

## 凉膈散火湯이 腦血流 및 腦虛血 損傷에 미치는 영향

손상곤\* · 신민규\*\* · 송일병\*

### Abstract

## Effects of *Yanggyuksanhwa-Tang*(凉膈散火湯) on Cerebral Blood Flow and Ischemic Brain Damage in Rats

Son Sang-kon\* · Shin Min-gyu\*\* · Song Il-byung\*

\*Dept. of Oriental Medicine, Graduate School, Kyung-hee University Seoul, Korea

\*\*Dept. of Physiology Oriental Medicine, Kyung-hee University Seoul, Korea

This study demonstrates the effects of *Yanggyuksanhwa-Tang*, Sasang constitutional herb prescription reported its clinical effect on the stroke of the So-yang In(少陽人), on the cerebral blood flow changes induced by nitro L-arginine methyl ester (L-NAME) treatment and ischemic brain damage induced by the middle cerebral artery occlusion (MCAO) in the rats. The changes of the arterial blood pressure, cerebral blood flow, and the diameter of the pial artery were measured in rats treated with L-NAME. And the changes of the infarct size, volume, and plasma tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) levels were measured in the rats that the middle cerebral artery has been occluded by the intraluminal suture thread method. *Yanggyuksanhwa-Tang* was administered by the i.v. injection on the L-NAME treated rats, by the i.o. administration on the MCAO rats.

### The results is

1. The changes of the arterial blood pressure was not different statistically between in the L-NAME treated control group and in the *Yanggyuksanhwa-Tang* administered group.
2. Increase in the cerebral blood flow induced by L-NAME treatment was attenuated in the *Yanggyuksanhwa-Tang* administered group significantly ( $P < 0.05$ ) as compared with the L-NAME treated control group.
3. Decrease in the diameter of the pial artery induced by L-NAME treatment was attenuated about 18% in the *Yanggyuksanhwa-Tang* administered group as compared with the L-NAME treated control group.
4. Ischemic damaged infarct areas were decreased significantly ( $P < 0.05$ ) in the interaural 12mm, 10mm, and 6mm brain sections of the *Yanggyuksanhwa-Tang* administered group as compared the MCA occluded control group.
5. Total ischemic infarct volume was decreased significantly ( $P < 0.05$ ) in the *Yanggyuksanhwa-Tang* administered group as compared the MCA occluded control group.
6. Plasma TNF- $\alpha$  levels were decreased significantly ( $P < 0.01$ ) in the *Yanggyuksanhwa-Tang* administered group as compared the MCA occluded control group.

\* 경희대학교 한의과대학원 사상체질과 \*\* 경희대학교 한의과대학 생리학교실  
교신저자: 손상곤 주소)서울 노원구 상계9동 4-12 다래B/D 304호 손상곤한의원 전화)934-2727 E-mail)skson@kebi.com

## I. 서론

본 연구에서는 중풍 환자 중 소양인 환자에 다용되어지고 또한 유효하다고 임상적으로 보고되어진<sup>4)</sup> 양격산화탕을 실험약물로 선택하였다. 지금까지의 양격산화탕에 대한 연구로는 徐의 문헌연구<sup>10)</sup>와 宋 등의 임상연구<sup>8,11,13)</sup>와 崔등의 실험적 연구<sup>14,15,16,17,18)</sup>가 보고되고 있다.

허혈성 뇌졸중에 대한 치료효과를 평가하기 위해서는 뇌혈류량<sup>19)</sup>·혈압·뇌연막동맥 직경 변화에 대한 관찰과 허혈성 뇌경색의 손상면적 변화 및 허혈성 뇌손상에 관련된 tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )의 변화에 대한 관찰은 중요하다. 뇌혈류 측정에 이용한 Laser Doppler flowmeter (LDF)는 생리적 조건 하에서 혈관에 직접 침투하지 않은 상태로 실시간의 뇌혈류를 관찰할 수 있는 이점이 있다.

이러한 LDF를 이용한 뇌혈류 변화의 측정과 뇌연막동맥 직경의 변화를 관찰한 연구로는 Hudets 등<sup>20-29)</sup>이 발표한 바가 있고, 사상체질의학에서는 열다한소탕<sup>30)</sup>, 소합향원과 성향정기산<sup>31)</sup>, 청폐사간탕<sup>32)</sup>등을 사용한 연구가 있었다. 또한 직접 실험동물의 중대뇌동맥을 폐쇄하여 뇌경색을 유발하고 뇌손상 면적 및 체적의 변화를 측정한 실험은 Belayev 등<sup>33)</sup>과 많은 연구자<sup>34-37)</sup>들이 발표하였으며, 허혈성 뇌손상에 관련된 tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )의 변화에 대하여는 Lavine 등<sup>38-41)</sup>이 발표한 바 있다.

또한 생지황의 지표물질 함량분석을 실시하여 양격산화탕 엑기스 제제 내 생지황 함량에 대한 검증을 하였다.

이에 저자는 뇌졸중에 대한 치료효과가 있다고 보고된 양격산화탕의 효능을 실험적으로 검증하기 위하여 흰쥐에게 뇌허혈을 유발시키고, 뇌혈류·혈압·뇌연막동맥 직경 및 뇌허혈로 인한 뇌경색의 변화와 TNF- $\alpha$ 의 변화를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험 방법

### 1. 동물

실험동물은 대한실험동물센터에서 구입한 체중

180g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 물과 펠렛사료(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. 약물

실험 약물은 『東醫壽世保元』에 수록된 양격산화탕이며, 경희의료원에서 엑기스제제로 만든 것을 사용하였다. 양격산화탕 엑기스제제는 『東醫壽世保元』의 처방에 따라 조제를 한 후 가열교반식추출기·원심분리여과기·박막유해식감압농축기·분무건조기·유동층조립건조기를 거쳐 제작되었다.

양격산화탕 엑기스 제제를 0.9% saline에 1%, 2%, 3%로 희석하여 pore 0.45 $\mu$ m인 syringe filter(MFS Inc, Japan)를 사용하여 여과액을 얻었다.

### 양격산화탕 구성 약재

한 약 명	생 약 명	중량(g)
生地黃	Rehmanniae Radix	8
忍冬藤	Lonicerae Caulis	8
連翹	Forsythiae Fructus	8
山梔子	Gardeniae Fructus	4
薄荷	Menthae Herba	4
知母	Anemarrhenae Rhizoma	4
石膏	Gypsum Fibrosum	4
防風	Ledebourieliae Radix	4
荊芥	Schizonepetae Herba	4
총량		48

### 3. 양격산화탕 엑기스제제의 catalpol 함량 분석

#### A. 검액제조

##### 1) 생지황 검액 제조

한의학 연구원에 보관 중인 생지황을 분쇄기로 갈아서 5g을 정확히 취한 후 MeOH 약 70ml로 2시간 전탕하여 추출하고 여과하는 조작을 3회 실시하여 지황의 MeOH extract를 얻었다. 감압하에 용매를 날려보낸 후 MeOH에 녹여 500ml에 표선을 맞춘 액

을 생지황의 검액으로 하였다.

### 2) 양격산화탕 검액 제조

양격산화탕 엑기스 분말 5g을 정확히 취하여 생지황의 검액 제조 방법과 동일하게 MeOH로 추출하여 500ml에 표선을 맞춘 액을 양격산화탕 검액으로 하였다.

### 3) catalpol 표준용액 제조

catalpol 10mg을 MeOH에 녹여 25ml에 표선을 맞춘액을 catalpol 표준 용액으로 하였다.

## B. HPLC에 의한 정량 분석

검액과 표준 용액을 다음 조건에서 HPLC를 실시하여 정량하였다.

---

HPLC : Shimadzu LC-10AT  
 Detection : UV 205nm  
 Column : VP-ODS (250 x 4.6mm)  
 Eluent : gradient elution from Water to 50% Acetonitrile in 20min  
 Flow rate : 1ml/min

---

## C. 정량분석결과

위의 조건에서 HPLC로 정량한 결과 양격산화탕 엑스 중의 catalpol의 함량은 약 0.196%(196mg/100g)인 것으로 나타났다.

## 4. 방법

### A. 뇌혈류 측정<sup>21,22,25,28)</sup>

#### 1) 마취

250g-300g의 수컷 흰쥐 8 마리를 수술 전 물과 사료를 충분히 공급해준 상태에서 흡입마취기(Matrix, England)를 이용하여 70% N<sub>2</sub>O, 30% O<sub>2</sub>가 혼합된 4% isoflurane (일성신약, 에어에인, 한국) 으로 충분히 마취시킨 후 수술 중에는 1.5% isoflurane으로 마취상태를 유지시켰다. 대퇴동정맥 삽입술과 두개골절개술이 끝난 흰쥐는 urethane (Junsei Chemical, Japan) 500 mg/kg과 α-chloralose (Sigma Chemical, USA) 60 mg/kg을 각각 복강주사하여 마취상태를 유지시켰으며, 이 기간동안 isoflurane 흡입마취는 중지하였다.

### 2) 동맥혈압측정을 위한 준비

동맥으로부터 직접 혈압측정과 약물의 정맥주사를 위하여 좌측 대퇴부를 절개하고 femoral sheath를 드러내어 대퇴동맥(femoral artery)과 대퇴정맥(femoral vein) 그리고 대퇴신경(femoral nerve)을 조심스럽게 분리하였다. 혈액응고를 방지하기 위하여 heparine 100 I.U를 채워 넣은 PE-50 tube (Narume, Japan)를 각각의 동맥과 정맥에 삽입하였다.

### 3) 뇌혈류 측정을 위한 준비

우측 대뇌피질의 뇌혈류 측정을 위하여 대퇴동정맥 삽입술을 실시한 흰쥐를 뇌정위고정장치(Narishige, SR-6, Japan)에 단단히 고정시킨 후 두피를 절개하여 두개골을 드러내고 수술용 현미경(Carl Zeiss, Zeiss, Germany)하에서 bregma 후방 2mm, 외측 6mm 되는 지점에 dental drill (세신정밀, SS-79, 한국)을 이용하여 약 지름 3mm 정도의 cranial window를 만들었다. 이때 뇌경막(dura mater)과 얇은 뼈층은 손상되지 않게 조심하여 남겨두었다. 이 작업중 고속회전하는 drill의 마찰력에 의한 온도상승을 방지하기 위하여 작업부위를 0.9% saline으로 적셔 주면서 작업하였다.

### 4) 혈압과 뇌혈류의 측정

동맥혈압은 대퇴동맥에 삽입된 PE-50 tube를 transducer를 통하여 polygraph(Grass, model 7, USA)에 연결하여 측정하였으며, 뇌혈류는 두개골 절개술에 의해 만든 두개골구멍(cranial window)에 Laser Doppler flowmeter (Moor instrument, flolab, England)의 probe (2.0mm diameter)를 접촉시켜 측정하였다. 뇌혈류 측정시 눈에 보이는 큰 혈관은 피하여 측정하였다. 동맥혈압과 뇌혈류측정의 모든 정보는 신호변환기(ADInstrument, Maclab/8e, USA)를 거쳐 컴퓨터(Apple, Power PC 6200/75, USA)에 저장하였다.

### 5) Pial artery의 직경측정

Pial artery의 직경변화를 측정하기 위하여 수술용 현미경(Carl Zeiss, Zeiss, Germany)하에서 bregma 후방 2mm, 바깥쪽으로 6mm되는 지점에 dental drill을 이용하여 약 지름 3mm 정도의 구멍을 만들며 drill이 뇌경막(dura mater)에 이르러서는 special fine forcep

(Natume, Japan)으로 조심스럽게 뇌경막(dura mater)을 제거하였다. 노출된 대뇌표면은 건조되지 않게 생리 식염수로 적셔주었다. 드러난 pial artery는 video camera system을 사용하여 녹화하였고 이렇게 얻어진 pial artery의 영상은 컴퓨터(Apple, PowerMac G3, USA)로 옮긴 후 영상분석용 "NIH image" software(NIH, Ver 1.66m USA)를 사용하여 직경을 측정하였다.

### 6) 약물의 주사

동맥혈압과 뇌혈류가 안정된 후 nitro L-arginine methyl ester (L-NAME, Sigma Chemical Co., USA) 15 mg/kg을 microsyringe (ADRIICH, Hamilton microsyringe, USA)에 넣고 syringe pump (HARVARD, compac infusion pump, England)를 이용하여 5  $\mu$ l/min의 속도로 정맥주사하였다. L-NAME 정맥주사 후 20분, 50분, 80분에 각각 1%, 2%, 3%를 희석되고 filtering된 실험약물 25 $\mu$ l를 microsyringe에 넣고 5 $\mu$ l/min의 속도로 정맥주사하였다.

## B. 뇌허혈 손상 면적 및 체적의 측정<sup>33,34,36)</sup>

### 1) 뇌허혈 손상 유발

중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상 유발 방법 중 Zea-Longa 등<sup>36)</sup>의 혈관내수술삽입술 (intraluminal method)을 채택하였다. 수술의 모든 과정은 그의 방법을 따랐으나, 보다 광범위하고 일정한 뇌허혈 유발을 위해 Belayev 등<sup>33)</sup>이 사용한 poly-L-lysine 코팅법과 영구폐쇄방법을 시행하였다.

수술과정을 요약하면 다음과 같다. 체중 250~300g 사이의 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 chloral hydrate 350mg/kg을 복강 주사하여 마취한 후 수술용 현미경 (Carl Zeiss, Zeiss, Germany) 하에서 혈관을 노출시킨 후 외경동맥과 총경동맥을 잘 정리하였다. 후두동맥과 상갑상동맥을 electric coagulator (Ellman, Dento-Surg 90 FFP, USA)를 사용하여 절단하였다. 외경동맥의 원위부는 절찰하고, 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 Scissors)로 외경동맥의 혈관벽을 약간 절개 후 poly-L-lysine 용액 (SIGMA Diagnostics, P8920, 0.1% w/v in water)으로 코

팅한 수술실 (4-0 nylon suture, Ethilon, Brazil)을 18-20 mm 정도 삽입하였다. 삽입 후 내경동맥과 총경동맥을 다시 관류시키고, 외경동맥의 원위부를 절단하였다. 전정부의 피부를 봉합, 소독하고 마취에서 깨어난 후 자유롭게 움직이게 하였다.

혈관내수술실 삽입술을 시행한 19마리 중 11마리는 대조군으로 하고, 8마리는 수술 후 1시간과 4시간에 양적산화탄소 색기스체제를 경구 투여하였다. 또한 5마리는 위의 과정 중 혈관 내 수술실삽입 과정만을 제외한 수술을 시행하여 sham군으로 하였으며, 모든 실험군에서 수술과 중대뇌동맥의 폐쇄는 우측만을 시행하였다.

### 2) 뇌허혈 손상 면적 및 체적의 측정

뇌허혈 유발 24시간 후에 실험동물에 20% chloral hydrate을 복강 내에 주사하여 희생시켜 단두하였다. 즉시 뇌를 적출하고 5 $^{\circ}$ C 이하의 생리식염수에 1분간 담귀 뇌를 안정화시킨 후 rat brain matrix (ASI, USA)를 이용하여 rat brain atlas의 interaural distance에 따라 2mm 두께 6개의 뇌절편을 만들었다. 이 6개의 뇌절편을 2% TTC(Sigma, USA)용액에 넣어 37 $^{\circ}$ C의 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. 총뇌경색 체적은 뇌허혈 부위를 아래 식과 같이 적분하여 계산하였다.

$$\text{Total Infarct Volume(mm}^3\text{)} = \frac{\text{Area(mm}^2\text{ per side)}}{\text{No. of sides analyzed}} \times \text{I}2\text{mm(maximal extent of infarct)}$$

## C. 혈액내 TNF- $\alpha$ 의 관측<sup>38,39)</sup>

혈중 TNF- $\alpha$ 량의 측정에는 효소결합면역측정법 (Enzyme-

Linked Immunoabsorbent Assay, ELISA)으로 하였다. ELISA kit (R&D Systems, USA)을 사용하여 샌드위치 분석법을 이용하였다. 이 실험에 사용된 모든 재료는 kit에 포함된 것을 사용하였다. 실험과정을 요약하면 다음과 같다.

중대뇌동맥 폐쇄 24 시간 후에 각각의 실험동물 심장으로부터 약 1ml의 혈액을 채취하여 2000×g에서 1분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 실온에서 2시간 보관하여 혈장을 응고시켰다. 응고된 혈장을 2000×g에서 다시 20분간 원심분리하여 혈청을 얻고 실험에 사용되기 전까지 -80℃ 냉동실에 보관하였다. 이를 2배로 희석된 혈장 50μl로 만들고 TNF-α의 단일클론 항체 (monoclonal antibody)가 코팅된 microplate에 옮겨 혈장내의 TNF-α가 micropate에 코팅된 단일클론항체와 결합되게 한 후 wash buffer로 충분히 세척하여 반응된 TNF-α의 항원들을 제거하였다. 다시 TNF-α의 효소결합 다클론 항체 (enzyme-linked polyclonal antibody)를 첨가하여 항원항체결합체와 결합되게 한 후 wash buffer로 충분히 세척하고 기질용액을 첨가하였다. 이 효소반응으로 TNF-α와 결합된 곳은 파란색으로 되며, 이 파란색은 정지용액을 첨가하면 노란색으로 변한다. 이렇게 발색된 용액의 농도를 분광광도계로 측정하여 standard curve를 이용하여 결합된 TNF-α량을 구하였다.

### 5. 통계처리 방법

각 자료의 통계처리는 이변수 통계법인 student T-test를 시행하였다.

## III. 실험결과

### 1. 동맥혈압에 미치는 영향

Table 1. Effect of *Yanggyuksanhwa-Tang* on the arterial blood pressure change induced by L-NAME in rats (mmHg)

Time (min)	Control (n=8)	YGSH (n=8)
0	107.9±2.1	103.3±3.3
5	114.2±2.3	107.5±4.0
10	118.1±4.8	112.1±4.5
15	120.7±4.8	113.4±4.3
20	121.0±4.3	117.2±4.5
25	121.7±4.3	118.0±5.9
30	121.8±4.1	119.9±5.9
35	122.7±4.3	122.0±5.9
40	124.2±3.5	124.4±6.2
45	125.7±3.7	128.2±5.7
50	126.6±3.3	132.3±6.5
55	127.4±3.1	135.3±5.0
60	128.0±3.2	136.0±4.7
65	129.6±3.8	136.0±5.8
70	130.7±4.1	136.4±5.5
75	131.5±3.8	134.7±7.3
80	131.5±4.0	133.2±5.8
85	132.2±3.8	131.4±6.4
90	132.9±4.2	131.7±5.9
95	133.5±3.9	130.2±6.2
100	133.1±3.8	128.2±7.1

▷ Control group is rats treated with 15 mg/kg L-NAME.

▷ YGSH group is *Yanggyuksanhwa-Tang* administrated rats after L-NAME treatment.

Number of animals was 8 in each group. Data are shown as Mean ± Standard Error. Data are not different statistically between the control and YGSH group.

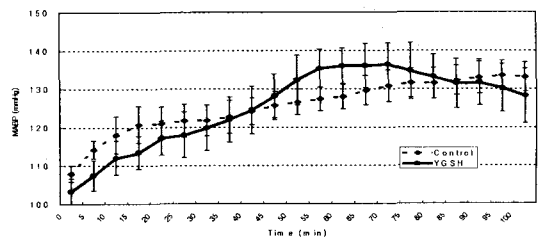


Fig. 4 Effect of *Yanggyuksanhwa-Tang* on the arterial blood pressure change induced by L-NAME in rats.

▷ Control group is rats treated with 15 mg/kg L-NAME.

▷ YGSH group is *Yanggyuksanhwa-Tang* administrated rats after L-NAME treatment.

Number of animals was 8 in each group. Data are shown as Mean  $\pm$  Standard Error. Data are not different statistically between the control and YGSH group.

## 2. 뇌혈류에 미치는 영향

Table 2. Effect of Yanggyuksanbwa-Tang on the cerebral blood flow change induced by L-NAME in rats (%)

Time (min)	Control (n=8)	YGSH (n=8)
0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0
5	95.9 $\pm$ 1.5	95.7 $\pm$ 6.2
10	92.3 $\pm$ 2.3	90.3 $\pm$ 5.3
15	88.6 $\pm$ 2.0	84.4 $\pm$ 4.9
20	84.5 $\pm$ 2.8	80.7 $\pm$ 3.7
25	80.9 $\pm$ 3.2	79.4 $\pm$ 4.3
30	77.5 $\pm$ 2.9	79.5 $\pm$ 4.4
35	75.5 $\pm$ 4.3	79.7 $\pm$ 4.7
40	74.5 $\pm$ 4.8	79.5 $\pm$ 4.8
45	74.4 $\pm$ 5.6	80.9 $\pm$ 3.9
50	74.5 $\pm$ 5.2	83.3 $\pm$ 4.7
55	74.7 $\pm$ 5.0	86.5 $\pm$ 4.3
60	75.2 $\pm$ 5.2	88.5 $\pm$ 3.4*
65	75.5 $\pm$ 5.4	89.9 $\pm$ 3.0*
70	75.9 $\pm$ 5.4	91.1 $\pm$ 3.8*
75	76.1 $\pm$ 5.6	92.3 $\pm$ 3.8*
80	76.8 $\pm$ 5.7	92.9 $\pm$ 3.1*
85	77.7 $\pm$ 6.4	93.2 $\pm$ 3.5
90	78.8 $\pm$ 6.8	93.1 $\pm$ 3.0
95	79.6 $\pm$ 7.1	94.8 $\pm$ 3.0
100	80.3 $\pm$ 7.6	93.1 $\pm$ 3.4

▷ Control group is rats treated with 15 mg/kg L-NAME.  
 ▷ YGSH group is *Yanggyuksanbwa-Tang* administrated rats after L-NAME treatment.  
 Number of animals was 8 in each group. Data are shown as Mean  $\pm$  Standard Error. (\*; P<0.05)

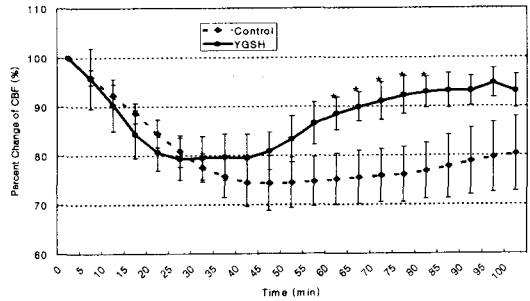


Fig. 5 Effect of *Yanggyuksanbwa-Tang* on the cerebral blood flow change induced by L-NAME in rats.

▷ Control group is rats treated with 15 mg/kg L-NAME.  
 ▷ YGSH group is *Yanggyuksanbwa-Tang* administrated rats after L-NAME treatment.  
 Number of animals was 8 in each group. Data are shown as Mean  $\pm$  Standard Error.  
 (\*; P<0.05)

## 3. Pial artery 직경에 미치는 영향

Table 3. Effect of Yanggyuksanbwa-Tang on the pial artery diameter change induced by L-NAME in rats ( $\mu$ m)

Group	No. of animals	60 min	90 min
Normal	6	71.3 $\pm$ 5.4	-
Control	8	53.6 $\pm$ 3.8	56.2 $\pm$ 4.2
YGSH	8	63.1 $\pm$ 4.7 (17.7%)	66.4 $\pm$ 5.3 (18.1%)

▷ Normal group is rats without L-NAME treatment.  
 ▷ Control group is rats treated with 15 mg/kg L-NAME.  
 ▷ YGSH group is *Yanggyuksanbwa-Tang* administrated rats after L-NAME treatment. Data are shown as Mean  $\pm$  Standard Error.

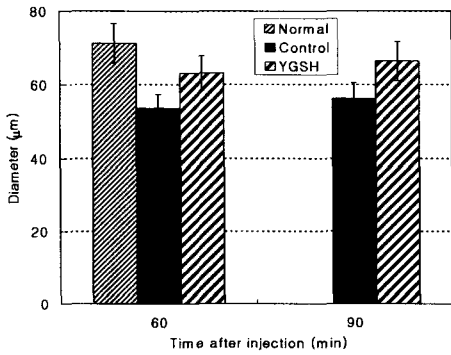


Fig. 6 Effect of *Yanggyuksanhwa-Tang* on the pial artery diameter change induced by L-NAME in rats.

- ▷ Normal group is rats without L-NAME treatment.
  - ▷ Control group is rats treated with 15 mg/kg L-NAME.
  - ▷ YGSH group is *Yanggyuksanhwa-Tang* administrated rats after L-NAME treatment.
- Data are shown as Mean ± Standard Error.

#### 4. 뇌손상 면적에 미치는 영향

Table 4. Effect of *Yanggyuksanhwa-Tang* on the infarct area induced by MCA Occlusion in rats (mm<sup>2</sup>)

Group	No. of animals	Interaural distance (mm)					
		12	10	8	6	4	2
Control	11	19.9±3.0	28.8±3.3	26.6±3.9	20.7±4.7	9.7±2.1	6.3±1.9
YGSH	8	11.9±1.6*	24.0±2.0*	22.9±4.2	10.7±3.3*	5.6±3.6	3.2±1.6

- ▷ Control group is MCA occluded rats.
  - ▷ YGSH group is *Yanggyuksanhwa-Tang* administrated rats after MCA occlusion.
- Data are shown as Mean ± Standard Error. Statistical significance of YGSH group compared to that of the control group (\*; P<0.05).

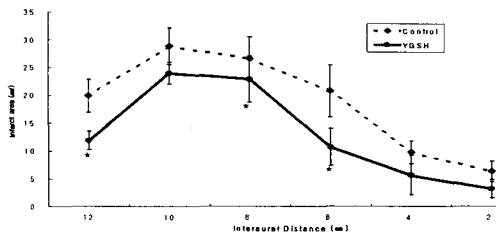


Fig. 8 Effect of *Yanggyuksanhwa-Tang* on the infarct area induced by MCA Occlusion in rats.

- ▷ Control group is MCA occluded rats.
  - ▷ YGSH group is *Yanggyuksanhwa-Tang* administrated rats after MCA occlusion.
- Data are shown as Mean ± Standard Error.

(\*; P<0.05).

#### 5. 뇌손상 체적에 미치는 영향

Table 5. Effect of *Yanggyuksanhwa-Tang* on the infarct volume induced by MCA Occlusion in rats (mm<sup>3</sup>)

Group	No. of animals	Total Infarct Volume
Control	11	244.3±21.8
YGSH	8	156.3±26.4*

- ▷ Control group is MCA occluded rats.
- ▷ YGSH group is *Yanggyuksanhwa-Tang* administrated rats after MCA occlusion.

Data are shown as Mean ± Standard Error.

(\*; P<0.05).

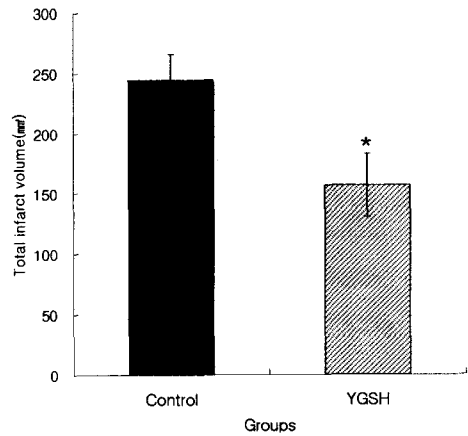


Fig. 9 Effect of *Yanggyuksanhwa-Tang* on the infarct volume induced by MCA Occlusion in rats.

- ▷ Control group is MCA occluded rats.
- ▷ YGSH group is *Yanggyuksanhwa-Tang* administrated rats after MCA occlusion.

Data are shown as Mean ± Standard Error.

(\*; P<0.05).

## 6. 혈중 TNF- $\alpha$ 量에 미치는 영향

Table 6. The effects of Yangguksanhwa-Tang on the level of serum TNF- $\alpha$  of the MCA occluded rats.

Group Name	TNF- $\alpha$ 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	11
YGSH	29.8	1.5**	8

▷ Normal group is rats without any treatment.

▷ Sham group is sham-operated rats.

▷ Control group is MCA occluded rats.

▷ YGSH group is Yangguksanhwa-Tang administrated rats after MCA occluded.

Data are shown as Mean  $\pm$  Standard Error.

(\*\*, P<0.01)

## V. 고찰

양격산화당에 대한 기존의 연구보고 중에, 비만 중에 미치는 효과에 대한 朴<sup>17)</sup>의 논문이 있고, 崔<sup>14)</sup>는 실험동물에 Alloxan을 투여하여 고혈당을 유발시킨 후 혈청 중의 glucose量, insulin含量, total cholesterol含量, triglyceride含量, 尿糖量의 변화치를 측정하여 이를 검토한 바 양격산화당은 Alloxan으로 증가된 혈당량을 유의성있게 감소시킨다는 결과를 발표하였다. 또한 李<sup>16)</sup>는 蜘蛛膜下出血에 의한 腦基底動脈에 양격산화당이 유의한 변화를 일으켰다고 발표한 바 있다. 南<sup>18)</sup>은 양격산화당이 고혈압 및 고지혈증치료와 예방에 유용하다는 실험 논문을 발표한 바 있다. 양격산화당에 대한 임상발표로는, 경희의료원 사상 의학과에 입원한(1994년 1월-1995년 12월) 중풍환자 361명과 외래(1995년 1월- 1996년 10월)에 통원 치료한 중풍환자 320명을 대상으로 사상의학적 중풍관리의 임상적연구를 실시한 결과 입원환자의 소양인 환자의 89.8%에게 양격산화당이 투여되었으며, 퇴원 시 처방에서는 소양인 환자의 57%에게 양격산화당이 투여되었고, 입원 환자의 外來1月후의 처방에서는 소양인 환자의 60%에게 양격산화당이 투여되었고, 입원 환자의 외래 마지막 처방에서는 소양인 환자의 47.5%에게 양격산화당이 투여되었음을 알 수 있고, 외래처방에서는 소양인 환자의 40.5%에게 양격산화당이 투여되었음을 알 수 있다.<sup>8)</sup> 이러한 양격

산화당의 높은 사용빈도는 소양인 뇌졸중 치료 효과에 대한 임상적 증거로 생각된다.

이러한 양격산화당을 뇌허혈이 유발되어진 흰쥐에게 투여함으로써, 뇌허혈로 수반되어진 병리현상을 측정하였다. 본 실험에서 사용된 L-NAME은 혈관 내피세포에서 분비되는 혈관이완인자로 알려져 있는 nitric oxide의 합성에 관여하는 nitric oxide synthase (NOS)의 억제제이다. Nitric oxide는 혈관의 이완과 더불어 중추신경계 내에서 신경전달물질로서 뇌세포의 대사와 뇌혈류 조절의 매개자 (mediator of cerebral metabolism-blood flow coupling)인 동시에 중추신경계의 기능적인 재구성 (neuronal plasticity)을 유도하는 인자로 알려져 있다. 이러한 nitric oxide의 합성에 관여하는 NOS를 L-NAME 또는 nitro L-arginine (L-NA) 등과 같은 NOS inhibitor를 투여하여 억제하면 뇌혈관의 cGMP를 감소시켜 연막동맥 직경을 감소시키고, 뇌혈류를 억제한다고 보고하고 있다.<sup>55,56,57)</sup>

흰쥐에 30 mg/kg의 L-NAME을 정맥주사한 경우 Sokoloff 등<sup>58)</sup>은 뇌혈류가 36%, Buchanan과 Phillis<sup>59)</sup>는 42% 감소하였다고 보고하였으며, Pelligrino 등<sup>60)</sup>은 60mg/kg 투여시 56~64% 감소한다고 하였다.

양격산화당의 효능을 관찰하기 위하여 일차적으로 완전한 뇌혈관의 폐쇄가 아니라 위와 같은 L-NAME의 작용을 이용하여 기능적으로 뇌혈류를 감소시킨 상태에 대한 양격산화당의 영향을 관찰하였다. 본 실험의 결과는 L-NAME의 투여에 의한 전신적인 혈압상승에 대하여 양격산화당은 혈압상승 억제의 효과를 나타내지 않는 것으로 관찰되었다. 그러나 뇌혈류의 변화에 대하여는 양격산화당 투여에 의하여 60분부터 80분까지 대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 뇌혈류 감소의 회복을 나타내었다. 또한 대뇌피질 표면의 연막동맥 직경은 L-NAME투여군에 비하여는 통계학적 유의성은 없었으나 직경이 약 18% 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과를 종합해보면 양격산화당은 전신적인 혈압의 변화에는 큰 영향을 미치지 않으나 대뇌피질의 연막동맥의 직경을 증가시켜 뇌혈류를 증가시키는 효능이 있는 것으로 생각된다.

위와 같이 기능적으로 감소된 뇌혈류의 증가 효능이 입증되었으므로 이차적으로 직접 중대뇌동맥의 폐쇄에 의하여 뇌경색을 유발하고 양격산화당의 효능을 관찰하였다. 흰쥐에게 실험적으로 중대뇌동



맥을 폐쇄한 경우 폐쇄 1 시간 후에 이미 12 내지 24 시간 후에 뇌경색이 나타날 손상부위의 경계를 확정할 수 있을 정도로 특히 대뇌피질의 layer III와 layer IV에서 명확한 세포의 위축이 조직학적으로 관찰되며,<sup>61,62)</sup> 선조체에서는 뇌동맥 폐쇄 1 시간 후부터 뇌세포 수의 감소가 나타나서 6 시간 후에는 거의 모든 뇌세포가 사라진다고 하였다.<sup>63,64)</sup> 그러므로 뇌경색 유발 초기에 양격산화당을 투여하고 그 효능을 관찰한 본 실험의 결과는 interaural 12, 10 및 6 mm 절편에서는 유의성 있는 뇌손상 면적의 감소를 나타내었으며, 대조군에 비하여 유의성있는 뇌손상 체적의 감소를 나타내었다. 그러므로 양격산화당은 허혈성 뇌경색을 유의하게 억제하는 작용이 있는 것으로 관찰되었다.

뇌허혈 손상에 대한 분자생물학적 관점에서 허혈성 뇌손상 조직 내의 TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) 단백질 및 mRNA 발현의 변화에 대하여 많은 연구가 진행되고 있으며, TNF- $\alpha$ 는 생체 내에서 뇌손상과 연관된 blood-brain barrier, 혈관계 등의 변화에 긴밀한 관계를 가지는 cytokine으로 염증반응 및 면역반응에 관계하는 것으로 알려져 있다.<sup>65)</sup> 뇌허혈이 유발된 후 외부에서 유입된 TNF- $\alpha$ 는 뇌손상의 진행을 악화시키며,<sup>66)</sup> anti TNF- $\alpha$  antibody나 soluble TNF- $\alpha$  receptor를 투입하여 세포 내부의 TNF- $\alpha$  기능을 감소시키면 뇌허혈에 의한 뇌손상으로부터 신경세포를 일정정도 보호한다고 하였다.<sup>67,68)</sup>

본 실험에서는 혈액 중 순환하는 mature 형태의 TNF- $\alpha$  량을 효소결합면역측정법으로 관찰한 결과, 양격산화당 투여군은 대조군에 비하여 유의하게 TNF- $\alpha$  량을 감소시켰다. 이 결과로 양격산화당이 중대뇌동맥 폐쇄로 유발된 혈중 TNF- $\alpha$ 의 증가를 유의하게 억제하였음을 알 수 있었다.

이와 같이 양격산화당이 白鼠의 뇌허혈로 인한 뇌혈류량 감소의 회복·뇌손상 면적과 체적의 축소·TNF- $\alpha$  량의 억제에 유의한 작용이 있음을 확인하였다.

## V. 결 론

소양인 중풍 환자에 임상적으로 빈용되어지는 양격산화당의 효능을 실험적으로 검증하기 위하여 L-NAME 투여에 의한 동맥혈압, 뇌혈류 및 뇌연막동

맥의 직경 변화에 미치는 영향, 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상 면적, 총체적 및 혈중 TNF- $\alpha$ 의 변화에 미치는 영향을 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 동맥혈압은 L-NAME을 투여한 대조군과 L-NAME 투여 후 양격산화당 투여군간에 유의한 차이는 없었다.
2. 뇌혈류는 양격산화당투여군이 약물투여 후 60분부터 80분까지 대조군에 비하여 감소된 뇌혈류의 유의한 ( $P<0.05$ ) 회복을 나타내었다.
3. 대뇌피질 연막동맥 직경은 양격산화당 투여군이 대조군에 비하여 약 18% 직경이 증가하는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다.
4. 뇌허혈 손상 면적은 대조군에 비하여 양격산화당 투여군에서 耳間(interaural) 12, 10 및 6 mm 절편에서 유의성 ( $P<0.05$ ) 있는 뇌손상 면적의 감소를 나타내었다.
5. 뇌허혈 손상의 총 체적은 대조군에 비하여 양격산화당 투여군에서 유의성 ( $P<0.05$ ) 있는 뇌손상 체적의 감소를 나타내었다.
6. 혈액 중 TNF- $\alpha$ 의量は 대조군에 비하여 양격산화당 투여군에서 유의하게( $p<0.01$ ) 감소하였다.

## 참 고 문 헌

1. 통계청 : 『사망원인통계연보(인구동태신고에 의한 집계)』, 1998.
2. National Stroke Association : "The Stroke/Brain Attack Reporter's Handbook," Englewood, co, 1997.
3. 한국과학재단 : 뇌기능과 뇌혈류와의 관계, p.3, 1992.
4. 최재영, 박성식 : 사상의학적 중풍치험 157례에 대한 임상적 연구, 서울, 사상의학회지, 10(2), 1998.
5. 박재인 : 최근 우리 나라 뇌졸중의 역학적 양상에 관한 연구, 경희대 박사학위논문, p.21, 1994.
6. 허 준 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.359, 1981.
7. 송일병 : 사상인병증약리의 성립과정과 그 운영 정신에 대한 고찰, 사상의학회지, 8(1), pp.1-15,

- 1996.
8. 송일병 : 사상의학적 증풍관리의 임상적 연구, 사상의학회지, 8(2), pp.117-129, 1996.
  9. 최재영, 박성식 : 사상의학적 증풍치험 157례에 대한 임상적 연구, 서울, 사상의학회지, 10(2), pp.431-453, 1998.
  10. 서용 : 소양인 新定처방의 형성과정에 대한 고찰, 사상의학회지, 9(1), pp.229-230, 1997.
  11. 박성식 : 양격산화탕 활용에 대한 임상적 연구, 사상의학회지, 10(2), p.455, 1998.
  12. 張機 : 仲景全書, 台北, 集文書局, pp. 78-79, 중화민국72년.
  13. 김권현 : 양격산화탕의 복발성 구강궤양을 치료한 경험, 사상의학회지, 8(2), p.257, 1996.
  14. 최병일 : 소양인 양격산화탕과 인동등지골피탕 및 숙지황고삼탕이 Alloxan 투여고혈당 백서에 미치는 영향, 사상의학회지, 10(2), p.513, 1998.
  15. 김경요 : 太·少陰人, 少陽人의 처방이 Gold thioglucose로 유발된 白鼠의 비만증에 미치는 효과, 사상의학회지, 8(1), p.295, 1996.
  16. 이동원 : 蜘蛛膜下出血에 의한 腦基底動脈 변화에 미치는 涼隔膈火湯의 효과, 동국대학교 박사학위논문, 1998.
  17. 박재형 : 涼隔膈火湯이 Gold thioglucose로 誘發된 白鼠의 肥滿症에 미치는 효과, 대한한의학회지, 17(2), 1996.
  18. 남창규 : 涼隔散火湯이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향, 대전대학교 석사논문, 1995.
  19. Michael Swash, M. D., John Oxbury Ph D. : CLINICAL NEUROLOGY, CHURCHILL LIVINGSTONE, LONDON AND NEW YORK, (2), p. 924. 1991.
  20. A. G. Hudetz, B. B. Biswal, H. Shen, K. K. Lauer, and J. P. Kampine : Spontaneous fluctuations in cerebral oxygen supply, Oxugen Transport to Tissue XX, edited by Hudetz and Bruley, New York, Plenum Press, pp.551-559, 1998.
  21. Pragati Ganjoo, M.B.B.S., D.A., D.N.B, Neil E.Father, M.D., Ph.D., Antal Hudetz, B.M.D., Ph.D., Jeremy J. Smith, M.B., F.F.A.R.C.S.I., Enric Samso, M.D., John P. Kampine, M.D., Ph.D., William T. Schmeling, M.D., Ph.D. : In Vivo Effects of Dexmedetomidine on Laser Doppler Flow and Pial Arteriolar Diameter, Anesthesiology. 88(2), pp.129-139, Feb 1998.
  22. Yoko Morita, Yasuo Fukuuchi, Atsuo Koto, Norihiro Suzuki, Kazuo Isozumi, Jun Gotoh, Toshiko Shimizu, Masaki Tcao and Masahiro Aoyama. : Rapid Changes in Pial Arterial Diameter and Cerebral Blood Flow Caused by Ipsilateral Carotid Artery Occlusion in Rats, Keio JmED, 46(3), pp.120-127, September 1997.
  23. Masazumi Fujii, MD; Hideaki Hara, Ph D; Wei Meng, MD; Jean Paul Vonsattel, MD; Zhihong Huang, MD; Michael A. Moskowitz, MD. : Strain-Related Differences in Susceptibility to Transient Forebrain Ischemia in SV-129 and C57Black/6Mice. Stroke. 28, pp.1805-1811, 1997.
  24. William I. Rosenblum.MD. : Selective Impairment of Response to Aceptycholine After Ischemia/Reperfusion in Mice, Stroke, 28, pp.448-452, 1997.
  25. Al C. Ngai, Joseph R. Meno, and H. Richard Winn : Simultaneous Measurements of Pial Arteriolar Diameter and Laser-Doppler Flow During Somatosensory Stimulation. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 15, pp.124-127, New York, 1995.
  26. H. Kumano, H. Furuya, H. Yomosa, T. Nagahata, T. Okuda and T. Sakaki : Response of pial vessel diameter and regional cerebral blood flow to CO<sub>2</sub> during midazolam administration in cats. Acta Anaesthesiologica Scand,18, pp.729-733, 1994.
  27. Eiharu Moricawa, MD; Michael A. Moskowitz, MD; Zhihong Huang, MD; Tazuka Yoshida, MD; Katsumi Irikura, MD; Turgay Dalkara, MD, Ph.D. : L-Arginine Infusion Promotes Nitric Oxide-Dependent Vasodilation, Increases Regional Cerebral Blood Flow, and Reduces Infarction Volume in the Rat. Stroke, 25, pp.429-435, 1994.
  28. H. Kumano, T. Shimomura, H. Furuya, H. Yomosa, T. Okuda, T. Sakaki and M. Kuro : Effects of flumazenil during administration of midazolam on pial vessel diameter and regional cerebral blood flow in cats. Acta Anaesthesiologica Scand, 17, pp.567-570. 1993.

29. Eiharu Morikawa, Sami Rosenblatt, Michael A. Moskowitz : L-Arginine dilates rat pial arterioles by nitric oxide-dependent mechanism and increases blood flow during focal cerebral ischemia. *J. Pharmacol*, 107, pp. 905-907, 1992.
30. 최용준 : 열다한소탕이 혈압, 국소뇌혈류량 및 뇌연막동맥에 미치는 영향. *사상의학회지*, 10(1), pp. 285-293, 1998.
31. 정성문 : 소음인 소합향원, 소음인 성향정기산 정맥주입이 혈압, 국소뇌혈류량 및 뇌연막동맥에 미치는 영향. *경희대학교 석사학위논문*, 2000.
32. 정국영 : 청폐사간탕 정맥주입이 혈압, 국소뇌혈류량 및 뇌연막 동맥에 미치는 영향. *경희대학교 석사학위논문*, 2000.
33. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, and Ginsberg MD.: Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat by Intraluminal Suture. *Stroke*, 27(9), pp.1616-1623, 1996.
34. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8, pp.1-8, 1986.
35. Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, and Pulsinelli W : Focal brain ischemia in the rat: Methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries : *J Cereb Blood Flow Metab*, 8, pp.474-485, 1988.
36. Zea-Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *stroke* 20, pp.84-91, 1989.
37. Coyle P : Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke*, 13(6), pp.855-859, 1982.
38. Lavine SD, Hofman FM, and Zlokovic BV : Circulating antibody against tumor necrosis factor-alpha protects rat brain from reperfusion injury, *J Cereb blood flow Metab*, 18, pp.52-58, 1998.
39. Liu T, Clark RK, McConnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, and Feuerstein GZ : Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons. *Stroke*, 25(7), pp.1481-1488, 1994.
40. Hallenbeck JM : Cytokines, macrophages, and leukocytes in brain ischemia. *Neurology*, 49:S5-S9, 1997.
41. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, and Takehara K : Elevated serum tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in patients with systemic sclerosis: Association with pulmonary fibrosis. *J Rheum*, 24(4), pp. 663-665, 1997.
42. 이제마 : 동의수세보원, 서울, 신일문화사, p.70, 1964.
43. 한국과학재단 : 뇌기능과 뇌혈류와의 관계, pp.153-154, 1992.
44. 신태양사편집국백과사전부 : 원색최신의료대백과사전, 서울, 신태양사, 5, p.34, 1991.
45. ACADEMIC PRESS : ENCYCLOPEDIA OF HUMAN BIOLOGY, 2, USA, 1997.
46. 黃帝內經 : 張·馬譯註, 台聯國風出版社, pp.291-298, 1976.
47. 孫思邈 : 備急千金要方, 北京, 人民衛生出版社影印, p.153, 1982.
48. 劉完素 : 劉河間傷寒三六書, 서울, 成輔社, pp. 38, 157-159, 1976.
49. 李東垣 : 東垣醫集, 北京, 人民衛生出版社, pp.306-307, 1993.
50. 朱丹溪 : 丹溪心法, 서울, 행림출판사, p.19, 1965.
51. 張介賓 : 景岳全書, 上海, 上海科學技術出版社, pp.188-198, 1984.
52. 叢法滋 編著 : 腦病的中醫論治, 北京, 人民衛生出版社, pp.76, 80, 81, 82, 1993.
53. 전국한의과대학사상의학교실 : 사상의학, 서울, 집문당, p.64, p.156, 1997.
54. 박석연 : 동의사상대전, 서울, 의도한국사, pp.394, 395, 1976.
55. Rosenblum WI, Nelson GH, Shimizu T : L-Arginine suffusion restores response to acetylcholine in brain arterioles with damaged endothelium. *Am J Physiol* 262:H961-H964, 1992.
56. Irikura K, Rosenblatt S, Kontos HA, Moskowitz MA : The effect of nitric oxide synthase (NOS) inhibition on pial arterial dilation produced by somatosensory

- stimulation and hypercapnia. *J Cereb Blood Flow Metab Suppl* 13:S132, 1993.
57. Alafaci C, Tomasello F, Jansen I, You J, Edvinsson L : The effect of L-NMMA, a specific inhibitor of endotheliumdependent relaxation, on vasodilatory responses in rat cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab Suppl*, 13:S172, 1993.
58. Sokoloff L, Kennedy C, Adachi K, Wang S, Takahashi S, Melzer P : Effects of inhibition of nitric oxide synthase on resting cerebral blood flow and on changes induced by hypercapnia or local functional activity. In: *Pharmacology of Cerebral Ischemia* (Kriegstein J, Oberpichler-Schwenk H, eds), Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, pp. 371-381, 1992.
59. Buchanan JE, Phillis JW : The role of nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *Brain Res* 610, pp.248-255, 1993.
60. Pelligrino DA, Koenig H, Albrecht RF : Nitric oxide synthesis and regional cerebral blood flow responses to hypercapnia and hypoxia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 13, pp.80-87, 1993.
61. Kaplan B, Brint S, Tanabe J, Macewicz M, Wang X-J, and Pulsinelli W : Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Stroke*, 22(8), pp.1032-1038, 1991.
62. Memezawa H, Smith ML, and Siesjo BK : Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 23(4), pp.552-559, 1992.
63. Bartus RT, Dean RL, Cavanaugh K, Eveleth D, Carriero D, and 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*, 15, pp.969-979, 1995.
64. Clark RK, Lee EV, Fish CJ, White RF, Price WJ, Jonak ZL, Feuerstein GZ, and Barone FC : Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: An immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull*, 31, pp.565-572, 1993.
65. Estrada, C., Gomez, C. and Martin, C. : Effects of TNF- $\alpha$  on the production of vasoactive substances by cerebral endothelial and smooth muscle cells in culture. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 15, pp.920-928, 1995.
66. Barone, F.C., Arvin, B., White, R. F. Miller, A., Webb, C. L., Willette, R. N., Lysko, P. G., and Feuerstein, G. Z. : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  ; A mediator of Focal Ischemic Brain Injury. *Stroke* 28, pp.1233-1244, 1997.
67. Lavine, S. D., Hofman, F. M., and Zlokovic : Circulating antibody against tumor necrosis factor-alpha protects rat brain from reperfusion injury. 18, pp.52-58, 1998.
68. Nawashiro H, Martin D, and Hallenbeck JM : Neuroprotective effects of TNF binding protein in focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 778(2), pp.265-271, 1997.