

## 紅景天이 腦組織內出血 흰쥐의 腦浮腫과 Matrix Metalloproteinase 발현에 미치는 영향

류사현, 이준석, 신정원, 김성준, 손낙원\*

경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공\*

### Effects of *Rhodiola Rosea* on Brain Edema and Matrix Metalloproteinase Expressions Following Intracerebral Hemorrhage in the Rat

Sahyun Ryu, O.M.D., Joon-suk Lee, O.M.D., Jung-won Shin, Ph.D.,  
Seong-joon Kim, O.M.D., Nak-won Sohn, O.M.D.\*

Dept. of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science,  
Kyung Hee University\*

#### ABSTRACT

**Objectives :** This study aimed at evaluation of the effects of *Rhodiola rosea* on brain edema and expressions of matrix metalloproteinases (MMPs) related to blood-brain barrier (BBB) disruption.

**Methods :** Brain edema following intracerebral hemorrhage (ICH) was induced by the stereotaxic intrastriatal injection of bacterial collagenase type VII in rats (Sprague-Dawley). Then ethanol extract of *Rhodiola rosea* was treated once a day for 3 days. Brain edema % and water contents, and BBB leakage were examined. Immunohistochemistry was processed for MMP-9, MMP-12, and iNOS expressions in the brain sections and each immuno-labeled cells were analyzed with image analysis software.

**Results :** 1. Ethanol extract of *Rhodiola rosea* reduced brain edema following ICH in rats significantly.  
2. Ethanol extract of *Rhodiola rosea* reduced excessive brain tissue water contents following ICH in rats significantly.  
3. Ethanol extract of *Rhodiola rosea* reduced BBB leakage in the cerebral cortex following ICH in rats.  
4. Ethanol extract of *Rhodiola rosea* reduced cellular edema of neurons in peri-hematoma and the cerebral cortex following ICH in rats significantly.  
5. Ethanol extract of *Rhodiola rosea* reduced MMP-9 positive cells in the cerebral cortex following ICH in rats significantly.  
6. Ethanol extract of *Rhodiola rosea* reduced MMP-12 positive vessels in the cerebral cortex following ICH in rats significantly.  
7. Ethanol extract of *Rhodiola rosea* reduced iNOS positive cells in the cerebral cortex and external capsule following ICH in rats significantly.

**Conclusions :** These results suggest that *Rhodiola rosea* reveals protective effect against brain edema and cytotoxic edema of neurons by means of down-regulation of MMPs and iNOS expressions, and inhibition of BBB leakage.

**Key words :** Intracerebral hemorrhage, *Rhodiola rosea*, Brain edema, BBB, MMPs, iNOS.

## 서론

中風 즉 뇌졸중은 전 세계적으로 성인 사망의 3대 원인 중 하나일 뿐 아니라 국내에서는 수년간 전체 사망원인 중 악성 신생물에 이어 두 번째로 사망율이 높은 질환이다<sup>1)</sup>. 뇌졸중은 뇌출혈 또는 뇌허혈 등으로 인하여 운동기능장애와 인지기능 장애 등을 수반하는 질환으로, 생존하더라도 이들 중 40%는 중등도의 기능장애가 있는 상태로 살아가고, 15-30%는 심각한 장애인으로 살아가게 된다<sup>2,3)</sup>. 中風으로 인한 장애의 정도는 다른 장애유형보다 중증 비율이 더 높고, 심각한 후유장애로 인한 막대한 사회적 비용의 부담 증가와 개인적인 삶의 질 저하 등 심각한 사회문제로 대두되고 있다<sup>4)</sup>.

뇌졸중의 원인 중 서양에서는 뇌출혈이 전체 뇌졸중의 10-15%를 차지하나<sup>3)</sup> 동양인에서는 30% 정도에 이른다<sup>5)</sup>. 국내 보고에서 뇌출혈의 비중은 1960년대에는 전체 뇌혈관질환의 46.1%를 차지하였고, 1970년대에 39.1%, 1980년대에 33.2%를 차지하여 점차 감소되는 추세이나 여전히 높은 비율로 발생하고 있으며<sup>1)</sup>, 비슷한 크기의 허혈성 뇌경색에 비하면 회복기의 예후가 더욱 나쁜 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>.

한의학에서 中風은 風, 火熱, 氣血虛, 濕痰, 瘀血 등의 원인으로 발병되며, 祛風通絡, 清熱, 補氣血, 除濕化痰, 活血祛瘀 등의 치법을 사용한다<sup>7,8)</sup>. 이러한 中風에 대한 한의학의 치법과 한약물의 효능을 관찰한 실험연구에서 허혈성 뇌경색에 대하여는 많은 연구보고들이 있으나 뇌출혈에 대한 한의학의 치법 또는 한약물의 효능연구 보고는 매우 드물다.

紅景天 (*Rhodiola rosea*, "golden root")은 유럽과 아시아의 고산지대에 널리 분포되어 서식하는 다년생 초본식물로서 돌나물과 (Crassulaceae)의 돌꽃속 (Rhodiola)에 속하고 참돌꽃이라는 별칭을 가지고 있으며 뿌리와 줄기를 약용 한다<sup>9,10)</sup>. 한의학에서는 돌나물과 (경천과, Crassulaceae)에 속하는 大株紅景天 (*Rhodiola kirilowii*)의 根과 根莖을 사용하며, 補氣清肺, 益智養心, 收澀止血, 散瘀消腫의 효능으로 氣虛體弱, 病後畏寒, 氣短乏力, 肺熱咳嗽, 神經症 등의 치료에 사용하였다<sup>11-13)</sup>. 이러한 홍경천은 항피로와 강장효능이 있으며, 신경증과 고혈압, 노인성 심장쇠약, 당뇨병, 폐결핵, 빈혈, 간 및 담낭 질환, 신경쇠약, 산후 및 병후허약 건망증 등에 사용하였으며<sup>9-13)</sup>, 또한 신경계 자극, 우울증 감소, 작업능력 향상, 피로회복, 고산병 예방 등에 유효한 전통약물로 동유럽과 아시아에서 오래전부터 사용되어 왔다<sup>9-13)</sup>. 최근에는 홍경천의 항산화 효능<sup>14)</sup>, 스트레스와 정신적 작업능력의 향상<sup>15,16)</sup>, 신경세포손상 보호<sup>17)</sup>, 학습과 기억 증강<sup>18)</sup> 및 운동능력 향상<sup>19)</sup> 등의 효능이 보고되었다. 이러한 홍경천의 효능에 근거할 때 뇌출혈과 뇌부종에 대하여도 일정한 효능을 나타낼 것으로 생각되나 이에 대한 연구보고가 없었다.

그러므로 본 연구에서는 홍경천이 뇌출혈과 뇌부종에 미치는 효능을 관찰하기 위하여, 실험동물의 뇌 선조체 (striatum) 내에 collagenase를 주입하여 뇌조직내출혈 (intracerebral hemorrhage, ICH)을 유발하고 홍경천 에탄올추출물을 경구투여한 후 뇌부종과 뇌혈관관문 (blood-brain barrier, BBB) 누출 손상, 신경세포의 세포부종에 대한 영향을 관찰하였으며, 뇌부종과 BBB 손상에 관여

하는 주요인자인 matrix metalloproteinase (MMP)-9와 MMP-12 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현을 면역조직화학염색으로 관찰한 바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

## 재료와 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 샘타코 (Samtako, Korea)에서 구입한 11주령, 약 300 g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도 (21-23°C), 습도 (40-60%), 조명 (12 시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료를 자유롭게 공급하며 사육되었고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

### 2. 약물의 제조 및 투여

본 실험에 사용한 한약물은 홍경천 (*Rhodiola rosea*, RR)으로 益康藥材有限公社 (安國市, 中國)에서 구입하였다. 세절된 홍경천 400 g에 40% ethanol 3,000 ml를 가하여 실온에서 5일간 추출하였으며, 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축 후 동결건조하여 62.5 mg/g의 추출물을 얻어 수율은 6.3% 이었다. 실험동물의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100 g 당 20.8 mg을 2 ml의 온수에 녹여 뇌조직내출혈 유발 3시간 후부터 1일 1회 3일간 경구투여 하였다.

### 3. 실험군의 구분

뇌조직내출혈에 대한 홍경천의 효능을 관찰하기 위하여 실험군을 다음과 같이 구분하였다. 마취와 두정부의 피부절개 및 두개골의 천공 과정은 시행하였으나 뇌조직 내에 collagenase를 주입하지 않은 정상대조군 (Sham)과 위의 과정과 같은 사전준비 수술에 이어 선조체에 collagenase를 주입하여 뇌조직내출혈을 유발한 대조군 (ICH) 및 대조군과 같이 뇌조직내출혈을 유발한 다음 3일간 홍경천 에탄올추출물을 경구투여한 홍경천투여군 (ICH+RR)으로 나누었다. 각 군의 실험동물은 각각 18마리씩 총 54마리로, 뇌부종 측정과 뇌조직 수분함량 측정, 뇌혈관관문 손상 관찰 및 뇌조직의 면역조직화학염색용으로 사용하였다.

### 4. 뇌조직내출혈의 유발

뇌조직내출혈 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>21)</sup>.

마취된 흰쥐의 머리를 뇌정위고정장치 (Stoelting, USA)에 고정된 다음 두정부의 정중선을 따라 피부를 절개하고 두개골이 드러나게 하였다. 두개골의 bregma로부터 전방으로 0.2 mm, 외측으로 3.5 mm 위치에 전기드릴을 사용하여 약 1 mm 직경의 구멍을 만들고, 뇌정위고정장치에 장착된 hamilton 주사기 (26-gauge, 10  $\mu$  l, Hamilton, USA)를 뇌경막 (dura mater)으로부터 5.5 mm 깊이로 선조체에 삽입하였다. 이어서 1  $\mu$  l의 0.23 U, bacterial collagenase type VII (C0773, Sigma-Aldrich, USA) 용액을 hamilton 주사기에 연결된 micropump (Model 310, Kd Scientific Inc, USA)를 작동하여 0.1  $\mu$  l/min의 속도로 주입하였다. Collagenase 용액의 주입이 끝난 후에도 약 10분간 hamilton 주사기를 유지하여 collagenase 용액의 역류를 방지하였으며, 이후 hamilton 주사기를 제거하고 구멍은 bone wax로 메운 다음 절개한 두정부의 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다.

### 5. 뇌부종의 측정

뇌조직내출혈 유발과 흥경천 에탄올추출물 투여 3일 후에 실험동물을 과용량의 pentobarbital sodium 복강주사로 희생시켰다. 즉시 단두하고 뇌를 적출한 다음 흰쥐용 brain matrix (ASI, USA)를 사용하여 2 mm 두께의 뇌조직 절편을 만들고, digital camera로 촬영한 다음 ImageJ software (ver. 1.41)를 사용하여 각각의 뇌 절편으로부터 정중선을 기준으로 ICH유발측과 정상측의 대뇌반구 면적을 측정하고, 정상측 대뇌반구 면적에 대한 ICH유발측 대뇌반구의 면적비율로 뇌부종 비율을 계산하였다 (Fig. 1).

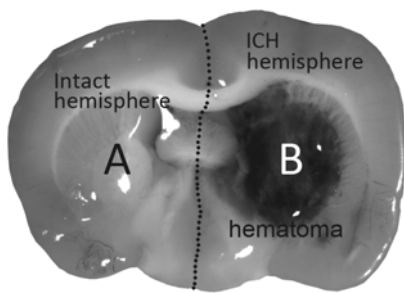


Fig. 1. A representative section of the rat brain with edema formation following intracerebral hemorrhage. Brain edema % is calculated from expanded area of ICH hemisphere (B) with respect to the area of intact hemisphere (A).

### 6. 뇌조직 수분함량의 측정

뇌조직내출혈 유발과 흥경천 에탄올추출물 투여 3일 후에 실험동물을 과용량의 pentobarbital sodium 복강주사로 희생시킨 후 즉시 단두하고 뇌를 적출한 다음 뇌로부터 소뇌와 뇌간을 제거하고 정중선을 따라 정상측과 ICH유발측 대뇌반구를 분리하였다. 뇌조직내출혈이 유발된 대뇌반구의 무게를

전자저울로 측정하고, 120°C의 mechanical convection oven (DMC121, Daeil Engineering Co., Korea)에서 24시간 동안 건조한 다음 건조중량을 측정하여 그 무게 차이의 비율을 수분함량 자료로 사용하였다.

### 7. 뇌혈관관문 누출의 관찰

뇌조직내출혈 유발과 흥경천 에탄올추출물 투여 3일 후에 실험동물을 2% isoflurane을 포함한 70% N<sub>2</sub>O와 30% O<sub>2</sub> gas로 흡입마취하고, 대퇴정맥을 통하여 4% Evans blue 용액을 4 ml/kg 주입한 다음 30분 후에 단두하여 실험동물을 희생시켰다. 즉시 뇌를 적출한 다음 -40°C의 dry ice-isophentane 용액으로 동결시키고, cryocut으로 20  $\mu$  m 두께의 관상절편으로 제작하여 slide glass에 부착한 다음 hot plate에서 완전히 건조시켰다. 이후 별도의 염색 없이 봉입하여 조직표본을 제작하고 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다<sup>22)</sup>.

### 8. 신경세포 크기의 측정

#### 8-1. 뇌조직의 처리 및 cresyl violet 염색

뇌조직내출혈 유발과 흥경천 에탄올추출물 투여 3일 후에 실험동물을 pentobarbital sodium의 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출한 다음 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 담가 침전시켰다. 다음 뇌를 -40°C의 dry ice-isophentane 용액으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80°C에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 20  $\mu$  m 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다. Cresyl violet 염색은 뇌조직을 실온에서 1.0% (w/v) cresyl violet acetate 용액에 2분간 염색하고, 농도별 ethanol 용액으로 탈수한 다음 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

#### 8-2. 신경세포의 영상분석 및 크기의 측정

Cresyl violet 염색된 뇌조직의 영상을 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)에 장착된 CCD camera (DP70, Olympus, Japan)를 통하여 영상분석시스템에 저장하고, Image J software (ver. 1.41)를 사용하여 신경세포의 크기를 측정하였다. 그 영상분석 과정을 간단히 기술하면 다음과 같다 (Fig. 2).

Image J에서 측정 대상의 영상을 불러온 다음 (step 1), 영상을 8-bit의 흑백영상으로 변환하고 (step 2), 적정의 grey level threshold를 입력하여 (step 3), 흑백영상으로부터 threshold 값 이상의 optical density를 나타내는 신경세포 area를 결정하였다 (step 4). 선정된 pixel들이 구성하는 area 중 300  $\mu$  m<sup>2</sup> 이상과 30  $\mu$  m<sup>2</sup> 이하의 area들 즉, 신경세포 이외의 불필요한 area들을 제거하고 (step 5), 각각의 pixel area를 측정하였다 (step 6). 총 500 개의 신경세포 크기를 측정하여 그 평균을 자료로 사용하였다.



Fig. 2. Image process for measurement of neuron cell size in cresyl violet-stained brain sections by using an image analysis software (Image J, ver. 1.41). Step 1, opening of the cresyl violet-stained image; step 2, making of 8-bit image; step 3, determination of threshold optical density; step 4, selection of all pixels greater than threshold optical density; step 5, discard of particles smaller than  $30 \mu m^2$  and greater than  $300 \mu m^2$ ; step 6, measurement of area of particles.

## 9. MMP-9, MMP-12 및 iNOS 발현의 면역조직화학염색 및 관찰

### 9-1. 뇌조직의 처리

뇌조직내출혈 유발과 흥경천투여군 에탄올추출물 투여 3일 후에 실험동물을 pentobarbital sodium의 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출한 다음 위의 신경세포 측정을 위한 뇌조직 처리방법 8-1과 동일하게 시행하였다.

### 9-2. 면역조직화학염색

뇌조직 절편을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1%  $H_2O_2$ 에서 10-15분 정도 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 primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 anti-MMP-9 1:200 (AB19016, Chemicon, USA), anti-MMP-12 1:20 (MAB919, R&D, USA) 및 anti-iNOS 1:250 (610329, BD, USA)을 사용하였으며, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 overnight로 반응시켰다. 다음 biotinylated anti-rabbit secondary antibody 1:200 (Vector Laboratories, USA)에 실온에서 1시간동안 반응시키고, 조직을 PBS로 씻어내고, avidin-biotin immuno-peroxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 1시간씩 반응시켰다. 다음 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB, Sigma-Aldrich, USA)에서 1-2분간 발색 반응시키고, 수세한 다음 탈수, 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

### 9-3. MMP-9, MMP-12 및 iNOS 발현의 측정

MMP-9, MMP-12 및 iNOS 발현의 측정을 위한 영상분석 및 측정방법은 위의 신경세포 크기 측정 8-2와 동일한 과정으로, 뇌의 각 부위별로 동일한 일정면적 ( $10^5 \mu m^2$ ) 내에서 양성반응을 나타낸 신경세포의 수를 Image J software (ver. 1.41)를 사용하여 측정하였다.

## 10. 통계처리

측정된 모든 자료는 Student's *t*-test를 사용하여 대조군

(ICH)과 흥경천투여군 (ICH+RR) 사이에서  $P < 0.05$ 의 유의수준으로 검정하였다.

## 실험성적

### 1. 뇌부종 비율의 변화

정상측 대뇌반구에 비교한 뇌조직내출혈이 유발된 대뇌반구의 뇌부종 비율을 측정한 결과 Sham군은  $1.8 \pm 0.2\%$ 의 뇌부종이 나타났으며, ICH 대조군은  $19.4 \pm 0.8\%$ 로 뇌조직내출혈에 의하여 현저한 뇌부종의 증가가 관찰되었다. 이에 비하여 흥경천투여군은  $17.1 \pm 0.6\%$ 로 ICH 대조군에 비하여  $P < 0.05$ 의 유의성 있는 뇌부종 비율의 감소를 나타내었다 (Fig. 3).

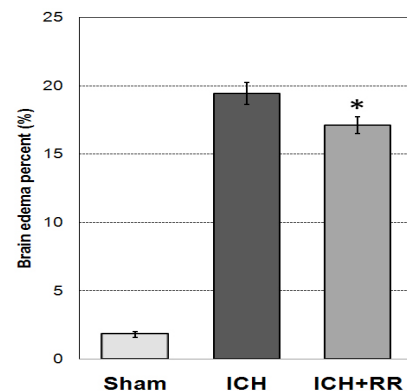


Fig. 3. Effect of *Rhodiola rosea* on brain edema % following intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase. A significant decrease of brain edema % resulted from administration of ethanol extract of *Rhodiola rosea* (ICH+RR), compared with that of ICH control group (\*,  $P < 0.05$ ;  $n=6$ ).

### 2. 뇌조직 수분함량의 변화

뇌조직내출혈이 유발된 대뇌반구의 수분함량을 측정한 결과 Sham군은  $79.34 \pm 0.14\%$ 의 수분함량을 나타내었고, ICH 대조군은  $81.16 \pm 0.33\%$ 로 뇌조직내출혈에 의하여 현저한 수분함량의 증가가 관찰되었다. 이에 비하여 흥경천투여군은  $80.08 \pm 0.31\%$ 로 ICH 대조군에 비하여  $P < 0.05$ 의 유의성 있는 수분함량의 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

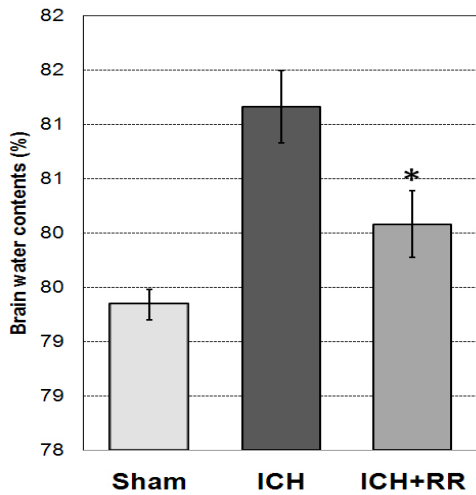


Fig. 4. Effect of *Rhodiola rosea* on brain tissue water contents following intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase. A significant decrease of brain tissue water contents resulted from administration of ethanol extract of *Rhodiola rosea* (ICH+RR), compared with that of ICH control group (\*, P<0.05; n=6).

### 3. 뇌혈관관문 누출의 변화

뇌조직내출혈 유발에 따른 뇌혈관관문 누출의 손상 정도를 Evans blue 주입으로 관찰한 결과, Sham군에서는 뇌혈관관문 누출을 관찰할 수 없었다. ICH 대조군에서는 hematoma 주변부에서 뇌혈관관문 손상에 의하여 심한 Evans blue 누출을 관찰할 수 있었으며 (Fig. 5-1), 대뇌피질에서도 혈관주위에 Evans blue가 누출된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5-3). 이에 비하여 홍경천투여군은 hematoma 주변부에서는 Evans blue 누출이 ICH 대조군과 큰 차이가 없었으나 (Fig. 5-2), 대뇌피질에서는 혈관주위 Evans blue 누출이 ICH 대조군에 비하여 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5-4).

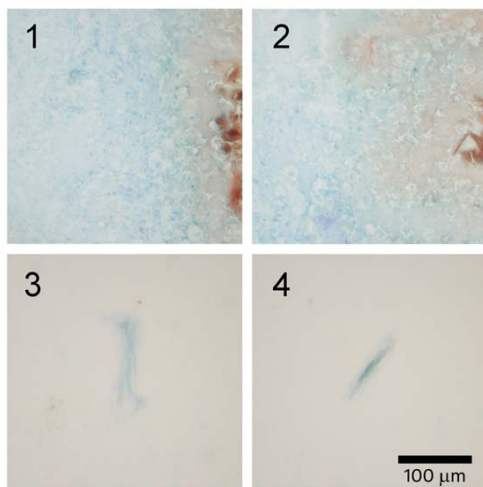


Fig. 5. Representative sections of BBB leakage in the rat brain with intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase (x400). In ICH control group, excessive Evans blue leakage resulted from intracerebral hemorrhage in peri-hematoma (1), and that of ICH+RR (2) was not different from ICH control group. Evans blue leakage in the cerebral cortex of ICH+RR group (4) was decreased than that of ICH control group (3). Scale in the section 4 is applicable to all sections.

### 4. 신경세포의 크기와 크기별 분포의 변화

뇌조직내출혈이 유발된 대뇌반구에서 hematoma 주변부와 대뇌피질의 신경세포를 조직학적으로 관찰한 바 Sham군은 정상적인 선조체 및 대뇌피질 6층의 구조를 나타내었다 (Fig. 6-1, 4). ICH 대조군은 선조체 내에 일정 크기의 hematoma가 형성되었으며, hematoma 주변부의 신경세포들 중 일부는 세포가 심하게 응축되어 세포사망의 형태 (Fig. 6-2, arrow)를 보였고 일부는 현저한 세포부종의 형태 (Fig. 6-2, arrow head)를 나타내었다. 대뇌피질에서는 layer II/III와 layer V/VI의 신경세포들이 세포부종의 형태 (Fig. 6-5, arrow head)를 나타내었으며, 특히 layer V의 신경세포들에서 세포부종이 심하였다. 이에 비하여 홍경천투여군은 hematoma 주변부 (Fig. 6-3)와 대뇌피질 layer V (Fig. 6-6) 모두에서 신경세포의 세포부종이 감소한 것을 관찰할 수 있었다.

위와 같은 세포부종의 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여 각각의 조직으로부터 신경세포의 크기를 측정한 바, hematoma 주변부에서는 Sham군은  $77.42 \pm 1.38 \mu m^2$ 을 나타내었고, ICH 대조군은  $90.18 \pm 1.90 \mu m^2$ 으로 Sham군에 비하여 세포크기가 약 16.5% 증가하였다. 이에 비하여 홍경천투여군은  $81.75 \pm 1.96 \mu m^2$ 으로 ICH 대조군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 신경세포 크기의 감소가 관찰되었다 (Fig. 7). 또한 대뇌피질의 layer V에서는 Sham군은  $92.93 \pm 1.61 \mu m^2$ 을 나타내었고, ICH 대조군은  $115.07 \pm 2.67 \mu m^2$ 으로 Sham군에 비하여 세포크기가 약 23.8% 증가하였다. 이에 비하여 홍경천투여군은  $102.88 \mu m^2$ 으로 ICH 대조군에 비하여 P<0.01의 유의성 있는 신경세포 크기의 감소가 관찰되었다 (Fig. 7).

또한 각 군의 신경세포 크기를 50-100  $\mu m^2$  이하, 100-150  $\mu m^2$  이하 및 150  $\mu m^2$  이상으로 구분하여 그 분포를 관찰한 결과는 Table 1에 제시하였다. Hematoma 주변부에서 ICH 대조군과 홍경천투여군은 Sham군에 비하여 세포크기가 50-100  $\mu m^2$  이하인 것은 감소하고, 100-150  $\mu m^2$  이하 및 150  $\mu m^2$  이상의 것은 증가하였으며, ICH 대조군과 홍경천투여군 간에 크기별 분포는 유의한 차이가 없었다 (Fig. 8). 대뇌피질의 layer V에서는 ICH 대조군과 홍경천투여군은 Sham군에 비하여 세포크기가 50-100  $\mu m^2$  이하인 것은 크게 감소하고, 150  $\mu m^2$  이상의 것이 크게 증가하였으며, 특히 홍경천투여군은 150  $\mu m^2$  이상의 세포크기 비율이 ICH 대조군에 비하여 P<0.05의 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 8).

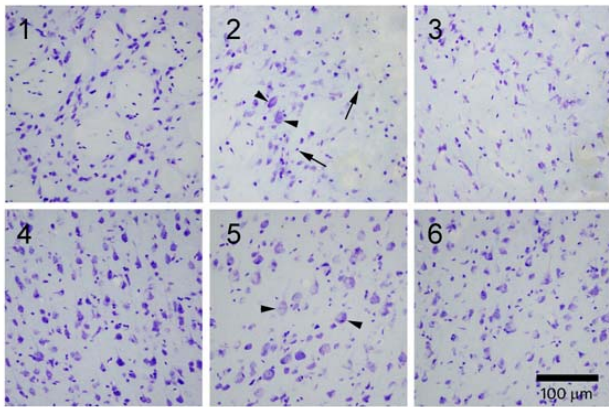


Fig. 6. Representative cresyl violet-stained sections of the rat brain with intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase (x400). Neurons in peri-hematoma (1) and the cerebral cortex layer V (4) of Sham showed normal configuration. In ICH control group, some neurons in peri-hematoma (2, arrows) showed dense shrinkage. Some neurons in peri-hematoma (2, arrow heads) and the cerebral cortex layer V (5, arrow heads) showed excessive cellular edema. In ICH+RR group, cellular edema of neurons in peri-hematoma (3) and the cerebral cortex layer V (6) were decreased with administration of ethanol extract of *Rhodiola rosea* (ICH+RR), compared with that of ICH control group. Scale in the section 6 is applicable to all sections.

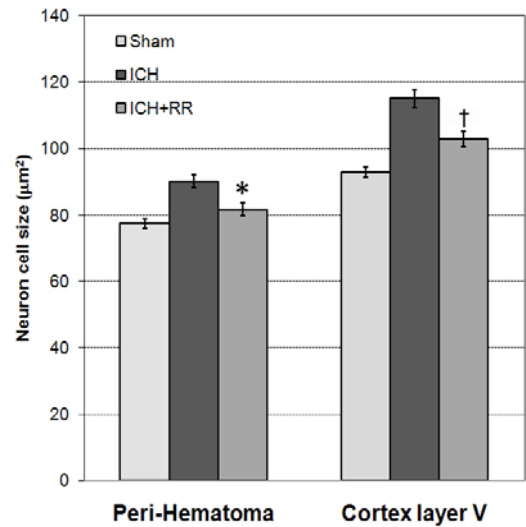


Fig. 7. Effects of *Rhodiola rosea* on neuron cell size in the rat brain with intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase. A significant decrease of cellular edema resulted from administration of ethanol extract of *Rhodiola rosea* (ICH+RR), compared with that of ICH control group in peri-hematoma (\*, P<0.05; n=6) and the cerebral cortex layer V (†, P<0.01; n=6).

Table 1. Cell-Size Population of Neurons Following Intracerebral Hemorrhage Induced by the Intrastriatal Injection of Collagenase in Rats

	Peri-Hematoma			Cortex layer V		
	cell-size (μ m <sup>2</sup> )					
	50<100	100<150	150<	50<100	100<150	150<
Sham	83.6±1.0	11.7±1.1	4.8±1.1	67.7±1.5	25.5±1.0	6.7±0.5
ICH	71.8±2.8	17.4±1.7	10.8±1.9	53.3±3.4	26.4±1.6	20.3±1.4
ICH+RR	71.3±3.2	20.5±1.8	8.2±1.1	55.1±3.1	29.4±1.3	15.5±1.5*

Data presented Mean ± Standard Error.

Sham : Sham operated group without intracerebral hemorrhage.

ICH : Control group of intracerebral hemorrhage induced by collagenase injection

ICH+RR : Sample group administrated ethanol extract of *Rhodiola rosea* after intracerebral hemorrhage.

\* : statistical significance with Student's *t*-test between ICH and ICH+RR (\*, P<0.05; n=6).

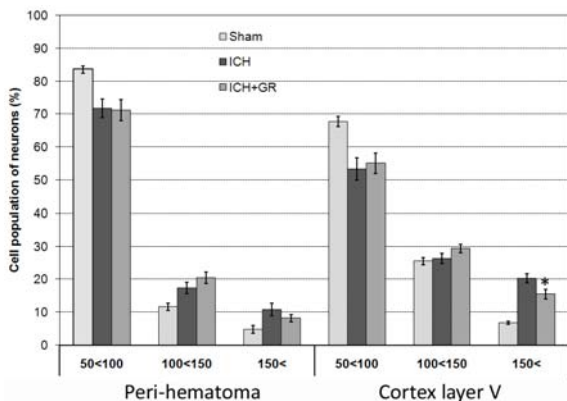


Fig. 8. Effects of *Rhodiola rosea* on cell-size population of neurons in the rat brain with intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase. A significant decrease of percentage of cell population in cell-size over 150 μ m<sup>2</sup> resulted from administration of ethanol extract of *Rhodiola rosea* (ICH+RR), compared with that of ICH control group in the cerebral cortex layer V (\*, P<0.05; n=6).

### 5. MMP-9 발현의 변화

뇌조직내출혈이 유발된 대뇌반구에서 hematoma 주변부와 대뇌피질의 MMP-9 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한 결과 Sham군에서는 선조체 (Fig. 9-1)와 대뇌피질 (Fig. 9-4) 모두에서 극히 일부의 세포에서만 MMP-9 양성반응을 관찰할 수 있었다. ICH 대조군은 hematoma 내부와 주변부에서 매우 강한 MMP-9 양성반응을 나타내는 세포들이 많이 관찰되었으며 (Fig. 9-2, arrow), 대뇌피질에서도 일부 신경세포에서 약한 MMP-9 양성반응이 관찰되었다 (Fig. 9-5, arrow). 이에 비하여 홍경천투여군은 hematoma 주변부와 대뇌피질 layer V 모두에서 MMP-9 양성반응의 강도는 ICH 대조군과 차이가 없었으나 양성반응 세포수가 감소한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 9-3, 6, arrows).

위와 같은 MMP-9 양성반응 세포수의 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여 각각 조직의 일정면적 내에서 양성반응 세포수를 측정하는 바, hematoma 주변부에서는 Sham군은

0.8±0.5 개를 나타내었고, ICH 대조군은 84.2±8.6 개가 관찰되었으며, 이에 비하여 홍경천투여군은 66.0±5.0 개로 ICH 대조군에 비하여 약 21.6% 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 10). 또한 대뇌피질의 layer V에서는 Sham 군은 0.7±0.3 개를 나타내었고, ICH 대조군은 44.7±6.4 개가 관찰되었으며, 이에 비하여 홍경천투여군은 26.5±4.4 개로 ICH 대조군에 비하여 약 40.7% 감소하고, P<0.05의 유의성 있는 MMP-9 양성반응 세포수의 감소가 관찰되었다 (Fig. 10).

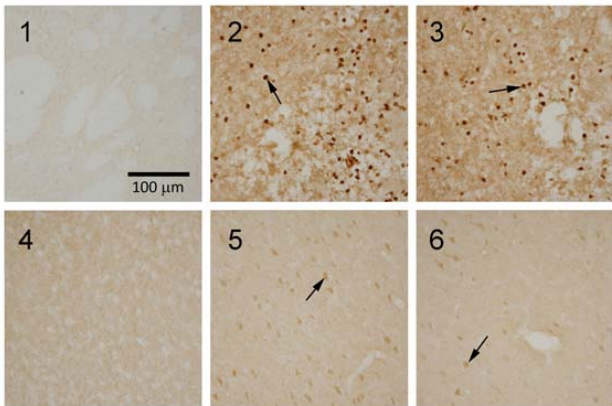


Fig. 9. Representative MMP-9 immuno-labeled sections of the rat brain with intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase (x400). MMP-9 positive cell was not observed in peri-hematoma (1) and the cerebral cortex layer V (4) of Sham group. In ICH control group, peri-hematoma showed strong positive MMP-9 immuno-labeled cells (2, arrow) and the cerebral cortex layer V showed weak positive MMP-9 immuno-labeled neurons (5, arrow). In ICH+RR group, MMP-9 immuno-positive density was not different from ICH control group, but MMP-9 positive cells were decreased both in peri-hematoma (3, arrow) and the cerebral cortex layer V (6, arrow) than that of ICH control group. Scale in the section 1 is applicable to all sections.

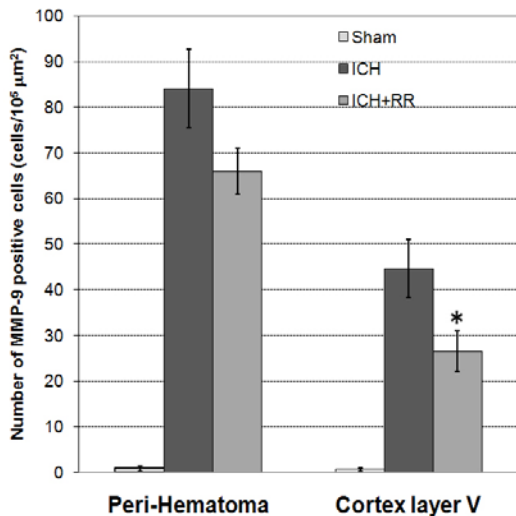


Fig. 10. Effects of *Rhodiola rosea* on MMP-9 positive cells in the rat brain with intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase. A significant decrease of MMP-9 positive cells resulted from administration of ethanol extract of *Rhodiola rosea* (ICH+RR), compared with that of ICH control group in the cerebral cortex layer V (\*, P<0.05; n=6).

## 6. MMP-12 발현의 변화

뇌조직내출혈이 유발된 대뇌반구에서 hematoma 주변부와 대뇌피질의 MMP-12 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한 결과 Sham군에서는 선조체 (Fig. 11-1)와 대뇌피질 (Fig. 11-4) 모두에서 MMP-12 양성반응 세포를 관찰할 수 없었다. ICH 대조군은 hematoma 내부와 주변부에서 강한 MMP-12 양성반응을 나타내는 세포들이 많이 관찰되었으며 (Fig. 11-2, arrow), 대뇌피질에서는 일부 혈관 벽에서만 강한 MMP-12 양성반응이 관찰되었다 (Fig. 11-5, arrow). 이에 비하여 홍경천투여군은 hematoma 주변부와 대뇌피질 layer V 모두에서 MMP-12 양성반응의 강도는 ICH 대조군과 차이가 없었으나 양성반응의 세포와 혈관 수가 감소한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 11-3, 6, arrows).

위와 같은 MMP-12 양성반응 세포 및 혈관 수의 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여 각각 조직의 일정면적 내에서 양성반응 세포 및 혈관 수를 측정할 때, hematoma 주변부에서 ICH 대조군은 33.5±4.2 개의 세포가 관찰되었으며, 이에 비하여 홍경천투여군은 27.3±2.8 개로 ICH 대조군에 비하여 약 18.4% 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 12). 또한 대뇌피질의 layer V에서 ICH 대조군은 48.3±5.5 개의 혈관이 관찰되었으며, 이에 비하여 홍경천투여군은 29.5±3.6 개로 ICH 대조군에 비하여 약 39.0% 감소하고, P<0.05의 유의성 있는 MMP-12 양성반응 혈관 수의 감소가 관찰되었다 (Fig. 12).

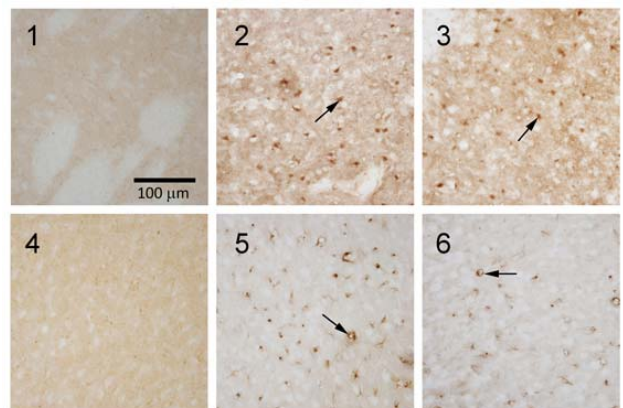


Fig. 11. Representative MMP-12 immuno-labeled sections of the rat brain with intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase (x400). MMP-12 positive cell was not observed in peri-hematoma (1) and the cerebral cortex layer V (4) of Sham group. In ICH control group, peri-hematoma showed strong positive MMP-12 immuno-labeled cells (2, arrow) and the cerebral cortex layer V showed strong positive MMP-12 immuno-labeled vessels (5, arrow). In ICH+RR group, MMP-12 immuno-positive density was not different from ICH control group, but MMP-12 positive cells or vessels were decreased both in peri-hematoma (3, arrow) and the cerebral cortex layer V (6, arrow) than that of ICH control group. Scale in the section 1 is applicable to all sections.

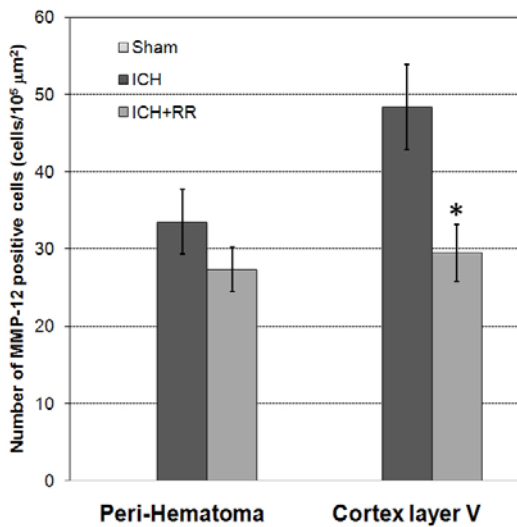


Fig. 12. Effects of *Rhodiola rosea* on MMP-12 positive cells and vessels in the rat brain with intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase. A significant decrease of MMP-12 positive vessels resulted from administration of ethanol extract of *Rhodiola rosea* (ICH+RR), compared with that of ICH control group in the cerebral cortex layer V (\*, P<0.05; n=6).

### 7. iNOS 발현의 변화

뇌조직내출혈이 유발된 대뇌반구에서 hematoma 주변부와 대뇌피질 및 외포 (external capsule)에서 iNOS 발현을 면역조직화학염색을 통하여 관찰한 결과 Sham군에서는 선조체 (Fig. 13-1)와 대뇌피질 (Fig. 13-4) 및 외포 (Fig. 13-7) 모두에서 극히 미약한 iNOS 양성반응을 관찰할 수 있었다. ICH 대조군은 hematoma 내부와 주변부에서 iNOS에 양성반응을 나타내는 세포들이 많이 관찰되었으며 (Fig. 13-2, arrow), 대뇌피질에서도 일부 신경세포에서 iNOS 양성반응을 관찰할 수 있었다 (Fig. 13-5, arrow). 특히 hematoma가 형성된 선조체와 대뇌피질 사이의 외포에서도 iNOS 양성반응을 관찰할 수 있었다 (Fig. 13-8, arrow). 이에 비하여 흥경천투여군은 hematoma 주변부와 대뇌피질 layer V 및 외포 모두에서 iNOS 양성반응의 강도는 ICH 대조군과 차이가 없었으나 양성반응의 세포수가 감소한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 13-3, 6, 9, arrows).

위와 같은 iNOS 양성반응 세포수의 변화를 정량적으로 관찰하기 위하여 각각 조직의 일정면적 내에서 양성반응 세포수를 측정할 때, hematoma 주변부에서 Sham군은 0.5±0.3 개, ICH 대조군은 40.7±5.4 개가 관찰되었으며, 이에 비하여 흥경천투여군은 36.3±3.5 개로 ICH 대조군에 비하여 약 10.7% 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 14). 또한 대뇌피질의 layer V에서 Sham군은 1.3±0.9 개, ICH 대조군은 32.3±3.5 개가 관찰되었으며, 이에 비하여 흥경천투여군은 22.5±2.5 개로 ICH 대조군에 비하여 약 30.4% 감소하고, P<0.05의 유의성 있는 iNOS 양성반응 세포수의 감소가 관찰되었다 (Fig. 14). 특히 외포에서 Sham군은 1.2±0.8 개, ICH 대조군은 31.8±2.2 개가 관찰되었으며, 이에 비하여 흥경천투여군은 18.7±2.1 개로 ICH 대조군에 비하여 약 41.4% 감소하고, P<0.01의 유의성 있는 iNOS 양성반응 세포수의 감소가 관찰되었다 (Fig. 14).

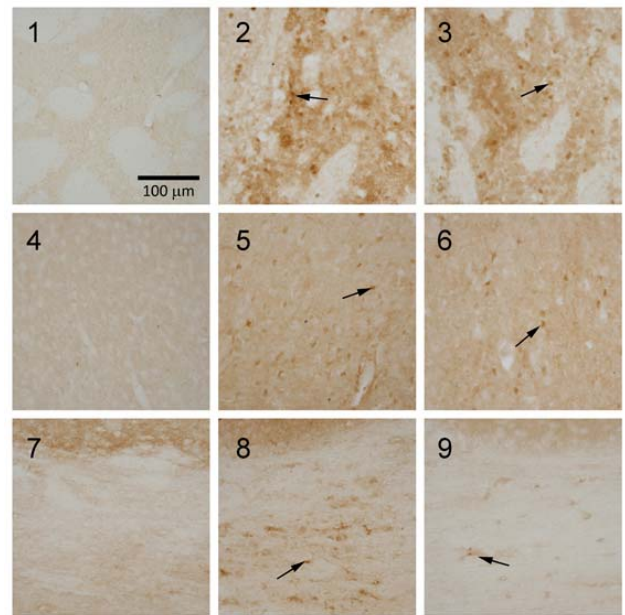


Fig. 13. Representative iNOS immuno-labeled sections of the rat brain with intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase (x400). iNOS positive cells were scarce in peri-hematoma (1), the cerebral cortex layer V (4), and external capsule (7) of Sham group. In ICH control group, peri-hematoma, the cerebral cortex layer V, and external capsule showed strong positive iNOS immuno-labeled cells (2, 5, 8, arrows). In ICH+RR group, iNOS immuno-positive density was not different from ICH control group, but iNOS positive cells were decreased in peri-hematoma (3, arrow), the cerebral cortex layer V (6, arrow), and external capsule (9, arrow) than that of ICH control group. Scale in the section 1 is applicable to all sections.

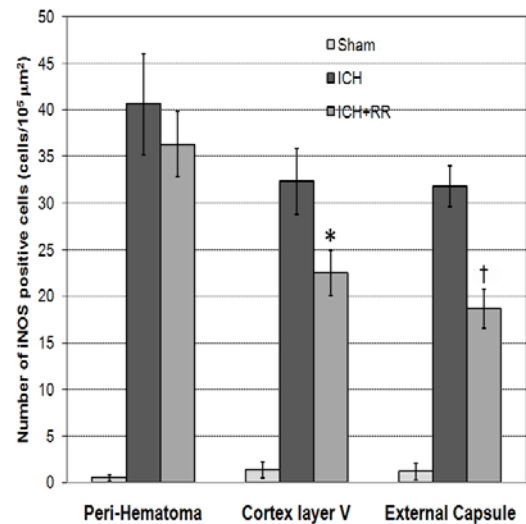


Fig. 14. Effects of *Rhodiola rosea* on iNOS positive cells in the rat brain with intracerebral hemorrhage induced by the intrastriatal injection of collagenase. A significant decrease of iNOS positive cells resulted from administration of ethanol extract of *Rhodiola rosea* (ICH+RR), compared with that of ICH control group in the cerebral cortex layer V and external capsule (\*, P<0.05; †, P<0.01; n=6).

### 고찰

흥경천은 1970년대부터 러시아의 연구자들에 의하여 각종



화학적, 생물학적 및 신체적 스트레스인자들에 대한 저항력 증강효능이 연구되었으며, 그 결과 홍경천은 고려인삼 (*Panax ginseng*)이나 가시오가피 (*Eleutherococcus senticosus*)와 같은 '어댑토젠 (adaptogen)' 의 일종으로 보고되어 있다<sup>9,22)</sup>. '어댑토젠' 이란 러시아의 과학자 Lazarev에 의하여 창안된 용어이며, Brekhman과 Dardymov가 각종 화학적, 생물학적 및 신체적 스트레스인자들에 대한 저항력 증강 같은 생명체에 비특이적 반응을 나타내고, 각종 스트레스인자에 의한 생리적 평형이상에 대하여 방향에 상관없는 생리적 평형의 회복 효과를 가지며, 정상적인 생체 기능에 대해서는 큰 영향을 발휘하지 않는 물질들을 '어댑토젠' 의 개념으로 규정하였다<sup>23)</sup>.

홍경천으로부터 분리된 생리활성물질들은 organic acids, flavonoids, cyanogenic glycosides 및 phenolic glycosides를 포함하여 12종 이상의 신물질이 보고되었다<sup>10,24,25)</sup>. 특히 어댑토젠의 효능을 나타내는 성분으로 p-tyrosol과 phenolic glycoside rhodiololide가 알려져 있으며<sup>26)</sup>, p-tyrosol은 산화적 손상의 억제효능과 5-lipoxygenase 억제효능이 있고, salidroside의 일종인 rhodiololide와 rhodiolin, rosin, rosavin, rosarin, rosiridin 등의 유효성분들이 항산화 효능<sup>14)</sup>, 항스트레스<sup>15)</sup>, 정신적 작업능력 향상<sup>16)</sup>, 운동능력 향상<sup>19)</sup>, 학습과 기억 증강<sup>18)</sup> 등의 다양한 효능들과 특히 신경세포손상 보호효능<sup>17)</sup>을 발휘하는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서는 홍경천의 뇌출혈에 의한 뇌부종과 뇌혈관관문 (blood-brain barrier, BBB) 손상에 대한 효능을 관찰하고자 하였다.

뇌조직내출혈은 BBB의 손상을 초래하여 뇌부종을 유발한다<sup>3)</sup>. BBB는 뇌조직 모세혈관의 내피세포들이 폐쇄연접 (tight junction)으로 결합되어 구성된 '물리적 장벽' 으로, BBB의 온전한 유지는 신경세포 신호전달의 미세환경을 유지하고 조절하는데 중요한 역할을 한다<sup>27)</sup>. 또한 BBB를 구성하는 모세혈관의 내피세포와 모세혈관 주위를 감싸고 있는 성상아교세포 및 신경세포들은 기능적으로 서로 밀접한 관련성을 가지며, 여러 가지 환경에서 다양하게 조절된다<sup>28)</sup>.

뇌조직의 염증은 histamine과 bradykinin의 분비와 cytokine들의 발현을 통하여 BBB의 폐쇄연접을 느슨하게 하고 투과성을 증가시켜 뇌부종을 유발한다<sup>29)</sup>. 또한 뇌경색, 뇌허혈, 외상, 다발성 경화증, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, 간질, 뇌종양, 뇌출혈 등 다양한 중추신경계 질환의 경우에서 BBB의 투과성 증가와 손상이 일어나고, 이차적으로 뇌부종이 유발된다<sup>30)</sup>. 특히 뇌경색의 경우에는 성상아교세포에서 분비되는 transforming growth factor- $\beta$ 는 뇌조직 모세혈관 내피세포에서 섬유소분해효소인 tPA (tissue plasminogen activator)와 thrombomodulin의 발현을 감소시켜 BBB를 손상시키며, 혈관의 기저막과 주위 기질의 단백질 분해를 촉진하여 투과성을 증가시킨다고 하였다<sup>31,32)</sup>. 이러한 BBB의 손상과 투과성의 증가에 의한 뇌부종을 혈관성 뇌부종 (vasogenic edema)이라 하고, BBB의 손상과 관계없이 세포막에서 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>의 투과성 증가, 에너지 고갈에 따른 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ion-pump의 장애, 삼투성 용해질의 지속적인 유입 등의 기전에 의하여 세포 내부에 다량의 수분이 유입되어 일어나는 부종은 세포독성 뇌부종 (cytotoxic edema)으로 분류한다<sup>30,33)</sup>.

뇌조직내출혈을 유발하기 위하여 흰쥐의 뇌 선조체 (striatum)에 bacterial collagenase type VII를 주입하여 뇌조직내출혈과 이에 따른 뇌부종을 유발하고, 3일간 홍경천 에탄올추출물을 경구투여한 다음 뇌부종 정도를 측정본 실험의 결과, 홍경천투여군은 대조군에 비하여 유의성 있는 뇌부종 비율의 감소를 나타내었으며, 뇌조직내출혈이 유발된 대뇌반구의 수분함량 증가를 유의하게 억제하였다. 또한 Evans blue를 혈관으로 주입하여 뇌혈관관문의 누출을 관찰한 결과, hematoma 주변부에서 뇌혈관관문 손상에 의하여 심한 Evans blue 누출을 관찰할 수 있었으며, 대뇌피질에서도 혈관주위에 Evans blue가 누출된 것을 관찰할 수 있었다. 이에 비하여 홍경천투여군은 hematoma 주변부에서는 Evans blue 누출이 대조군과 큰 차이가 없었으나, 대뇌피질에서는 대조군에 비하여 감소된 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들은 조직의 파괴와 출혈이 심한 hematoma 주변부에서는 유의하지 못하나 전체적으로는 홍경천이 뇌조직내출혈로 인하여 BBB가 손상되어 유발되는 혈관성 뇌부종을 억제하는 효능이 있음을 보여주는 결과이다.

또한 뇌조직내출혈의 유발 방법에서 hematoma가 선조체 내에 생성되도록 collagenase를 주입하였으므로, 혈관성 부종이 유발되는 선조체의 hematoma 주변부와 세포독성 부종이 일어나는 대뇌피질에서 각각 신경세포의 크기를 관찰하였다. 그 결과, hematoma 주변부의 신경세포는 Sham군에 비하여 약 16.5%의 부종이 일어났으며, 대뇌피질의 layer V 신경세포에서는 약 23.8%의 세포부종이 일어나는 것이 관찰되었다. 이에 비하여 홍경천투여군은 조직학적 관찰에서 hematoma 주변부와 대뇌피질 layer V 모두에서 신경세포의 부종을 감소시킨 것을 관찰할 수 있었으며, 신경세포의 크기를 측정본 정량적 관찰에서도 유의한 신경세포 크기의 감소가 인정되었다. 이러한 결과는 홍경천이 BBB 손상에 의한 혈관성 부종과 세포독성의 신경세포 부종 모두를 유의하게 억제하는 효능이 있음을 추정하게 하는 것이다.

MMPs는 serine proteases와 함께 뇌조직 모세혈관과 신경세포 주위의 세포외기질 (extracellular matrix)을 구성하고 있는 type IV collagen과 laminin, fibronectin 같은 분자들을 분해하여 BBB를 파괴하고, 뇌부종과 조직출혈을 일으키는 데 관여하는 주요인자이다<sup>34,35)</sup>. 한편으로 MMPs는 중추신경계의 발생기에는 신경세포의 이동, 신경돌기의 성장 등의 과정에 필수적으로 관여하기도 한다<sup>36)</sup>. 그러나 성인의 중추신경계에서는 정상적인 상태에서는 발현되지 않고, 각종 병리적 상태에서 신경세포, 성상아교세포, 미교세포 (microglia), 혈관내피세포 등에서 발현이 증가하여 BBB를 손상시켜 뇌부종과 출혈을 유발시킨다<sup>37)</sup>. 특히 MMP-9는 뇌조직 손상 상태에서 성상아교세포와 미교세포에서 발현이 증가하여 세포외기질과 BBB를 손상시키며, 이는 immediate early genes, free radicals와 cytokine들을 활성화시키고, 활성화된 cytokine들이 다시 MMP-9 발현을 더욱 증가시켜 이차적인 혈관 손상을 유발시키고 신경세포의 사멸을 유도하므로 손상을 더욱 악화시키는 것으로 알려져 있다<sup>34,37)</sup>. MMP-12 역시 hematoma 주변의 손상된 혈관에서 발현이 증가하며, 이는 중성백혈구로부터 분비된 TNF- $\alpha$ 의 자극에 의하여 증가하는 것으로 혈관의 손상과 부종의 형성에 관여한다고 하였다<sup>38,39)</sup>.

본 실험의 결과에서 홍경천이 뇌조직내출혈로 인하여 BBB

가 손상되어 유발되는 혈관성 뇌부종을 억제하는 효능이 관찰되었으므로 나아가 홍경천이 MMP-9와 MMP-12 발현에 미치는 영향을 면역조직화학염색을 통하여 관찰하였다. 그 결과, 뇌조직내출혈로 인하여 hematoma 내부와 주변부에서 매우 강한 MMP-9 양성반응을 나타내는 세포들이 많이 관찰되었으며, 대뇌피질에서도 일부 신경세포에서 약한 MMP-9 양성반응이 관찰되었다. 이에 비하여 홍경천투여군은 hematoma 주변부와 대뇌피질 layer V 모두에서 MMP-9 양성반응의 강도는 대조군과 차이가 없었으나 양성반응 세포수가 감소하는 경향을 보였으며, MMP-9 양성반응 세포수의 변화를 정량적으로 관찰한 결과는 대뇌피질에서 유의성 있는 감소가 인정되었다. MMP-12 양성반응 혈관 수를 관찰한 결과 역시 hematoma 주변부에서는 유의하지 못하였고, 대뇌피질에서는 유의성 있는 MMP-12 양성반응의 감소가 인정되었다. 이러한 결과는 홍경천의 혈관성 부종의 억제효과가 MMP-9와 MMP-12의 과발현을 억제하는 기전에 의한 것을 추측하게 한다. 그리고 hematoma 주변부에서 유의한 효과가 나타나지 않은 것은 손상의 정도가 심한 때문인 것으로 생각된다.

뇌허혈이나 뇌출혈에서 iNOS에 의하여 생성되는 nitric oxide (NO)는 peroxynitrite와 hydroxyl radicals를 생성하여 BBB를 손상시키고 뇌부종을 유발하는데 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려진 사실이다<sup>3,28)</sup>. 또한 NO와 free radicals는 MMPs를 활성화시켜 뇌조직 손상과 신경세포 사멸을 유발한다고 하였다<sup>40)</sup>. 그러므로 홍경천이 iNOS 발현에 미치는 영향을 면역조직화학염색을 통하여 관찰하였다. 그 결과, hematoma 주변부에서는 유의하지 못하였고, 대뇌피질과 외포에서는 홍경천이 iNOS 양성반응을 유의하게 감소시켰다. 특히 홍경천이 회백질로 구성된 외포에서 iNOS 발현을 유의하게 감소시킨 결과는 회백질을 통하여 뇌부종이 확산되는 것을 억제하는 효과가 있음을 추정하게 한다.

본 연구 결과들을 종합하면, 홍경천은 뇌조직내출혈로 인하여 유발된 뇌부종 비율과 뇌조직의 수분함량을 유의하게 감소시키고, 대뇌피질에서 뇌혈관관문의 누출과 신경세포의 세포부종을 유의하게 감소시켰으므로 뇌조직의 혈관성 부종과 신경세포의 세포독성 부종을 억제하는 효능이 있는 것으로 생각된다. 또한 외포의 iNOS 과발현을 유의하게 억제하는 것으로 보아, 홍경천은 회백질을 통한 뇌부종의 확산을 방지하는 효능이 있음을 추측하게 한다. 이러한 홍경천의 효능은 hematoma 주변부와 대뇌피질에서 MMP-9와 MMP-12 및 iNOS의 과발현을 억제하여 BBB 손상을 보호하는 기전에 의한 것으로 생각된다.

## 결 론

홍경천이 뇌출혈에 미치는 효능을 관찰하기 위하여, 흰쥐의 뇌 선조체 내에 collagenase를 주사하여 뇌조직내출혈을 유발하고, 홍경천 에탄올추출물을 경구투여한 후 뇌부종과 뇌조직 수분함량, 뇌혈관관문 누출 손상, 신경세포의 세포부종에 대한 영향을 관찰하였으며, 뇌부종과 BBB 손상에 관여하는 주요인자인 MMP-9와 MMP-12 및 iNOS 발현을 면역조직화학염색으로 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 홍경천 에탄올추출물은 뇌조직내출혈로 인한 뇌부종을 유의하게 감소시켰다.
2. 홍경천 에탄올추출물은 뇌조직내출혈로 인하여 증가된 뇌조직 수분함량을 유의하게 감소시켰다.
3. 홍경천 에탄올추출물은 뇌조직내출혈로 인한 대뇌피질의 뇌혈관관문 누출을 억제하였다.
4. 홍경천 에탄올추출물은 뇌조직내출혈로 인한 hematoma 주변부와 대뇌피질의 신경세포 세포부종을 유의하게 감소시켰다.
5. 홍경천 에탄올추출물은 뇌조직내출혈로 인하여 증가된 hematoma 주변부의 MMP-9 발현을 유의하게 억제하지 못하였으나, 대뇌피질에서 증가된 MMP-9 발현은 유의하게 억제하였다.
6. 홍경천 에탄올추출물은 뇌조직내출혈로 인하여 증가된 hematoma 주변부의 MMP-12 발현을 유의하게 억제하지 못하였으나, 대뇌피질에서 증가된 MMP-12 발현은 유의하게 억제하였다.
7. 홍경천 에탄올추출물은 뇌조직내출혈로 인하여 증가된 hematoma 주변부의 iNOS 발현을 유의하게 억제하지 못하였으나, 대뇌피질과 외포에서 증가된 iNOS 발현은 유의하게 억제하였다.

이상의 결과로 보아, 홍경천은 뇌조직내출혈 상태에서 뇌부종과 신경세포의 세포독성 부종을 억제하는 효능이 있으며, 이는 MMPs와 iNOS 과발현을 억제하는 작용에 의한 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Byung-Chul Lee, Kyung-Ho Yu, Epidemiology of Stroke in Korea, J. Korean Med. Association, 2002 ; 45 : 1415-21.
2. Badjatia N, Rosand J, Intracerebral hemorrhage, Neurologist, 2005 ; 11(6) : 311-24.
3. Xi G, Keep RF, Hoff JT, Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage, Lancet Neurol, 2006 ; 5(1) : 53-63.
4. Grant JS, Elliott TR, Weaver M, Glandon GL, Raper JL, Giger JN, Social support, social problem-solving abilities, and adjustment of family caregivers of stroke survivors, Arch Phys Med Rehabil, 2006 ; 87(3) : 343-50.
5. Lo YK, Yiu CH, Hu HH, Su MS, Laeuchli SC, Frequency and characteristics of early seizures in Chinese acute stroke, Acta Neurol Scand, 1994 ; 90(2) : 83-5.

6. Jørgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Intracerebral hemorrhage versus infarction: stroke severity, risk factors, and prognosis. *Ann Neurol*. 1995 ; 38(1) : 45-50.
7. Joon Heo, Dongeuibogam, Seoul : Namsandang, 1998 : 509-19.
8. Young-Suk Kim, Pathogenesis and Pathology of Stroke. *J. Oriental Chronic Dis*. 1995 ; 1(1) : 113-40.
9. Kelly GS. *Rhodiola rosea*: a possible plant adaptogen. *Altern Med Rev*. 2001 ; 6(3) : 293-302.
10. Ming DS, Hillhouse BJ, Guns ES, Eberding A, Xie S, Vimalanathan S, Towers GH. Bioactive compounds from *Rhodiola rosea* (Crassulaceae). *Phytother Res*. 2005 ; 19(9) : 740-3.
11. Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Beijing : Press of Chemistry and Industry. 2000 : 27.
12. Editors of The State Administration of Chinese Materia Medica(中華本草). Chinese Materia Medica (中華本草). Shanghai : Shanghai Press of Science and Technology. 1999 : 763.
13. Rong-han Zhou, Resource Science of Chinese Medicinal Materials. Beijing : Press of Chinese Medicine and Technology. 1987 : 83-5.
14. Kanupriya, Prasad D, Sai Ram M, Kumar R, Sawhney RC, Sharma SK, Ilavazhagan G, Kumar D, Banerjee PK. Cytoprotective and antioxidant activity of *Rhodiola imbricata* against tert-butyl hydroperoxide induced oxidative injury in U-937 human macrophages. *Mol Cell Biochem*. 2005 ; 275(1-2) : 1-6.
15. Darbinyan V, Kteyan A, Panossian A, Gabrielian E, Wikman G, Wagner H. *Rhodiola rosea* in stress induced fatigue—a double blind cross-over study of a standardized extract SHR-5 with a repeated low-dose regimen on the mental performance of healthy physicians during night duty. *Phytomedicine*. 2000 ; 7(5) : 365-71.
16. Shevtsov VA, Zholus BI, Shervarly VI, Vol'skij VB, Korovin YP, Khristich MP, Roslyakova NA, Wikman G. A randomized trial of two different doses of a SHR-5 *Rhodiola rosea* extract versus placebo and control of capacity for mental work. *Phytomedicine*. 2003 ; 10(2-3) : 95-105.
17. Mook-Jung I, Kim H, Fan W, Tezuka Y, Kadota S, Nishijo H, Jung MW. Neuroprotective effects of constituents of the oriental crude drugs, *Rhodiola sacra*, *R. sachalinensis* and *Tokaku-joki-to*, against beta-amyloid toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Biol Pharm Bull*. 2002 ; 25(8) : 1101-4.
18. Petkov VD, Yonkov D, Mosharoff A, Kambourova T, Alova L, Petkov VV, Todorov I. Effects of alcohol aqueous extract from *Rhodiola rosea* L. roots on learning and memory. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*. 1986 ; 12(1) : 3-16.
19. Abidov M, Crendal F, Grachev S, Seifulla R, Ziegenfuss T. Effect of extracts from *Rhodiola rosea* and *Rhodiola crenulata* (Crassulaceae) roots on ATP content in mitochondria of skeletal muscles. *Bull Exp Biol Med*. 2003 ; 136(6) : 585-7.
20. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*. 1990 ; 21 : 801-7.
21. Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ. TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int*. 2008 ; 52(3) : 447-56.
22. Provalova NV, Skurikhin EG, Pershina OV, Suslov NI, Minakova MY, Dygai AM, Goldberg ED. Mechanisms underling the effects of adaptogens on erythropoiesis during paradoxical sleep deprivation. *Bull Exp Biol Med*. 2002 ; 133(5) : 428-32.
23. Brekhman II, Dardymov IV. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Ann Rev Pharmacol*. 1969 ; 9 : 419-30.
24. Ganzera M, Yayla Y, Khan IA. Analysis of the marker compounds of *Rhodiola rosea* L. (golden root) by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull*. 2001 ; 49(4) : 465-7.
25. Tolonen A, Pakonen M, Hohtola A, Jalonen J. Phenylpropanoid glycosides from *Rhodiola rosea*. *Chem Pharm Bull*. 2003 ; 51(4) : 467-70.
26. Linh PT, Kim YH, Hong SP, Jian JJ, Kang JS. Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the underground part of *Rhodiola rosea* by high performance liquid chromatography. *Arch Pharm Res*. 2000 ; 23(4) : 349-52.
27. Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res*. 2003 ; 61 : 39-78.
28. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006 ; 7(1) : 41-53.
29. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation*. 1998 ; 5(3-4) : 143-59.
30. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience*. 2004 ; 129(4) : 1021-9.
31. Tran ND, Correale J, Schrieber SS, Fisher M. Transforming growth factor- $\beta$  mediates astrocyte

- specific regulation of brain endothelial anticoagulant factors. *Stroke*, 1999 ; 30 : 1671-7.
32. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature Rev Neurosci*, 2003 ; 4 : 399-415.
33. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Pathophysiology of brain edema formation. *Neurosurg Clin N Am*, 2002 ; 13 : 371-83.
34. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998 ; 18 : 1163-72.
35. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke*, 2000 ; 31 : 3034-40.
36. Seeds NW, Siconolfi LB, Haffke SP. Neuronal extracellular proteases facilitate cell migration, axonal growth, and pathfinding. *Cell Tissue Res*, 1997 ; 290 : 367-70.
37. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*, 2002 ; 39 : 279-91.
38. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 2001 ; 2 : 502-11.
39. Power C, Henry S, Del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, Yong VW, Peeling J. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol*, 2003 ; 53 : 731-42.
40. Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, Sato Y, Hiraga N, Adachi N, Yoshino T, Nishibori M. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J*, 2007 ; 21(14) : 3904-16.