

豨薟이 腦虛血에 미치는 효과

한종현^{1*} · 나한일 · 경은호 · 조규원 · 김경수

원광대학교 한의학 전문대학원, 1: 원광대학교 한의과대학

Effects of *Siegesbeckiae Herba* on the Brain Ischemia

Jong Hyun Han^{1*}, Han Il Na, Eun Ho Kyung, Kyu Won Jo, Kyung Soo Kim

Professional Graduate School, 1: Oriental Medical College of Wonkwang University

This experimental study was designed to investigate the effects of *SIEGESBECKIAE HERBA* extract (SHE) on the change of cerebral hemodynamics [regional cerebral blood flow (rCBF) and mean arterial blood pressure(MABP)] in normal condition and cerebral ischemic rats, and to determine the mechanism of action of SHE. This study was designed to investigate whether or not SHE inhibit lactate dehydrogenase (LDH) activity in neuronal cells and cytokines production in serum of cerebral ischemic rats. The results were as follows SHE increased rCBF significantly in a dose-dependent manner, but MABP was not changed by SHE in normal rats. The SHE-induced increase in rCBF was significantly inhibited by pretreatment with indomethacin (IDN), an inhibitor of cyclooxygenase but was increased by methylene blue (MTB), an inhibitor of guanylate cyclase. SHE inhibited lactate dehydrogenase (LDH) activity significantly in neuronal cells. rCBF was increased significantly and stably by SHE(10 mg/kg, i.p.) during the period of cerebral reperfusion, which contrasted with the findings of rapid and marked increase in control group in ischemic rats. In serum by drawing from femoral arterial blood after middle cerebral arterial occlusion(MCAO) for 1 hr and reperfusion for 1 hr, the sample group was decreased IL-1 β production significantly compared to that of the control group. In serum by drawing from femoral arterial blood after MCAO 1 hr and reperfusion 1 hr, sample group decreased TNF- α production significantly compared to that of the control group. In serum by drawing from femoral arterial blood after reperfusion 1 hr, sample group increased TGF- β production significantly compared to that of the control group. In serum by drawing from femoral arterial blood after MCAO for 1 hr and reperfusion for 1 hr, IL-10 production of the sample group was similar to that of control group. These results suggested that SHE had inhibitive effect on the brain damage by inhibited LDH activity, IL-1 β and TNF- α production, but accelerated TGF- β production.

Key words : *Siegesbeckiae Herba*, regional cerebral blood flow (rCBF), mean arterial blood pressure(MABP)

서 론

豨薟은 국화과에 속한 1년생 초본인 진득찰 및 동속 근연식물의 전초로 性味는 苦·寒·無毒하고 歸經은 肝·脾·腎 3經이며, 效能은 祛風濕·強筋骨하기 때문에 인체에 風寒濕邪가 侵襲된 후에 經絡이 저체되어 氣血循行이 不暢하게 됨으로써 발생하는 四肢麻痺·筋骨不利·半身不遂·口眼喎斜·言語蹇澀·枝緩骨痛 또는 濕熱로 인한 瘡毒·風疹濕痒 등의 증상을 다스린다¹⁻³⁾.

風과 濕에 의해서 발생하는 것을 현대 의학적인 관점에서

보면 腦血管系 질환과 관련되어 발생하는 질환을 포함하고 있으며, 이러한 질환은 고령 인구의 증가와 식생활을 포함한 생활양식의 변화로 과거에 비해 발병율이 증가 추세에 있다. 腦血管 질환은 중추신경계에 영향을 미치는 치명적인 것으로 국소 뇌혈류의 장애로 인해 초래되는 신경학적 결함과 돌발적인 발병을 특징으로 한다⁴⁾. 한의학에서는 뇌혈관계 질환이라는 용어의 언급은 없으나 중풍의 전신적 증상과 유사하며 나타나는 양태는 중풍과 밀접한 관계가 있다.

중풍의 病因·病理는 內經⁵⁾ 이후 宋代까지는 주로 風寒과 虛를, 金元時代의 劉⁶⁾, 李⁷⁾, 朱⁸⁾ 등은 火·氣·濕·痰을 發病原因으로 보았다. 중풍에 대한 치료는 먼저 응급상태에서의 방법으로 捏法, 針法(三稜針), 開嚙法, 取嚏法 및 吐法이 있으며, 중풍의

* 교신저자 : 한종현, 익산시 신동동 344-2, 원광대학교 한의과대학

· E-mail : gernie@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6842

· 접수 : 2004/09/26 · 수정 : 2004/10/29 · 채택 : 2004/11/27

분류에 따른 치료법은 다양하며⁹⁾, 그 治法으로는 辛涼開竅, 清肝熄風, 辛溫開竅, 除痰熄風, 益氣回陽救逆 등의 方法으로 처방을 선정하고 약물을 선택하여 증상의 완화 및 후유증을 최소화하였다.

최근까지 보고되어진 뇌혈류 및 뇌질환에 대한 연구 동향을 살펴본 결과, 祛風導痰湯 등¹⁰⁻¹²⁾이 뇌혈관을 확장시킴으로써 뇌혈류를 증가시켰다는 보고가 있고, 뇌허혈에 관한 연구로는 牛黃清心元 등¹³⁻¹⁶⁾이 중대뇌동맥 폐색범으로 유발된 뇌허혈 병태 모델에 있어서 항허혈 및 뇌손상 억제 효과가 있다는 보고와 蘇藜의 고혈압 모델 쥐에 미치는 혈압 강하작용¹⁷⁾과 이뇨작용¹⁸⁾이 있음을 관찰할 수 있었다.

이에 저자는 蘇藜(SIEGESBECKIAE HERBA extract, SHE)의 효능을 실험적으로 규명하고자 SHE를 정상 흰쥐에 투여하여 국소 뇌혈류량(regional cerebral blood flow, rCBF) 및 평균혈압(mean arterial blood pressure, MABP)의 변동을 관찰하였고, 신경세포 사멸과정에서 생성되는 LDH 양의 억제효과, 뇌허혈시 변동되는 국소 뇌혈류량의 개선 효과를 살펴보는 동시에 항허혈 기전을 밝히고자 뇌허혈 병태 모델의 혈액 내에서 항염증 사이토카인의 생성능과 염증촉발 사이토카인의 생성능을 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

동물은 생후 2 일째의 ICR 생쥐와 체중 300 g내외의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 (주)다물사이언스 및 화인 실험 동물 센터로부터 구입하여 항온항습 장치가 부착된 사육장에서 고형 사료 (삼양주식회사, Korea)와 1차 증류수를 충분히 공급하면서 실험실 환경 (실내온도 24±2 °C, 습도 55±5 %)에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약재 및 건조분말

실험에 사용된 蘇藜는 원광대학교 부속익산한방병원에서 구입한 후 정선해서 사용하였다. 蘇藜 100 g을 3,000 ml 환저 플라스크에 증류수 1,500 ml와 함께 120 분간 가열한 다음 전탕액을 여과지로 여과한 뒤 5,000 rpm으로 30 분간 원심분리 한 후 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)에 넣어 감압 농축한 후 freeze dryer (SFDSM 06, Korea)로 동결 건조시켜 12.9 g의 분말을 얻었다.

2. 방법

1) 정상 흰쥐의 뇌혈류역학 변화 관찰

(1) 국소 뇌혈류량 변화 측정

흰쥐를 stereotactic frame (DKI, U.S.A.)에 고정시키고 정중 선을 따라 두피를 절개하여 두정골을 노출시킨 후 bregma의 4~6 mm 측방, -2~1 mm 전방에 직경 5~6 mm의 두개창 수술을 시행하였다. 이때 두개골의 두께를 최대한 얇게 남겨 경막의 출혈을 방지하도록 하였다. Laser doppler flowmeter (Transonic Instrument, U.S.A.)용 needle probe(직경 0.8 mm)를 대뇌(두정엽

피질 표면에 수직이 되도록 stereotactic micromanipulator를 사용하여 뇌연막 동맥에 조심스럽게 근접시켰다. 일정시간 동안 안정시킨 후 실험 protocol에 따라 SHE를 농도별(0.01 mg/kg~10.0 mg/kg, i.p.)로 투여한 다음 변화되는 국소 뇌혈류량을 30 분간씩 측정하였다¹⁹⁾.

(2) 평균혈압 변화 측정

흰쥐를 urethane(750 mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후 체온이 37~38 °C로 유지될 수 있도록 heat pad 위에 복외위로 고정시켰다. SHE 투여 농도(0.01 mg/kg~10.0 mg/kg, i.p.)에 따른 평균혈압(mean arterial blood pressure, MABP) 변화는 동물의 대뇌동맥에 삽입된 polyethylene tube에 연결된 pressure transducer (Grass, U.S.A.)를 통하여 MacLab과 Macintosh computer로 구성된 data acquisition system으로 30 분간씩 측정하였다¹⁹⁾.

2) 정상 흰쥐의 뇌혈류역학 변화에 미치는 기전 관찰

SHE가 rCBF 및 MABP 변화에 미친 작용기전을 알아보기 위하여 prostaglandin의 생성효소인 cyclooxygenase 억제제 indomethacin (IDN, 1 mg/kg, i.p., Sigma I7378) 그리고 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)의 생성효소인 guanylate cyclase 억제제 methylene blue (MTB, 10 µg/kg, i.p., Sigma M9140)를 전처치한 후 SHE를 농도별(0.01 mg/kg~10.0 mg/kg, i.p.)로 투여한 다음 변화되는 rCBF 및 MABP를 30 분간씩 측정하였다²⁰⁾.

3) 신경 세포내 lactate dehydrogenase(LDH) 활성도 측정

생쥐의 뇌조직을 적출한 다음 Ca²⁺과 Mg²⁺이 들어 있지 않은 Hank's balanced salt solution (GibcoBRL 14180-061)에 5 mg/ml glucose, 7 mg/ml sucrose 및 0.35 mg/ml NaHCO₃가 첨가된 배양액에 넣었다. 입체현미경하에서 뇌막을 제거하고 대뇌피질을 얻어 잘게 조각을 낸 다음 0.25 % trypsin이 함유된 상기 배양액에 넣어 37 °C에서 15 분간 처치한 후 1,000 rpm에서 5 분간 원심분리한 다음 trypsin이 들어 있는 용액을 제거하고, 분리된 세포를 Eagle's minimal essential medium (GibcoBRL 11430-030)에 2 mM glutamine과 10 % fetal bovine serum (Hyclone A1111-L) 및 10 % horse serum (Hyclone A3311-L)이 포함된 배양액 1~2 ml에 넣은 다음 구멍이 좁혀진 파이펫으로 약 10 회 분쇄하였다. Epidermal growth factor (Sigma E4127)를 10 ng/ml 농도로 첨가한 후 24 well plate (Primaria, Falcon)에 0.5 hemisphere/plate 밀도로 각 well 당 400 µl씩 도포하여 37 °C, 5 % CO₂와 100 % 습도가 유지되는 CO₂ 배양기 (VS-9108MS, Korea)에서 배양하였다. 2~4 주 후 교세포(glial cell)가 충분히 증식한 다음 약물 처리전 배양액으로 3 번 씻어주고 나서 SHE를 농도별(1, 10 및 100 µg/ml)로 처리하였다. SHE 투여 24 시간 후 96 well plate의 각 well에 배양액 25 µl를 넣고, buffer 125 µl, 0.3 mg/ml NADH 100 µl, 22.7 mM pyruvate 30 µl를 넣은 다음 곧 바로 microplate reader를 이용하여 340 nm 파장에서 LDH 양을 측정하였다²¹⁾. 약물처리 방법은 24 well plate를 이용하여 맨 첫 줄(4 well)은 약물처리하지 않은 허위군으로, 둘째 줄(4 well)은 N-methyl-D-aspartate (NMDA, 30 µM)를 처리한 대조군으로, 셋째 줄부터 다섯째 줄까지는 SHE를 처리한 실험군으로 하였다.

4) 뇌허혈 병태모델의 뇌혈류역학 변동에 미치는 개선 효과 관찰

(1) 뇌허혈 병태모델 유발

뇌허혈 병태 모델 유발은 널리 사용하는 중대뇌동맥(middle cerebral artery, MCA) 폐쇄법을 이용하였다. 병태 모델은 Longa 등의 방법²²⁾에 따라 정상 흰쥐의 총경동맥과 외경동맥을 결찰하고 내·외경동맥의 분지점으로부터 내경 동맥내로 외경동맥을 통하여 3-0 단선조 나일론 봉합사를 삽입함으로써 MCA 기저부를 폐쇄하였다. 2 시간 후 내경 동맥내에 삽입되어 있는 단선조 나일론 봉합사를 MCA 기저부로부터 제거해 줌으로써 혈액을 재관류시켰다.

(2) 뇌허혈 병태 모델의 국소 뇌혈류량 변동 측정

5)-(1)과 같이 뇌허혈 병태 모델을 유발시킨 후 실험 protocol에 따라 SHE(10 mg/kg, i.p.)를 투여하였다. 병태모델 유발 2 시간 후 혈류를 재관류시켜 변동되는 rCBF를 2)-(1)과 동일한 방법으로 4 시간 측정하였다¹⁹⁾.

5) 뇌허혈 병태 모델의 혈청내 사이토카인 생성능 측정

(1) 채혈 및 혈청분리

5)-(1)와 같이 뇌허혈 병태 모델을 유발시킨 후 실험 protocol에 따라 SHE(10.0 mg/kg, i.p.)를 투여한 다음 폐쇄 1 시간 후와 재관류 1 시간이 경과한 다음 병태 모델의 대뇌동맥에서 1.0 ml를 채혈하였다. 채혈시에는 반드시 뇌혈류역학 변동이 변화되지 않도록 하기 위하여 조심스럽게 5.0 ml 주사기를 통해 채혈하였고, 만약 채혈시 뇌혈류역학 변동에 이상이 발생되면 사이토카인 생성능 측정 혈청으로 사용하지 않았다. 채혈 후 30 분 동안 실온에 방치한 후 3,000 rpm으로 30 분 동안 원심분리시킨 후 혈청만을 취해 냉동 보관하면서 필요시마다 해동시켜 사용하였다.

(2) Interleukin (IL)-1 β 생성능 측정

뇌허혈 병태 모델의 혈청내에서 생성되는 IL-1 β 양 측정은 rIL-1 β ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 rIL-1 β Standard diluent buffer(SDB) 100 μ l를 농도별로 넣은 후, 나머지 well에는 혈청 50 μ l와 SDB 50 μ l를 넣은 다음 실온에서 3 시간 동안 방치한 뒤 washing buffer(WB)로 4 회 세척하였다. 이후 각 well에 Biotin-labeled anti-rIL-1 β 100 μ l를 넣은 후 실온에서 1 시간 동안 방치한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 각 well에 Streptavidin-Peroxidase(HRP) 100 μ l를 넣은 다음 실온에서 30 분 동안 방치한 뒤 WB로 4 회 세척한 후 stabilized chromogen(SC) 100 μ l를 넣은 다음 빛을 차단시킨 실온에서 30 분 동안 방치하였다. 이후 stop solution(SS) 100 μ l를 넣은 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다²³⁻²⁴⁾.

(3) Tumor necrosis factor (TNF)- α 생성능 측정

뇌허혈 병태 모델의 혈청내에서 생성되는 TNF- α 양 측정은 rTNF- α ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 rTNF- α SDB 50 μ l를 농도별로 넣은 다음, 나머지 well에 혈청과 control(high, low)을 각각 50 μ l씩 분주한 후 SDB 50 μ l를 넣었다. 이후 각 well에 Biotin-labeled anti-rTNF- α 50 μ l를 넣고 실온에서 90 분 동안 incubation한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해놓은 HRP를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 다시 실온에서 45 분 동안 incubation한 후 WB로 4 회 세척하였다. 그 다음

SC를 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 SS를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다²⁵⁻²⁶⁾

(4) IL-10 생성능 측정

뇌허혈 병태 모델의 혈청내에서 생성되는 IL-10 양 측정은 rIL-10 ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 SDB 100 μ l씩 분주한 후 나머지 well에 혈청과 control (high, low)을 각각 50 μ l씩 분주한 다음 SDB 50 μ l를 넣었다. 이후 각 well에 Biotin-labeled anti-rIL-10 50 μ l를 넣고 실온에서 2 시간 동안 incubation한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해놓은 HRP를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 다시 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 WB로 4 회 세척하였다. 그 다음 SC를 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 SS를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다²⁷⁻²⁸⁾.

(5) Transforming growth factor(TGF)- β 생성능 측정

뇌허혈 병태 모델의 혈청내에서 생성되는 TGF- β 양 측정은 TGF- β 1 ELISA kit를 이용하였다. 96 well plate에 SDB 200 μ l씩 분주한 후 나머지 well에 혈청과 control을 각각 200 μ l씩 넣은 다음 각 well에 Biotin-labeled anti-TGF- β 1 50 μ l를 분주한 후 실온에서 3 시간 동안 incubation한 다음 WB로 4 회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해놓은 HRP를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 다시 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 WB로 4 회 세척하였다. 그 다음 SC를 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30 분 동안 incubation한 후 SS를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다²⁹⁻³⁰⁾.

3. 통계처리

SHE의 효과에 대한 통계처리는 Student's paired and/or unpaired t-test에 의하였고, p-value는 0.05 이하인 경우에만 유의성을 인정하였다³¹⁾.

실험성적

1. SHE가 정상 흰쥐의 뇌혈류역학에 미치는 효과

SHE가 rCBF 및 MABP에 미치는 효과를 알아보기 위하여 SHE를 농도별(0.01, 0.1, 1.0 및 10.0 mg/kg, i.p.)로 투여한 다음 변화되는 뇌혈류역학을 관찰하였다(Fig. 1). SHE를 투여하지 않은 정상 흰쥐의 rCBF를 100.00 \pm 0.03 %로 환산하였을 때, SHE 0.01 mg/kg을 투여하였을 때의 rCBF는 105.67 \pm 0.05 %로, 0.1 mg/kg을 투여하였을 때의 rCBF는 108.14 \pm 0.07 %로 정상시보다 증가되었다. SHE 1.0 mg/kg과 10.0 mg/kg을 투여하였을 때의 rCBF는 각각 118.64 \pm 0.05 %와 121.26 \pm 0.06 %로 정상시보다 농도 의존적으로 유의성(P<0.05)있게 증가되었다. SHE를 투여하지 않은 정상 흰쥐의 MABP를 100.00 \pm 0.04 %로 환산하였을 때, SHE를 농도별로 투여하였을 때의 MABP는 각각 100.53 \pm 0.03 %, 100.29 \pm 0.04 %, 101.74 \pm 0.03 %, 101.88 \pm 0.02 %로 정상시에 비해 증가되는 경향이었을 뿐 별다른 변화는 나타나지 않았다.

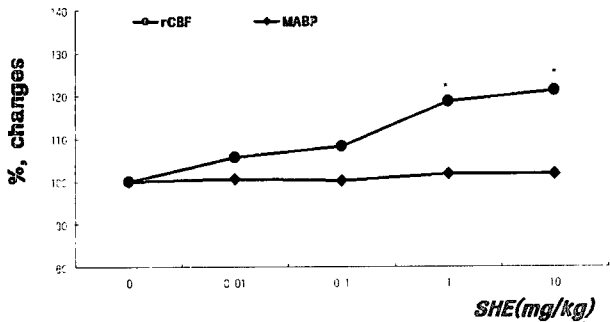


Fig. 1. Effects of SHE on the rCBF and MABP by injected dosage in normal rats. SHE : *SIEGESBECKIAE HERBA* extract, 0 : After SHE non-injected, group-measured during 30 min, 0.01, 0.1, 1, 10 : After SHE(0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg/kg, i.p.) injected, group-measured during 30 min. rCBF : regional cerebral blood flow, MABP : mean arterial blood pressure. * : Statistically significance compared with 0 group(*; P<0.05).

2. SHE 투여로 변화된 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량에 미치는 작용기전 관찰

SHE 투여로 변화된 rCBF의 작용기전을 알아보기 위하여 SHE 투여로 유의성있게 증가된 rCBF를 대조군으로, cyclooxygenase의 억제제인 IDN을 전처치한 다음 SHE 투여로 변화된 rCBF를 IDN군으로, guanylate cyclase의 억제제인 MTB를 전처치한 다음 SHE 투여로 변화된 rCBF를 MTB군으로 하였다(Fig. 2). IDN을 전처치하고 SHE를 투여하지 않았을 때의 rCBF를 100.00±0.11 %라 하였을 때, IDN 전처치한 후 SHE를 용량별 (0.01, 0.1, 1.0 및 10.0 mg/kg, i.p.)로 투여하였을 때의 rCBF는 94.46±0.16 %로 감소되는 듯 하였으나 투여농도가 증가될수록 103.94±0.13 %, 104.16±0.10 %, 113.47±0.11 %로 용량 의존적으로 증가되었으나 IDN군의 rCBF 변화는 대조군의 rCBF 변화보다 유의성(P<0.05)있게 감소되었다. MTB를 전처치하고 SHE를 투여하지 않았을 때의 rCBF를 100.00±0.13 %라 하였을 때, MTB를 전처치한 후 SHE를 용량별로 투여하였을 때의 rCBF는 각각 107.81±0.10 %, 114.94±0.11 %, 122.10±0.12 %, 130.91±0.12 %로 대조군의 rCBF 변화보다도 용량에 의존해 증가되었다.

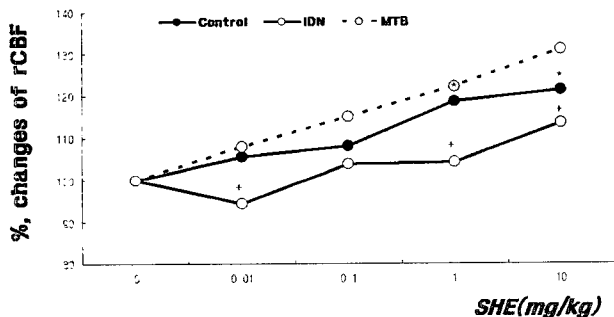


Fig. 2. Effects of pretreatment with IDN and MTB on the SHE-induced changed rCBF in normal rats. IDN : indomethacin(1 mg/kg, i.p.), MTB : methylene blue(10 µg/kg, i.p.), Control : SHE treated group 0 : After SHE non-injected, group-measured during 30 min, 0.01, 0.1, 1, 10 : After SHE(0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg/kg, i.p.) injected, group-measured during 30 min, Other legends are the same as Fig. 1. + : Statistically significance compared with Control group(+; P<0.05).

3. SHE 투여로 변화된 정상 흰쥐의 평균혈압에 미치는 작용기전 관찰

SHE 투여로 증가되는 경향을 나타낸 MABP의 작용기전을 알아보기 위하여 SHE 투여로 변화된 MABP를 대조군으로, IDN을 전처치한 다음 SHE 투여로 변화된 MABP를 IDN군으로, MTB를 전처치한 다음 SHE 투여로 변화된 MABP를 MTB군으로 하였다(Fig. 3). IDN을 전처치하고 SHE를 투여하지 않았을 때의 MABP를 100.00±0.07 %라 하였을 때, IDN 전처치한 후 SHE를 용량별로 투여하였을 때의 MABP는 각각 99.10±0.05 %, 98.13±0.06 %, 98.86±0.06 %, 100.58±0.05 %로 변화되었고, 대조군의 MABP 변화보다는 유의성(P<0.05)있게 감소되었다. MTB를 전처치하고 SHE를 투여하지 않았을 때의 MABP를 100.00±0.07 %라 하였을 때, MTB를 전처치한 후 SHE를 용량별로 투여하였을 때의 MABP는 각각 100.24±0.06 %, 99.26±0.04 %, 98.45±0.05 %, 99.63±0.05 %로 나타났고, 대조군의 MABP 변화보다는 감소되었다.

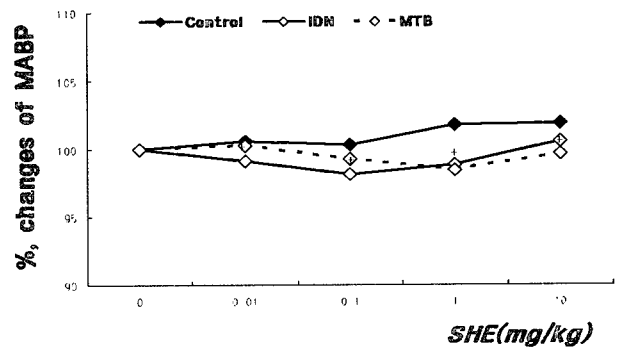


Fig. 3. Effects of pretreatment with IDN and MTB on the SHE-induced changed MABP in normal rats. Other legends are the same as Fig. 2. + : Statistically significance compared with Control group(+; P<0.05).

4. SHE가 신경 세포의 LDH 활성도에 미치는 효과

SHE가 신경 세포의 손상을 억제하는지에 대하여 알아보기 위하여 NMDA를 처리한 신경 세포에 SHE를 농도별(1, 10 및 100 µg/ml)로 투여한 결과 다음과 같았다(Fig. 4). SHE를 처리하지 않고 NMDA만을 처리한 대조군의 LDH 활성도를 100.00±0.04 %라 하였을 때, NMDA와 SHE를 처리하지 않은 허위군의 LDH 활성도는 72.66±0.02 %이었다. NMDA와 SHE를 처리한 실험군중 SHE 1 µg/ml과 10 µg/ml를 처리한 실험군의 LDH 활성도는 95.50±0.02 %와 90.47±0.03 %로 대조군에 비해 감소되었고, SHE 100 µg/ml를 처리한 실험군의 LDH 활성도도 76.08±0.06 %로 대조군에 비해 유의성(P<0.01)있게 감소되었다.

5. SHE가 뇌허혈 병태 모델의 국소뇌혈량 변동에 미치는 개선 효과

뇌허혈 병태 모델의 rCBF 변동에 미치는 SHE의 개선효과를 관찰하기 위하여 MCA폐쇄법으로 뇌허혈 병태 모델을 유발시킨 다음 SHE(10 mg/kg, i.p.)를 투여하여 뇌허혈-재관류 후에 변동되는 rCBF를 관찰하였다(Fig. 5). 정상 흰쥐의 rCBF를 100.00±0.07

%라 하였을 때, 뇌허혈 상태 대조군의 rCBF 변동은 뇌허혈 2 시간 동안 각각 39.83±0.15 %, 34.58±0.26 %, 43.52±0.09 %, 44.27±0.13 %로 차단되었다. 그러나 대조군의 rCBF 변동은 재관류 후 2 시간 동안 기저치보다 각각 143.65±0.06 %, 146.82±0.12 %, 143.95±0.21 %, 132.84±0.09 %로 불안정한 증가상태를 나타내었고, 이후 재관류 시간이 경과될수록 각각 129.03±0.15 %, 128.63±0.25 %, 126.99±0.09 %, 126.69±0.10 %로 감소되는 경향을 보였으나 기저치보다는 불안정한 증가상태를 나타내었다. 정상 환위의 rCBF를 100.00±0.12 %라 하였을 때, SHE를 투여한 뇌허혈 상태 실험군의 rCBF 변동은 뇌허혈 2 시간 동안 각각 33.60±0.19 %, 30.43±0.22 %, 32.95±0.19 %, 35.91±0.13 %로 차단되었고, 재관류 후에는 기저치보다 각각 113.02±0.11 %, 121.30±0.05 %, 126.18±0.06 %, 128.24±0.08 %로 불안정한 증가상태를 나타내었지만 이후 재관류 시간이 경과될수록 실험군의 rCBF는 121.08±0.11 %, 120.45±0.13 %, 120.31±0.13 %, 116.07±0.12 %로 감소되는 경향을 보였다. 실험군의 rCBF 변동은 대조군의 불안정한 rCBF 변동에 비해서 유의성(P<0.05)있게 안정적으로 개선되었다.

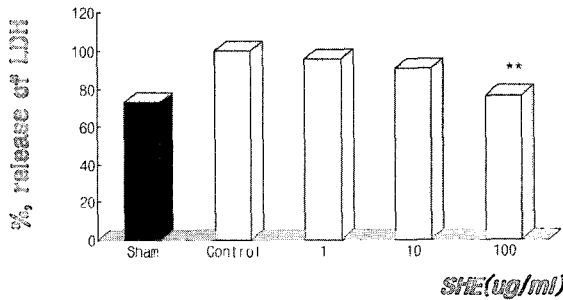


Fig. 4. Effects of SHE on the LDH activity in neuronal cells. SHE : *SIEGESBECKIAE HERBA* extract, Sham : NMDA and SHE non treated group, Control : NMDA(30 μ M) treated, but SHE non-treated group, 1, 10, 100 : SHE(1.0 μ g/ml, 10.0 μ g/ml, 100.0 μ g/ml) and NMDA treated group. * : Statistically significance compared with Control group(** : P<0.01).

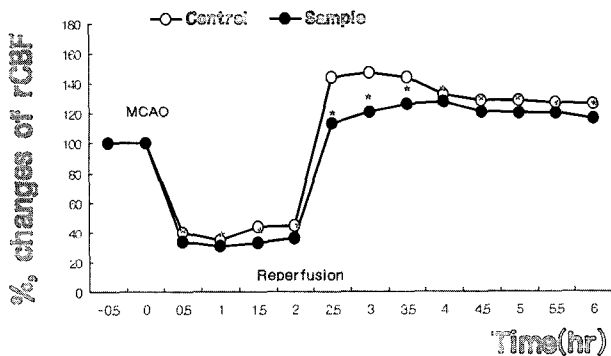


Fig. 5. Effects of SHE on the rCBF response in cerebral ischemic rats. SHE : *SIEGESBECKIAE HERBA* extract, MCAO : middle cerebral artery occlusion, Control : After caused MCAO(5 min), SHE non-treated group. Sample : After caused MCAO, SHE(10 mg/kg, i.p.) treated group. rCBF : regional cerebral blood flow.* : Statistically significance compared with Control group(* : P<0.05).

6. SHE가 뇌허혈 병태 모델의 혈청에서 생산되는 사이토카인 양에 미치는 효과

1) IL-1 β 생성능에 미치는 효과

뇌허혈 병태 모델의 혈청에서 생산되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 MCA 폐색법으로 뇌허혈을 유발시킨 후 SHE를 투여하고, 유발 1 시간 후와 재관류 1 시간이 경과된 다음 뇌허혈 병태 모델의 혈액을 취하여 IL-1 β 생성능을 측정하였다(Fig. 6). 폐색 1 시간 후 대조군의 IL-1 β 생성능을 100.00±0.02 %라 하였을 때 실험군의 IL-1 β 생성능은 87.60±0.03 %로 대조군보다 유의성(P<0.01)있게 감소되었고, 재관류 1 시간 후 대조군의 IL-1 β 생성능을 100.00±0.03 %라 하였을 때 실험군의 IL-1 β 생성능은 83.49±0.03 %로 대조군보다 유의성(P<0.01)있게 감소되었다.

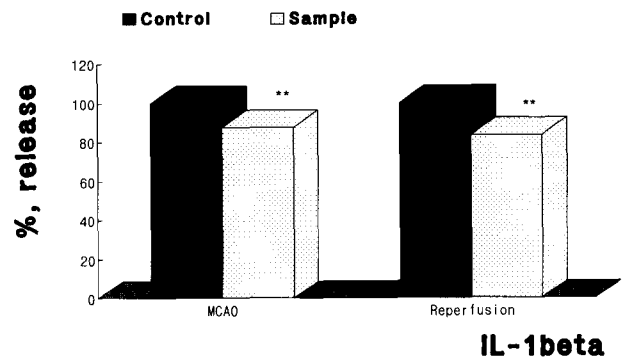


Fig. 6. Effects of SHE on the IL-1beta production in serum of cerebral ischemic rats. MCAO : cytokines production of serum by drawing from femoral arterial blood after MCAO 1 hr. Reperfusion : cytokines production of serum by drawing from femoral arterial blood after reperfusion 1 hr. Other legends are the same as Fig. 5. * : Statistically significance compared with Control group(** : P<0.01).

2) TNF- α 생성능에 미치는 효과

뇌허혈 병태 모델의 혈청에서 생산되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 MCA 폐색법으로 뇌허혈을 유발시킨 후 SHE를 투여하고, 유발 1 시간 후와 재관류 1 시간이 경과된 다음 뇌허혈 병태 모델의 혈액을 취하여 TNF- α 생성능을 측정하였다(Fig. 7). 폐색 1 시간 후 대조군의 TNF- α 생성능을 100.00±0.03 %라 하였을 때 실험군의 TNF- α 생성능은 81.73±0.05 %로 대조군보다 유의성(P<0.01)있게 감소되었고, 재관류 1 시간 후 대조군의 TNF- α 생성능을 100.00±0.02 %라 하였을 때 실험군의 TNF- α 생성능은 73.21±0.02 %로 대조군보다 유의성(P<0.001)있게 감소되었다.

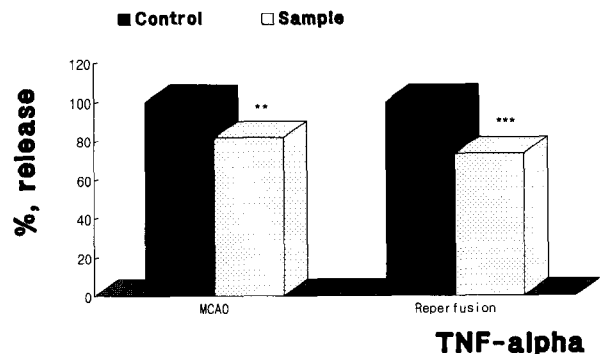


Fig. 7. Effects of SHE on the TNF- α production in serum of cerebral ischemic rats. Other legends are the same as Fig. 6. * : Statistically significance compared with Control group(** : P<0.01, *** : P<0.001).

3) TGF-β 생성능에 미치는 효과

뇌허혈 병태 모델의 혈청에서 생산되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 MCA 폐색법으로 뇌허혈을 유발시킨 후 SHE를 투여하고, 유발 1 시간 후와 재관류 1 시간이 경과된 다음 뇌허혈 병태 모델의 혈액을 취하여 TGF-β 생성능을 측정하였다(Fig. 8). 폐색 1 시간 후 대조군의 TGF-β 생성능을 100.00±0.05 %라 하였을 때 실험군의 TGF-β 생성능은 110.81±0.03 %로 대조군보다 증가되었고, 재관류 1 시간 후 대조군의 TGF-β 생성능을 100.00±0.03 %라 하였을 때 실험군의 TGF-β 생성능은 120.19±0.04 %로 대조군보다 유의성(P<0.01)있게 증가되었다.

고찰

稀薺¹⁻³⁾은 祛風濕藥으로 肌肉과 經絡 또는 筋骨間의 風濕邪氣를 祛風·散寒·除濕 및 通經絡·行痺·止痛의 效能 인체에 風·寒·濕邪가 侵襲된 후에 經絡이 저체되어 氣血循行이 不暢하게 되어 나타나는 痺證인 肌肉·筋骨間의 疼痛 혹은 酸楚麻木·重着·筋脈拘攣등의 주요 증상을 치료한다. 稀薺의 주요 성분⁵⁴⁾으로는 darutoside, darutigenol, 16,17-dihydroxy-16β-kauranoic acid, 16,17-hydroxy-16β-kauranoic 등 diterpenoids 화합물과 고미질, alkaloids, 정유 등을 함유하고 있고, 최근에는 피임 성분인 neodarutoside가 분리되었으며, 약리작용으로는 소염작용, 혈압강화작용, 혈관 확장작용, 항말라리아작용 및 피임작용 등이 있다.

본 연구에서는 뇌혈류가 감소하게 되면 허혈성 뇌손상이 나타나게 되고, 이로 말미암아 대사산물이 침착되어 뇌세포가 사멸하게 되기 때문에 중풍 치료 및 예방에 효과가 있을 것으로 기대되는 SHE의 효과를 실험적으로 규명코자 하였다. SHE를 정상 흰쥐에 투여하여 rCBF 및 MABP에 미치는 효과와 작용기전을 살펴보고, 신경세포 사멸과정에서 생성되는 LDH 양의 억제효과, 뇌허혈시 변동되는 rCBF의 개선 효과를 살펴보는 동시에 항허혈 기전을 밝히고자 뇌허혈 병태 모델의 혈액내에서 항염증 사이토카인의 생성능과 염증촉발 사이토카인의 생성능을 살펴보았다.

뇌혈류량은 뇌관류압에 비례하고 뇌혈관 저항에 반비례하는데, 뇌관류압은 생리적 상태하에서 뇌정맥압이 매우 낮아 평균 동맥압에 비례하며, 뇌혈관저항은 뇌혈관직경의 4승에 반비례하기 때문에 정상적인 뇌혈류 유지를 위해 혈압이 하강될 경우 뇌혈관은 확장되어야 하고, 혈압이 상승하게 될 경우 반대로 뇌혈관은 수축되어야 한다. 혈압은 심장의 박동과 수축력, 말초혈관, 자율신경의 활성 및 renin-angiotensin계를 포함한 각종 호르몬과 생체내 내인성 활성물질 등에 의해 조절된다^{32,33)}.

혈관확장에 관여하는 인자로는 혈류 변화와 혈관내피세포에서 유리되는 prostaglandin 및 nitric oxide(NO) 등이 있다^{20,34)}. NO 중 constitutive NO는 주위의 혈소관에 작용하여 혈소관내 세포전령 분자물질인 cGMP 양을 증가시키는 동시에 그의 생성 효소로서 혈관을 이완시키는 guanylate cyclase도 활성화시킨다³⁵⁻³⁷⁾. 또한 prostaglandin은 renin-angiotensin계에 작용하는 약물로 혈관을 이완시키는 작용과 함께 혈압을 강하시키는 작용을 한다²⁰⁾. 이러한 혈관확장에 관여하는 인자들을 억제할 수 있는 약물로는 여러 가지가 있지만 그 중에서도 MTB³⁸⁾는 cGMP의 생성 효소인 guanylate cyclase를 억제하는 약물이고, IDN³⁹⁾은 prostaglandin의 생성효소인 cyclooxygenase를 억제하는 약물이다.

SHE가 정상 흰쥐의 뇌혈류역학 변화에 미치는 효과를 알아보기 위하여 SHE를 투여한 결과 rCBF는 투여농도에 의존해 정상시보다 120 %이상 유의성있게 증가된 반면 MABP는 투여농도에 관계없이 증가되는 경향을 나타내었을 뿐 정상시와 유사하였다. 이와 같은 결과는 SHE 투여로 증가된 rCBF가 혈압의 상승보다는 뇌연막 동맥의 직경 확장으로 인한 결과라 생각된다.

SHE 투여로 변화된 뇌혈류역학의 작용기전을 밝히고자

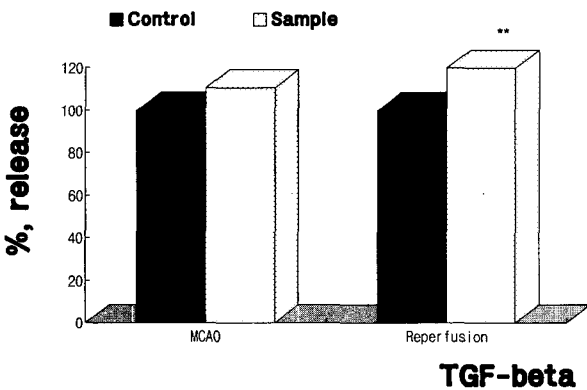


Fig. 8. Effects of SHE on the TGF-β production in serum of cerebral ischemic rats. Other legends are the same as Fig. 6. * : Statistically significance compared with Control group(** : P<0.01).

4) IL-10 생성능에 미치는 효과

뇌허혈 병태 모델의 혈청에서 생산되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 MCA 폐색법으로 뇌허혈을 유발시킨 후 SHE를 투여하고, 유발 1 시간 후와 재관류 1 시간이 경과된 다음 뇌허혈 병태 모델의 혈액을 취하여 IL-10 생성능을 측정하였다(Fig. 9). 폐색 1 시간 후 대조군의 IL-10 생성능을 100.00±0.11 %라 하였을 때 실험군의 IL-10 생성능은 102.99±0.02 %로 나타났고, 재관류 1 시간 후 대조군의 IL-10 생성능을 100.00±0.06 %라 하였을 때 실험군의 IL-10 생성능은 101.71±0.03 %로 대조군과 유사하게 나타났다.

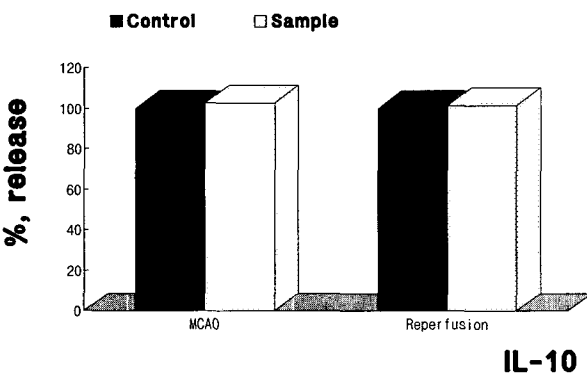


Fig. 9. Effects of SHE on the IL-10 production in serum of cerebral ischemic rats. Other legends are the same as Fig. 6.

SHE 투여로 유의성있게 증가된 rCBF를 대조군으로 한 후, cyclooxygenase의 억제제인 IDN을 전처치한 다음 SHE 투여로 변화된 rCBF는 대조군보다 유의성있게 감소되었고, guanylate cyclase의 억제제인 MTB를 전처치한 다음 SHE 투여로 변화된 rCBF는 대조군보다 오히려 더욱 증가되었다. 이와 같은 결과는 Bakalova 등^{40,41)}이 IDN 처치로 rCBF가 감소되는 것은 cyclooxygenase와 관련이 있다는 보고와 같은 결과로 SHE 투여로 나타난 국소뇌혈류량의 작용기전은 cyclooxygenase와 관련이 있는 것으로 생각된다.

SHE 투여로 증가경향을 나타내었을 뿐 정상시에 비해 별다른 변화를 보이지 않은 MABP의 작용기전을 알아보고자 SHE 투여로 나타난 MABP의 변화를 대조군으로 한 후, IDN을 전처치한 다음 SHE를 투여한 MABP 변화는 대조군보다 유의성있게 감소되었고, MTB를 전처치한 다음 SHE를 투여한 MABP 변화도 대조군보다 감소되었다. 이는 SHE 투여로 증가된 rCBF의 작용기전과 같은 것으로 SHE의 작용기전은 cyclooxygenase와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다. 뇌허혈에 의해 ATP가 저하되면 ATP 의존성 Na⁺-K⁺ 수송계 억제, 세포내 Na⁺ 축적, Na⁺-Ca²⁺ antiport의 역전 및 내형질 세망으로부터 세포질로의 칼슘 유리, 특히 NMDA 수용체를 통한 칼슘유입이 나타남으로써 허혈성 세포손상이 나타난다^{42,43)}. 이에 뇌혈류를 유의성있게 변화시킨 SHE가 뇌세포의 사멸시 분비되는 LDH의 양을 억제시킬 수 있는지 알아보기 위하여 NMDA로 뇌세포 사멸을 유도한 후 SHE를 처리한 결과, 고농도 투여시 유의성있게 LDH 활성도를 억제시켰다. 이는 뇌혈류 감소로 인해 뇌조직 혹은 뇌세포가 괴사되는 과정에 SHE를 고농도로 투여하게 되면 뇌혈류 변화를 통한 뇌세포의 사멸을 억제할 수 있음을 보여주는 결과라 생각된다. 최근 보고에 의하면 허혈성 뇌손상은 허혈 당시보다는 허혈이 일어난 조직으로 산소가 재공급될 때 주로 일어난다⁴⁴⁾하여 일과성 뇌허혈을 유발시킨 후 SHE를 투여한 결과 재관류 후 불안정한 증가상태를 보였던 대조군의 rCBF보다 유의성있게 안정적으로 개선되었다. 이로 미루어 볼 때 정상 흰쥐에서 뇌혈류역학에 유의성 있게 변화를 나타낸 SHE는 뇌허혈시에도 유의한 뇌혈류역학 변동을 개선시킴으로써 허혈로 인한 뇌손상을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

뇌허혈이 일어나면 혈액중의 다형 백혈구가 혈관 내벽에 부착하여 뇌조직 내로 침윤을 하게 됨으로써 염증반응에 의한 허혈성 뇌조직 손상은 더욱 진행하게 되고^{45,46)}, 또한 허혈성 뇌손상 시에는 세포성장, 세포활성, 염증 등과 같은 중요한 생물학적 작용을 조절하기 위해 각종의 사이토카인들이 작용한다^{47,48)}. 염증에 관여하는 사이토카인에는 IL-1β와 TNF-α 등이 있는데, 이 중 IL-1β는 내독소, 물리적 손상이나 염증반응에 의해 유발되고, 뇌로 이동될 경우 열을 유발시키며, TNF-α는 종양의 출혈성 괴사 및 염증반응에 관여하고, IL-1β와 TNF-α는 염증의 급성기에 서로 작용하여 상승작용을 나타낸다^{49,50)}. 염증촉발 사이토카인을 억제하는 기전으로는 항염증 사이토카인인 IL-10과 TGF-β 등이 있는데, 이 중 IL-10은 IL-1β와 TNF-α를 생성하는 대식세포의 생성을 억제하고, TGF-β는 혈소판 및 내피세포 등에서 생산되는

것으로 대식세포에서 생성되는 NO의 양 등을 불활성화시킨다^{48,49)}. 또한 Daddi 등은 IL-10과 TGF-β가 뇌허혈시 재관류로 인해 나타나는 뇌손상을 감소시킨다고 보고하였다⁵⁰⁾.

뇌허혈시 염증반응이 나타나고, 염증반응으로 인해 더욱 더 심한 뇌손상이 나타난다하여 허혈로 인해 야기되는 뇌손상 억제 효과를 나타낸 SHE가 염증촉발 사이토카인의 생성능과 항염증 사이토카인의 생성능에 미치는 효과를 관찰하였다. MCA 폐색 1 시간 후 실험군의 TGF-β의 생성능은 대조군보다 증가되었으나 IL-1β 및 TNF-α의 생성능은 대조군에 비해 유의성있게 감소되었으며, IL-10의 생성능은 대조군과 유사하게 나타났다. 이와 같은 결과는 SHE가 뇌허혈 초기에 항염증 사이토카인인 TGF-β의 생성능을 촉진시켜 염증촉발 사이토카인의 생성능을 억제시킨 것으로 생각된다. 재관류 1 시간 후 TGF-β의 생성능도 대조군보다 유의성있게 증가되었으나 IL-1β 및 TNF-α의 생성능은 대조군에 비해 유의성있게 감소되었으며, IL-10의 생성능은 대조군과 유사하게 나타났다. 이와 같은 결과는 뇌허혈 초기와 같은 결과로 SHE가 뇌허혈 기간동안 항염증 사이토카인의 생성능을 촉진시켜 염증촉발 사이토카인의 생성능을 억제시킨 것으로 생각된다. 이상의 결과, 뇌허혈시 IL-1β와 TNF-α가 상승된다는 보고^{51,52)}에서 볼 수 있듯이 SHE는 염증촉발 사이토카인의 생성을 억제함으로써 허혈시 나타나는 염증반응을 억제하였고, 뇌허혈 후 prostaglandin E2와 관련하여 TGF-β가 허혈-재관류시 뇌미세 혈관을 감소시킨다는 Armstead 등의 보고⁵³⁾에서 같이 SHE는 prostaglandin의 생성 효소인 cyclooxygenase에 작용하여 TGF-β의 생성능을 촉진시킴으로써 뇌허혈 병태모델의 뇌혈류 변동 개선 효과와 함께 LDH 활성도를 감소시켜 뇌손상을 억제시키는 것으로 생각된다.

결론

繻蕨의 뇌허혈에 미치는 효능을 알아보기 위하여 정상 및 뇌허혈 병태모델 흰쥐에서 국소 뇌혈류량 및 평균혈압에 미치는 효과 및 작용기전, LDH 양의 억제효과, 뇌허혈 병태 모델의 rCBF 변동에 미치는 개선 효과 그리고 혈액내 사이토카인 생성능을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 정상 흰쥐에 繻蕨을 투여한 결과, 국소 뇌혈류량은 유의하게 증가되었으나 평균혈압은 변화를 관찰할 수 없었다. 정상 흰쥐에 indomethacin을 전처치한 후 繻蕨을 투여한 결과, 국소 뇌혈류량과 평균혈압은 대조군에 비해 유의하게 감소되었다. 정상 흰쥐에 methylene blue를 전처치한 후 繻蕨을 투여한 결과, 국소 뇌혈류량은 대조군에 비해 오히려 증가되었으나 평균혈압은 오히려 감소되었다. 신경세포에 繻蕨을 투여한 결과, LDH 활성도는 고농도에서 유의하게 억제되었다. 뇌허혈 병태 모델에 繻蕨을 투여한 결과, 실험군의 국소 뇌혈류량의 변동은 재관류시 대조군의 변동보다 유의하게 개선되었다. 뇌허혈 병태 모델에 繻蕨을 투여한 결과, MCA 폐색 1 시간 후와 재관류 1 시간 후에서 실험군의 IL-1β와 TNF-α 생성능은 대조군에 비해 유의하게 감소되었다. 뇌허혈 병태 모델에 繻蕨을 투여한 결과, 재관류 1 시간 후에서 실험군의 TGF-β 생

성능은 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다. 뇌허혈 병태 모델에 稀莖을 투여한 결과, 실험군의 IL-10 생성능은 대조군과 유사하게 나타났다. 이상의 결과, 稀莖은 cyclooxygenase와 관련하여 뇌혈류역학의 변동을 개선시킴으로써 허혈로 인한 뇌손상을 억제하는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 뇌질환 한방연구센터의 연구개발과제(03-PJ9-PG6-SO02-0001)에 의하여 이루어짐.

참고문헌

1. 신민교 : 原色 臨床本草學, 서울, 남산당, pp. 671~672, 1986.
2. 김호철 : 한약 약리학, 서울, 집문당, pp. 195~197, 2001.
3. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編 : 本草學, 서울, 영림사, pp. 276~279, 1999.
4. 나영설 · 윤상협 · 민병일 : 최근 뇌졸중에 대한 역학적 고찰, 서울, 경희의학, 7 : 280~6, 1991.
5. 楊維傑 : 黃帝內經(靈樞 · 素問), 서울, 성보사, pp. 42~61, 320~327, 1980.
6. 劉完素 : 劉河間傷寒三六書, 서울, 성보사, p. 38, 157~159, 1976.
7. 李 杲 : 東垣十種醫書, 서울, 대성문화사, pp. 635~637, 1983.
8. 朱震亨 : 丹溪心法附餘, pp. 67~70, 서울, 대성문화사, 1982.
9. 김세길 : 風의 병리적 의미규명과 中風의 原因 및 治療에 대한 동서의학적 비교, 大韓韓醫學會誌 16(1) : 96~117, 1995.
10. 宋政錫, 鄭鉉雨 : 祛風導痰湯이 白鼠의 腦血流變化에 미치는 機轉研究, 東醫生理病理學會誌 16(1) : 99~103, 2002.
11. 金天中, 趙秀仁, 鄭鉉雨 : 清暈化痰湯이 局所腦血流量에 미치는 實驗的 研究, 東醫生理病理學會誌 16(2) : 316~321, 2002.
12. 鄭鉉雨, 金義成 : 四君子湯, 二陳湯, 六君子湯이 腦血流力學變動에 미치는 實驗的 研究, 東醫生理病理學會誌 18(1) : 75~83, 2004.
13. 조규선, 정승현, 신길조, 이원철 : 牛黃清心元이 중대뇌동맥 결찰로 유발된 뇌허혈에 미치는 영향, 대한한의학회지 22(1) : 78~89, 2001.
14. 김선영, 이원철 : 흰쥐의 중대뇌동맥 결찰로 유발된 腦虛血에서 星香正氣散과 藿香正氣散이 神經細胞에 미치는 효과, 大韓韓醫學會誌 22(4) : 142~150, 2001.
15. 임광모, 정현우 : 滋陰健脾湯加枳殼 · 天麻가 腦細胞 및 腦血流力學變動에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 17(1) : 64~70, 2003.
16. 梁起豪, 鄭鉉雨 : 天麻半夏湯이 腦血流力學에 미치는 影響, 東醫生理病理學會誌 18(1) : 94~199, 2004.
17. 김제훈, 장일무, 유재천, 이종훈, 김중수 : 희침 성분중 디터핀 물질이 오카모토 고혈압 모델 쥐에 미치는 혈압 강하작용, 생약학회지 11(2) : 61~65, 1980.
18. 김일용 : 희침 에탄올엑기스의 이뇨작용에 관한 연구, 한국약제학회 10(3) : 5~13, 1980.
19. Chen, S.T., Hsu, C.Y., Hogan, E.L., Maricque, H., Balentine, J.D. : A model of focal ischemic stroke in the rat ; reproducible extension cortical infarction, Stroke, 17 : 738~743, 1986.
20. 김경환 : 이우주의 약리학 강의(제4판), 서울, 의학문화사, pp. 82, 120~124, 146, 355, 397, 404, 432~442, 1998.
21. Choi, D.W. : Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system, J. Neuron, 1 : 623~634, 1988.
22. Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R. : Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, Stroke 20(1) : 84~91, 1989.
23. Trembaly, L.F., Valenza, S.P. and Ribelro, J.Li. : Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model, J. Clin. Invest 99(5) : 944~952, 1999.
24. Wang, C.X., Olschowka, J.A. and Wrathall, J.R. : Increase of interleukin-1beta mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat, Brain Res. 759(2) : 190~196, 1997.
25. Stepaniak, J.A., Gould, K.E, Sun, D., Swanborg, R.H. : A comparative study of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis and DA rats, J. Immunol. 155 : 2762~2769, 1995.
26. Rivera, D.L., Olistter, S.M., Liu, X., Thompson, J.H., Zhang, X.J., Pennline, K., Azuero, R., Clark, D.A., Miller, M.J. : Interleukin-10 attenuates experimental fetal growth restriction and demise, FASEB J. 12(2) : 189~197, 1998.
27. Okura, Y., Takeda, K., Honda, S., Hanawa, H., Watanabe, H., Kodama, M., Izumi, T., Aizawa, Y., Seki, S., Abo, T. : Recombinant murine interleukin-12 facilitates induction of cardiac myosin-specific type 1 helper T cells in rats, Circ Res. 82(10) : 1035~1042, 1998.
28. Lobell, A., Weissert, R., Storch, M.K., Svanholm, C., de Graaf, K.L., Lassmann, H., Andersson, R., Olsson, T., Wigzell, H. : Vaccination with DNA encoding an immunodominant myelin basic protein peptide targeted to Fc of immunoglobulin G suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis, J. Exp. Med. 187(9) : 1543~1548, 1998.
29. Kim, S.J., Romeo, D., Yoo, Y.D., Park, K. : Transforming growth factor-beta ; expression in normal and pathological conditions, Horm. Res. 42(1-2) : 5~8, 1994.
30. Kloen, P., Gebhardt, M.C., Perez-Atayde, A., Rosenberg, A.E., Springfield, D.S., Gold, L.I., Mankin, H.J. : Expression of transforming growth factor-beta(TGF-beta) isoforms in osteosarcomas ; TGF-beta3 is related to disease progression, Cancer, 80(12) : 2230~2239, 1997.

31. Snedecor, G.H. and Cochran, W.G. : *Statistical Methods*, 6th ed. Amos, Iowa State Univ, 1967.
32. 江蘇中醫學院編 : 中藥大辭典(下), 香港, pp. 2548~2549, 1977.25. 서울대학교 의과대학 내과학교실편 : 내과학, 서울, 군자출판사, pp. 146~158, 1996.
33. 金祐謙 : 인체의 생리, 서울, 서울대학교 출판부, pp. 30~47, 107~118, 1985.
34. 성호경 : 생리학(제6판), 서울, 의학문화사 p. 110, 1996.
35. Garthwaite, J., Charles, S.L. and Chess-Williams, R. : Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the Brain, *Nature* 336 : 385~388, 1988.
36. Palmer, P.M.J., Ferrige, A.G. and Moncada, S. : Nitric oxiderelease accounts for the biology activity of endothelium derived relaxing factor, *Nature* 327 : 524~526, 1990.
37. Shibuki, K. and Okada, D. : Endogenous nitric oxide release required for long term synaptic depression in the cerebellum, *Nature* 349 : 326~328, 1991.
38. Iwamoto, J., Yoshinaga, M., Yang, S.P., Krasney, E. and Krasney, J. : Methylene blue inhibits hypoxic cerebral vasodilation in awake sheep, *J. Appl Physiol.* 73(6) : 2226~2232, 1992.
39. Wang, Q., Pelligrino, D.A., Paulson, O.B. and Lassen, N.A. : Comparison of the effects of NG-nitro-L-arginine and indomethacin on the hypercapnic cerebral blood flow increase in rats, *Brain Res.* 641(2) : 257~264, 1994.
40. Bakalova, R., Matsuura, T., Kanno, I. : The cyclooxygenase inhibitors indomethacin and Rofecoxib reduced regional cerebral blood flow evoked by somatosensory stimulation in rats, *Exp. Biol. Med.* 227(7) : 465~473, 2002.
41. Okamoto, H., Ito, O., Roman, R.J., Hudetz, A.G. : Role of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 endotoxin-induced cerebral hyperemia, *Stroke* 29(6) : 1209~1218, 1998.
42. Cheung, J.Y., Bonventre, J.V., Malis, C.D., Leaf, A. : Mechanism of disease ; calcium and ischemic injury, *New Eng J. Med.* 26 : 1670~1676, 1986.
43. Weisfeldt, M.L. : Reperfusion and Reperfusion injury, *Clin Res.* 35 : 13~20, 1987.
44. McCord, J.M. : Mechanisms of disease : oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury, *New Eng J. Med.* 312 : 159~163, 1985.
45. Hallenbeck, J.M., Dutka, A.J., Tanishima, T., Kochanek, P.M., Kumaroo, K.K., Thompson, C.B., Obrenovich, T.P., Contreras, T.J. : Polymorphonuclear leukocyteaccumulation in brain region with low blood flow during the early postischemic period, *Stroke* 17 : 246~253, 1986.
46. Garcia, J.H., Liu, K.F., Yoshida, Y., Lian, J., Chen, S., del Zoppo, G.J. : Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct(Wistar rat), *Am J. Pathol.* 144 : 188~199, 1994.
47. Vila, N., Castillo, J., Davalos, A., Esteve, A., Planas, A.M., Chamorro, A. : Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke, *Stroke* 34(3) : 671~675, 2003.
48. 하대유 외 25인 : 면역학, pp. 100~105, 고문사, 서울, 1994.
49. 대한병리학회 : 병리학, pp. 87~99, 1263~1264, 고문사, 서울, 1994.
50. Daddi, N., Suda, T., D'Ovidio, F., Kanaan, S.A., Tagawa, T., Grapperhaus, K., Kozower, B.D., Ritter, J.H., Yew, N.S., Mohanakumar, T., Patterson, G.A. : Recipient intramuscular cotransfection of naked plasmid transforming growth factor beta1 and interleukin 10 ameliorates lung graft ischemia-reperfusion injury, *J. Thorac Cardiovasc Surg.* 124(2) : 259~269, 2002.
51. Hayashi, Y., Jikihara, I., Yagi, T., Fukumura, M., Ohashi, Y., Ohta, Y., Takagi, H., Maeda, M. : Immunohistochemical investigation of caspase-1 and effect of caspase-1 inhibitor in delayed neuronal death after transient cerebral ischemia, *Brain Res.* 893(1-2) : 113~120, 2001.
52. Cain, B.S., Meldrum, D.R., Dinarello, C.A., Meng, X., Joo, K.S., Banerjee, A., Harken, A.H. : Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function, *Crit Care Med.* 27(7) : 1309~1318, 1999.
53. Armstead, W.M., Mirro, R., Zuckerman, S.L., Shibata, M., Leffler, C.W. : Transforming growth factor-beta attenuates ischemia-induced alterations in cerebrovascular responses, *Am J. Physiol.* 264 : 381~385, 1993.