

鷄血藤 추출물이 뇌허혈에 미치는 실험적 연구

이상록 · 최찬헌 · 백진웅 · 윤대환 · 정상훈² · 한 응² · 정현우* · 김계업¹

동신대학교 한의과대학, 1: 동신대학교 물리치료학과, 2: 우석대학교 한의과대학

Experimental Study of *Patholobi Caulis* on the Transient Cerebral Ischemia in Rats

Sang Lok Lee, Chan Hun Choi, Jin Ung Baek, Dae Hwan Youn, Sang Hun Jeong², Ung Han², Hyun Woo Jeong*, Gye Yeop Kim¹

College of Oriental Medicine, 1: Department of Physical Therapy, Dongshin University, 2: College of Oriental Medicine, Woosuk University

The study was designed to investigate the mechanism of *Patholobi Caulis* freeze dried powder (PCF) on the regional cerebral blood flow (rCBF) and mean arterial blood pressure (MABP) in normal rats and cytokines production (IL-1 β , TNF- α , IL-10, TGF- β) in cerebral ischemic rats. The results in normal rats were as follows ; Increase of PCF-induced rCBF was significantly inhibited by pretreatment with methylene blue (10 μ g/kg, i.p.), an inhibitor of guanylate cyclase, and was inhibited by indomethacin (1 mg/kg, i.p.), an inhibitor of cyclooxygenase. Increase of PCF-induced MABP was decreased by pretreatment with methylene blue, but was increased by indomethacin. These results suggested that the mechanism of action PCF was mediated by cyclic 3',5'-guanosine monophosphate. The results in cerebral ischemic rats were as follows ; In cytokine production in serum from femoral arterial blood 1 hr after middle cerebral arterial occlusion, PCF (10 mg/kg, i.p.) significantly decreased IL-1 β and TNF- α production, and increased IL-10 production compared with control group. In cytokine production in serum from femoral arterial blood 1 hr 1 hr after reperfusion, PCF (10 mg/kg, i.p.) significantly decreased IL-1 β production, and increased IL-10 production compared with control group. These results suggested that PCF was significantly and stably increased regional cerebral blood flow by inhibiting IL-1 β production, and by accelerating IL-10 production.

Key words : *Patholobi Caulis*, regional cerebral blood flow (rCBF), mean arterial blood pressure (MABP), cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-10, TGF- β), cyclic 3',5'-guanosine monophosphate

서 론

鷄血藤은 活血去瘀, 行血, 舒筋, 活絡하는 효능이 있어 手足麻木, 肢體癱瘓, 關節酸痛 등의 병증에 활용되어 왔으며¹⁻³, 약리 작용으로는 혈액순환 및 항응고작용이 있어 혈압 강하작용이나 동맥경화 억제작용 등이 있는 것으로 알려져^{4,5}, 고혈압, 심장병 등에 활용되고 있다⁶.

동맥경화증은 관상동맥이나 경동맥의 근육성 동맥벽이肥大해져 벽의 탄력성이 소실되는 질환으로 심근경색 등이 나타나고⁷, 이러한 경색증은 심혈관의 수축으로 동맥 혈류가 감소되어 나

타는 허혈성 병변에 해당된다⁸. 이중 허혈성 뇌질환은 경동맥을 통해 뇌로 공급되는 뇌혈류량 - 평균 700~800 ml/min^{9,10} - 이 20%이상 감소하게 될 경우 유발되며^{8,9,11}, 뇌신경 세포의 손상으로 인한 의식, 운동, 감각 및 반사장애 등이 나타난다¹².

뇌혈류에 관련된 뇌혈관 질환의 연구 동향을 살펴보면 石菖蒲¹³·靑皮¹⁴ 등의 單味劑와 祛風導痰湯¹⁵·清量化痰湯¹⁶ 등을 이용해 정상 흰쥐에 미치는 뇌혈류역학 작용에 관한 연구가 있고, 중대뇌동맥을 폐색시킨 일과성 뇌허혈에 관련된 연구로는 滋陰健脾湯加枳殼·天麻^{17,18}, 牛黃清心元¹⁹, 六君子湯²⁰과 八物湯²¹이 뇌혈류 및 혈청 내 사이토카인 양을 변화시켜 뇌허혈에 유의성이 있음이 보고되었다.

계혈등에 관련된 연구들로는 류마티오이드 관절염 억제 효과²², 항산화 효과^{23,24}, 항노화 효과²⁴, 항암 효과^{25,26}가 있고, 최근에는

* 교신저자 : 정현우, 전남 나주시 대호동 동신대학교 한의과대학 병리학교실

· E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr, · Tel : 061-330-3524

· 접수 : 2007/08/17 · 채택 : 2007/09/21

뇌혈류량 및 Lactate Dehydrogenase 활성에 관한 연구에서 뇌혈류 변동을 유의하게 개선시키는 물론 뇌허혈로 인한 뇌세포 사멸에도 관여하는 효과²⁷⁾가 있다고 보고되었으나 항허혈에 미치는 작용기전에 관한 연구 보고는 아직까지 접하지 못하였다. 이에 계혈등 추출물이 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량과 평균 혈압에 미치는 작용 기전을 혈관 확장 인자의 억제제를 이용하여 살펴보고, 중대뇌동맥 폐색법으로 유발된 뇌허혈 흰쥐의 혈청 내 사이토카인 생성에 미치는 효과를 관찰한 결과 유의성을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

동물은 체중 300 g내외의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 (주) 다물 사이언스에서 구입하여 사용하였다. 동물은 항온항습 장치가 부착된 사육장에서 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경 (실내온도 24±2℃, 습도 55±5%, 12시간 dark/light)에 1주일 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2) 시료

실험에 사용된 계혈등 (*Patholobi Caulis*)²⁾ 100 g을 3,000 ml 환저 플라스크에 증류수 1,500 ml와 함께 120분 가열하고 전탕액을 여과지로 여과하여 5,000 × g로 30분 동안 원심 분리하여 상청액을 취하였다. 그 후 rotary vacuum evaporator (Büchi, Postfach, Switzerland)에 넣어 감압 농축한 다음 동결 건조시켜 계혈등 건조 분말 (*Patholobi Caulis freeze dried powder, PCF*) 15.8 g을 얻었다.

2. 방법

1) 정상 흰쥐의 뇌혈류학 변화에 미치는 작용 기전 관찰

(1) 국소 뇌혈류량 변화 관찰

계혈등 추출물이 국소 뇌혈류량 변화에 미치는 작용 기전을 알아보기 위하여 흰쥐를 stereotaxic frame (DKI, Tokyo, Japan)에 고정시키고 정중선을 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, Deven, U.K.)용 needle probe (직경 0.8 mm)를 대뇌 (두정엽) 피질 표면에 수직이 되도록 stereotaxic micromanipulator를 사용하여 뇌연막 동맥에 조심스럽게 근접시켰다. 일정시간 동안 안정시킨 후 혈관 확장 인자 억제제 - prostaglandin의 생합성효소인 cyclooxygenase의 억제제인 인도메타신 (indomethacin 1 mg/kg, i.p., IDN, Sigma I7378), cyclic guanosine monophosphate (cGMP)의 생합성효소인 guanylate cyclase의 억제제인 메틸렌블루 (methylene blue 0.01 mg/kg, i.p., MTB, Sigma M9140) - 를(Fig. 1) 전처치한 후 실험 절차에 따라 계혈등 추출물을 용량별 (0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg, 10.0 mg/kg, i.p.)로 투여한 다음 변화되는 국소 뇌혈류량 (regional cerebral

blood flow, rCBF)을 각각 30분 동안 측정하였다²⁸⁾.

(2) 평균 혈압 변화 관찰

계혈등 추출물이 평균 혈압 변화에 미치는 작용 기전을 알아보기 위하여 흰쥐를 우레탄 (1 g/kg, i.p.)으로 마취시킨 후 체온이 37~38℃로 유지될 수 있도록 heat pad 위에 복외위로 고정시킨 후 혈관 확장 인자 억제제 - prostaglandin의 생합성효소인 cyclooxygenase의 억제제인 인도메타신 (indomethacin 1 mg/kg, i.p., IDN, Sigma I7378), cyclic guanosine monophosphate (cGMP)의 생합성효소인 guanylate cyclase의 억제제인 메틸렌블루 (methylene blue 0.01 mg/kg, i.p., MTB, Sigma M9140) - 를 (Fig. 1) 전처치하였다. 이후 계혈등 추출물 투여 용량 (0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg, 10.0 mg/kg, i.p.)에 따른 평균 혈압 (mean arterial blood pressure, MABP) 변화를 흰쥐의 대퇴동맥에 삽입된 polyethylene tube에 연결된 pressure transducer (Grass, West Warwick, U.S.A.)를 통하여 MacLab과 macintosh computer로 구성된 data acquisition system으로 각각 30분 동안 측정하였다²⁸⁾.

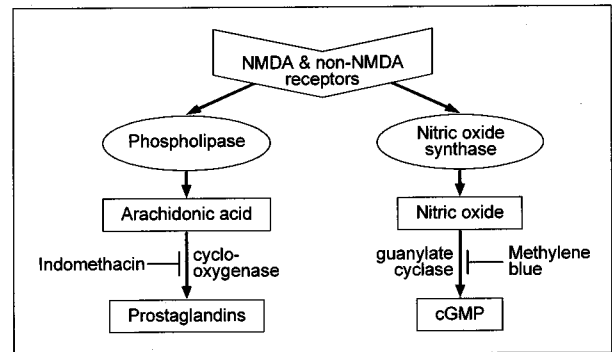


Fig. 1. Mechanisms of action of indomethacin and methylene blue as inhibitors of cyclooxygenase and guanylate cyclase, respectively.

2) 뇌허혈 흰쥐 유발

Longa 등의 방법²⁹⁾에 따라 중대뇌동맥 (middle cerebral artery, MCA) 폐색법을 이용하였다. 병태 모델은 정상 흰쥐의 중경동맥과 외경동맥을 절찰하고, 내·외경동맥의 분지점으로부터 내경동맥내로 외경동맥을 통하여 3-0 단선조 나일론 봉합사를 삽입함으로써 MCA 기저부를 폐색시켰다. 120분 후 내경동맥내에 삽입되어 있는 단선조 나일론 봉합사를 MCA 기저부로부터 제거해 줌으로써 혈액을 재관류시켰다.

3) 뇌허혈 유발 흰쥐의 혈청 내 사이토카인 양 측정

(1) 채혈 및 혈청분리

뇌허혈을 유발시킨 후 계혈등 추출물을 투여하지 않은 대조군과 계혈등 추출물 (10 mg/kg, i.p.)을 투여한 실험군으로 분류하였다. 이후 MCA 폐색 1시간 후와 재관류 1시간 후에 병태 모델의 대퇴동맥에서 혈액을 1.0 ml 채혈하였다. 채혈시에는 반드시 국소 뇌혈류량과 평균 혈압이 변화되지 않도록 하기 위하여 조심스럽게 5.0 ml 주사기를 통해 채혈하였고, 만약 채혈시 국소 뇌혈류량과 평균 혈압의 변동이 발생되면 사이토카인 생성을 측정 혈청으로 사용하지 않았다. 채혈 후 30분 동안 실온에 방치한 후 3,000 × g로 30분 동안 원심 분리시킨 후 혈청만을 취해 냉동 보

관하면서 필요시마다 해동시켜 사용하였다.

(2) Interleukin (IL)-1 β 양 측정

뇌허혈 유발 흰쥐의 혈청 내에서 생성되는 IL-1 β 양 측정은 rIL-1 β ELISA kit (Biosource, CA, U.S.A.)를 이용하였다. 96 well plate에 rIL-1 β standard diluent buffer (SDB) 100 μ l를 넣은 후, 나머지 well에는 혈청 50 μ l와 SDB 50 μ l를 넣은 다음 실온에서 3시간 방치한 뒤 washing buffer (WB)로 4회 세척하였다. 이후 각 well에 biotin-labeled anti-rIL-1 β 100 μ l를 넣은 후 실온에서 1시간 방치한 다음 WB로 4회 세척하였다. 이후 각 well에 streptavidin-HRP 100 μ l를 넣은 다음 실온에서 30분 동안 방치한 뒤 WB로 4회 세척한 후 stabilized chromogen (SC) 100 μ l를 넣은 다음 빛을 차단시킨 실온에서 30분 동안 방치하였다. 이후 stop solution (SS) 100 μ l를 넣은 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다^{30,31)}.

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

뇌허혈 유발 흰쥐의 혈청 내에서 생성되는 TNF- α 양 측정은 rTNF- α ELISA kit (Biosource, CA, U.S.A.)를 이용하였다. 96 well plate에 rTNF- α SDB 50 μ l를 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 90분 동안 incubation한 다음 WB로 4회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해 놓은 streptavidin-HRP를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 다시 실온에서 45분 동안 incubation한 후 WB로 4회 세척하였다. 그 다음 SC를 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30분 동안 incubation한 후 SS를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다^{32,33)}.

(4) IL-10 양 측정

뇌허혈 유발 흰쥐의 혈청 내에서 생성되는 IL-10 양 측정은 rIL-10 ELISA kit (Biosource, CA, U.S.A.)를 이용하였다. 96 well plate에 SDB를 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 2시간 동안 incubation한 다음 WB로 4회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해 놓은 streptavidin-HRP를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 다시 실온에서 30분 동안 incubation한 후 WB로 4회 세척하였다. 그 다음 SC를 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30분 동안 incubation한 후 SS를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다^{34,35)}.

(5) Transforming growth factor (TGF)- β 1 양 측정

뇌허혈 유발 흰쥐의 혈청 내에서 생성되는 TGF- β 1 양 측정은 TGF- β 1 ELISA kit (Biosource, CA, U.S.A.)를 이용하였다. 96 well plate에 SDB를 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 3시간 동안 incubation한 다음 WB로 4회 세척하였다. 이후 희석하여 준비해 놓은 streptavidin-HRP를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 다시 실온에서 30분 동안 incubation한 후 WB로 4회 세척하였다. 그 다음 SC를 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 빛이 차단된 실온에서 30분

동안 incubation한 후 SS를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다^{36,37)}.

3. 통계처리

계혈등 추출물이 국소 뇌혈류량 및 평균 혈압에 미치는 효과를 각각 30분 단위로 합산 통계 처리하였고, 각 군 간의 유의성 검정은 SigmaPlot 9.0의 student's paired and/or unpaired t-test에 의하였으며, p-value는 0.05 미만인 경우에만 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량 작용기전 관찰

계혈등 추출물 투여로 변화된 국소 뇌혈류량의 작용기전을 알아보기 위하여 계혈등 추출물 투여로 유의성 있게 증가된 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량을 대조군으로, cyclooxygenase의 억제제인 인도메타신을 전처치한 다음 계혈등 추출물 투여로 변화된 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량을 인도메타신 처리군으로, guanylate cyclase의 억제제인 메틸렌블루를 전처치한 다음 계혈등 추출물 투여로 변화된 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량을 메틸렌블루 처리군으로 하였다.

인도메타신을 전처치하고 계혈등 추출물을 투여하지 않았을 때의 국소 뇌혈류량 기저치를 100.00 \pm 9.24%라 하였을 때, 인도메타신을 전처치한 후 계혈등 추출물을 용량별 (0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg, 10.0 mg/kg, i.p.)로 투여한 인도메타신 처리군의 국소 뇌혈류량은 각각 102.76 \pm 6.21%, 109.85 \pm 7.00%, 116.42 \pm 9.46%, 129.37 \pm 7.89%로 투여 용량에 비례하여 증가되었으나 대조군의 국소 뇌혈류량과 유사한 변화를 나타내었다.

메틸렌블루를 전처치하고 계혈등 추출물을 투여하지 않았을 때의 국소 뇌혈류량 기저치를 100.00 \pm 7.59%라 하였을 때, 메틸렌블루를 전처치한 후 계혈등 추출물을 용량별로 투여한 메틸렌블루 처리군의 국소 뇌혈류량은 각각 100.94 \pm 6.74%, 102.68 \pm 5.64%, 112.12 \pm 6.94%, 115.24 \pm 6.56%로 투여 용량에 비례하여 증가되었으나 대조군의 국소 뇌혈류량 변화보다는 유의성 (p<0.05)있게 감소되었다(Fig. 2).

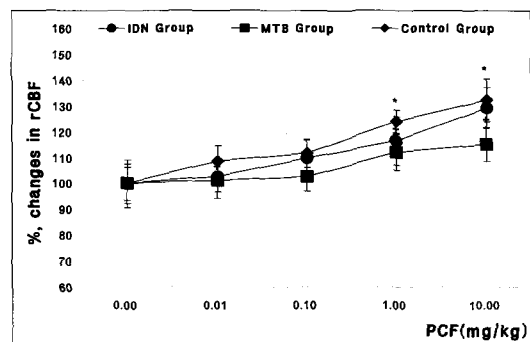


Fig. 2. Effects of pretreatment with indomethacin and methylene blue on the PCF-induced changes in rCBF in normal rats. PCF : Patholobi Caulis freeze dried powder, rCBF : regional cerebral blood flow, IDN Group : indomethacin (1 mg/kg, i.p.) treated group, MTB Group : methylene blue (10 μ g/kg, i.p.) treated group, Control Group : non-treated group. The data are expressed as Mean \pm SE of 6 experiments. * : Statistically significant compared with 0 mg/kg group (* : p<0.05). + : Statistically significant compared with Control group (+ : p<0.05).

2. 정상 흰쥐의 평균 혈압 작용기전 관찰

계혈등 추출물 투여시 변화되지 않은 평균 혈압과 혈관 확장 인자와의 관계를 알아보기 위하여 계혈등 추출물 투여시 나타난 정상 흰쥐의 평균 혈압을 대조군으로, 인도메타신을 전처치한 다음 계혈등 추출물 투여시 변화된 정상 흰쥐의 평균 혈압을 인도메타신 처리군으로, 메틸렌블루를 전처치한 다음 계혈등 추출물 투여시 변화된 정상 흰쥐의 평균 혈압을 메틸렌블루 처리군으로 하였다.

인도메타신을 전처치하고 계혈등 추출물을 투여하지 않았을 때의 평균 혈압 기저치를 100.00±4.89%라 하였을 때, 인도메타신을 전처치한 후 계혈등 추출물을 용량별로 투여한 인도메타신 처리군의 평균 혈압은 각각 99.86±7.02%, 103.22±6.52%, 107.37±6.91%, 113.35±6.41%로 투여 용량에 비례하여 증가되었고, 대조군의 평균 혈압보다도 증가되었다.

메틸렌블루를 전처치하고 계혈등 추출물을 투여하지 않았을 때의 평균 혈압 기저치를 100.00±6.10%라 하였을 때, 메틸렌블루를 전처치한 후 계혈등 추출물을 용량별로 투여한 메틸렌블루 처리군의 평균 혈압은 각각 99.70±5.62%, 100.72±4.46%, 101.49±4.01%, 101.50±4.85%로 대조군의 평균 혈압보다 감소되었다(Fig. 3).

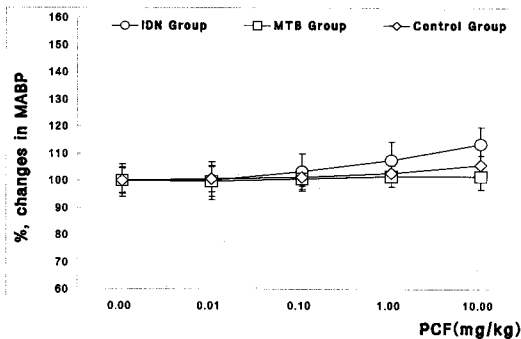


Fig. 3. Effects of pretreatment with indomethacin and methylene blue on the PCF-induced changes in MABP in normal rats. MABP : mean arterial blood pressure. The data are expressed as Mean±SE of 6 experiments. Legends are the same as Fig. 2.

3. 뇌허혈 유발 흰쥐의 혈청에서 생성되는 사이토카인 양에 미치는 효과

1) 중대뇌동맥 폐색 1시간 후 생성되는 사이토카인 양에 미치는 효과
 뇌허혈 흰쥐의 혈청에서 생성되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 중대뇌동맥 폐색법으로 뇌허혈을 유발시킨 후 계혈등 추출물 (10 mg/kg, i.p.)을 투여하고, 유발 1시간이 경과된 다음 뇌허혈 흰쥐에서 혈청만을 취하여 생성되는 사이토카인 양을 측정하였다.

염증 매개 사이토카인의 경우, 대조군의 혈청에서 생성되는 IL-1β의 양을 100.00±1.94%라 하였을 때 계혈등 추출물 투여군의 혈청에서 생성되는 IL-1β의 양은 93.82±1.67%로 대조군보다 유의성 (p<0.05) 있게 감소되었고, 대조군의 혈청에서 생성되는 TNF-α의 양을 100.00±1.93%라 하였을 때 계혈등 추출물 투여군의 혈청에서 생성되는 TNF-α의 양은 91.38±1.45%로 대조군보다 유의성 (p<0.01)있게 감소되었다.

항염증 사이토카인의 경우, 대조군의 혈청에서 생성되는 IL-10의 양을 100.00±4.40%라 하였을 때 계혈등 추출물 투여군의

혈청에서 생성되는 IL-10의 양은 118.00±6.06%로 대조군보다 유의성 (p<0.05) 있게 증가되었고, 대조군의 혈청에서 생성되는 TGF-β1의 양을 100.00±6.81%라 하였을 때 계혈등 추출물 투여군의 혈청에서 생성되는 TGF-β1의 양은 110.32±6.81%로 대조군에 비해 증가되었다(Fig. 4).

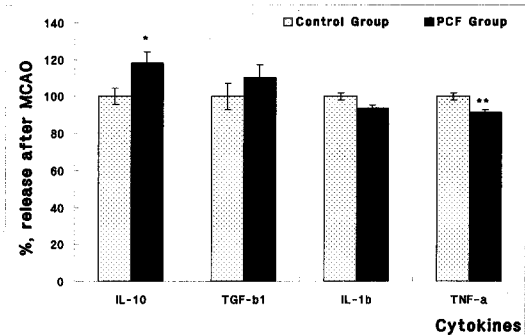


Fig. 4. Effect of PCF on the production of cytokines in the serum from femoral arterial blood 1 hr after right middle cerebral artery occlusion. PCF : *Patholobi Caulis freeze dried powder* (10 mg/kg, i.p.) The data are expressed as Mean±SE of 6 experiments. * : Statistically significant compared with Control group (* : p<0.05, ** : p<0.01).

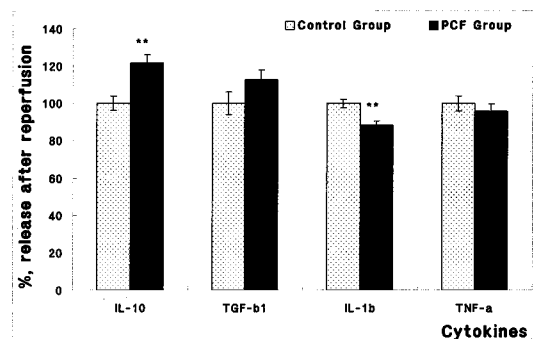


Fig. 5. Effect of PCF on the production of cytokines in the serum from femoral arterial blood 1 hr after reperfusion. The data are expressed as Mean±SE of 6 experiments. * : Statistically significant compared with Control group (** : p<0.01). Legends are the same as Fig. 4.

2) 재관류 1시간 후 생성되는 사이토카인 양에 미치는 효과

뇌허혈 유발 흰쥐의 혈청에서 생성되는 사이토카인 양을 알아보기 위하여 중대뇌동맥 폐색법으로 유발된 뇌허혈 흰쥐의 혈류를 재관류시킨 다음 1시간이 경과된 후 뇌허혈 흰쥐에서 혈청만을 취하여 생성되는 사이토카인 양을 측정하였다.

염증 매개 사이토카인의 경우, 대조군의 혈청에서 생성되는 IL-1β의 양을 100.00±2.29%라 하였을 때 계혈등 추출물 투여군의 혈청에서 생성되는 IL-1β의 양은 88.48±2.15%로 유의성 (p<0.01) 있게 감소되었고, 대조군의 혈청에서 생성되는 TNF-α의 양을 100.00±4.05%라 하였을 때 계혈등 추출물 투여군의 혈청에서 생성되는 TNF-α의 양은 95.62±4.09%로 대조군에 비해 감소되었다. 항염증 사이토카인의 경우, 대조군의 혈청에서 생성되는 IL-10의 양을 100.00±3.91%라 하였을 때 계혈등 추출물 투여군의 혈청에서 생성되는 IL-10의 양은 121.84±4.09%로 대조군에 비해 유의성 (p<0.01) 있게 증가되었고, 대조군의 혈청에서 생성되는 TGF-β1

의 양을 $100.00 \pm 6.16\%$ 라 하였을 때 계혈등 추출물 투여군의 혈청에서 생성되는 TGF- β 1의 양은 $112.62 \pm 5.43\%$ 로 대조군에 비해 증가되었다(Fig. 5).

고 찰

뇌는 생명을 유지시켜주는 중추적인 역할을 하는 장기로 전체 혈액량에 있어서는 18%, 즉, 분당 18 ml/100 mg씩, 700~800 ml가 흐르나^{9,10)} 만약 뇌혈관 폐색 등으로 인하여 뇌로 공급되는 혈류량 중 20% 이상이 감소하게 되면 산소와 글루코스 공급이 감소하게 되고, 이로 인한 일련의 생화학적 반응, 즉 세포막의 붕괴와 신경세포에 필요한 에너지를 방해하려는 다양한 기전들이 발생해 허혈성 뇌손상이 유발된다^{8,9,11)}.

혈류 감소로 인해 나타나는 허혈성 뇌질환은 뇌혈관의 순환 장애로 인해 뇌신경세포의 손상이 야기됨으로써 의식, 운동, 감각 및 반사장애등이 나타나는데¹²⁾, 뇌 신경세포의 손상 정도는 허혈의 기간과 이 기간 중에 공급되는 뇌혈류량에 따라 달라진다³⁸⁾.

鷄血藤은 콩과에 속한 蜜花豆의 藤莖을 건조한 것으로 活血去瘀, 行血, 舒筋, 活絡하는 효능이 있어 手足麻木, 肢體癱瘓 및 關節酸痛과 月經不調 및 痛經 등의 병증에 활용되어 왔고^{1,3)}, 약리작용으로는 순환기 계통의 혈액순환 및 혈액응고에 관여하여 혈압 강하작용, 혈중 지질 및 동맥경화 억제작용, 항암작용이 있는 것^{4,5)}으로 밝혀져 혈액순환을 돕고 혈류 순환을 촉진시킨다⁶⁾. 계혈등에 관련된 연구들로는 류마티드 관절염 병태 모델에 계혈등을 투여한 결과 T 세포와 B 세포를 증가시켜 류마티드 관절염 발생을 억제하였고²²⁾, 항산화 효과^{23,24)} 및 matrix metalloproteinase-1의 활성을 저해시키는 효과 등이 있어 항노화 소재로서의 개발 가능성이 있으며²⁴⁾, 그 외 항염증 효과³⁹⁾, 지질 대사 조절 효과⁴⁰⁾, 조절과 면역조절 작용⁴¹⁾ 및 자궁에 관련된 암종에 항암 효과^{25,26)}가 있음이 보고 되어있다. 최근에는 뇌혈류량 및 Lactate Dehydrogenase (LDH) 활성에 관한 연구²⁷⁾에서 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량을 투여 용량에 비례해 유의성 있게 증가시켰고, 뇌허혈 흰쥐의 불안정한 국소 뇌혈류량을 유의성 있게 안정적으로 개선시켰으며, 생쥐의 신경세포에 N-methyl-D-aspartic acid를 처리한 결과 LDH 활성도가 유의성 있게 억제되었다 보고되었다.

이에 계혈등 추출물 (PCF)이 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량과 평균 혈압에 미치는 작용 기전을 혈관 확장 억제제를 이용하여 살펴보고, 동시에 뇌허혈 - 재관류 시 각종 염증 반응이 나타나므로 중대뇌동맥 폐색법 (MCAO)으로 유발된 뇌허혈 흰쥐의 혈청 내 염증 매개 사이토카인과 항염증 사이토카인의 양을 측정하였다.

혈관 확장은 혈류 변화 및 산소 농도 변화 등에 의해 혈관내피세포에서 생성되는 endothelium-derived relaxing factor (EDRF)와 prostaglandin 등이 혈관 평활근을 이완시킴으로써 나타나고, 혈관 확장에 관여하는 EDRF 중 가장 잘 알려진 것으로는 nitric oxide (NO)가 있다^{34,42)}. NO 중 constitutive NO synthase에서 생성되는 것은 혈소판과 혈관에서 guanylate cyclase를 활성화시켜 세포내 2차 전령 물질인 cGMP의 양을 증

가시킴으로써 혈관 확장을 일으키고 혈관 내피세포나 혈소판끼리의 부착 및 응집을 억제시키는 작용을 한다^{43,44)}. Prostaglandin은 세포막에서 유리되는 arachidonic acid가 cyclooxygenase에 의하여 생성되는데 혈소판의 응집을 억제시키고 심박출량과 장장으로 공급되는 혈류를 증가시킨다⁴²⁾.

계혈등 추출물 투여로 유의성 있게 증가된 국소 뇌혈류량이 뇌혈관의 직경 확장에 의한 것인지에 대하여 알아보고자 cyclooxygenase의 억제제인 인도메타신⁴⁵⁾을 전처치한 후 계혈등 추출물을 투여한 결과, 인도메타신 처리군의 국소 뇌혈류량은 유의성 있게 증가된 대조군의 국소 뇌혈류량보다 감소되었지만 평균 혈압의 경우는 증가된 대조군의 평균 혈압보다 더욱 증가되었다(Fig. 2, 3). Guanylate cyclase의 억제제인 메틸렌블루⁴⁶⁾를 전처치한 후 계혈등 추출물을 투여한 결과, 메틸렌블루 처리군의 국소 뇌혈류량은 유의성 있게 증가된 대조군의 국소 뇌혈류량보다 유의성 있게 감소되었고, 평균혈압도 증가된 대조군의 평균 혈압보다 감소되었다(Fig. 2, 3).

이와 같은 결과를 고찰하여 보면, Shin 등⁴⁷⁻⁴⁹⁾은 메틸렌블루 전처치로 국소 뇌혈류량이 감소되는 것은 cGMP의 생성효소인 guanylate cyclase와 관련이 있다는 보고와 Bakalova⁵⁰⁾와 Okamoto 등⁵¹⁾이 인도메타신 처리로 국소 뇌혈류량이 감소되는 것은 cyclooxygenase와 관련이 있다고 보고한 것 등에 미루어 볼 때, 계혈등 추출물 투여로 유의성 있게 증가된 국소 뇌혈류량은 guanylate cyclase와 cyclooxygenase의 활성화와 모두 관련이 있는 것으로 생각된다. 하지만 평균 혈압의 변화를 관찰해보면 인도메타신을 전처치한 후 오히려 평균 혈압이 더욱 증가되는 것으로 볼 때 국소 뇌혈류량과 평균 혈압 등 전반적인 뇌혈류역학적 측면에서 고찰해보면, 계혈등 추출물 투여로 인해 증가된 뇌혈류량은 guanylate cyclase의 활성화로 뇌혈관이 확장된 결과라 생각된다.

실험적으로 뇌허혈을 야기시키는 방법 중 동물을 이용한 중대뇌동맥의 폐색법은 시술이 시술이 비교적 용이하고, 頭蓋의 절개도 필요 없을 뿐만 아니라 뇌허혈 기간 중 흰쥐의 사망을 최소화할 수 있으며⁵²⁾, 後腦 (소뇌, 뇌교, 연수)의 작용과 후방 순환시 혈류에 영향을 미치지 않아 호흡과 체순환에 무리가 되지 않는다는 측면에서 허혈로 인한 신경손상의 병태 모델로 연구에 활용되고 있다⁵³⁻⁵⁶⁾.

뇌허혈이 일어나면 염증 반응에 의한 허혈성 뇌조직 손상이 더욱 더 진행되고^{57,58)}, 이때 각종의 사이토카인들이 작용하게 된다. 그 중 염증에 관여하는 IL-1 β 는 대식세포, 림프구 및 내피세포 등의 세포에서 유리되는 것으로 내독소, 물리적 손상이나 염증반응에 의해 유발되고, TNF- α 는 종양의 출혈성 괴사 및 염증반응에 관여하며, 염증의 급성기에 IL-1 β 와 TNF- α 가 서로 작용하여 생성이 촉진되기도 한다^{59,60)}. 그러나 반대로 염증 매개 사이토카인을 억제하는 항염증 사이토카인인 IL-10은 IL-1 β 와 TNF- α 를 생성하는 대식세포의 생성을 억제하고, TGF- β 1은 혈소판 및 내피세포 등에서 생성되는 것으로 대식세포에서 생성되는 NO의 양 등을 불활성화시킨다^{8,60)}.

뇌허혈시 IL-1 β 와 TNF- α 는 상승되고^{61,62)}, IL-10과 TGF- β 1은 재관류시 나타나는 뇌손상을 감소시키기 때문에⁶³⁾, 계혈등 추출

물이 염증 매개 사이토카인과 항염증 사이토카인에 미치는 영향을 관찰한 결과, 중대뇌동맥 폐색 1시간 후 항염증 사이토카인인 IL-10 양은 계열등 추출물 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었고, 염증 매개 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α 양은 계열등 추출물 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 4). 재관류 1시간 후에도 계열등 추출물 투여군의 IL-10 양은 대조군보다 유의성 있게 증가되었지만 IL-1 β 의 양은 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5).

이와 같은 결과는 IL-10이 cGMP와 관련되어 있고⁶⁴⁾, cGMP가 IL-1 β , TNF- α 및 산소자유기를 억제하며⁶⁵⁾, IL-10은 급성시조기 치료기전으로 작용하여 뇌손상을 감소시킨다는 것^{66,67)}에 근거해 볼 때, 계열등 추출물은 cGMP의 생성효소인 guanylate cyclase를 활성화시켜 뇌혈관의 직경을 확장시키고, 허혈로 인한 뇌손상 초기에 IL-10을 활성화시켜 염증 매개 사이토카인인 IL-1 β 를 감소시킴으로써 항허혈 작용을 나타낸 것으로 생각된다.

결 론

계열등 추출물이 일과성 뇌허혈에 미치는 작용 기전을 알아보고자 정상 흰쥐의 뇌혈류역학에 미치는 작용 기전과 뇌허혈 흰쥐의 혈청 내 사이토카인 양을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

계열등 추출물로 유의성 있게 증가된 국소 뇌혈류량은 혈관 확장 인자 중 guanylate cyclase의 억제제인 메틸렌블루를 전처치하였을 때 유의성 있게 억제되었고, 평균 혈압도 대조군의 변화에 비해 억제되었다. 계열등 추출물로 유의성 있게 증가된 국소 뇌혈류량은 혈관 확장 인자 중 cyclooxygenase의 억제제인 인도메타신을 전처치하였을 때 대조군보다 억제되었으나 평균 혈압은 대조군의 변화보다 오히려 증가되었다. 계열등 추출물은 뇌허혈 유발 1시간 후 흰쥐의 혈청내 염증 매개 사이토카인인 IL-1 β 와 TNF- α 양을 유의성 있게 감소시킨 반면 항염증 사이토카인인 IL-10의 양을 유의성 있게 증가시켰다. 계열등 추출물은 재관류 1시간 후 흰쥐의 혈청내 염증 매개 사이토카인인 IL-1 β 양을 유의성 있게 감소시킨 반면 항염증 사이토카인인 IL-10의 양을 유의성 있게 증가시켰다.

이상의 결과, 活血化痰 약물인 계열등 추출물은 guanylate cyclase와 관련되어 뇌혈류를 개선시켰고, 항염증 사이토카인의 생성을 촉진시키는 동시에 염증 매개 사이토카인의 생성을 억제시켜 항허혈 효과를 나타내었다.

참고문헌

1. 趙學敏. 本草綱目拾遺. 商務印書館香港分館, 香港, pp 260-262, 1986.
2. 全韓國醫科大學 本草學教授 共編. 本草學, 永林社, 서울, pp 445-446, 1999.
3. 常敏毅. 抗癆本草, 湖南科學技術出版社, 長沙, pp 171-172, 1987.
4. 鄭虎占. 中藥現代研究與應用, 學苑出版社, 北京, pp 2539-2546, 1998.

5. 李宇彬. 抗癆中藥藥理與應用, 黑龍江科學技術出版社, 黑龍江, pp 745-747, 1999.
6. Kang, I.C., Kim, S.A., Song, G.Y., Beak, N.I., Park, Y.D., Ryu, S.Y., Saiki, I., Kim, S.H. Effects of the ethyl acetate fraction of *Patholobi caulis* on tumor cell aggregation and migration, *Phytother. Res.* 17: 163-167, 2003.
7. 김상호, 문형배, 서재홍, 정동규, 정상우. 일반병리학, 고문사, 서울, pp 146-147, 1995.
8. 대한병리학회. 병리학. 고문사, 서울, pp 33-34, 87-99, 127-129, 452-455, 475-484, 1263-1264, 1994.
9. 의과대학 신경해부학교수 편. 증례를 통한 임상신경해부학. 한우리, 서울, p 191, 1998.
10. 김인세. 뇌허혈과 뇌보호, 대한마취과학회지 33: 195-203, 1997.
11. 이경은, 김경환. 허혈, 재관류 손상에서 뇌조직 아민 변동과 Free Radical과의 관련성, 大韓神經科學會誌 8(1):2-8, 1990.
12. Schubert, J., Brill, W.A. Antagonism of experimental cyanide toxicity in relation to the in vivo activity of cytochrome oxidase, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 162(2):352-359, 1968.
13. 이금수, 정현우, 강성용. 석창포가 백서의 뇌연막동맥의 직경에 미치는 기전연구, 대한본초학회지 15(2):1-7, 2000.
14. 강성용, 이원석, 정현우, 한중현. 청피의 실험적 연구(I), 대한방제학회지 8(1):329-342, 2000.
15. 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.
16. 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.
17. 임광모, 박철훈, 정현우. 자음건비탕가지각·천마가 뇌세포 및 뇌혈류역학 변동에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 17(1):64-70, 2003.
18. 정현우. 자음건비탕가지각·천마가 뇌허혈 동물의 뇌혈류역학 변동 개선에 미치는 작용기전, 동의생리병리학회지 17(5): 1194-1201, 2003.
19. 조규선, 정승현, 신길조, 이원철. 牛黃清心元이 중대뇌동맥 결찰로 유발된 뇌허혈에 미치는 영향, 대한한의학회지 22(1):78-89, 2001.
20. 김희성, 이상록, 정현우. 육군자탕이 뇌허혈에 미치는 억제효과, 동의생리병리학회지 18(2):419-426, 2004.
21. 박철훈, 배인태, 정현우. 팔물탕이 뇌혈류역학 변화에 미치는 효과, 동의생리병리학회지 18(4):1014-1020, 2004.
22. 崔貞植, 宋泰元, 金東熙. 鷄血藤이 collagen으로 유발된 생쥐의 關節炎 抑制에 관한 研究, 大韓本草學會誌 18(3):79-88, 1003.
23. 차배천, 이은희, 노미애. 계열등의 항산화 활성, 생약학회지 36(1):50-55, 2005.
24. 심관섭, 김진화, 이동환, 박성민, 표형배, 장영희, 이범천. 계열등 추출물의 항산화와 사람 피부 섬유아세포에서의 Matrix Metalloproteinase-1 발현저해 효과, 한국생물공학회지 20(1):40-45, 2005.

25. 박영선, 백승희. 鷄血藤의 beta-sitosterol 성분이 자궁근종세포의 증식억제와 세포자멸사의 유동에 미치는 영향, 대한한방부인과학회지 18(1):181-191, 2005.
26. 김병희, 백승희. 鷄血藤이 자궁경부암세포의 세포자멸사 유도와 관련 유전자 발현에 미치는 영향, 대한한방부인과학회지 18(1):169-180, 2005.
27. 이상록, 정현우. 계혈등이 뇌혈류량 및 Lactate Dehydrogenase 활성에 미치는 실험적 효과, 동의생리병리학회지 20(1):25-30, 2006.
28. 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.
29. 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.
30. Trembaly, L.F., Valenza, S.P. and Ribello, J.L. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model, J. Clin. Invest 99(5):944-952, 1999.
31. 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.
32. 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.
33. Rivera, D.L., Ollister, 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 이광주, 정희원. 임상신경학, 고려의학, 서울, pp 128-131, 203-204, 1997.
39. Li, R.W., Lin, G.D., Myers, S.P., Leach, D.N. Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants, J. Ethnopharmacol. 85: 61-67, 2003.
40. Wang, W., Wang, J., Zhao, D., Liu, H., Zhou, W., Chen, K.: Comparison of Spatholobus suberectus Dunn, Euonymus alatus (Thunb.) Sied and Eupolyphaga sinensis Walker on regulation of plasma lipid, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 16: 299-301, 1991.
41. 吳馨淑. 鷄血藤 抽出物이 생쥐의 造血 및 免疫作用에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 2000.
42. 김경환. 이우주의 약리학 강의(제4판), 의학문화사, 서울, pp 82, 120-124, 432-442, 146, 355, 397, 404, 1998.
43. Palmer, P.M.J., Ferrige, A.G. and Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biology activity of endothelium derived relaxing factor, Nature 327: 524-526, 1990.
44. Shibuki, K. and Okada, D. Endogenous nitric oxide release required for long term synaptic depression in the cerebellum, Nature 349: 326-328, 1991.
45. 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.
46. 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.
47. Shin, H.K., Shin, Y.W., Hong, K.W. Role of adenosine A(2B) receptors in vasodilation of rat pial artery and cerebral blood flow autoregulation, Am J. Physiol Heart Circ Physiol. 278(2):339-344, 2000.
48. Yamamoto, S., Nishizawa, S., Yokoyama, T., Ryu, H., Uemura, K. Subarachnoid hemorrhage impairs cerebral blood flow response to nitric oxide but not to cyclic GMP in large cerebral arteries, Brain Res. 757(1):1-9, 1997.
49. Iadecola, C., Zhang, F., Xu, X. SIN-1 reverses attenuation of hypercapnic cerebrovasodilation by nitric oxide synthase inhibitors, Am J. Physiol. 267(1Pt 2):228-235, 1994.
50. 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.
51. 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.
52. 김인세, 박두진, 권재영, 김해규, 백승완, 신상욱. 백서의 중대 뇌동맥 폐쇄에 의한 허혈성 뇌손상 모델에서 Dexamethasone과 MK-801이 뇌부종 형성에 미치는 영향, *대한마취학회지* 37: 327-333, 1999.
 53. Petito, C.K., Feldmann, E., Pulsinelli, W.A., Plum, F. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest, *Neurology* 37(8):1281-1286, 1987.
 54. Abe, K., Aoki, M., Kawagoe, J., Yoshida, T., Hattori, A., Kogure, K., Itoyama, Y. Ischemic delayed neuronal death ; A mitochondrial hypothesis, *Stroke* 26(8):1478-1489, 1995.
 55. Hergruido, M.J., Carceller, F., Roda, J.M. and Avendano, C. Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rat ; A critical assessment, *Neuroscience* 93: 71-80, 1999.
 56. Schmidt-Kastner, R.K., Freund, T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia, *Neuroscience* 40: 599-636, 1991.
 57. 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.
 58. 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.
 59. 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.
 60. 하대유 외 25인. *면역학*, 고문사, 서울, pp 100-105, 1994.
 61. 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.
 62. 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.
 63. 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.
 64. Lei, Y., Zhen, J., Ming, X.L., Jian, H.K. Induction of higher expression of IL-beta and TNF-alpha, lower expression of IL-10 and cyclic guanosine monophosphate by pulmonary arterial hypertension following cardiopulmonary bypass, *Asian J. Surg.* 25(3):203-208, 2002.
 65. Schubert, P., Morino, T., Miyazaki, H., Ogata, T., Nakamura, Y., Marchini, C., Ferroni, S. Cascading glia reactions ; a common pathomechanism and its differentiated control by cyclic nucleotide signaling, *Ann. N. Y. Acad Sci.* 903: 24-33, 2000.
 66. 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.
 67. Di Santo, E., Sironi, M., Pozzi, P. Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin-1 beta production in the brain without affecting the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, *Neuroimmunomodulation* 2(3):149-154, 1995.