

# 갈근이 뇌허혈 손상 흰쥐의 해마 구역별 HSP70 발현에 미치는 영향

김연섭\*

경원대학교 한의과대학 해부경혈학교실

## Effect of *Puerariae Radix* on HSP70 Expression in Ischemic Damaged Rats

Youn Sub Kim\*

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

This study investigated a HSP70 expression of *Puerariae Radix* in cerebral ischemia. The global cerebral ischemia was induced by bilateral common carotid arteries occlusion under hypotension (40 mmHg) in Sprague-Dawley rats. After the treatment of *Puerariae Radix* extract, the heat shock protein 70 (HSP70) expressions were measured immunohistochemically. The upregulation of HSP70 expression in hippocampal regions resulted by cerebral ischemia. Then *Puerariae Radix* treatment demonstrated significant decrease of HSP70 expressions in CA1 region and dentate gyrus of the hippocampus as compared with control group. These results suggested that *Puerariae Radix* reveals the neuroprotective effect through the control of noxious stress stimulations to neurons.

Key words : *Puerariae Radix*, HSP70, CA1 region

### 서 론

葛根은 콩과에 속한 다년생 藤本인 칩의 뿌리를 건조한 것으로 약성이 甘辛, 平하며, 發散透表하고 解肌除熱하므로 風寒, 風熱에 사용하며, 生津止渴의 효능으로 胃熱口渴, 消渴 등에 사용한다<sup>1-3</sup>. 약리작용으로 해열, 혈압강하, 뇌혈류량 증가, 관상동맥 확장, 항부정맥, 혈소판 응집억제 작용 등이 으며<sup>3,4</sup>, alcohol 대사<sup>5-10</sup>와 간질환에 대하여 유의한 효능이 있다<sup>9,12</sup>고 하였다. 葛根에 대한 실험연구 보고들을 살펴보면, 갈근이 alcohol에 의한 뇌해마의 손상에 대하여 BrdU 양성반응 신경세포와 NOS 발현을 유의하게 증가시키므로 다양한 뇌해마의 손상에 대하여 葛根이 유의한 효능을 나타낼 수 있음을 보여주었으며<sup>13,14</sup>, 葛根의 유효성분인 puerarin은 뇌조직의 산화적 손상(oxidative damage)을 개선하는 효능이 있으며<sup>15</sup>, 또한 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌부종을 유의하게 억제하였다고 하였다<sup>16</sup>. 이러한 보고들 역시 葛根이 뇌허혈 손상에 대하여 유의한 보호효능을 나타낼 수 있음을 추측하게 한다. 실험동물을 사용한 뇌허혈 연구에서 허혈에 대한 발생기전

및 약물의 효능 검증을 위하여 가장 많이 사용하는 것이 뇌해마 CA1구역 추체신경세포의 변화를 관찰하는 것이다<sup>17,18</sup>. 또한 heat shock protein (HSP)은 열 충격이나 허혈 등 각종 스트레스에 의하여 보상적으로 세포내에서 유발되는 단백질 (stress-induced proteins)의 일종으로<sup>19</sup>, 뇌허혈 손상에 의하여 뇌혈류량이 매우 낮은 부위를 제외한 모든 허혈손상을 받은 세포에서 HSP70 mRNA가 발현되었다고 보고되어 있으므로<sup>20</sup> HSP70 단백질의 발현은 뇌허혈의 경계영역을 규정하거나 뇌허혈 영역 중에서 단백질 변성구역(zone of protein denaturation)을 결정하는 지표 또는 각종 스트레스에 대한 뇌신경세포 반응의 지표로 사용된다<sup>21</sup>.

이에 저자는 뇌허혈에 대한 갈근의 효능을 실험동물에서 확인해보고자 뇌허혈 손상은 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법으로 손상을 유발하고, 뇌해마에서 HSP70 단백질의 발현정도를 면역조직화학염색을 통하여 관찰한 바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

### 실험방법

#### 1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 12주령 (280~300g)의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온

\* 교신저자 : 김연섭, 성남시 수성구 복정동 산65, 경원대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2003/11/18 · 수정 : 2003/12/13 · 채택 : 2004/01/15

도 (21~23℃), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균윤수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

## 2. 약물의 조제 및 투여

본 실험에 사용한 약물은 갈근 (Puerariae Radix)로 약재 200g을 일반적인 물추출 엑기스 제조방법에 의하여 약재 4g 당 1,500mg의 엑기스를 얻었다. 약물은 뇌허혈 후 1일 1회씩 3일간 경구투여 하였으며, 1회 투여량은 체중 100g 당 25.0mg으로 하였다.

## 3. 실험군의 구분

실험군은 뇌허혈을 유발하기 위한 수술과정 중 저혈압 유발과 총경동맥 폐쇄를 제외하고 모든 수술과정을 시행한 비교군을 sham군 (Sham)으로 하고, 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 8분간 폐쇄하여 뇌허혈을 유발한 군을 대조군 (Control), 저혈압 상태에서 대조군과 동일하게 뇌허혈을 유발하고 갈근추출물을 경구투여한 군을 갈근군 (Sample)으로 구분하였으며, 각 실험군은 흰쥐 6마리씩으로 구성하였다.

## 4. 뇌허혈 손상 유발

뇌허혈은 Chan 등<sup>22)</sup>의 방법에 따라 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 transient global ischemia (TGI) 방법을 적용하였다. TGI 방법을 간단히 설명하면, 마취는 70% N<sub>2</sub>O와 30% O<sub>2</sub>의 혼합가스에 5% isoflurane으로 마취를 시작하여 수술 도중에는 1.5~2.0%의 농도로 마취를 유지하였다. 체온은 feedback-regulated heating pad로 수술 전과정 동안 37.0±0.5℃로 조절하였다. 양측 서혜부의 대퇴동맥을 노출시킨 후 PE-50 polyethylene catheter를 장착시키고, 한쪽에는 physiograph를 연결하여 동맥혈압을 수술 전과정 동안 지속적으로 기록하고, 다른 한쪽은 저혈압 유발을 위한 혈액채취에 사용하였다. 이후 전경부에서 양측 총경동맥을 노출시킨 후 PE-30 polyethylene tube로 만든 폐쇄용 고리를 장착하였다. 총경동맥 폐쇄를 위한 준비수술이 끝난 후 약 5분간의 안정기를 주었다.

저혈압의 유도는 Chan 등<sup>22)</sup>의 방법과 Sugawara 등<sup>23)</sup>의 연구결과에 근거하여 평균동맥혈압이 40mmHg가 유지되도록 한 쪽 대퇴동맥으로부터 빠르게 혈액을 제거하였다. 혈압이 40mmHg에 이르면 즉시 전경부의 폐쇄고리를 당기고 metal clip으로 양측 총경동맥을 폐쇄하여 뇌허혈을 유발시켰다. 뇌허혈 유발 8분 후에 양측 총경동맥을 폐쇄한 metal clip을 제거하여 혈액을 재개통하고, 대퇴동맥을 통하여 혈액을 재주입하여 혈압을 정상으로 회복시켰다. 이후 상치부위를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다.

## 5. 뇌조직의 처리

TGI 유발 3일 후 각각의 실험동물을 sodium pentobarbital의 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 두개골로부터 제거한 다음 24시간 정

도 재고정하고, sucrose 용액에 넣어 침전시켰다. 다음 -40℃의 dry ice-isophentan으로 동결시키고 조직절편을 제작할 때까지는 -80℃에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

## 6. HSP70 면역조직화학염색<sup>24)</sup>

선택한 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10분~15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum과 bovine serum albumin을 phosphate buffered saline (PBS)에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. HSP70/73 antibody (mouse monoclonal IgG, Oncogene Science)는 1:200의 희석배율로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후, 4℃에서 overnight으로 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, avidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O를 섞은 diaminobenzidine-tetrachloride에서 5~10분간 발색 반응 시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2~3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

## 7. 뇌해마 각 구역의 HSP70 발현 면역염색농도의 측정

뇌해마의 CA1, CA2, CA3 및 DG구역의 HSP70 발현에 따른 면역염색농도 (immuno-reaction density, IRD)의 측정은 CCD 카메라와 영상분석시스템이 부착된 광학현미경과 NIH Image software를 사용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, HSP70 발현이 면역조직화학적으로 염색된 뇌해마 조직의 각 부위를 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고, 뇌해마의 기준구역과 측정하고자 하는 구역의 면역염색농도를 256등급의 흑백농도 (grey level)에 따라 측정하고, 측정구역의 측정값을 기준구역의 측정값에 대하여 표준화하는 방법으로 면역염색농도를 계산하였다. 기준구역은 CA1 하부의 뇌해마 실질조직 부위로 하였다.

## 실험성적

### 1. 뇌해마 CA1 구역에서 HSP70 발현에 따른 면역염색농도의 변화

뇌허혈을 유발하지 않은 sham군에서 뇌해마 HSP70 발현의 IRD는 CA1구역에서 3.5±1.5, 뇌허혈이 유발된 대조군은 CA1구역에서 57.2±8.2으로 측정되었다. 이는 뇌허혈에 의하여 HSP70 발현이 CA1구역에서 매우 현저한 증가가 관찰된 것을 나타낸다.

뇌허혈이 유발 후 갈근추출물을 투여한 갈근군은, CA1구역에서 34.5±8.4로 대조군에 비하여 P<0.05의 유의한 HSP70 발현의 감소가 관찰되었다. 이러한 결과는 갈근이 일정한 신경세포손상 보호효능을 가지고 있음을 나타내준다. (Fig. 1, 2)

### 2. 뇌해마 CA2 구역에서 HSP70 발현에 따른 면역염색농도의 변화

뇌허혈을 유발하지 않은 sham군에서 뇌해마 HSP70 발현의 IRD는 CA2구역에서 5.3±2.5, 뇌허혈이 유발된 대조군은 CA2구역에서 24.7±6.8으로 측정되었다. 이는 뇌허혈에 의하여 HSP70 발현

이 현저하게 증가가 관찰된 것을 나타낸다.

뇌허혈이 유발 후 갈근추출물을 투여한 갈근군은, CA2구역에서 23.7±5.4로 대조군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다.(Fig. 1, 2)

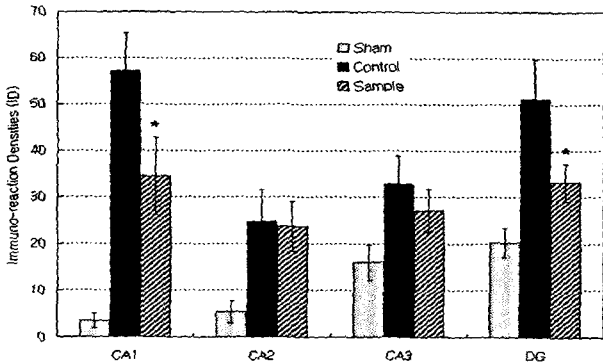


Fig. 1. Effect of Puerariae Radix on immuno-reaction densities depending on HSP70 expression in hippocampus of ischemic damaged rats induced by bilateral common carotid artery occlusion. (\*; P<0.05)

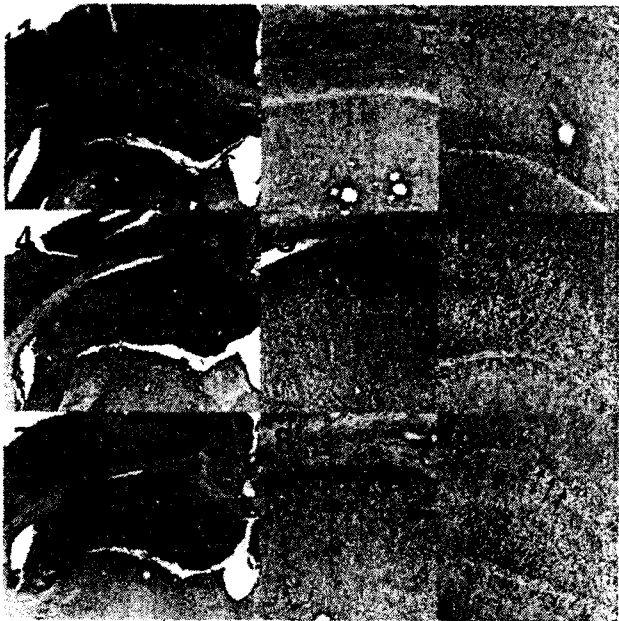


Fig. 2. Immunohistochemical expressions of HSP70 in hippocampal sub-regions of ischemic damaged rats induced by bilateral common carotid artery occlusion (section 1, 2 and 3, Sham; section 4, 5 and 6, Control; section 7, 8 and 9, Sample). The sample group (Puerariae Radix treatment group) shows significant decrease of immuno-reaction of HSP70 in CA1 and DG of hippocampus as compared to the control group.

3. 뇌해마 CA3 구역에서 HSP70 발현에 따른 면역염색농도의 변화

뇌허혈을 유발하지 않은 sham군에서 뇌해마 HSP70 발현의 IRD는 CA3구역에서 15.9±3.8, 뇌허혈이 유발된 대조군은 CA3구역에서 32.9±6.1로 측정되었다. 이는 뇌허혈에 의하여 HSP70 발현이 현저하게 증가가 관찰된 것을 나타낸다.

뇌허혈이 유발 후 갈근추출물을 투여한 갈근군은, CA3구역에서 27.1±4.7로 대조군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. (Fig. 1, 2)

4. 뇌해마 DG 구역에서 HSP70 발현에 따른 면역염색농도의 변화

뇌허혈을 유발하지 않은 sham군에서 뇌해마 HSP70 발현의 IRD는 DG구역에서는 20.3±3.1로 다른 구역에 비해 비교적 높은 발현이 관찰되었다. 뇌허혈이 유발된 대조군은 DG구역에서 51.1±8.6으로 측정되었다. 이는 뇌허혈에 의하여 HSP70 발현이 현저하게 증가가 관찰된 것을 나타낸다.

뇌허혈이 유발 후 갈근추출물을 투여한 갈근군은, DG구역에서 33.2±4.1로 대조군에 비하여 P<0.05의 유의한 HSP70 발현의 감소가 관찰되었다. 이러한 결과는 갈근이 일정한 신경세포 손상 보호효능을 가지고 있음을 나타내준다. (Fig. 1, 2)

### 고찰

葛根은 콩과에 속한 다년생 藤本인 葛의 뿌리를 건조한 것으로 약성이 甘辛, 平하다. 辛味가 發散透表하여 解肌除熱하는 작용이 있으므로 風寒, 風熱에 사용하며, 生津止渴의 효능이 있어 胃熱口渴, 消渴 등에 사용한다 하였다<sup>1-3)</sup>. 또한 散鬱火, 解酒毒하며, 傷寒中風과 陽明頭痛, 腸風瘡疹 등에 활용된다고 하였다<sup>4,5)</sup>. 약리작용으로도 해열과 혈압강하 작용이 있으며, 관상동맥 확장과 뇌혈류량 증가 및 기억력 증강 작용이 보고된 바 있다<sup>4,5)</sup>.

葛根에 대한 실험연구는 解酒毒한다는 효능과 관련하여 alcohol 대사 및 alcohol 중독에 대한 효능<sup>5-10)</sup>과 간질환에 대한 연구<sup>9-12)</sup>가 많이 보고되었으며, 최근 연구에 의하면 葛根이 alcohol을 투여한 실험동물의 뇌해마에서 증가된 c-Fos 발현을 葛根이 유의하게 감소시켰다고 하였으며<sup>13)</sup>, 뇌해마에서의 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 양성반응 신경세포와 nitric oxide synthase (NOS) 발현을 통하여 alcohol 손상에 대한 葛根의 효능을 관찰한 바 葛根투여에 의하여 저하된 BrdU 양성반응 신경세포와 NOS 발현을 유의하게 증가시켰다고 하였다<sup>14)</sup>. 또한 葛根의 유효성분인 puerarin은 D-galactose에 의하여 노령의 생쥐에게 유발된 기억력의 감퇴를 유의하게 개선하며, 뇌조직의 superoxide dismutase (SOD) 활성을 유의하게 증가시키고 lipofuscin 함량을 유의하게 감소시키므로 노령에 따른 뇌조직의 산화적 손상 (oxidative damage)을 개선하는 효능이 있다고 하였다<sup>15)</sup>. 또한 puerarin은 중대뇌동맥 폐쇄에 따른 뇌부종을 유의하게 억제하였다고 하였다<sup>16)</sup>. 이러한 보고들은 葛根이 뇌허혈 손상에 대하여 유의한 보호효능을 나타낼 수 있음을 추측하게 한다.

실험동물에 뇌허혈을 유발하는 방법 중 중대뇌동맥을 폐쇄하는 국소뇌허혈 (focal ischemia) 방법에서는 뇌혈류가 증가하므로 오랜 시간동안 동맥을 폐쇄하여야 하며, 허혈손상이 뇌의 일정 부위에 집중되므로 허혈손상의 중심부와 주변부에서 각기 다른 대사적, 병리적 과정을 나타내는 것이 실험적 단점이다<sup>25,26)</sup>. 또한 전뇌허혈 (global ischemia) 방법에서는 완전한 폐쇄가 이루어지기 위해서는 양측 추골동맥을 영구폐쇄한 상태에서 양측 경동맥을 일시적으로 폐쇄하여야 하나 추골동맥 폐쇄의 과정이 복잡하여 불완전한 폐쇄가 일어날 수 있는 단점이 있다<sup>27,28)</sup>. 그러므로 본 실험에서는 Chan 등<sup>22)</sup>과 Sugawara 등<sup>23)</sup>이 사용한 방법으로 40 mmHg 정도의 저혈압을 유발한 상태에서 경동맥을 폐쇄

하여 일시적인 뇌허혈을 유발하는 방법을 사용하였다. 이러한 방법은 실험적으로 일정한 뇌허혈을 유발할 수 있는 장점이 있다.

HSP70은 HSP72로도 불리며, 식물이나 이스트, 박테리아 및 포유류 등 모든 살아있는 세포에서 발견되는 가장 대표적인 inducible HSP이다<sup>29,30</sup>. HSP70은 열, 중금속, 독소, 허혈 등 변성 단백질을 생산하는 여러 스트레스에 대한 반응으로 합성되며, HSP family에는 그 분자량에 의하여 명칭이 붙여진 HSP10, HSP27, HSP60, HSP70 및 HSP90 등과 ubiquitin 등이 존재한다<sup>31-33</sup>. HSP의 작용기전은 변성단백질에 의하여 결합-HSP90이 heat-shock-factor proteins (HSFs)으로부터 분리되는 것으로부터 시작되며, HSFs로부터 HSP90이 분리되면 HSF가 활성화 되고, 활성화된 HSFs는 HSP70 gene의 전사를 촉진하여 스트레스를 받은 세포내에는 HSP70 단백질과 mRNA 수준이 급격히 증가하게 된다<sup>34-36</sup>. 국소뇌허혈 후 뇌허혈량이 매우 낮은 부위를 제외한 모든 허혈세포에서 HSP70 mRNA가 발현되었다고 보고되어 있다. HSP70 단백질은 뇌경색 중심부에서 허혈에 내성이 강한 내피세포에서 주로 생산되었으며, 뇌경색 바깥영역의 신경세포와 뇌경색 가장자리의 신경교세포에서도 발현된다 하였다<sup>20,37</sup>. 이러한 뇌경색 바깥영역에서의 HSP70 발현은 뇌허혈의 경계역역을 규정하거나 뇌허혈 영역 중에서 단백질변성구역 (zone of protein denaturation)을 결정하는 지표로 사용된다<sup>21,38</sup>.

본 실험의 결과 뇌허혈을 유발하지 않은 sham군에서 뇌해마 각 구역의 HSP70 발현은 DG구역에서만 비교적 높은 발현이 관찰되었다. 뇌허혈이 유발된 대조군은 뇌해마 전 구역에서 HSP70 발현이 현저하게 증가되었으며, 특히 CA1구역에서는 매우 현저한 증가가 관찰되었다. 뇌허혈이 유발 후 갈근추출물을 투여한 갈근군은, CA1구역에서는 대조군에 비하여 P<0.05의 유의한 HSP70 발현의 감소가 관찰되었고, CA2와 CA3구역에서는 대조군에 비하여 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 또한 DG구역에서는 대조군에 비하여 P<0.05의 유의한 HSP70 발현의 감소가 관찰되었다. 이러한 결과는 뇌허혈 유발에 의하여 증가된 HSP70 발현이 갈근의 투여에 의하여 CA1과 DG구역에서 현저히 감소된 이러한 결과는 갈근이 일정한 신경세포손상 보호효능을 가지고 있음을 나타내준다.

## 결 론

뇌허혈에 대한 갈근의 효능을 실험동물에서 확인해보고자 뇌허혈 손상은 저혈압 상태에서 양측 총경동맥을 일시적으로 폐쇄하는 방법으로 손상을 유발하고, 뇌해마에서 HSP70 단백질의 발현정도를 면역조직화학염색을 통하여 관찰한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

뇌허혈이 유발 후 갈근추출물을 투여한 갈근군은 CA1구역에서 대조군에 비하여 유의한 HSP70 발현의 감소가 관찰되었다. 뇌허혈이 유발 후 갈근추출물을 투여한 갈근군은 CA2와 CA3구역에서 대조군에 비하여 HSP70 발현이 감소는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 뇌허혈이 유발 후 갈근추출물을 투여한 갈근군은 DG구역에서 유의성 있는 HSP70 발현의 역제가 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 갈근은 뇌허혈에 의하여 신경세포에 가해지는 유해 스트레스 반응을 감소시킴으로써 신경세포손상 보호효과를 나타내는 것으로 생각된다.

## 감사의 글

The present research has been conducted by the Research Grant of Kyungwon University (FY2002-2003)

## 참고문헌

1. 이상인. 본초학. 서울:의학사. pp.65-66, 1975.
2. 상해중의학원. 중초약학. 香港:상무인서관. pp.532-534, 1977.
3. 이상인, 안덕균, 신민교. 한약임상응용. 서울, 성보사. pp.370-372, 1982.
4. 김호철. 한약약리학. 서울:집문당. pp.92-94, 2001.
5. 김지훈, 김명정, 김성곤, 박제민, 정영인. 정상 성인에서 갈근(Radix puerariae)의 장기투여가 혈중 알콜 농도에 미치는 영향. 신경정신의학. 35(6):1230-1235, 1996.
6. 강철중, 김명정, 김성곤, 김인주. 알코올 의존환자에서 갈근이 알코올 갈망과 대뇌 국소혈류량의 변화에 미치는 영향. 신경정신의학. 36(5):861-869, 1997.
7. Lee MK, Cho SY, Jang JY, Cho MS, Jeon SM, Jang MK, Kim MJ, Park YB. Effects of Puerariae Flos and Puerariae Radix extracts on antioxidant enzymes in ethanol-treated rats. Am J Chin Med. 29(2):343-354, 2001.
8. Keung WM. Anti-dipsotropic isoflavones: The potential therapeutic agents for alcohol dependence. Med Res Rev. 23(6):669-696, 2003.
9. 우홍정, 이장훈, 김영철. 인진과 갈근이 d-galactosamine, 급성 alcohol중독 및 CCl4중독 백서의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 18:411-429, 1997.
10. 송우섭, 장준혁, 김경호, 윤종화, 김감삼. 갈근수침이 Ethanol 투여로 유발된 흰쥐의 간손상에 미치는 영향. 대한침구학회지. 15:279-288, 1998.
11. Guerra MC, Speroni E, Broccoli M, Cangini M, Pasini P, Minghett A, Crespi-Perellino N, Mirasoli M, Cantelli-Forti G, Paolini M. Comparison between chinese medical herb Pueraria lobata crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. Life Sci. 67(24):2997-3006, 2000.
12. Arao T, Udayama M, Kinjo J, Nohara T. Preventive effects of saponins from the Pueraria lobata root on in vitro immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures. Planta Med. 64(5):413-6, 1998.
13. Jang MH, Shin MC, Lee TH, Bahn GH, Shin HS, Lim S, Kim EH, Kim CJ. Effect of Puerariae radix on c-Fos

- expression in hippocampus of alcohol-intoxicated juvenile rats. *Biol Pharm Bull.* 26(1):37-40, 2003.
14. Jang MH, Shin MC, Chung JH, Shin HD, Kim Y, Kim EH, Kim CJ. Effects of Puerariae radix on cell proliferation and nitric oxide synthase expression in dentate gyrus of alcohol-intoxicated Sprague-Dawley rats. *Jpn J Pharmacol.* 88(3):355-358, 2002.
  15. Xu XH, Zhao TQ. Effects of puerarin on D-galactose-induced memory deficits in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 23(7):587-590, 2002.
  16. Wang L, Zhao A, Wang F, Chai Q, Chai X. Protective effect of puerarin on acute cerebral ischemia in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 22(12):752-754, 1997.
  17. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22:391-397, 1999.
  18. Michenfelder JD, Lanier WL, Scheithauer BW, Perkins WJ, Shearman GT, Milde JH. Evaluation of the glutamate antagonist dizocilpine maleate (MK-801) on neurologic outcome in a canine model of complete cerebral ischemia: correlation with hippocampal histopathology. *Brain Res.* 481:228-234, 1989.
  19. Lindquist S. Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Curr Opin Genet Dev.* 2(5):748-755, 1992.
  20. Kinouchi H, Sharp FR, Hill MP, Koistinaho J, Sagar SM, Chan PH. Induction of 70-kDa heat shock protein and hsp70 mRNA following transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 13:105-115, 1993.
  21. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol.* 36:557-565, 1994.
  22. Chan PH, Kawase M, Murakami K, Chen SF, Li Y, Calagui B, Reola L, Carlson E, Epstein CJ. Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci.* 18(20):8292-8299, 1998.
  23. Sugawara T, Kawase M, Lewen A, Noshita N, Gasche Y, Fujimura M, Chan PH. Effect of hypotension severity on hippocampal CA1 neurons in a rat global ischemia model. *Brain Res.* 877:281-287, 2000.
  24. Gilby KL, Armstrong JN, Currie RW, Robertson HA. The effects of hypoxia-ischemia on expression of c-Fos, c-Jun and Hsp70 in the young rat hippocampus. *Mol Brain Res.* 48:87-96, 1997.
  25. Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia JH. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci.* 125:3-10, 1994.
  26. Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM. Quantitative assessment of early brain damage in the rat model of focal ischemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 50:402-410, 1987.
  27. Pulsinelli WA, Brierly JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanaesthetized rat. *Stroke.* 10:267-272, 1979.
  28. Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke.* 19:913-914, 1988.
  29. Welch WJ. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 339:327-33, 1993.
  30. Yenari MA, Fink SL, Sun GH, Chang LK, Patel MK, Kunis DM, Onley D, Ho DY, Sapolsky RM, Steinberg GK. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol.* 44:584-591, 1998.
  31. Abe K, Lee TH, Aoki M, Nitta Y, Ioyama S. Preferential expression of HSC70 heat shock mRNA in gerbil heart after transient brain ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 25:1131-1135, 1993.
  32. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science.* 248:850-854, 1990.
  33. Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones.* 1: 109-115, 1996.
  34. Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell.* 94:471-480, 1998.
  35. Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem.* 32:17-29, 1997.
  36. Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:441-469, 1995.
  37. Nowak TS Jr, Jacewicz M. The heat shock/stress response in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol.* 4:67-76, 1994.
  38. Kinouchi H, Sharp FR, Koistinaho J, Hicks K, Kamii H, Chan PH. Induction of heat shock hsp70 mRNA and HSP70 kDa protein in neurons in the 'penumbra' following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 619:334-338, 1993.