

廣豆根 분획물이 中大腦動脈閉鎖에 의한 뇌허혈손상에 미치는 효과(I) - 행동평가를 기준으로

최문석 · 김연섭*

경원대학교 한의과대학 해부경철학교실

Effect of Sophora Subprostrata Fractions on Focal Ischemic Brain Damage Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats(I)

Moon-Seok Choi, Youn-Sub Kim*

Department of Anatomy-Pointology College of Oriental Medicine, Kyungwon University

This research was performed to investigate protective effect of Sophora Subprostrata fractions against focal ischemic brain damage after middle cerebral artery(MCA) occlusion. Rats were divided into six groups: MCA-occluded group(Control); each administered groups with Sophora Subprostrata total phase(Total), Sophora Subprostrata Aqueous phase (Aqueous), Sophora Subprostrata BuOH phase(BuOH), and Sophora Subprostrata Alkaloid phase(Alkaloid) after MCA-occlusion; sham-operated group(Sham). The right MCA was occluded by A poly-L-lysine coated 4-0 nylon suture thread through the internal carotid artery permanently. Sophora Subprostrata and fractions were administered orally(5mg/ml) for 7 days after MCA-occlusion. The behavior of ischemic rats were examined at 24 hours, 3, 5 and 7 days after MCA-occlusion from the views of 4 different aspects: posture & balance tests(4 subtests), reflex tests(6 subtests), muscle-tone tests(3 subtests), and foot-fault test. The results showed that 1) in muscle tone test, Sophora Subprostrata total phase only increased reduced muscle tone function from 3 to 7 days, 2) in reflex test, Sophora Subprostrata total and Aqueous phase increased fast recovery from 24 hours and 3 days, 3) in posture & balance test, Sophora Subprostrata total and Aqueous phase increased fast recovery from 24 hours, and Sophora Subprostrata BuOH and Alkaloid phase increased posture & balance function from 3 days, but 4) in motor function test, Sophora Subprostrata did not show effective recovery compared with control group. In conclusion, Sophora Subprostrata has protective effects against brain damage at the early stage of focal cerebral ischemia. Sophora Subprostrata total and Aqueous phase produced more pronounced protective effect against focal ischemic brain damage.

Key words : Ischemia, Neuroprotection, MCA-occlusion, Behavior, Sophora Subprostrata

서론

뇌중풍은 특별한 전조증상 없이 갑자기 일어나므로 환자 대부분이 뇌신경세포손상을 막아내기 어려울 뿐만 아니라 손상된 뇌 조직은 재생되지 않으므로 경색이나 출혈이 있었던 부위에 섬유 교증반흔(fibrogliotic scar)을 남긴다^{1,2)}. 아울러 이미 손상된 뇌세포들은 뇌신경조직 특성상 원상회복에 한계성을 가지고 있어 재생시킬 수 있는 효과적인 치료제도 아직 없는 실정이다. 하지만 세

포자살(apoptosis)과 비슷한 양상으로 뇌허혈 뒤 약 5-7일 정도 나타나는 지연성 신경세포괴사(delayed neuronal cell death)^{3,4)}시기에 신경방어효과를 가진 약물에 의한 처치는 2차적 신경세포퇴화를 막을 수 있는데, 허혈 발생 뒤 처치가 빠를수록 더욱 높은 효과를 가질 수 있다⁵⁾. 그러므로 뇌중풍은 예방과 더불어 발병 초기 뇌조직손상을 최대한 줄이는 것이 가장 좋은 치료방법이다^{6,7)}.

이에 저자는 뇌허혈손상에 대한 보호효과가 기대되는 廣豆根을 분획하여 허혈성 뇌손상 초기·졸중기에 나타나는 뇌조직 변화와 행동학적 결손에 미치는 효과를 관찰하고자, 중대뇌동맥(MCA, middle cerebral artery)을 폐쇄한 흰쥐에게 廣豆根 전층과 분획물들을 경구 투여한 다음 7일 동안 행동학적 결손을 비교

* 교신저자 : 김연섭, 성남시 수정구 복정동 산65 경원대학교 한의과대학

· E-mail : ysk@kyungwon.ac.kr, · Tel : 031-750-5420

· 접수 : 2005/03/19 · 수정 : 2005/04/20 · 채택 : 2005/05/18

관찰한 바, 유의한 효능이 있어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로 Sprague-Dawley계(Charls River, U.S.A.) 체중 180±20g 수컷 흰쥐를 대한실험동물센터에서 구입 사용하였다. 물과 pellet사료(제일사료주식회사, 대전)를 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실 내 온도를 22.5±1.5℃, 습도를 50±10%로 유지하였고, 낮과 밤 주기를 각각 12시간으로 하였다. 실험실 환경에 2주간 적응시킨 다음 실험하였으며, 실험할 때 흰쥐 체중은 242±12g이었다.

2. 약물 조제와 투여

廣豆根 전층과 분획물 추출과정은 다음과 같다. 경희의료원에서 구입한 中國 廣西省產 廣豆根(*Sophora Subprostrata*) 500g을 round flask에 정제수 3,000ml와 함께 넣고, 냉각기가 부착된 전탕기에서 2시간 동안 가열한 다음, 여과포로 여과한 여액을 감압 농축하는 방법으로 2회 시행하여 廣豆根 1,000g에서 농축액 500ml를 얻었다. 농축액 500ml 가운데 50ml를 먼저 동결 건조해 분획전 전층 15.6g을 얻고 나머지 농축액 450ml를 분획하여 분획물을 얻었는데, 맨 처음 hexan층(hexane phase) 0.02g을 얻고, 다음 단계로 클로로포름층(CHCl₃ phase) 1.04g, 알칼로이드층(alkaloid phase) 3.99g, 부탄올층(BuOH phase) 5.33g 및 분획 뒤 남은 물층(water phase) 46.12g 등을 순서대로 얻었다.

한약물 투여는 실험동물 체중 250g당 추출물 5mg을 물 1ml에 녹여, 24시간 실험의 경우 중대뇌동맥폐쇄시점으로부터 1시간과 4시간 뒤에 경구투여 하였으며, 7일 실험의 경우 추가로 24시간 뒤부터 희생시킬 때까지 날마다 1회 경구 투여하였다.

3. 뇌허혈손상 유발

중대뇌동맥폐쇄에 의한 뇌허혈손상 유발 방법 가운데 Longa 등⁸⁾의 혈관내봉합사삽입술(*intraluminal method*)을 채택하였다. 모든 수술 과정은 그 방법에 따라 시행했지만, 보다 광범위하고 일정한 뇌허혈을 유발하기 위해 Belayev 등⁹⁾이 사용한 poly-L-lysine coating method와 영구폐쇄방법을 시행하였다.

수술과정을 요약하면 다음과 같다. 건강한 체중 242±12g Sprague-Dawley계 흰쥐 복강에 chloral hydrate 350mg/kg을 주사하여 마취한 다음, 수술용 현미경(Carl Zeiss, Zeiss, Germany) 아래서 먼저 목에 있는 anterior triangle 부위 근육을 정리하여 혈관을 노출시킨 뒤, ECA (external carotid artery)와 CCA(common carotid artery)를 잘 정리하였다. Occipital artery와 superior thyroid artery를 electric coagulator (Ellman, Dento-Surg 90 FFP, U.S.A.)를 사용하여 cutting하였다. ECA distal part는 결찰하고, 수술실(5-0 silk suture)로 고정고리를 두 개 만들어 놓은 다음, ICA(internal carotid artery)와 CCA는 수술실(3-0 silk suture)과 artery clamp(micro-vascular clip)를 사용하여 혈행을 완전 차단하였다. Micro-dissecting Spring Scissor로 ECA 혈관벽을 약간

절개한 다음, poly-L-lysine용액(0.1% wt/vol in deionized water, Sigma Diagnostics, P8920, St. Louis, MO, U.S.A.)으로 coating한 끝이 둥근 봉합사(4-0 nylon suture, Ethilon, Brazil)를 18-20mm정도 밀어 넣었다. 이때 lateral part로 분지하는 pterygopalatine artery로 봉합사가 들어가지 않도록 방향에 유의했다. Tip은 carotid bifurcation으로부터 흰쥐 크기에 따라 18-20mm 위치 right MCA origin에 오도록 하였으며, 삽입한 다음 ICA와 CCA를 다시 관류시키고, ECA distal part를 절단하였다. 목 앞 부위 피부를 봉합, 소독하고 마취에서 깨어난 뒤 자유롭게 움직이게 하였다.

실험군은 중대뇌동맥을 폐쇄한 대조군(Control), 폐쇄 뒤 廣豆根 전층 투여군(Total), 분획물 물층 투여군(Aqueous), 부탄올층 투여군(BuOH), 알칼로이드층 투여군(Alkaloid) 및 혈관내 봉합사 삽입과정만을 뺀 수술 시행 군(Sham) 등 6개 군(총 11개 군, 각 군 n=6)으로 나누어 시행하였다.

4. 뇌허혈손상 행동생리학적 평가

뇌허혈에 따른 운동기능실조를 평가하기 위해 다양한 항목의 운동기능 검사지표들을 기능적으로 분류하여 4가지로 정리하였으며, 廣豆根 전층과 분획물들이 뇌허혈 초기·중기 운동기능실조에 미치는 효과에 대한 평가항목으로 결정하였다. 각각 기능들은 Posture & balance function test, Muscle tone function test, Reflex function test, and Motor function test이며, 각각은 몇 가지 검사 조합으로 구성했다. Posture & balance function test는 torso twisting¹⁰⁾, beam balance¹¹⁾, visual limb stretching^{12,14)}, and visual limb placing^{12,13)} 등 4가지, Muscle tone function test는 resistance to lateral push^{12,13)}, resistance to back push^{12,13)}, and wall placing 등 3가지, Reflex function test는 dorsal limb reflex¹³⁾, proprioceptive dorsal limb reflex¹³⁾, lateral limb reflex, proprioceptive lateral limb reflex¹³⁾, body proprioception reflex¹⁵⁾, and chin tactile reflex 등 6가지, Motor function test는 foot-fault test^{16,17)}로 구성했다.

5. Statistical Analysis

廣豆根과 분획물들의 효과를 판정하기 위하여 각 실험군을 대조군과 비교하는 Student's t-test¹⁸⁾를 사용하였으며, P<0.05 수준을 유의하다고 인정하였다.

결 과

1. Muscle Tone Function Test

뇌허혈손상 뒤 근육강도와 관련한 운동기능 회복에 미치는 한약물 효과 검사 결과, 廣豆根 전층 투여군의 경우 폐쇄 3일 뒤부터 5일 및 7일 뒤까지 기능점수가 3.85±0.15, 3.26±0.24 및 3.02±0.16으로 대조군에 비해 유의한(P<0.01) 회복이 나타났으나, 분획물 물층, 부탄올층 및 알칼로이드층 투여군 모두는 대조군에 비해 유의한 차이가 나타나지 않아 7일간 廣豆根 분획물들의 경구 투여에 따른 근육강도 회복정도에 미치는 효과는 거의 없었다(Fig. 1).

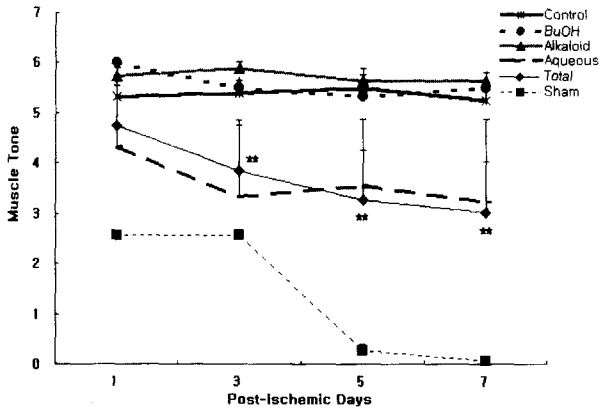


Fig. 1. Muscle Tone Scores during 7 days after MCA-occlusion. Higher scores indicate greater impairment. ★ and ★★ indicates that their statistical significances are $P<0.05$ and $P<0.01$, compared to the value for Control Group, respectively. Control, group of the MCA-occluded rats (n=6); Total, group of the Sophora Subprostrata total phase was administered to MCA-occluded rats (n=6); Aqueous, group of the Sophora Subprostrata Aqueous phase was administered to MCA-occluded rats (n=6); BuOH, group of the Sophora Subprostrata BuOH phase was administered to MCA-occluded rats (n=6); Alkaloid, group of the Sophora Subprostrata alkaloid phase was administered to MCA-occluded rats (n=6); Sham, group of the sham-operated rats (n=6). Data are presented as the mean \pm SEM.

2. Reflex Function Test

뇌허혈손상 뒤 정상적 반사수준으로 회복하는 데 미치는 한약물 효과 검사 결과, 대조군은 Sham군에 비해 높은 운동기능 손상이 있었으며, 7일 뒤까지 지속하여 유지되었다. 한약물 투여군의 경우 廣豆根 전층 투여군은 24시간 뒤부터 기능점수 10.02 ± 0.17 로 대조군에 비해 유의한($P<0.05$) 회복이 나타나 그 뒤 3일, 5일 및 7일 뒤까지 8.21 ± 0.23 , 5.53 ± 0.41 및 5.55 ± 0.31 로 점차 회복이 유의하게($P<0.01$) 증가하였으며, 廣豆根 분획물에 있어서 물층 투여군도 기능점수가 3일, 5일 및 7일 뒤에 각각 7.56 ± 1.41 , 6.78 ± 1.53 및 6.67 ± 1.90 으로 대조군과 비교하여 유의한(각각 $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$) 효과가 있었으나 부탄올층과 알칼로이드층 투여군은 유의성이 없었다(Fig. 2).

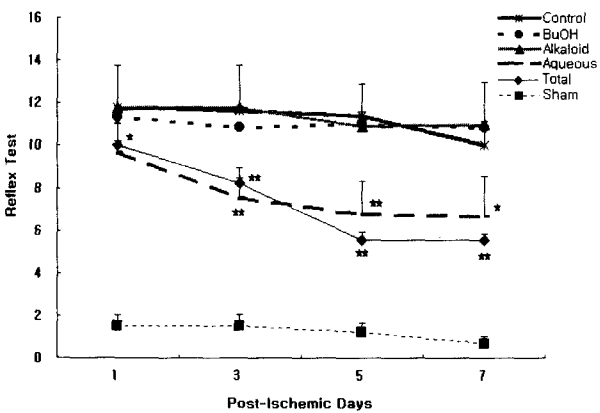


Fig. 2. Reflex Scores during 7 days after MCA-occlusion.

3. Posture & Balance Function Test

뇌허혈손상 뒤 자세와 균형기능을 관찰한 결과, 중대뇌동맥폐쇄 대조군은 Sham군에 비해 높은 운동기능 손상이 있었으며 7일 뒤까지 지속하여 유지되었다. 한약물 투여군의 경우 廣豆根 전층과 분획물 물층 투여군은 24시간 뒤부터 대조군에 비해 유

의한($P<0.05$) 회복이 나타나 점차 회복이 증진되었다(3일, 5일 및 7일 뒤 $P<0.01$). 廣豆根 부탄올층과 알칼로이드층 투여군은 3일 뒤부터 대조군과 비교하여 유의한($P<0.05$) 회복이 나타났고, 그 뒤 5일 및 7일 뒤까지 실험기간에 걸쳐 유의한($P<0.01$) 결과가 나타났다(Fig. 3).

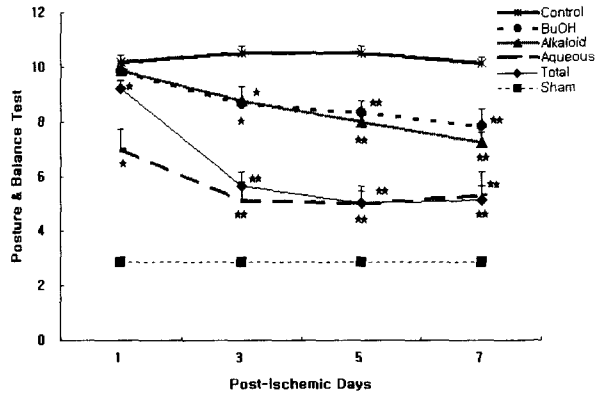


Fig. 3. Posture & Balance Scores during 7 days after MCA-occlusion.

4. Foot-Fault Test

Motor function의 관찰 결과, 중대뇌동맥폐쇄 대조군은 Sham군에 비해 높은 운동기능 손상으로 뚜렷한 차이가 있었으나, 회복 정도 관찰에서 한약물 투여군의 경우 廣豆根 전층과 분획물 물층, 부탄올층 및 알칼로이드층 투여군 모두 대조군에 비해 운동조정통합기능 회복에 유의한 차이를 나타내지 못했다(Fig. 4).

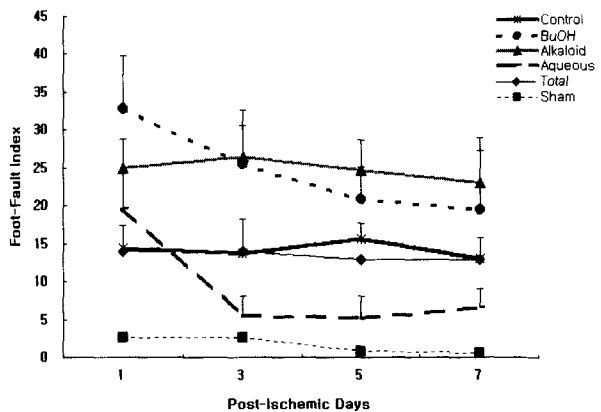


Fig. 4. Foot-Fault Index during 7 days after MCA-occlusion.

고 찰

한약물이 중풍에 미치는 영향에 관한 기존 연구들은 주로 뇌손상 뒤 회복기에 미치는 영향들에 중점을 둔 임상연구나 재활요법 및 부차적 장애 해소를 위한 연구들을 주로 시행하고 있어 뇌중풍 초기와 중증기(7-14일) 약제개발 필요성이 제기 되고 있는데^{19,20}, 한약물이 중풍 초기·중증기에 뇌손상을 줄여 줄 수 있다는 직접적인 연구결과를 얻는다면 한의학 임상에 매우 유용한 연구가 될 것으로 생각하며, 본 연구에서는 廣豆根 전층과 분획물들이 뇌허혈에 미치는 효과를 관찰하고자 뇌허혈을 유발한

실험동물의 신경학적 손상들에 대한 효능 검증을 목표로 실험하였다. 본 연구에서 사용한 뇌허혈 동물모델 유발 방법인 intraluminal method와 poly-L-Lysine coating method는 비교적 일정한 부위에 뇌허혈을 유발시킬 수 있으며, 대뇌피질 뿐만 아니라 기저핵 부분에도 광범위하게 뇌허혈이 발생하여^{21,22)} 해부조직학적 평가는 물론 행동생리학적 평가를 하려는 본 연구 목적에 적합하여 채택하였다.

국소 뇌허혈은 감각운동 기능장애를 특징으로 하는 신경학적 결손을 유발하는 것으로 알려져 있다²³⁾. 신경학적 결손에 의한 행동을 연구하는 것은 뇌허혈 초기 단순 반응과 운동기능 검사를 많이 시행한다²⁴⁾. 본 실험에서 감각운동 장애에 대한 평가인 자세반사검사에서 대조군은 뇌허혈 유발 24시간과 3, 5 및 7일 뒤, Sham군에 비해 유의한 결과를 나타냈으며, 이는 Bederson 등²³⁾의 연구와도 비슷한 결과를 나타냈다.

뇌허혈손상 뒤 초기·졸중기에 걸친 운동기능회복에 미치는 한약물의 효과를 관찰한 결과, 한쪽 마비에 따른 posture & balance function에 있어서 廣豆根 전층과 분획물 투여군 모두에서 대조군에 비해 빠른 회복양상을 보였으며, reflex function의 경우도 廣豆根 전층과 분획물 물층 투여군에서 대조군과 비교하여 빠른 회복양상을 보였다. 하지만 근육 강도를 측정하는 muscle function의 경우 廣豆根 전층 투여군에서만 3일째부터 대조군에 비해 유의한(P<0.01) 효과를 나타냈으며, motor function 검사로서 foot-fault index의 경우 한약물 투여군 모두 대조군에 비해 별다른 차이를 나타내지 않아 운동조정통합기능에 있어서는 효과를 보이지 못했다. 비록 조직학적 뇌허혈손상에 미치는 廣豆根 전층과 분획물 물층의 효과가 모든 행동학적 결손을 평가하는 운동검사지표들과 일치할 수는 없지만 다른 분획물과 비교해 볼 때 보다 유효한 상관성을 갖는 결과이며, 운동기능 중 특히 상관성을 가질 수 있는 측면이 있음을 의미한다고 생각한다. 또한, 廣豆根 부탄올층과 알칼로이드층 투여군에서도 유의하지 않았던 뇌허혈 7일 뒤 조직학적 평가와 달리 posture & balance function test 결과상 유의한 효과를 보인 바, 뇌허혈손상 부위 면적과 체적 감소보다 행동학적 회복속도 증가에 廣豆根 전층과 분획물들이 효과를 발현할 수 있음을 알 수 있다.

한편, 廣豆根 전층과 분획물 투여군들에서 뇌허혈손상 부위에 대한 초기(24시간) 방어 효과를 7일 뒤까지 지속하지 못한 조직학적 검사결과와 다르게 행동학적 연구결과가 유효하게 나타난 바, 廣豆根 전층과 분획물들이 뇌허혈 초기·졸중기에 이미 손상된 조직학적 결손 뒤 운동기능 회복에도 효과를 미치는 것으로 생각한다. 최근 신경 손상에 관한 연구들에 의하면 조직병리학적 손상 증가 없이도 뇌허혈손상에 이은 행동과 대사 장애를 유발하기도 한다고 알려졌고, 이에 대해 허혈 뒤 뇌경색 부분에 새로운 혈관이 생긴다(angiogenesis)는 등 여러 측면²⁵⁻²⁸⁾에서 설명을 시도하고 있다. 이러한 최근 연구들과 본 연구에서 나타난 바는 뇌허혈에 의한 손상 연구나 치료제 개발에 있어 뇌조직 변화뿐만 아니라 행동학적 변화²⁹⁾와 대사 측면^{30,31)}에서 연구도 병행할 필요성을 요구한다고 할 수 있다.

본 실험에서 시일이 경과함에 따라 운동기능평가 점수가 다

시 높아지는 변동을 보이는 바, 이러한 이유는 실험동물들의 시간에 따른 생물학적 변동요인이 작용한 것으로 생각하는데, Garcia 등¹⁵⁾은 매일 행동학적 측정에 있어 수직 변동에 대해 대뇌동맥 폐쇄에 수반되는 생물학적 반응에 있어서 다양성의 반영이라고 하였으며, 실제 임상에서 동맥폐쇄에 따른 유사한 경우에서도 이러한 현상이 나타난다.

결론은 본 연구에서 중대뇌동맥폐쇄에 의한 뇌허혈손상 초기(24시간)·졸중기(7일)에 미치는 廣豆根 분획물들의 보호효과를 실험으로 검증하였으며, 廣豆根 전층과 분획물에 있어서는 물층이 다른 부탄올층과 알칼로이드층에 비해 높은 보호효과를 가지고 있음이 밝혀졌다. 이러한 결과는 앞으로 뇌허혈손상 초기·졸중기 치료제 개발로써 한약물을 연구하고 발전시킬 필요성을 제기 하며, 신약 개발 연구성과로써도 그 의의를 가질 것으로 기대한다.

결 론

廣豆根 전층과 분획물들이 허혈성 뇌손상 초기(24시간)·졸중기(7일)에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 중대뇌동맥을 폐쇄한 다음 한약물을 경구투여하여 행동학적 변화를 비교 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

뇌허혈손상 뒤 근육강도와 관련한 운동기능 회복에 미치는 한약물 효과 검사 결과, 廣豆根 전층과 분획물 물층 투여군의 경우 중대뇌동맥폐쇄 3일 뒤부터 7일 뒤까지 대조군에 비해 유의한(P<0.01) 회복을 나타냈다. 정상적 반사수준으로 회복을 관찰한 결과, 廣豆根 전층 투여군의 경우 중대뇌동맥폐쇄 24시간 뒤부터 대조군에 비해 유의한(P<0.05, 3일 뒤부터 P<0.01) 회복이 7일 뒤까지 점차 증가하였고, 분획물 물층 투여군은 3일 뒤부터 유의한(P<0.01, 7일 뒤 P<0.05) 효과가 있었다. 자세와 균형기능에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군에 비해 한약물을 투여한 모든 군에서 중대뇌동맥폐쇄 24시간(전층, 분획물 물층 각각 P<0.05, 3일 뒤부터 P<0.01)과 3일 뒤부터(부탄올층, 알칼로이드층 각각 P<0.05, 5일 뒤부터 P<0.01) 유의한 효과를 보였다. 뇌허혈손상 뒤 운동조정통합기능 회복정도는 廣豆根 전층과 분획물 투여군 모두에서 대조군에 비해 유의성을 나타내지는 못하였다.

이러한 관찰 결과로 중대뇌동맥폐쇄에 의하여 발생하는 초기(24시간) 허혈성 뇌손상 억제와 졸중기(7일) 운동기능회복을 증강시키는 효과가 廣豆根에 있는 것으로 생각하며, 특히, 허혈성 뇌손상 방어효과는 廣豆根 전층과 분획물 물층이 가장 큰 것으로 생각한다.

참고문헌

1. 大韓病理學會 編. 病理學. 4판. 서울, 高文社, pp 1065-1073, 2000.
2. 송계용, 지제근, 함의근. 핵심병리학. 서울, 고려의학, pp 809-811, 1998.
3. Du, C., Hu, R., Csernansky, C.A., Hsu, C.Y., Choi, D.W. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia:

- a role for apoptosis? *J cereb Blood Flow Metab.* 16(2):195-201, 1996.
4. Kirino, T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239(1):57-69, 1982.
 5. Garcia, J.H., Liu, K.F., Ho, K.L. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke.* 26(4):636-642, 1995.
 6. 김종열. 허혈성 뇌졸중의 치료. 2000년도 대한응급의학회 춘계학술대회 및 연수강좌. 99-122, 2000.
 7. 김영석. 임상중풍학, 서울:서원당, 303-308, 317-329, 1997.
 8. 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.
 9. Belayev, L., Alonso, O.F., Busto, R., Zhao, W., Ginsberg, M.D. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. *Stroke.* 27(9):1616-1623, 1996.
 10. Borlongan, C.V., Randall, T.S., Cahill, D.W., Sanberg, P.R. Asymmetrical motor behavior in rats with striatal lesions as revealed by the elevated body swing test. *Brain Res.* 676(1):231-234, 1995.
 11. Clifton, G.L., Jiang, J.Y., Lyeth, B.G., Jenkins, L.W., Hamm, R.J., Hayes, R.L. Marked protection by moderate hypothermia after experimental traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 11(1):114-121, 1991.
 12. Ohlsson, A.L., Johansson, B.B. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke.* 26(4):644-649, 1995.
 13. De Ryck, M., Van Reempts, J., Borgers, M., Wauquier, A., Janssen, A. J. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after infarcts in rats. *Stroke.* 20(10):1383-1390, 1989.
 14. Bona, E., Johansson, B.B., Hagberg, H. Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatr Res.* 42(5):678-683, 1997.
 15. Garcia, J.H., Wagner, S., Liu, K.F., Hu, X.J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke.* 26(4):627-634, 1995.
 16. Hernandez, T.D., Schallert, T. Seizure and recovery from experimental brain damage, *Exp. Neurol.* 102(3):318-324, 1998.
 17. Germano, I.M., Bartkowski, H.M., Cassel, M.E., Pitts, L.H. The therapeutic value of nimodipine in experimental focal cerebral ischemia. Neurological outcome and histopathological findings. *J Neuro- surg.* 67(1):81-87, 1987.
 18. Dinal, W.W. A foundation for analysis in the health science. *Biostatistics.* 3, 136-146, 1983.
 19. 김영석. 중풍환자의 임상진료지침. 대한중풍학회 제1회연수 강좌 및 학술논문집. pp 9-20, 2000.
 20. 이미화, 박형숙, 최원철. 뇌졸중 치료제인 한약의 효과. *재활간호학회지* 3(2):169-180, 2000.
 21. Belayev, L., Busto, R., Zhao, W., Fernandez, G., Ginsberg, M.D. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res.* 833(2):181-190, 1999.
 22. Belayev, L., Alonso, O.F., Busto, R., Zhao, W., Ginsberg, M. D. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke.* 27(9):1616-1622, 1996.
 23. Bederson, J.B., Pitts, L.H., Tsuji, M., Nishimura, M.C., Davis, R.L., Bartkowski, H. Rat middle cerebral artery occlusion. Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke.* 17(3):472-476, 1986.
 24. Shiino, A., Harada, K., Handa, J. Focal brain ischemia model in rats. an experimental study. *Surg Neurol.* 31(3):203-208, 1989.
 25. Zhang, Z.G., Zhang, L., Tsang, W., Soltanian-Zadeh, H., Morris, D., Zhang, R., Goussev, A., Powers, C., Yeich, T., Chopp, M. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22(4):379-392, 2002.
 26. Wei, L., Erinjeri, J.P., Rovainen, C.M., Woolsey, T.A. Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. *Stroke* 32(9):2179-2184, 2001.
 27. Kataoka, Y., Cui, Y., Yamada, H., Utsunomiya, K., Niiya, H., Yanase, H., Nakamura, Y., Mitani, A., Kataoka, K., Watanabe, Y. Neo-vascularization with blood-brain barrier breakdown in delayed neuronal death. *Biochem Biophys Res Commun.* 273(2):637-641, 2000.
 28. Robinson, R.G., Shemaker, W.J., Schlumpf, M., Valk, T., Bloom, F. E. Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines and behaviour. *Nature* 255(5506):332-334, 1975.
 29. Grabowski, M., Brundin, P., Johansson, B.B. Paw-reaching, sensorimotor, and rotational behavior after brain infarction in rats. *Stroke* 24(6):889-895, 1993.
 30. Jaspers, R.M., Block, F., Heim, C., Sontag, K.H. Spatial learning is affected by transient occlusion of common carotid arteries (2VO): comparison of behavioural and histopathological changes after '2VO' and 'four-vessel-occlusion' in rats. *Neurosci Lett.* 117(1-2):149-153, 1990.
 31. Dietrich, W.D., Ginsberg, M.D., Busto, R., Watson, B.D. Photochemically induces cerebral infarction in the pat. 1. Time course of hemodynamic consequences, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 6(2):184-194, 1986.