4 % paraformaldehyde(0.1M PBS, pH 7.4)로 관류고정한 후 흰쥐의 뇌를 적출하였다.

적출한 뇌를 4 %의 paraformaldehyde를 사용하여 24시간 동안 재고정시킨 다음, paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 5 μ m 두께로 절편을 제작하였다. 절편된 조직을 slide glass 위에 부착시킨 후 Xylene에서 100, 90, 80 % ethanol과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담구어 paraffin을 제거시켰다.

다음날 pH 7.4, 0.1M의 PBS(phosphate buffer saline)(0.9 % NaCl) 용액에 하룻밤 동안 배양시킨 다음 15분간 PBS로 세척한 뒤 10 % horse serum을 함유한 blocking solution을 사용하여 20분간 배양시키고 다시 PBS용액으로 15분간 세척하였다.

세척된 각각의 뇌조직 위에 VEGF 항체를 처리하고 습도가 높은 상온의 배양접시에서 2시간 동안 배양시킨 후 15분간 PBS 용액으로 세척하고 biotinylated anti-mouse IgG를 처리하여 30분간 배양시킨 후 15분간 PBS용액에 담구어 세척하였다. 이를 다시 avidin-biotinylated enzyme complex(ABC) reagent(Vector Lab, CA, USA)를 조직에 처리하여 30분간 반응시키고 다시 PBS로 15분간 세척하였다.

DAB 발색시약을 조직에 떨어뜨려 2분간 발색시킨 후 흐르는 물에 과량의 염색시약을 제거하고, 이를 50, 60, 70, 80 %까지의 ethanol에 수초 동안 담구고 90, 95, 100-I, 100-II, Xylene + 100 % EtOH, Xylene까지는 5분씩 담구어 수분을 완전히 제거시켰다.

Xylene이 마르지 않은 상태에서 Canada balsam을 한 방울 떨어뜨려 cover

glass로 씌운 후 hot plate 위에 고정하고 광학현미경으로 검경한 후 사진을 촬영하였다.

6. Cresyl violet stain을 통한 뇌신경 세포의 현미경적 관찰

흰쥐를 pentobarbital sodium(80mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후, 심장을 통해 0.9 % saline을 관류하여 혈액을 제거한 다음 4 % paraformaldehyde를 관류하여 고정하였다. 고정이 끝난 흰쥐의 뇌를 적출하여 동일 고정액으로 2시간 동안 고정한 다음 20 % sucrose가 함유된 PBS에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 침적하였다. 그 후 냉동절편기(Shandon cryotome E, UK)를 이용하여 30 μ m 두께의 시상 연속절편을 제작하였다. 절편을 PBS로 3번 수세한 다음 수화과정을 거쳐 cresyl violet buffer로 염색하였다.

7. 통계처리

실험결과에 대한 통계는 SAS(statistical analysis system) program에 의해 각 실험군 별로 평균치와 표준오차를 계산하였고, $\alpha=0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 結果

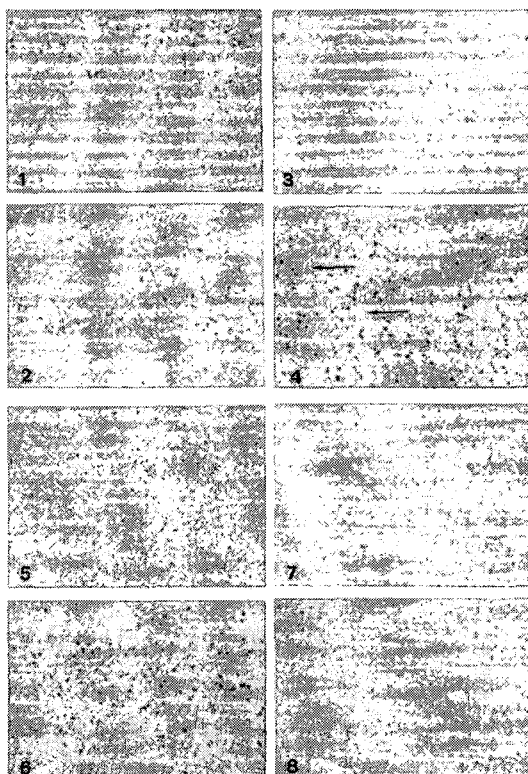
1. VEGF-면역반응성 세포의 현미경적 관찰

대조군 3일군에서는 두정엽 피질부의 뇌조직에서 다수의 VEGF-면역반응성 세포들이 관찰되었지만 반응성이 미약하였고, 주변 모세혈관에서는 VEGF-면역반응성이 관찰되지 않았다(Fig. 1).

단삼 3일군에서는 비교적 면역반응성이 미약한 세포들이 피질부위에서 집단적으로 관찰되었지만, 주변 모세혈관의 면역반응성은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2).

석창포 3일군에서도 다수의 VEGF-면역반응성 세포들이 관찰되었으나 반응성이 비교적 약하게 나타났으며, 주변 모세혈관의 면역반응성은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 3).

홍화 3일군에서는 VEGF-면역반응성 세포들이 대조군이나 다른 실험군에 비해 다수 관찰되었고 면역반응성 또한 가장 높게 나타났으며 주변 모세혈관의 내피세포에서도 VEGF-면역반응성이 매우 높게 관찰되었다(Fig. 4).



Figs. 1-4. Light micrographs of VEGF-immunoreactive cells in the parietal

lobe of contusion-induced after 3 days. Control group(Fig. 1), SR-administered group(Fig. 2), AR-administered group(Fig. 3) and CF-administered group(Fig. 4). VEGF-immunostain, $\times 100$.

Figs. 5-8. Light micrographs of VEGF-immunoreactive cells in the parietal lobe of contusion-induced after 7 days. Control group(Fig. 5), SR-administered group(Fig. 6), AR-administered group(Fig. 7) and CF-administered group(Fig. 8). VEGF-immunostain, $\times 100$.

대조군 7일군에서는 면역반응성 세포들이 매우 미약하게 관찰되었고(Fig. 5), 단삼 7일군에서는 VEGF-면역반응성 세포들이 단삼 3일군에 비해 매우 증가하였고 반응성 또한 매우 높게 나타났다(Fig. 6). 석창포 7일군에서는 석창포 3일군과 유사한 VEGF-면역반응성 세포의 소견이 나타났다(Fig. 7). 홍화 7일군에서는 VEGF-면역반응성 세포들의 반응성이 미약하게 나타났지만, 모세혈관의 내피세포에서는 면역반응성이 높게 관찰되었다(Fig. 8).

2. VEGF-면역반응성 세포 계수

뇌좌상에 의해 손상된 뇌의 모세혈관 신생정도를 규명하고자 VEGF의 발현세포를 면역조직화화학적 방법을 통하여 염색한 후 흰쥐 뇌의 두정엽 부위 4cm²에 존재하는 세포 수를 계수하였다.

그 결과, 단삼과 홍화에서는 3일군과 7일군 모두 대조군에 비해 면역반응성 세포들이 유의성 있게 증가하였다. 특히, 홍화

7일군에서는 대조군에 비해 약 2배정도 증가하여 나타났다. 그러나, 석창포 투여군에서는 대조군과 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Table. 1, Fig. 9).

groups		number of cells	
		mean±SE	Prob> T
3days	Con	18.4±1.8	
	D	24.0±2.0*	0.05
	S	18.0±2.0	0.94
	H	26.0±3.4	0.06
7days	Con	13.2±2.0	
	D	18.8±3.2*	0.04
	S	14.4±1.7	0.55
	H	27.0±1.3**	0.00

Table 1. The changes of the number of VEGF-immunoreactive cells according to the administered drugs in contusion-induced rats.

Con, control group; D, SR extracts administered group; S, AR extracts administered group; H, CF extracts administered group.

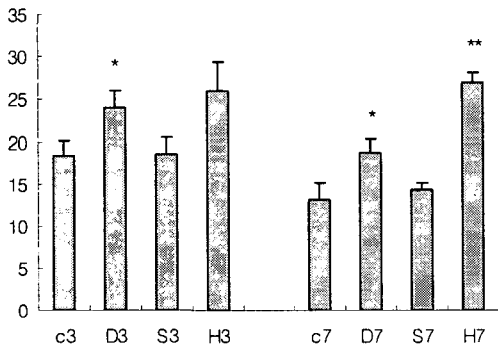
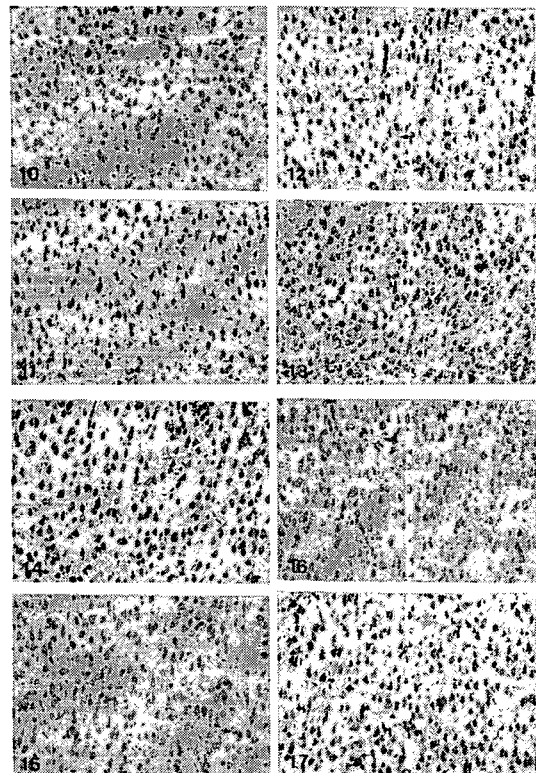


Fig. 9. The changes of the number of VEGF-immunoreactive cells according to the administered SR extracts(D3 and D7), AR extracts(S3 and S7) or CF extracts(H3 and H7) for 3 days and 7days.

3. Cresyl violet stain을 통한 뇌신경 세포의 현미경적 관찰

대조군 3일군에서 신경세포의 염색성이 미약하였고 축삭(axon)과 수상돌기(dendrite)의 발달도 미약하게 나타났다(Fig. 10). 단삼 3일군에서는 신경세포의 밀도가 다른 실험군에 비해 낮게 나타났으나 축삭과 수상돌기는 대조군에 비해 발달되어 있었다(Fig. 11). 석창포 3일군에서 신경세포의 밀도는 단삼 3일군보다는 높았으나 홍화 3일군보다는 낮았으며, 전반적으로 신경세포의 축삭과 수상돌기는 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 12). 홍화 3일군에서는 신경세포의 밀도가 대조군과 다른 실험군에 비해 높게 나타났으나, 수상돌기와 축삭은 뚜렷하게 관찰되지 않았다(Fig. 13).



Figs. 10-13. Light micrographs of the parietal lobe of contusion-induced after 3 days. Control group(Fig. 10), SR-administered group(Fig. 11), AR-administered group(Fig. 12), CF-administered group(Fig. 13). Cresyl violet stain, × 100.

Figs. 14-17. Light micrographs of the parietal lobe of contusion-induced after 7 days. Control group(Fig. 14), SR-administered group(Fig. 15), AR-administered group(Fig. 16), CF-administered group(Fig. 17). Cresyl violet stain, × 100.

대조군 7일군에서 신경세포는 대조군 3일군에 비해 세포의 형태가 뚜렷하였으며 염색성이 높게 관찰되었다(Fig. 14). 홍화 7일군은 단삼 7일군과 석창포 7일군에 비해 신경세포의 수상돌기와 축삭의 발달이 뚜렷하게 나타났고, 신경세포의 염색성과 밀도도 높게 나타났다(Fig. 15, 16, 17).

groups		numbers of nerurons	
		mean±SE	Prob > T
3days	Con	29.4±2.6	
	D	25.8±1.7	0.23
	S	29.0±1.8	0.89
	H	34.4±1.8	0.11
7days	Con	28.4±1.7	
	D	27.8±1.4	0.77
	S	22.8±1.0**	0.01
	H	29.4±1.7	0.65

Table 2. The changes of the number of neurons according to the administered drugs in contusion-induced rats.

Con, control group; D, SR extracts

administered group; S, AR extracts administered group; H, CF extracts administered group.

4. 두정엽 부위의 신경세포 계수

두정엽 부위의 신경세포 수는 홍화 투여군이 대조군에 비해 다소 증가하였으나 유의성은 없었고, 단삼 투여군에서는 오히려 약간 감소하였으며, 석창포 투여군에서도 감소하였는데, 특히 7일군에서는 유의성 있게 감소하였다(Table. 2, Fig. 18).

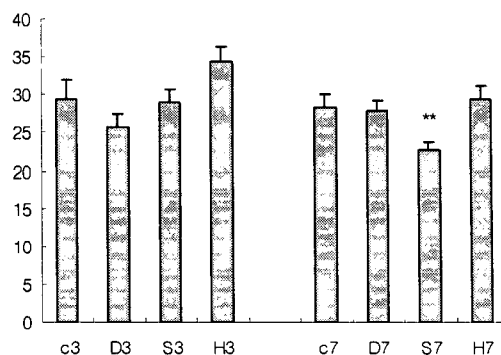


Fig. 18. The changes of the number of neurons according to the administered SR extracts(D3 and D7), AR extracts(S3 and S7) or CF extracts(H3 and H7) for 3 days and 7 days.

IV. 考 察

뇌좌상은 손상에 의한 국소 뇌실질 내의 출혈과 뇌조직의 괴사가 발생한 상태로 뇌조직의 자가조절기능이 파괴되어 모세혈관의 투과율이 증가되고 내피세포 접합부가 손상되어 수분과 교질이 세포의 공간으로 들어가서 腦浮腫을 일으키고 혈장삼투압이 감소하게 되며 뇌조직으로부터

acetylcholine이나 monoamine 등이 유리됨으로써 뇌부종이 더욱 심하게 된다. 그리고, 뇌부종으로 인해 두개강 내압이 상승되어 혈압상승 및 뇌세포의 괴사가 발생하게 되는데, 이는 중추신경계에 대한 국소적인 영향으로서 손상 부위에 신경세포 기능 및 뇌에너지 대사의 장애와 뇌혈류 감소로 인하여 뇌혈관계 자가조절 기능이 상실됨으로써 발생하게 되는 것이다^{1-8,24)}. 그러므로 뇌좌상 후 혈관신생, 뇌에너지 대사장애개선, 뇌세포막 펌프작용의 정상화로 뇌혈관계 자가조절 기능을 회복시켜 뇌부종을 치료함으로써 뇌손상을 가역적으로 회복시킬 수 있다^{2-5,24)}.

혈관의 형성은 식물의 성장과정과 유사하고 성장과 분화에 있어서 반드시 혈관을 필요로 하며 태아의 발생과정에서 기초적으로 생성되는 血管生成(Vasculogenesis)과 병리·생리학적인 상태에서 혈관이 새롭게 생성되는 血管形成(Angiogenesis)으로 크게 구분할 수 있다. 즉 혈관신생은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 것을 의미하는데 세포막의 분해, 혈관내피세포의 이동 및 증식, 혈관벽의 형성으로 혈류가 흐르게 되어 완성되는 복잡한 과정으로 이루어진다²⁵⁻²⁸⁾.

혈관신생은 정상적인 성장과정에서 뿐만 아니라 병리학적인 상태에서도 발생된다. 배아발생, 자궁내막 재생 및 자가 상처 치유 등과 같은 생리적인 조건하에서 일시적인 현상으로 발생되지만, 병리적인 상태에서는 종양발생과 진행, 전이에 필수적인 특징으로써 악성 성장세포종일수록 더 많은 종양의 혈관이 신생되는 것에서 알 수 있듯이 당뇨병 망막증, 신생혈관성 녹내장, 류마티스관절염, 건선 등과 같은 질병

의 악화와 매우 밀접한 관련이 있으며, 생리적인 상태에서 일시적인 현상으로 발생되는 것과는 다르게 빠르고 지속적으로 진행된다²⁵⁻²⁷⁾.

모든 조직 손상의 치유과정은 염증초기부터 손상받은 세포들이 건강한 세포로 대체됨으로써 재생이 되는데, 그것은 실질세포의 재생, 실질세포 및 결합조직세포의 이동과 증식, 세포 기질의 단백질합성, 결합조직 및 실질조직의 재모형, 교원질화 및 創傷張力의 획득 등 매우 복잡한 과정을 통해 이루어진다. 이 기전에서 성장인자의 역할, 세포-세포·세포-기질 사이의 상호작용, 세포기질의 합성과 교원질화 현상이 주요한 과정들이지만^{24,29)}, 그 중에서도 성장인자의 역할은 매우 중요하다. 특히, 혈관신생은 모혈관의 기저막 단백질의 분해를 통한 모세혈관의 발아, 혈관신생 자극원을 향한 내피세포의 이동, 이동세포 바로 다음 부위의 내피세포의 증식 및 성숙, 모세혈관으로의 분화 등의 과정으로 이루어진다²⁴⁻²⁷⁾.

내피세포는 내피분열 유발성 성장인자들을 분비하며 새로운 혈관생성을 유도하는 작용을 한다. 내피성장 인자와 관련있는 heparin-binding peptide인 일련의 혈관신생 유사분열 물질들이 밝혀졌는데, 혈관신생 유발인자로서 Transforming growth factor- α (TGF- α), Epidermal growth factor(EGF), Platelet derived growth factor(PDGF), Fibroblast growth factors(FGFs), IL-1, TNF, Angiotensin II, VEGF 등이 있다^{27,29)}. 그 중에서 TGF- α 와 EGF는 섬유아세포 및 몇몇의 상피세포에 대한 분열유발인자로 작용하고 세포표면에 있는 특수한 tyrosine kinase,

EGF 수용체를 통해 생화학적으로 세포분열, 혈관신생을 촉진한다. PDGF는 혈장, insulin과 같은 진행인자와 함께 세포주기만을 자극하는 적격인자로 작용한다. FGFs는 섬유모세포의 분열유발인자 및 혈관신생의 모든 단계를 유도하는 polypeptide이다. IL-1, TNF는 섬유조직형성(fibroplasia), 염증시 결합조직의 재모형(remodeling)에 관여한다. Angiotensin II는 내피세포의 이동과 증식을 유도하고 혈관형성을 자극하는 작용을 한다^{27,29}. 특히, VEGF는 세포내에서 확산, 분비되는 단백질이며 내피세포에 특이적으로 작용하는 대표적인 혈관신생인자로서 내피세포의 증식과 이동, 세포외 기질의 재형성, 모세혈관의 형성과 같은 혈관신생에 관여함으로써 심혈관계의 발생, 정상혈관계의 생리적 현상 및 뇌손상 부위에서 혈관을 신생하여 자가조절 기능과 뇌신경 세포를 유지, 보호하는 작용을 하는 내피성장인자이다^{2-5,8,24-37}.

반면에 α -interferon, heparin, TGF- β , endostatin, angiostatin 등은 주로 세포성장억제제, 내피세포의 이동과 증식을 차단, 혈관내피증식을 억제하여 혈관신생을 저해하는 혈관신생 억제인자들이다^{31,32,38-42}. 또한, 이들은 혈관신생 과정에서 혈관내피에 선택적으로 작용하여 부작용을 적게 일으킨다는 장점이 있어 현재 혈관신생으로 인하여 악화되는 당뇨병 망막증, 신생혈관성 녹내장, 류마티스관절염, 건선, 악성종양 등의 질환치료에 많이 연구이용되고 있다^{25-27,41,42}.

丹蔘은 活血祛瘀, 涼血消癰, 除煩安神하는 효능이 있어 月經不調, 經閉, 痛經, 癥瘕積聚, 胸腹刺痛, 心煩不眠, 瘡瘍腫痛 등

을 치료하고, 紅花는 活血通經, 散瘀止痛하는 효능이 있어 經閉, 痛經, 惡露不行, 癥瘕痞塊, 跌撲損傷, 瘡瘍腫毒 등을 치료하며, 石菖蒲는 化濕開胃, 開竅豁痰, 醒神益智하는 효능이 있어 神昏癲癇, 脘痞不飢, 噤口下痢, 健忘耳聾 등을治療하는데 사용되는 약물들이다⁹⁻¹².

최근의 이러한 약물들에 대한 연구를 살펴보면, 丹蔘에는 丹蔘藥針이 急性失血性貧血을 유발시킨 흰쥐의 회복효과·鎮痛 및 血壓降下에 미치는 영향과 丹蔘이 抗癌活性和 apoptosis, CC14 中毒 흰쥐의 損傷肝에 미치는 영향에 대한 研究들¹³⁻¹⁶이 있고, 紅花에는 紅花藥針이 急性毒性·腦部位別 Catecholamine 含量·白鼠의 腦血流力學 變動에 미치는 영향과 鎮痛 및 抗血栓 효능에 관한 研究들¹⁷⁻²⁰이 있으며, 또한 石菖蒲는 4-vessel occlusion으로 유발된 흰쥐 腦虛血의 神經細胞 損傷에 대한 방어효과에 관한 研究²¹가 있다.

그리고, 뇌좌상에 대한 연구를 살펴보면, 六味地黃湯이 腦挫傷 恢復에 미치는 영향에 관한 研究²²가 있었지만, 單味之劑로서 丹蔘, 紅花, 石菖蒲가 뇌좌상에 미치는 영향에 대한 연구는 아직까지 없었다.

이에 본 실험에서는 뇌좌상의 치료에 있어서 丹蔘, 紅花, 石菖蒲가 뇌혈관 신생, 뇌세포 손상보호 및 활성화에 어떠한 효능이 있는지를 검증하기 위해 특수하게 제작된 장치로 흰쥐에게 뇌좌상을 유발시킨 후 단삼 추출액 1g/kg, 석창포 추출액 0.45g/kg, 홍화 추출액 2.8mg/kg을 경구 투여하였다. 그리고 각각을 뇌조직의 부종이 가장 심한 3일군과 회복기에 들어서는 7일군으로 나누어 뇌조직을 적출하여 VEGF-면역반응성 세포와 뇌신경 세포를 관찰한 후

유의성을 검증하였다.

먼저 뇌좌상에 의해 손상된 뇌의 모세혈관 신생정도를 나타내는 중요한 뇌혈관 신생인자인 VEGF의 양을 실험적으로 규명하고자 VEGF 발현세포를 면역조직화학적 방법을 통하여 염색한 후 흰쥐의 뇌조직 단면을 광학현미경으로 관찰한 후 두정엽 부위 4cm에 존재하는 세포 수를 계수하였다.

대조군 3일군에서는 두정엽 피질부의 뇌조직에서 다수의 VEGF-면역반응성 세포들이 관찰되었지만 반응성이 미약하였고, 주변 모세혈관에서는 VEGF-면역반응성이 관찰되지 않았다(Fig. 1).

단삼 3일군에서는 비교적 면역반응성이 미약한 세포들이 피질부위에서 집단적으로 관찰되었지만, 주변 모세혈관의 면역반응성은 거의 관찰되지 않았다. 그러나 면역반응성 세포 수는 유의성 있게 증가하였다(Table 1, Fig. 2, 9).

석창포 3일군에서도 다수의 VEGF-면역반응성 세포들이 관찰되었으나 반응성이 비교적 미약하였고 주변 모세혈관의 면역반응성은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 3).

홍화 3일군에서는 VEGF-면역반응성 세포들이 대조군이나 다른 실험군에 비해 다수 관찰되었고 면역반응성 또한 가장 높게 나타났다. 또한 주변 모세혈관의 내피세포에서도 VEGF-면역반응성이 매우 높게 관찰되었고 세포계수에서도 유의성 있게 증가하였다(Table 1, Fig. 1, 2, 3, 4, 9).

대조군 7일군에서는 면역반응성 세포들이 아주 미약하게 관찰되었고 세포계수에서도 대조군 3일군보다 더욱 감소하였다(Table 1, Fig. 1, 5, 9). 단삼 7일군에서는 VEGF-면역반응성 세포들이 단삼 3일군에

비해 약간 감소하였으나 대조군에 비해서는 유의성 있게 증가하였고(Table 1, Fig. 2, 5, 6, 9), 석창포 7일군에서는 석창포 3일군보다 면역반응성 세포가 더욱 감소하였다(Table 1, Fig. 3, 7, 9). 홍화 7일군에서는 VEGF-면역반응성 세포들의 반응성은 미약하게 나타났지만 모세혈관의 내피세포에서는 면역반응성이 더욱 높게 관찰되었고, 세포계수에서도 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다(Table 1, Fig. 5, 8, 9).

결과적으로, 석창포는 뇌혈관 신생인자인 VEGF-면역반응성 세포의 활성화 및 유발에 유의할 만한 효과가 없었으나, 단삼과 홍화는 손상된 뇌부위에서 뇌혈관 신생인자인 VEGF-면역반응성 세포를 활성화하는데 유의한 효과가 있었다.

뇌신경계의 가장 중요한 구조와 기능의 단위는 뇌신경 세포이며 신경세포들은 전기화학적 신호에 의해서 정보를 교환한다. 신경세포는 신경원체(Cell body)와 수상돌기(Dendrites), 축삭(Axon)으로 구성되어 있으며, 물리적인 충격으로 유발된 뇌좌상의 경우 신경세포에 손상이 발생하게 된다^{8,24,28}). 그러므로, 신경세포의 손상 정도와 신경세포의 활성화 정도를 규명하기 위해 Cresyl violet stain을 통한 뇌신경세포의 현미경적 관찰을 하였다.

대조군 3일군에서 신경세포의 염색성은 미약하였고 수상돌기와 축삭의 발달도 미약하였다(Fig. 10). 단삼 3일군에서는 신경세포의 밀도가 다른 실험군에 비해 다소 낮게 나타났고 신경세포의 수상돌기와 축삭은 대조군에 비해 발달되어 있었으나, 신경세포 계수는 대조군에 비해 오히려 감소하였다(Table 2, Fig. 10, 11, 12, 13,

18). 석창포 3일군에서는 전반적으로 신경세포의 수상돌기와 축삭은 뚜렷하게 관찰되었으나 신경세포 계수는 대조군에 비해 감소하였다(Table 2, Fig. 10, 12, 18). 홍화 3일군에서는 신경세포 계수가 대조군과 다른 실험군에 비해 높게 나타났으나, 수상돌기와 축삭은 뚜렷하게 관찰되지 않았다(Table 2, Fig. 10, 11, 12, 13, 18).

대조군 7일군에서는 대조군 3일군에 비해 신경세포의 형태가 뚜렷하였고 염색성도 높게 관찰되었다(Fig. 10, 14). 단삼 7일군과 석창포 7일군은 대조군에 비해 신경세포의 염색성, 수상돌기와 축삭의 발달이 뚜렷하지 못하였고 세포계수에서도 감소하였는데, 특히 석창포는 유의성 있게 감소하였다(Table 2, Fig. 14, 15, 16, 18). 홍화 7일군의 세포계수는 대조군에 비해 약간 증가하였으나 유의성은 없었다(Table 2, Fig. 14, 17, 18).

이상의 결과를 종합해 보면, 석창포는 뇌좌상으로 인한 뇌손상에 있어 유의성 있는 효과가 없었으며, 홍화와 단삼은 뇌혈관 신생인자인 VEGF-면역반응성 세포를 활성화하는데 유의한 효과를 나타냈으므로 손상된 뇌조직의 혈관신생을 유도하여 뇌혈류를 개선시키는 효과가 있었다. 그러나 뇌신경세포의 손상을 방어하고 활성화하는데에는 유의성 있는 효과가 없었다. 여기에 대해서는 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

손상보호 및 활성화에 미치는 영향을 실험적으로 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. VEGF-면역반응성 세포 관찰

石菖蒲는 3일군과 7일군 모두에서 유의한 효과가 없었다. 丹蔘에서는 모든 군에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였고, 紅花에서도 모든 군에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났는데 특히, 7일군에서는 2배정도 증가하였다.

2. Cresyl violet stain을 통한 뇌신경세포의 관찰

丹蔘과 石菖蒲는 3일군에서 대조군에 비해 수상돌기와 축삭은 비교적 뚜렷하게 관찰되었고, 紅花에서는 3일군과 7일군 모두에서 대조군에 비해 뇌신경세포 수가 다소 증가하였으나 유의성은 없었다.

이상의 결과들로 미루어 보아, 石菖蒲는 뇌좌상으로 인한 뇌손상에 활용함에 있어 신중을 기해야 하며, 紅花와 丹蔘은 손상된 뇌조직의 혈관신생을 유도하여 뇌혈류를 개선시키는 효과가 있었으나 직접적인 뇌신경세포 손상 보호와 활성화작용은 미약하였다. 여기에 대해서는 더욱 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

丹蔘, 紅花, 石菖蒲가 뇌좌상이 유발된 흰쥐 뇌조직의 혈관 재생, 뇌신경 세포의

參 考 文 獻

1. Kurt j. Isselbacher 外. HARRISON'S 내과학. 서울: 도서출판 정담; 1997, p.1022-1023, 2506, 2508-2509.
2. 홍상수 外. 경도 두부외상 환자에서 뇌 좌상 주위 부종영역에서의 자기공명분광법을 이용한 대사변화. 대한신경외과학회지 2000;29(9):1233-1237.
3. 박종태. 두부손상에 따른 뇌의 이차적 변화. 서울: 中央醫學; 1997, p.437, 655-660.
4. 홍순기 外. 직접 및 간접타격이 두부 좌상환자의 예후에 미치는 영향. 대한신경외과학회지 1987;39:5-12.
5. 成 躡 慶. 腦의 機能에 對한 臟象論의 考察. 大韓韓醫學會誌 1995;16(1):468-474.
6. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울: 중앙문화사; 1989, p.157-158, 198, 333.
7. Raymond D. Adams 外. 아담스 신경과학. 서울: 도서출판 정담; 1998, p. 599-601, 805, 807.
8. 광용찬. 도해뇌신경외과학. 서울: 제일의학사; 1992, p.426.
9. 牛兵占. 神農本草經. 河北: 河北科學技術出版社; 1994, p.9, 31.
10. 康秉秀 外. 本草學. 서울: 永林社; 1999, p.419-420, 424-425, 523-524.
11. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 上海: 上海科學技術出版社; 1998, p.478-480, 612-614, 992-994
12. 申佶求. 申氏本草學. 서울: 壽文社; 1988, p.514-515, 519-520, 554-555.
13. 박민규. 丹蔘이 CC14로 손상된 흰쥐의 간에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2000.
14. 이종석. 丹蔘 및 當歸水鍼이 急性 失血性 貧血을 誘發시킨 흰쥐의 회복효과에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1990.
15. 송준호. 丹蔘水鍼이 鎮痛 및 血壓降下에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1984.
16. 최선미. 丹蔘의 抗癌活性과 apoptosis에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2000.
17. 윤계숙. 藥針用 紅花抽出液의 急性毒性에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1994.
18. 손철훈. 濃度別 紅花 水鍼刺戟이 흰쥐 腦部位別 Catecholamine 含量에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1991.
19. 김동환. 桃仁 및 紅花 藥針의 鎮痛, 抗血栓 效能에 관한 연구. 경희대학교 대학원. 2000.
20. 안영선. 亞門(GV15)의 紅花藥針이 白鼠의 腦血流力學 變動에 미치는 영향. 동신대학교대학원. 2002.
21. 임형수. 石菖蒲가 4-vessel occlusion으로 유발된 흰쥐 뇌허혈의 신경세포 손상에 대한 방어효과. 경희대학교대학원. 2000.
22. 김용진. 六味地黃湯이 흰쥐의 腦損傷 恢復에 미치는 영향. 동신대학교대학원. 2002.
23. Sukriti Nag, MD, PHD, FRCPC, Jennifer L. Takahashi, BSC and Daniel W. Kilty, BSC. Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Blood Brain Barrier Breakdown and Angiogenesis in Brain Trauma.

- Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 1997;56(8):912-921.
24. 김상호 外. 일반병리학. 서울: 고문사; 1995, p.5-8.
 25. Folkman J. and Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem 1992;267:10931-10934.
 26. Risau W. and Flamme I. Mechanism of angiogenesis. Nature 1997;386:671-674.
 27. Andrade S P, Fan T-P D. and Lewis G P. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. Br J Exp Pathol 1987;68:755-766.
 28. 배춘상 外. 신경해부학. 서울: 고문사; 1998, p.376-377.
 29. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사; 1991, p.89-90, 102, 106-108.
 30. 김종만. 신경해부생리학. 서울: 도서출판 정담; 2000, p.16-24, 268.
 31. Michael S O'Reilly et al. Endostatin : An endogeneous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 1997;88:277-285.
 32. Kun Lin Jin, Xiao Ou Mao. and David A. Greenberg. Vascular endothelial growth factor : Direct neuroprotective effect in in-vitro ischemia. PNAS 2000;97:10242-10247.
 33. Leach NJ, Swan JH, Eisenthal D, Dopson M, Nobbs M. BW619C89. A glutamate release inhibitor, protects against focal cerebral ischemic damage. Stroke 1993;24: 1063-1067.
 34. 최호영. 當歸類 韓藥材가 血管新生에 미치는 영향에 대한 비교연구. 경희대학교대학원. 2001.
 35. 최호영. 靈芝 抽出物이 血管新生誘導에 있어서의 役割. 경희대학교대학원. 2001.
 36. 유영천 外. 혈관신생인자가 복합조직 이식의 생착에 미치는 효과에 대한 연구. 경희대학교 의과대학 성형외과학교실. 1995.
 37. 정연웅 外. 혈관신생에 영향을 미치는 약제에 관한 연구. 영남대학교 의과대학 외과학교실. 1990.
 38. Weidong-Richard JI. et al. Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. FASEB 1998:1731-1738.
 39. Lynn A Cornelius. et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin : Effects on neovascularization. J Immunol 1998:6845-6852.
 40. Domenick J Falcone. et al. Macrophage formation of angiostatin during Inflammation. J Bio Chem 1998;273:31480-31485.
 41. 정성필 外. 인체 Endostatin의 신생혈관 형성에 대한 억제효과. 순천향대학교 의과대학 일반외과학교실. 2000.
 42. 전원경 外. 한약재의 신생혈관생성 억제활성에 관한 연구. 한국한의학회연구원 논문집. 1998.