

원저

## 防己가 백서 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈손상에 미치는 보호효과

정혁상, 이현삼, 원 란, 강철훈, 손낙원  
경희대학교 동서의학대학원 신경과학교실

### Protective Effects of *Stephania tetrandra* against Focal Cerebral Ischemic Damage by Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats

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

Department of Neuroscience, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

**Objective :** This study was performed to investigate the protective effect of *Stephania tetrandra*(ST) against ischemic brain damage after a middle cerebral artery(MCA) occlusion. The effect was evaluated using histological tests, neurobehavioral tests, and biochemical tests.

**Methods :** Rats(Sprague-Dawley) were divided into four groups: sham operated group, MCA occluded group, post MCA occlusion *Stephania tetrandra* administrated (7.6mg/100g) group, and normal group. The MCA was occluded by intraluminal method. *Stephania tetrandra* was administrated orally twice at 1 and 4 hours after MCA occlusion. The neurobehavioral test was performed at 3, 6, 9 and 24 hours after MCA occlusion by posture reflex test and swimming behavioral test. All groups were sacrificed then. The brain tissues were stained with 2% triphenyl tetrazolium chloride(TTC) or 1% cresyl violet solution, to examine infarct size, volume and cell number. Tumor necrosis factor- $\alpha$  level was measured from sera using Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay(ELISA). The mRNA expression level of inflammatory cytokines and related receptor type I and II, IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10 6hours after MCA occlusion were also studied by reverse transcriptase polymerase chain reaction(RTPCR).

**Results :** The results showed that: *Stephania tetrandra* (1) reduced infarct size and total infarct volume by 52.2% compared to the control group; (2) attenuated significantly in neuronal death, which was shown by a decrease in cell number(P<0.01) and size(P<0.01) in the boundary area of the infarction; (3) significantly reduced serum TNF- $\alpha$  level, and increased the mRNA level of IL-10 in the cortex region(P<0.01). However, there was no significant effect on motor deficit in swimming behavioral test.

**Conclusions :** In conclusion, *Stephania tetrandra* has protective effects against ischemic brain damage at the early stage of ischemia. (J Korean Oriental Med 2001;22(1):10-21)

**Key Words:** ischemia, neuroprotection, middle cerebral artery(MCA) occlusion, cytokine, *Stephania tetrandra*

### 서론

· 접수 : 2000년 12월 20일 · 채택 : 2001년 1월 15일  
· 교신저자 : 정혁상, 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1번지 경희대학교 동서의학대학원 신경과학교실 (Tel. 031-204-6832, Fax. 031-204-2189, E-mail : leanonjj@chollian.net)  
· 본 논문은 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(HMP-99-O-11-0002-C)과 BK21 사업에 의해 지원되었음.

한의학은 임상에서 뇌혈관 질환의 예방, 치료 및 후유장애 최소화 등 치료효과를 인정받고 있으나 치

료효과의 기전 등을 뒷받침하는 객관적인 실험적 근거가 미비하며 중풍모델의 선정도 완전히 확보되어 있지 않은 실정이다.

지금까지 뇌허혈에 따른 신경세포 보호효과에 관한 연구들은 주로 세포 외로부터 Ca-influx를 줄여줌으로써 얻어지는 신경방어 효과에 관한 연구로 진행되고 있으며<sup>1,3)</sup>, 또한 ATP와 creatinine phosphate의 사용율을 감소시키는 calcium 길항제나 calcium channel 차단제, 신경세포 독성을 일으키는 NMDA(N-methyl-D-aspartate) 또는 excitatory amino acid의 길항제 등의 연구들이 진행되고 있다<sup>2,5)</sup>.

방기(*Stephania Tetrandra*)는 방기과 식물 粉防己의 뿌리이며 祛風除濕, 利水消腫, 行氣止痛의 효능으로 風濕痺痛, 水腫脚氣, 小便不利, 關節紅腫熱痛 등의 증상에 사용되어온 약물이며<sup>6)</sup>, 최근의 연구에 의하면 진통, 소염 및 혈압강화작용<sup>7)</sup>을 보여주고 있다.

방기가 갖는 치료효과에 관하여 방기의 주요성분인 tetrandrine과 fangchinoline은 platelet-activating factor(PAF)에 의해 유도된 인간의 혈소판응집을 intracellular messenger system과 함께 억제한다는 것이<sup>8)</sup> 밝혀졌다.

이러한 방기의 구성성분으로서의 tetrandrine에 대한 많은 연구에 따르면<sup>8-10)</sup> 방기의 경구적 투여에 따른 뇌세포손상 보호효과가 예측되며 뇌허혈모델에 대한 연구의 필요성이 대두되는 바 본 연구에서는 이러한 기존에 보고된 방기 혹은 방기 추출물의 효과에 착안하여 방기제제가 경구적 투여로도 뇌손상에 대해 보호작용을 나타내는지를 연구하였다.

뇌허혈 모델을 사용한 새로운 약의 평가는 조직학적 신경학적 행동학적 연구를 서로간의 상관성 결여 때문에 동시에 시행해야한다는 보고가 있으며<sup>11)</sup>, 이에 본 연구진은 뇌허혈이 유발된 흰쥐에 방기의 생약 전탕액을 경구투여한 후 24시간후에 약물의 치료효과를 평가하여 약물의 효과가 해부조직학적, 행동생리학적, 생화학적 세가지의 평가항목에서 어떠한 결과를 나타내는지를 연구하였다.

## 방 법

### 1) 동물

실험동물은 대한실험동물센터에서 구입한 체중 180g 전후의 Sprague-Dawley 계 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) 약물의 조제 및 투여

방기(*Stephania tetrandra*) 600g을 5,000ml round flask에 넣고 3,000ml의 정제수를 가하여 냉각기가 부착된 전탕기에서 2시간 동안 가열한 후 여과포로 여과한 여액을 동결건조하여 물추출물을 얻었다. 약물의 투여는 실험동물의 체중 100g 당 방기 7.6mg을 2ml의 물에 녹여, 중대뇌동맥 폐쇄시점으로부터 1시간과 4시간에 각각 1회 경구투여하였다.

### 3) 뇌허혈 손상 유발

중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상 유발 방법 중 Zea Longa 등<sup>12)</sup>의 혈관내봉합사삽입술 (intraluminal method)을 채택하였으며 보다 광범위하고 일정한 뇌허혈 유발을 위해 poly-L-lysine으로 봉합사를 코팅하여 영구폐쇄방법<sup>13)</sup>을 시행하였다.

수술과정은 다음과 같다. 체중 250~300g 사이의 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 chloral hydrate 350mg/kg를 복강 주사하여 마취한 후 수술용 현미경 (Carl Zeiss, Zeiss, Germany)하에서 먼저 전경부의 근육을 정리하여 혈관을 노출시킨 후 외경동맥과 총경동맥을 잘 정리하였다. 후두동맥과 상갑상동맥을 electric coagulator (Ellman, Dento-Surg 90 FFP, USA)를 사용하여 절단하였다. 외경동맥의 원위부는 결찰하고, 수술실 (5-0 silk suture)로 고정고리를 두 개 만들어 놓은 후, 내경동맥과 총경동맥은 수술실 (3-0 silk suture)과 artery clamp (microvascular clip)를 사용

하여 혈행을 완전 차단하였다. 미세수술가위 (micro-dissecting spring scissor)로 외경동맥의 혈관벽을 약간 절개 후 poly-L-lysine 용액 (SIGMA Diagnostics, P8920, 0.1% w/v in water)로 코팅한 봉합사 (4-0 nylon suture, Ethilon, Brazil)을 18-20mm 정도 삽입하였다. 삽입후 내경동맥과 총경동맥을 다시 관류시키고, 외경동맥의 원위부를 절단하였다. 전경부의 피부를 봉합, 소독하고 마취에서 깨어난 후 자유롭게 움직이게 하였다.

혈관내봉합사삽입술을 시행한 21마리 중 11마리는 대조군으로 하고, 7마리는 수술 후 1시간과 4시간에 방기 물추출물을 경구 투여하였다. 또한 6마리는 위의 과정 중 혈관내봉합사 삽입과정만을 제외한 수술을 시행하여 sham군으로 하였으며, 모든 실험군에서 수술과 중대뇌동맥의 폐쇄는 우측만을 시행하였다.

#### 4) 뇌허혈 손상의 해부조직학적 평가

##### (1) 뇌허혈 손상 면적 및 체적의 측정

뇌허혈 유발 24시간 후에 실험동물에 20% chloral hydrate을 복강내 주사하여 희생하여 단두하였다. 곧 뇌를 적출한 후 rat brain matrix (ASI, USA)를 이용하여 rat brain atlas<sup>14)</sup>의 interaural distance에 따라 2mm 두께 6개의 뇌절편을 만들었다. 이 6개의 뇌절편을 2% TTC(Sigma, USA)용액에 넣어 37℃의 incubator (대일랩, DMC121, 한국)에서 30분간 염색을 시행하였다. 염색이 끝난 각각의 뇌절편은 camera (Nikon, Japan)로 사진촬영을 한 후 scanner (Epson, GT-9500, Japan)로 scan하여 컴퓨터 (Macintosh, Power PC G3, USA)에 입력한 다음 영상분석용 "NIH Image" software (NIH, Ver. 1.66, USA)를 사용하여 각 뇌절편에서 뇌허혈 손상 면적을 측정하였다. 뇌허혈 손상 면적 (A)은 부종에 의하여 손상면적이 늘어난 것을 보정하기 위하여, 먼저 정상측 대뇌반구의 면적 (B)을 측정하고 손상 측 대뇌반구 정상조직 면적 (C)을 측정한 다음 정상 측 대뇌반구 면적에서 손상 측 대뇌반구의 정상조직 면적을 감하는 방법 (A=B-C)으로 계산하였다. 총뇌허혈 손상 체적은 다음과 같이 계산

하였다<sup>15)</sup>.

Total Infarct Volume (mm<sup>3</sup>) =

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

##### (2) 뇌허혈 손상 부위 신경세포의 관찰 및 측정

TTC염색된 각각의 뇌절편은 Carnoy's 용액에 40분간 고정하고 80% ethanol에서 TTC를 제거한 후 탈수, 투영을 거쳐 paraffin 포매하여 8μm 두께의 조직절편을 제작하여 1%의 cresyl violet 용액에 25분간 염색하였다. 각각의 조직절편은 광학현미경 (Olympus, VANOX AHBS-3, JAPAN)으로 200배율 하에서 뇌허혈 손상부위에 나타나는 조직학적 변화를 관찰하면서 컴퓨터 (Macintosh, Power PC G3, USA)에 영상을 입력하였다. 입력된 영상을 "NIH Image" software (NIH, Ver. 1.66, USA)를 사용하여 interaural 6mm 절편 중 대뇌피질 부위의 일정 면적 (320μm×466μm)내에서 20μm<sup>2</sup> 이상의 크기를 갖는 신경세포의 수와 크기를 측정하였다(Fig. 1).

##### 5) 뇌허혈 손상의 행동생리학적 평가

##### (1) 자유유영 양상의 관찰 및 측정

뇌허혈 손상이 유발된 실험동물에 대한 행동생리학적 평가는 Morris water maze를 응용하였다<sup>16)</sup>. 원형 수조 (직경 1.32m, 높이 50cm)에 높이 42cm로 물을 채우고 1kg의 탈지분유를 풀어 수조 내의 색깔을 동일하게 하였으며, 실험기간 동안 물의 온도는 22±2℃로 유지하였다.

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

$$\text{Percentage of Left Turning Angles (\%)} = \frac{\text{좌측유영각도}}{\text{좌측유영각도} + \text{우측유영각도}} \times 100$$

$$\text{Percentage of Number of Left Turns (\%)} = \frac{\text{좌측유영횟수}}{\text{좌측유영횟수} + \text{직선유영횟수} + \text{우측유영횟수}} \times 100$$

(2) 자세반사 측정<sup>17)</sup>

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

6) 뇌허혈 손상의 생화학적 평가

(1) 효소결합면역측정법에 의한 혈중 TNF- $\alpha$ 량의 측정

효소결합면역측정법(Enzyme-Linked immunosorbent assay)에는 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 50 $\mu$ l로 만들고 TNF- $\alpha$ 의 단일클론 항체(monoclonal antibody)가 코팅된 microplate에 옮겨 혈장내의 TNF- $\alpha$ 가 micoroplate에 코팅된 단일클론항체와 결합되게 한 후 wash buffer로 충분히 세척하여 반응된 TNF- $\alpha$ 의 항원들을 제거하였다. 다시 TNF-

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

(2) Inflammatory Cytokine의 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

쥐의 뇌를 적출하여 2mm 두께로 자른 다음, interaural line 9.7-11.7mm 절편을 primary motor area와 secondary motor area 사이의 용기부 중점에서 rhinal fissure 까지 칼을 대고 external capsule을 기준으로 잘라 각기 cotex와 basal ganglia를 분리하였다. 이때 basal ganglia의 거의 대부분이 caudate putamen이었다. Hippocampus 시료는 5.7-7.7mm 절편에서 brain atlas에 준하여 준비되었다. 준비된 시료를 RNAzol(2ml/100mg tissue)를 더한 후 homogenizer로 처리하고 guanidium thiocyanate phenol/chloroform 추출법에 따라 총 RNA를 구하여 RNAase inhibitor의 존재하에서 차후의 반응까지 -80℃에 보관하였다.

역전사를 위하여 5 $\mu$ g의 RNA를 random primer(hexamer)와 AMV reverse transcriptase (Boehringer Mannheim)로 처리하였으며 실험조건은 시약제공회사에서 제공된 방법을 따랐고 2 $\mu$ l를 취하여 PCR에 사용되었다. PCR 조건은 초기조건 95℃ (3min)후 95℃(1min), 50℃(1min), 72℃(2min), 25 cycle이었으며 각 cytokine의 PCR을 위한 primer의 서열은 다음과 같다(Table 1).

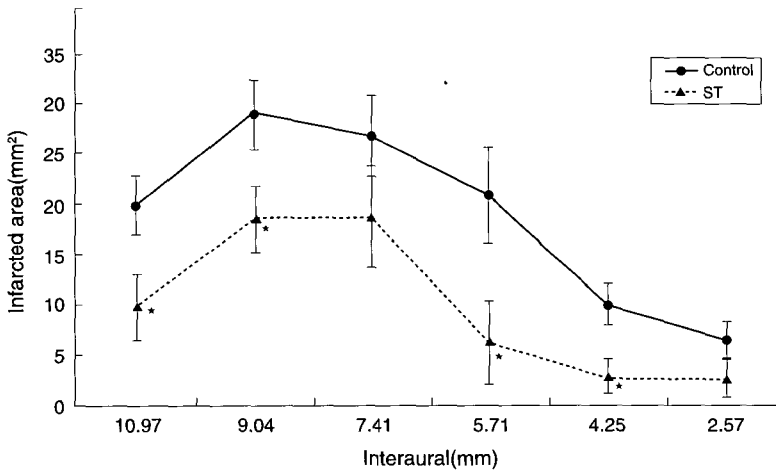
결 과

1) 뇌허혈 손상면적 및 체적 관찰

중뇌동맥을 폐쇄한 대조군에서는 허혈성 뇌손상이 interaural 10.97mm에서 2.57mm 절편까지 모두에서 나타났으며, 가장 뇌손상이 큰 절편은 9.04mm~7.41mm 절편이었다. 약물을 투여한 모든 군에서도

**Table 1.** Primers for Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Name	Sequences
L27A (internal standard)	5'-GGGAGCAACTCCATTCTGT-3' 5'-ATGCTAACGTCGAAGTCTA-3'
TNF- $\alpha$	5'-GAGATGTGGAAGTGGCAGAGG-3' 5'-GGTACAGCCCATCTGCTGGTA-3'
TNFR1	5'-TGGTGCTCCTGGCTCTGCT-3' 5'-ACCTGGAACATTTCTTTCCGAC-3'
TNFR2	5'-ATGAGAAATCCCAGCATGCAG-3' 5'-CTACAGACGTTACGATGCAG-3'
IL-1 $\beta$	5'-CCAGGATGAGGACCCAAG-3' 5'-TCCCGACCATTGCTGTTT-3'
IL-6	5'-GACTGATGTTGTTGACGCCACTGC-3' 5'-TAGCCACTCTTCTGTGACTCAA-3'
IL-10	5'-GAAGTGATGCCCCAGGCAGA-3' 5'-ACGTAGGCTTCTATCCAGT-3'

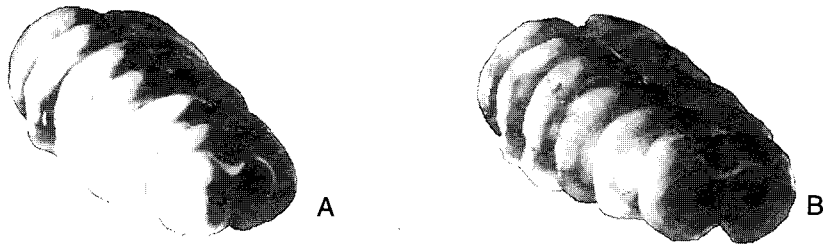


**Fig. 1.** Infarct areas at brain section 2.57 to 10.97mm from interaural line. Control group is MCA occluded rats. ST group is *Stephania tetrandra* administrated rats after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean. Statistical significance of ST compared to the value for control group. (☆; P<0.05)

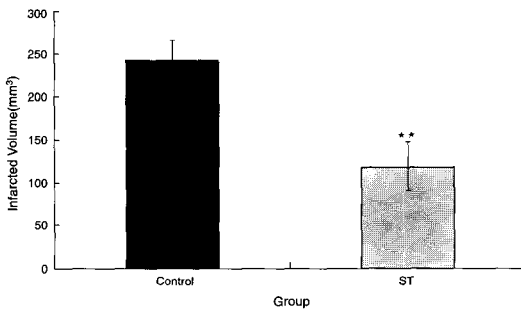
허혈성 뇌손상이 나타나는 양상은 대조군과 동일한 경향을 보였다(Fig. 1).

대조군에서는 허혈성 뇌손상 면적이 Interaural 10.97mm에서 2.57mm 절편까지 각각 2mm 간격으로 절편에서  $19.87 \pm 2.96 \text{mm}^2$ ,  $9.81 \pm 3.44 \text{mm}^2$ ,  $11.86 \pm 4.09 \text{mm}^2$ ,  $18.29 \pm 3.43 \text{mm}^2$ ,  $17.52 \pm 3.27 \text{mm}^2$ 을 나타내었다. 방기 투여군은 대조군과 비교하여 뇌손상 면적이 Interaural 10.97mm, 9.04mm, 5.71mm, 4.25mm 절편에서 각

각  $9.81 \pm 3.34 \text{mm}^2$ ,  $18.51 \pm 3.15 \text{mm}^2$ ,  $6.13 \pm 4.02 \text{mm}^2$ ,  $2.78 \pm 1.77 \text{mm}^2$ 로 줄어 각각 유의성(P<0.05)있게 뇌허혈 발생을 억제하였다. TTC 염색된 사진을 보면 방기 투여군은 뇌허혈 발생 부위와 정상 부위의 경계가 불확실하게 나타나보인다(Fig. 2). 이는 뇌허혈 치료시 관건이 되는 경계영역이 감소됨을 알 수 있다. 중대뇌 동맥을 폐쇄한 군에서는 뇌허혈 체적은  $244.31 \pm 21.75 \text{mm}^3$ 이었다. 방기 투여군은  $116.85 \pm 28.22 \text{mm}^3$ 으로



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



**Fig. 3.** Total infarct volume each group. Sham group is sham-operated rats. Control group is MCA occluded rats. ST group is *Stephania tetrandra* administrated rats after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean. Statistical significance of ST compared to the value for control group. (☆☆; P<0.01)

유의성(P<0.01)있게 감소하였다(Fig. 3).

### 2) 신경세포수와의 신경세포의 위축정도 관찰

허혈성 뇌손상을 입지 않은 정상적인 대뇌피질에서 나타나는 신경세포 수는  $204 \pm 2.08$ 개였고 허혈성 뇌손상 부위와 정상부위 사이의 경계구역에서 나타나는 신경세포의 수는 중뇌동맥을 폐쇄한 대조군에서는  $105.57 \pm 17.35$ 개로 정상부위의 신경세포 수에 비하여 현저한 감소를 하였다. 방기 투여군은 각각  $203.75 \pm 17.07$ 개로 유의성(P<0.01)있게 증가하였다(Table 2). 허혈성 뇌상을 입지 않은 정상적인 대뇌피질에서 나타나는 신경세포 크기는  $75.22 \pm 2.08 \mu\text{m}^2$  이었고 허혈성 뇌손상 부위와 정상부위 사이의 경계구역에서 나타나는 신경세포의 크기는 중뇌동맥을

폐쇄한 대조군에서는  $34.28 \pm 2.08 \mu\text{m}^2$ 로 정상부위의 신경세포 크기에 비하여 현저한 축소를 나타내었으며 방기 투여군은  $47.22 \pm 3.42 \mu\text{m}^2$ 로 유의성(P<0.01)있게 신경세포 크기의 축소 억제를 나타내었다(Fig. 4).

### 3) Behavioral Test

중뇌동맥을 폐쇄한 대조군의 유형성 특이점으로는 정상군과 sham 군의 경우 실험 동물이 주로 수조의 벽면을 타고 움직이거나 반대측 벽면을 향하여 직진하는 성향을 가진 반면 중뇌동맥을 폐쇄한 대조군은 좌측으로 작은 동심원을 그리며 회전하는 행동양상을 보였다. 실험동물의 이러한 유형을 Left turning angle 및 Number of left turns 으로 분석해본 결과, 대조군과 방기투여군은 모두 정상군과 비해 유의하게 다른 결과가 나왔으나, 방기투여군과 대조군사이의 유의한 차이가 없었다. 즉 방기가 중뇌동맥 폐쇄에 의한 행동결손을 24시간이내에서는 유의하게 변화시키지 못했다. Posture Reflex Test에서도 유의한 차이를 나타내지 못했다.

### 4) 혈액내 TNF- $\alpha$ 의 관찰

혈액 중 순환하는 mature 형태의 TNF- $\alpha$ 의 양을 ELISA 방법으로 측정된 결과, Sham 군은 정상군 같은 수준의 TNF- $\alpha$ 가 검출되었고, 중뇌동맥을 폐쇄한 대조군은 정상군에 비하여 약 22% 가량이 유의성있게(P<0.005) 증가되었다. 방기 투여군은 대조군에 비하여 유의성있게(P<0.005) 정상치로 감소되었음을

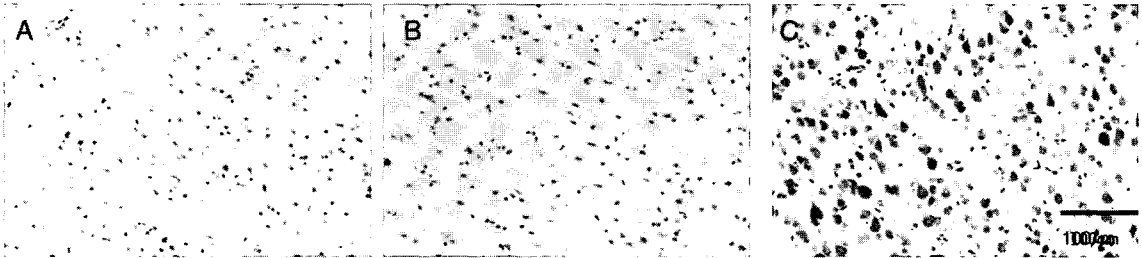
**Table 2.** Quantitative Changes in Cell Size and Cell Number after MCAO over Groups

Group	cell size( $\mu\text{m}^2$ )	cell number
Intact <sup>a)</sup>	75.2 $\pm$ 2.1	204.5 $\pm$ 17.4
Control	34.2 $\pm$ 2.1	105.6 $\pm$ 17.4
ST	47.2 $\pm$ 3.4**	203.8 $\pm$ 17.1**

The number are shown as Mean  $\pm$  Standard Error

a) means normal neocortex portion. Control group is MCA occluded rats. ST group is *Stephania tetrandra* administrated rats after MCA occlusion.

\*\* indicates that their statistical significance is  $P < 0.01$  compared to the value for Control Group, respectively.



**Fig. 4.** Neuron cells in the cerebral cortex over groups. Each section demonstrates the MCA occluded cerebral cortex stained with cresyl violet(X200). Section A shows the cerebral cortex of the MCA occluded control group. Section B shows *Stephania tetrandra* administrated group. Section C shows the neuron cells in the normal cerebral cortex. Neuron cells in section A revealed profound hypotrophy and cell loss with respect to section C. Neuron cells in section B are increased in cell size and cell number with respect to that in section A.

**Table 3.** The Effects of *Stephania Tetrandra* on the Level of TNF- $\alpha$  in Serum

Group Name	TNF- $\alpha$ Level in Serum (pg/ml)	Number of Samples
Normal	28.6 $\pm$ 2.4 <sup>#</sup>	6
Sham	28.4 $\pm$ 1.8	5
Control	34.9 $\pm$ 4.6	12
ST	28.0 $\pm$ 1.2*	7

Control group is MCA occluded rats and sham group is sham operated group. ST group is *Stephania tetrandra* administrated rats after MCA occlusion.

\* p values are less than 0.005 for ST. # indicates the standard deviation.

보여주고 있으며 그 감소량은 19.8%이다(Table 3).

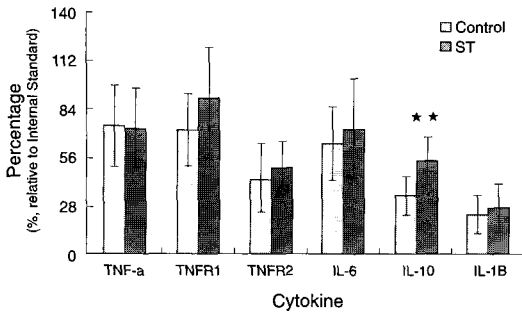
의 경우도 각각 약간의 차이를 보여주었으나 통계적인 유의성을 보여주지 않았다.

### 5) Inflammatory cytokine의 발현

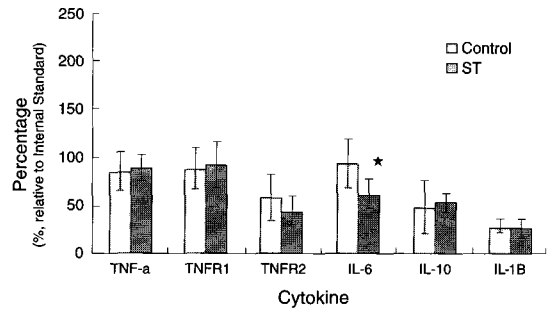
Basal ganglia, hippocampus, cortex 지역의 cytokine 분포를 RTPCR로 조사한 결과 모든 시료에서 검출되기는 하였지만 cortex에서 가장 많이 검출되었다. 그 결과를 정리하여 Fig. 5, 6, 7에 제시하였다. 방기를 투여한 후 cortex 지역의 IL-6의 mRNA 발현이 internal standard에 비하여 61.1 $\pm$ 16.5%로 대조군의 93.6 $\pm$ 25.7%에 비하여 약 34.7%가량 감소된 것으로 나타났다(  $P < 0.05$  ), basal ganglia의 IL-10의 발현이 53.9 $\pm$ 13.2%, 대조군의 경우 33.9 $\pm$ 10.9%로 각각 나타나 대조군에 비해 방기투여군의 발현이 59.0%가량 증가되었음을 보여주었다(  $P < 0.01$  ). 다른 cytokine

### 고찰

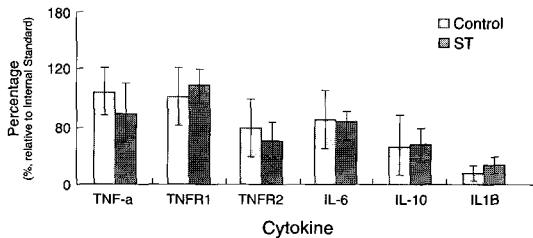
防己(*Stephania tetrandra*)의 치료효과적인 연구는 방기의 주요성분인 tetrandrine과 fangchinoline은 platelet-activating factor(PAF)에 의해 유도된 인간의 혈소판응집을 intracellular messenger system과 함께 억제한다는 것으로<sup>8)</sup> 밝혀졌다. 특히 방기의 bis-benzyl-isoquinoline alkaloid인 tetrandrine은 voltage-operated calcium channels을 폐색하고 세포질내나 다른 Ca 펌프를 폐색하여 [Ca<sub>i</sub>]를 증가시키며<sup>9,10)</sup>, 세포 내 칼슘저장 고갈에 의해 유발되는 non-voltage-oper-



**Fig. 5.** Comparative mRNA expression of cytokine in basal ganglia. Control group is MCA occluded rats. ST group is *Stephania tetrandra* administrated rats after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean. Statistical significance of ST compared to the value for control group.(★★; P<0.01)



**Fig. 6.** Comparative mRNA expression of cytokine in cortex. Control group is MCA occluded rats. ST group is *Stephania tetrandra* administrated rats after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean. Statistical significance of ST compared to the value for control group.(★; P<0.05)



**Fig. 7.** Comparative mRNA expression of cytokine in hippocampus. Control group is MCA occluded rats. ST group is *Stephania tetrandra* administrated rats after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean.

ated 갈슘이온의 entry를 막고<sup>18)</sup>, 유력한 면역억제제로서의 가능성에 대해서도 연구되어 있다<sup>19)</sup>.

이러한 방기의 구성성분으로서의 tetradrine에 대한 많은 연구에 따르면 방기의 경구적 투여에 따른 뇌세포손상 보호효과가 예측되며 뇌허혈모델에 대한 연구의 필요성이 대두되는 바 본 연구에서는 이러한 기준에 보고된 방기 혹은 방기 추출물의 효과에 착안하여 방기제제가 경구적 투여로도 뇌손상에 대해 보호작용을 나타내는지를 연구하였다.

대다수의 뇌보호작용제는 동물의 종에 따라서도 차이가 있지만<sup>20)</sup> 중뇌동맥의 영구적폐쇄보다는 일시적 폐쇄의 동물모델에서 더 효과적이며 비교적 일정한 부위의 뇌허혈을 유발시킬 수 있으며, 대뇌피질 뿐만 아니라 기저핵 부분에도 광범위하게 뇌허혈이 발생하

여 해부조직학적 평가는 물론 행동생리학적 평가를 하려는 본 연구의 목적에 적합하여 채택하였다.

방기를 투여하는 시간을 결정하는데 있어서는 최근에 연구된 뇌허혈의 기전을 참조하였다. Aronowsk 등<sup>21)</sup>은 TTC 염색상 뇌허혈의 크기는 중뇌동맥을 영구폐쇄한 동물모델에서 6시간에서 최대이며 9시간에서 24시간사이에서는 더 이상 증가하지 않으며, 특히 경계영역에서의 광범위한 뇌조직의 손상은 9시간 내에는 일어나지 않는다고 하였다. Nagasawa 등<sup>22)</sup>은 뇌허혈 발생후 3시간에서 6시간까지의 뇌허혈류가 1시간내보다 더 나쁘고 전체적으로는 대뇌피질보다 기저핵 부위의 뇌허혈류가 낮게 나타난다고 하였다. Garcia등<sup>23)</sup>은 뇌허혈 발생후 뇌세포의 비가역적 변화는 먼저 기저핵 부위에서 발생하고 점차 대뇌피질부위로 진행하고 첫 6시간동안은 위축과 부종같은 acute change가 생기고 괴사와 같은 delayed change는 6시간에서 12시간에 많은 수의 신경세포에 영향을 주는 고로 1시간 2시간내의 처치가 조직학적 반응을 변화시킬 수 있을 것이라고 하였다. 이러한 점에 근거하여 약물의 투여시간을 결정하는데 있어 뇌허혈이 유발된 뇌세포에 대하여 약물이 최대한 치료효과를 발휘할 수 있도록 약물을 경구투여하는 점을 감안하여 뇌허혈 유발 1시간후, 4시간 후에 하여 뇌세포가 본격적으로 괴사되기 시작하는 뇌허혈 발생 3



시간전후로 하여 약물의 효과가 최대로 나타날 수 있도록 하였다.

이러한 방법으로 방기 전탕액을 실험동물에 투여하여 평가해 본 결과 TTC 염색에 의한 뇌허혈 면적 측정에서 대조군에 비하여 현저한 감소를 나타내었으며, 또한 뇌허혈 발생부위의 뇌세포에 대한 정략적 관찰에서도 뇌세포의 크기와 수에서 증가를 나타내었다. 또한 혈액내 TNF- $\alpha$ 의 평가에서도 대조군에 대하여 유의성 있게 낮아졌다.

뇌허혈에 의한 뇌손상에 관한 분자생물학적 연구는 조직손상이 허혈 초기에 proinflammatory cytokine의 발현에 의해 시작되고 있음을 지적하고 있으며<sup>24)</sup>, 그 중 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 inflammation 유발초기에 발현되며 손상효과가 있다고 알려져 있으며<sup>25)</sup>, 그리고 IL-6<sup>26)</sup>와 IL-10<sup>27)</sup>의 발현은 지연되어 있으며 허혈에서 뇌조직에 보호효과가 있다고 보고된 바 있다. TNF- $\alpha$ 의 세포독성은 허혈의 진행에서 매우 중요한 요소이며<sup>28)</sup> 그 수용체와의 상호작용은 허혈의 중요한 연구 대상이다. TNF- $\alpha$ 의 수용체는 두가지가 있으며 그 중 type I은 뇌허혈에 의한 조직손상에 직접적으로 관계하고 있음이 보고되었다<sup>29)</sup>. 따라서 이들 cytokine의 발현은 허혈에 의한 뇌손상을 연구하는데 있어 중요한 정보들이다. TNF- $\alpha$ 는 뇌허혈이 발생후에 내부염증반응에 관여하는 cytokine의 하나로<sup>30)</sup> 뇌조직 손상을 가속화하는 염증세포의 침윤을 용이하게 하고<sup>31)</sup>, 한편으로는 조직손상의 회복에도 관여하는 인자로 알려져 있다<sup>32)</sup>. 최근 연구에 의하면 TNF- $\alpha$ 를 억제하면 뇌허혈 발생부위면적이 줄어든다고 하여<sup>33-35)</sup>, TNF- $\alpha$ 억제가 뇌허혈의 처치에 중요한 관건이 된다고 하였다<sup>36)</sup>.

본 실험에서는 이러한 TNF- $\alpha$ 의 특성을 이용하여 중뇌동맥폐쇄후의 약물에 의한 효과를 알아보고자 했다. 그러나 TNF- $\alpha$ 는 염증반응에 관련한 인자로, 수술에 의해서도 증가할 수 있기에 우선 Sham군을 정상군과 비교해 본 결과 두 군간의 차이는 없었다. 이 결과로 중뇌동맥 폐쇄 후에 serum에서 검출된 TNF- $\alpha$ 의 수치는 수술에 의한 차이가 배제된 것임을 알았다. 본 실험에서 다른 문헌<sup>37)</sup>과 비교하여 비교적

TNF- $\alpha$ 가 적게 검출되는 것은 TNF- $\alpha$ 의 양은 6시간 내지 12 시간 사이에 최대치가되고 24 시간에는 급격한 일시적 감소를 보여 거의 정상치에 이르는 진행양상을 보이는 것이 일반적이다<sup>38)</sup>. 따라서 본 연구에서 보이는 낮은 수치는 중뇌동맥폐쇄후 24시간후에 혈액을 채취하였기 때문이라고 생각되며 앞으로 시간에 따른 TNF- $\alpha$ 의 연구가 필요하리라 사료된다.

또한 뇌조직을 격리하고 있는 blood brain barrier의 존재는 허혈이 현격히 진행되지 않은 상황에서는 뇌에서 발현된 단백질이 혈액으로 유출이 대량으로 일어나지 않는다. 따라서 본 연구에서 보여진 낮은 혈액내 TNF- $\alpha$  단백질의 level은 이런 이유들에 기인한 것으로 생각된다.

RTPCR에 의한 mRNA의 발현 연구에 있어서 본 실험조건에서 core region이 cortex에 가깝게 위치하고 있어 proinflammatory cytokine의 발현도 cortex에 집중되어 나타날 것으로 예측할 수도 있다. 하지만 본 연구의 결과는 basal ganglia, hippocampus에서도 cortex와 준하는 정도의 발현을 보여주고 있다. Rat의 cortex에 국소허혈을 유발한 최근의 연구에 의하면<sup>39)</sup> ipsilateral 반구의 모든 부위에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 가 발현된다. 이에 근거하면 이들 inflammatory cytokine과 연관된 다른 인자들의 발현도 유발될 수 있는 개연성이 있으며 본 연구에서 보여진 바와 같이 basal ganglia와 hippocampus에서 보이는 cytokine의 발현은 이를 지적하고 있다. 따라서 본 연구의 결과는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 물론이고 TNF- $\alpha$ 의 수용체와 IL-10 등의 발현도 전반구에 걸쳐 진행되는 현상이 검증되었다.

방기에 의해 유발된 IL-6의 감소와 IL-10의 증가는 방기가 허혈에 보호효과가 있음을 지적하고 있으며 이는 방기가 tetrandrine, fangchinoline과 같은 antiinflammotry 효과를 가지는 생약성분을 함유하고 있음<sup>40)</sup>과 연관성이 있을 수 있다. 본 연구의 결과는 이들 화합물이 항염증효과가 동물의 허혈모델에 있어서도 효과가 있는지의 여부를 조사해 볼 필요가 있음을 시사한다.

행동생리학적 평가에서 행동결손의 개선에는 큰

영향을 주지 못하였다. 이 점은 뇌허혈 발생면적과 행동장애의 평가가 상관성있게 일치하지 않는다는 것을 의미한다. 하지만 중뇌동맥 폐쇄 후 3시간에서의 행동평가에서 유의성있는 변화를 관찰할 수 있었다. 행동자료에서 변화가 유의하게 변화하지 않은 것은 TTC 염색상에서 interural 9.04mm에서 뇌허혈 면적이 중뇌동맥을 폐쇄한 대조군과 방기투여군에서 유의성있게 변화하지 않은 것과 연관이 있을 것으로 생각된다. 이 부위는 운동과 직접 관련된 기저핵부위가 대부분을 차지하고 있기 때문에 이 부위의 뇌허혈면적이 감소되지않은 것은 이와 관련된 운동기능이 호전될 가능성이 적다고 볼 수 있다. 이는 TTC 염색에 의한 뇌허혈 면적이나 혈액내 TNF- $\alpha$ 의 측정은 단지 그 시간대에서의 조직학적, 생화학적 지표만으로 뇌허혈 발생후부터 24시간까지의 모든 상황을 예측할 수 없음을 감안하면 방기가 뇌허혈 발생초기에 손상된 뇌조직에 대해 긍정적인 효과를 나타냈을 것이라 사료된다.

본 연구는 뇌허혈 유발 초기에 방기의 경구투여가 뇌허혈 발생 24시간에서 뇌 신경세포 손상영역의 감소에 유의한 효과가 있음을 보여주었다. 국소 뇌허혈의 경우 정색부위의 많은 신경세포들이 24~72시간 사이에도 죽어가고 있기 때문에 이 결과는 경계영역에 있는 신경세포의 손상이 억제되고 있음을 지적하고 있지만 이 억제효과가 단지 신경세포의 손상을 지연시키고 있을 가능성도 있다. 따라서 이러한 방기의 효과가 뇌허혈 발생 후 24시간을 전후로 하여 어떠한 효과를 나타낼 것인지는 이 결과만으로는 알 수 없으므로 방기의 투여가 뇌허혈 발생 24시간이후에도 유의한 효과를 나타내는가 하는 것에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

방기가 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상 초기에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐를 사용하여 혈관내봉합사삽입술(intraluminal method)로 중대뇌동맥을 폐쇄하고 방기를 경구투여한 결과 뇌허혈 유발 24시간에서 뇌허혈 손상 부위의 면적 및 체적을 유의하게 감소시켰다. 또한 뇌허혈 유발 24시간에서 대뇌피질에서 신경세포 수의 손상을 유의하게 억제

하였으며, 신경세포의 위축 또한 유의하게 억제하는 효과를 나타내었다.

## 결론

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

1. 뇌허혈 유발 24시간에서 뇌허혈 손상 부위의 면적 및 체적을 유의하게 감소시켰다.
2. 뇌허혈 유발 24시간에서 대뇌피질에서 신경세포 수의 감소를 유의하게 억제하였으며, 또한 신경세포의 위축을 유의하게 억제하는 효과를 나타내었다.
3. 뇌허혈 유발 24시간까지의 자유유영과 자세반사측정에서는 방기투여군의 경우 대조군에 비해 회복되는 경향을 보였으나 유의한 차이를 나타내지는 않았다.
4. 뇌허혈 유발 24시간에서 혈액내 TNF- $\alpha$ 의 수치를 유의하게 감소시켰다.
5. 뇌허혈 유발 6시간에서 방기투여군의 경우 cortex 지역의 IL-6의 mRNA 발현이 internal standard에 비하여 유의하게 감소되었으며, basal ganglia의 IL-10의 발현이 대조군에 비해 유의하게 증가되었다.

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

## 참고문헌

1. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1988;1:623-634.
2. Sauter A, Rudin M, Wiederhold KH. Reduction of neural damage in irreversible cerebral ischemia by

- calcium antagonists. *Neurochemistry*. 1988;9:211-936.
3. Seubert P, Lee K, Lynch G. Ischemia triggers NMDA receptor-linked cytoskeletal proteolysis in hippocampus. *Brain Res*. 1989;492:366-370.
  4. Obana, WG, Pitts, LH, Nishimura, MC. Effect of opiate antagonists on middle cerebral artery occlusion infarct in the rat. *J Neurosurg*. 1988;69:98-103.
  5. Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb blood Metab*. 1989;9:127-140.
  6. 李尙仁. 本草學. 서울:學林社. 1986:319-321.
  7. Huang YT, Chang FC, Chen KJ, Hong CY. Acute hemodynamic effects of tetramethylpyrazine and tetrandrine on cirrhotic rats. *Planta Med*. 1999;65(2):130-134.
  8. Kim HS, Zhang YH, Fang LH, Yun YP, Lee HK. Effects of tetrandrine and fangchinoline on human platelet aggregation and thromboxane B2 formation. *J Ethnopharmacol*. 1999;66(2):241-246.
  9. Bickmeyer U, Weinsberg F, Muller E, Wiegand H. Blockade of voltage-operated calcium channels, increase in spontaneous catecholamine release and elevation of intracellular calcium levels in bovine chromaffin cells by the plant alkaloid tetrandrine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1998;357(4):441-445.
  10. Weinsberg F, Bickmeyer U, Wiegand H. Effects of tetrandrine on calcium channel currents of bovine chromaffin cells. *Neuropharmacology*. 1994;33(7):885-890.
  11. Florence W, Monique A, Michel P, Roger G. Neurological and Behavioral Outcomes of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke*. 1992;23:267-272.
  12. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84-91.
  13. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. *Stroke*. 1996;27:1616-1623.
  14. George P, Charles W. *The Rat Brain*. San Diego: Academic Press. 1997.
  15. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990;10(2):290-293.
  16. Morris RGM. Special localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*. 1981;12:239-260.
  17. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17:472-476.
  18. Leung YM, Berdik M, Kwan CY, Loh TT. Effects of tetrandrine and closely related bis-benzylisoquinoline derivatives on cytosolic Ca<sup>2+</sup> in human leukaemic HL-60 cells: a structure-activity relationship study. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23(8):653-659.
  19. Seow WK, Ferrante A, Goh DB, Chalmers AH, Li SY, Thong YH. In vitro immunosuppressive properties of the plant alkaloid tetrandrine. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1988;85(4):410-415.
  20. Sean DL, Florence MH, Berislav VZ. Circulating antibody against tumor necrosis factor-alpha protects rat brain from reperfusion injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*. 18(1):52-55.
  21. Aronowski J, Cho KH, Storng R, Grotta J. Neurofilament proteolysis after focal ischemia: When do cells die after experimental stroke? *Journal cerebral blood flow and metabolism*. June;19(6).
  22. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 1989;20:1037-1043.
  23. Garcia JH, Kai-Feng, Ho KL. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke*. 1995;20:636-643.
  24. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1431-1568.
  25. Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1994;6(4):341-360.
  26. Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal

- cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood vlow Metab.* 1998;18(2):176-179.
27. Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casati C, Lozza G, Ongini E. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischemic damage. *Eur J Neurosci.* 2000;12(7):2265-2272.
  28. Botchkina GI, Wang H, Di Santo E, Cockroft KM, Bloom O, Vishnubhakat JM, Ghezzi P, Tracey KJ. Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock.* 1997;8(5):341-348.
  29. Botchkina GI, Meistrell ME, Botchkina IL, Tracey KJ. Expression of TNF and TNF receptors(p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med.* 1997;3(11):765-781.
  30. Buttini M, Appel K, Sauter A, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW. Expression of tumor necrosis factor alpha focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience.* 1996;71(1):1-16.
  31. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons. *Stroke.* 1994; 25:1481-1488.
  32. Barger SQ, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegelstein J, Mattson M. Tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$  protect neurons against amyloid  $\beta$ -peptide toxicity; evidence for involvement of a  $\kappa$ B-binding factor and attenuation of peroxide  $Ca^{2+}$  accumulation. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92:9328-9332.
  33. Nawashiro H, Martin D, Hallenbeck JM. Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism.* 1997;17(2):229-232.
  34. Yang GY, Gong C, Qin Z, Ye W, Mzo Y, Bertz AL. Inhibition of TNF $\alpha$  attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. *Neuroreport.* 1998;9(9):2131-2134.
  35. Meistrell ME, Botchkina GI, Wang H, Di Santo E, Cockroft KM, Bloom O, Vishnubhakat M, Ghezzi P, Tracey KJ. Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock.* 1997;8(5):341-348.
  36. Barone FC, Arvin B, White F, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke.* 1997;28:1233-1244.
  37. Uno H, Matsuyama T, Akita H, Nishimura H, Sugita M. Induction of tumor necrosis factor-alpha in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17(5):491-499.
  38. Pan W, Kastin AJ, Bell RL, Olson RD. Upregulation of tumor necrosis factor alpha transport across the blood-brain barrier after acute compressive spinal cord injury. *J Neurosci.* 1999;19(9):3649-3655.
  39. Jander S, Schroeter M, Stoll G. Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia. *J Neuroimmunol.* 2000;22:109(2):181-187.
  40. Choi HS, Kim HS, Min KR, Kim Y, Lim HK, Chang YK, Chung MW. Anti-inflammatory effects of fangchinoline and tetrandrine. *J Ethnopharmacol.* 2000;69(2):173-179.