

원 저

Neuroprotective Effect of *HyulBuChookAu-Tang* on Focal Cerebral Ischemia of the Rats

Eun-Hee Cho, Jung-Nam Kwon, Young-Gyun Kim

Dept. of Oriental Medicine, Graduate School, Dong-eui University

Objectives : This study examined the neuroprotective effect of *Hyulbuchookautang* (血府逐瘀湯, HBCAT) against neural damage following focal cerebral infarction.

Methods : Sprague-Dawley Rats were induced with focal cerebral infarction by temporal middle cerebral artery occlusion (MCAO). The rats were divided into 2 groups. We treated extract of HBCAT to one group after operation (sample group), and the other group wasn't treated after operation (control group). We observed neurological scores and TTC-stained infarct area, total infarct volume in brain sections and Bax-positive neurons, HSP70- positive neurons in brain regions.

Results : HBCAT treatment at 3 days after MCAO reduced neurological scores induced by MCAO. HBCAT treatment at 5 days after MCAO reduced TTC-stained infarct area in brain sections induced by MCAO. HBCAT treatment at 5 days after MCAO reduced total infarct volume in brain sections induced by MCAO. HBCAT treatment after MCAO reduced Bax-positive neurons in cortex infarct core and cortex infarct penumbra and caudo-putamen of brain regions induced by MCAO. HBCAT treatment after MCAO reduced HSP70- positive neurons in cortex infarct penumbra of brain regions induced by MCAO.

Conclusions : These results suggest that HBCAT has a neuroprotective effect against focal cerebral ischemia.

Key Words: *Hyulbuchookautang* (血府逐瘀湯, HBCAT), middle cerebral artery occlusion (MCAO), neuroprotective effect, focal cerebral infarction.

緒 論

중풍은 급격한 의식장애나 운동장애, 감각장애 같은 신경계통의 증상을 일으켜 적극적인 치료에도 예후가 불량하여 높은 사망률을 나타내는 질환으로 회복 후에도 사회복귀가 어려운 경우가 빈번

하며, 주로 內風, 火熱, 濕痰 및 瘀血, 虛證 등의 원인으로 발병한다¹⁾.

血府逐瘀湯은 王²⁾의 醫林改錯에 처음 收載된 어혈치료의 대표처방으로, 活血祛瘀, 疎肝理氣, 行氣止痛의 효능을 갖고 주로 어혈로 인하여 頭部나 胸脇部에 발현되는 병증을 제거^{3,4)}하여 뇌혈관질환, 심근경색, 협심증, 뇌진탕 후유증 등에 응용되었다⁵⁻⁸⁾.

血府逐瘀湯에 대한 연구보고는 고지혈증 등 주로 혈액 및 혈관관련 인자에 대한 연구⁹⁻¹⁷⁾가 다수이며 이외에 면역기능^{18,19)} 및 肝臟^{20,21)}, 腎^{22,23)}과 관련된 보고 등이 있고 최근에 뇌세포 및 중풍의 연관성에 관한 논문이 발표되었다²⁴⁻²⁶⁾.

· 접수 : 2006년 3월 16일 · 논문심사 : 2006년 3월 20일
· 채택 : 2006년 6월 13일
· 교신저자 : 권정남, 부산광역시 부산진구 양정 2동 산 45-1
동의대학교 부속한방병원 한방 2내과
(Tel: 051-850-8622, Fax: 051-867-5162,
E-mail: jnkwon@demc.or.kr)

뇌허혈은 거풍지보단, 성향정기산, 당귀 등²⁷⁻³⁶⁾에 대한 연구보고는 있었으나 어혈로 인한 중풍처방인 血府逐瘀湯과 관련된 보고는 찾을 수 없었기에 血府逐瘀湯이 뇌허혈에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

본 연구에서는 흰쥐에 일시적인 중대뇌동맥폐쇄(middle cerebral artery occlusion, MCAO)에 의한 뇌허혈 손상을 유발하고 血府逐瘀湯 물 추출물을 경구 투여한 다음 신경학적 행동지표와 뇌경색 크기 및 뇌경색부위에서 발견되는 Bax (Bcl-associated protein X)와 HSP (heat shock protein)70에 미치는 영향을 조직학적 및 면역조직화학적 염색을 통하여 관찰한 바 유의한 뇌신경세포손상 보호효능을 관찰할 수 있었기에 보고하는 바이다.

사용하였다.

2. 약물의 제조

본 실험에 사용된 약물은 血府逐瘀湯은 醫林改錯²⁾에 수록된 것을 기준으로 하였으며 동의대학교 부속한방병원 약재과에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방내용과 1첩 분량은 다음과 같다.

약물의 조제는 일반적인 물추출 엑기스 제조방법에 의하여, 5첩 분량 490g을 3,000ml의 물과 함께 냉각기가 장착된 전탕기에서 2시간 전탕한 다음 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축 후 동결건조하여 121.4 g의 물추출 엑기스를 얻었다. 실험동물의 1회 투여량은 흰쥐 체중 100g 당 체중비례 계산량의 5배인 200mg으로 하였다.

實驗方法

1. 실험동물

실험동물은 바이오지노믹스(주)에서 구입한 12주령, 약 300g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐는 온도(21~23℃), 습도(40~60%), 조명(12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후

3. 실험군의 구분

뇌허혈 손상에 대한 血府逐瘀湯의 효능을 관찰하기 위하여, 실험군은 뇌허혈을 유발하기 위한 수술과정은 시행하였으나 중대뇌동맥을 폐쇄(middle cerebral artery occlusion, MCAO)시키지 않은 정상 대조군 (Sham), 일시적인 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 손상을 유발시킨 대조군 (Control) 및 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 국소뇌허혈 유발 후 血府逐瘀湯 물추출 엑기스를 1일 1회씩 5일간 경

Table 1.

한약명	생약명	용량
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	16 g
當歸	<i>Angelicae</i>	12 g
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	12 g
紅花	<i>Carthami Flos</i>	12 g
牛膝	<i>Achyranthis Radix</i>	12 g
枳殼	<i>Aurantii Fructus</i>	8 g
赤芍藥	<i>Paeoniae Radicis Rubra</i>	8 g
桔梗	<i>Platycodi</i>	6 g
川芎	<i>Chidii Rhizoma</i>	4 g
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4 g
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4 g
계	total amount	98 g

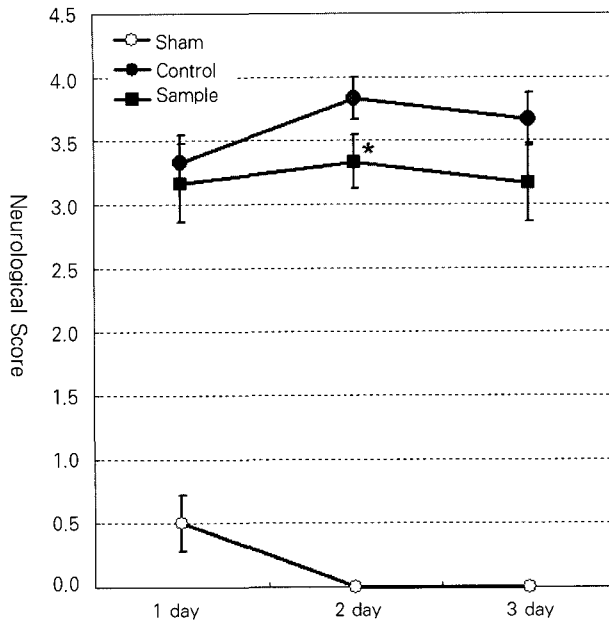


Fig. 1. Effect of *Hyulbuchookautang* on neurological scores of MCAO rats. Sample group demonstrated significant (*; $P < 0.05$ compared with control) reduction of the neurological score on 3 days after MCAO and treatment. Data presented as mean \pm standard error.

구투여한 血府逐瘀湯투여군(Sample)으로 나누었다. 각 군 당 실험동물은 12마리씩 배정하였으며, 그 중 6마리는 뇌경색 면적 측정용으로, 나머지 6마리는 면역염색화학염색용으로 사용하였다.

4. 국소뇌허혈의 유발

국소뇌허혈은 Zea Longa 등³⁷⁾의 방법 즉, 총경동맥으로 나일론 수술실을 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부를 폐쇄하는 방법을 사용하였다. 마취는 70% N₂O와 30% O₂의 혼합가스에 5% isoflurane

으로 마취를 시작하여 수술 도중에는 1.5~2%의 농도로 마취를 유지하였다. 체온은 feedback-regulated heating pad로 수술 전과정 동안 37.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C로 조절하였다. 전경부의 피부를 절개하고 총경동맥과 외경동맥 및 내경동맥의 분지 부위를 찾아 주위조직을 잘 정리하였다. 외경동맥에 나일론 수술실을 삽입할 수 있도록 입구를 만들고 절단한 다음, 총경동맥의 혈류를 일시적으로 차단한 상태에서, 약 4cm 길이의 나일론 수술실 (4-0 monofilament, Ethicon, Edinburgh, Scotland)을 내경동맥을 통하

Table 2. Neurological Score Evaluation

Score	Evaluation
0	명확히 관찰할 수 있는 결함이 없음
1	꼬리를 들었을 때 반대쪽 앞다리를 굴곡시킴
2	꼬리를 당겼을 때 반대쪽 앞다리의 악력(grip power)이 감소함
3	꼬리를 당겼을 때만 반대방향 원형돌기(contralateral circling)를 나타냄
4	지속적인 반대방향 원형돌기를 나타냄

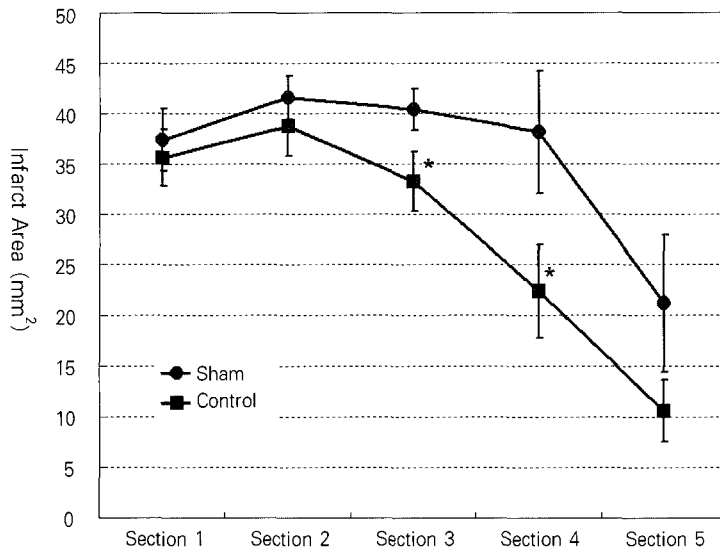


Fig. 2. Effect of *Hyulbuchookautang* on TTC-stained infarct area in brain sections of MCAO rats. Sample group demonstrated significant (*: $P < 0.05$ compared with control) reduction of the infarct area in 3rd and 4th brain sections as compared with the control group. Data presented as mean \pm standard error.

여 약 20mm 까지 천천히 삽입하여 중대뇌동맥의 기시부가 폐쇄되도록 하였다. 나일론 수술실의 삽입부 끝은 약 0.3mm 크기로 둥글게 만들었으며, 실험 당일에 0.1% poly-L-lysine으로 코팅하여 사용하였다. 삽입된 나일론 수술실은 혈관과 함께 고정하고, 한쪽 끝은 피부 봉합부위 외부로 약간 노출되도록 한 상태로 전경부의 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였다. 혈류의 재개통을 위하여, 폐쇄 2시간 후에 다시 마취한 상태에서 피부 봉합부위 밖으로 노출된 나일론 수술실을 조심스럽게 당겨내어 혈류를 재개통시키고 곧바로 마취에서 깨어나게 하였다.

5. 신경학적 행동지표 성적의 측정

국소뇌허혈을 유발한 실험군에서, 뇌허혈로 인한 신경학적 행동지표 성적 (neurological score)을 국소뇌허혈 후 1일, 3일 및 5일에 다음의 기준에 따라 판정하였다^{38,39)}.

6. 뇌경색 면적 및 체적의 측정

국소뇌허혈 5일째에 실험동물을 pentobarbital sodium의 복강주사로 깊게 마취한 다음 단두로 희생시키고, 즉시 뇌를 적출하여 흰쥐용 brain matrix (ASI,USA)를 사용하여 2mm 두께의 뇌조직 절편으로 만들었다. 뇌조직 절편을 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)로 염색하고⁴⁰⁾, digital camera로 촬영한 다음 “Image J” software를 사용하여 각 절편으로부터 뇌경색 면적을 측정하고, 측정값으로부터 총체적을 계산하였다.

7. 뇌조직의 처리

국소뇌허혈 5일째에 실험동물을 pentobarbital sodium의 복강주사로 깊게 마취한 다음 개흉하고 심장을 통하여 0.05M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출한 다음 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 담귀 침전시켰다. 다음 뇌를 -40°C의 dry ice-isophentan 용액으로 동결시키고

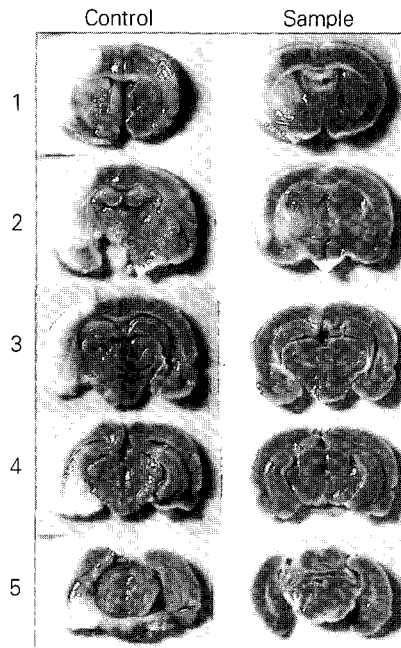


Fig. 3. TTC-stained brain sections of MCAO rats. Section number indicates the sequence from rostral to caudal order. Sample group demonstrated significant reduction of the infarct area in brain sections as compared with the control group.

조직절편을 제작할 때까지는 -80°C에 보관하였다. 뇌조직은 cryocut으로 50 μm 두께의 관상절편으로 제작하여 염색에 사용하였다.

8. Bax 및 HSP70의 염색

실험동물의 뇌조직을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10-15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum

(Vectastain)과 bovine serum albumin (Sigma)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어 낸 후, primary antibody를 처리하였다. Bax와 HSP70 antibody (mouse monoclonal IgG, Oncogene Science)는 1:200의 희석배율로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후, 4°C에서 overnight으로 반응시켰다^{41,42}. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunopero-

Table 3. Effect of *Hyulbuchookautang* on Neurological Scores of MCAO Rats

	1 day	3 days	5 days
Sham	0.50±0.22	0	0
Control	3.33±0.33	3.83±0.17	3.67±0.21
Sample	3.17±0.31	3.33±0.21*	3.17±0.31

Sham: Group operated without MCAO

Control: Group operated with temporal MCAO

Sample: Group operated with temporal MCAO and then treated with *HyulBuChookAu-Tang*

Data presented as mean ± standard error (*: P<0.05 compared with control).

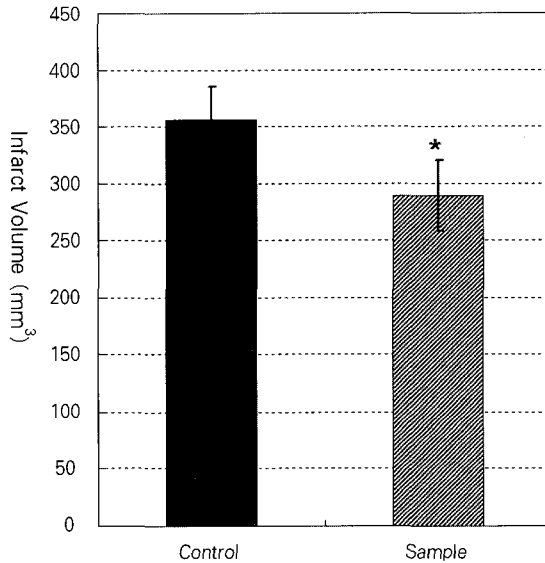


Fig. 4. Effect of *Hyulbuchookautang* on TTC-stained total infarct volume of MCAO rats. Sample group demonstrated significant (*: $P < 0.05$ compared with control) reduction of total infarct volume as compared with the control group. Data presented as mean \pm standard error.

xidase의 방법(ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시킨 다음 $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma, USA)를 섞은 diaminobenzidine-tetr-achloride (Sigma, USA)에서 5-10분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

찰하기 위하여, 면역조직화학적으로 염색된 뇌조직의 영상을 CCD 카메라를 통하여 영상분석시스템에 저장하고 “NIH Image” software를 사용하여, 대뇌피질의 뇌경색부위(cortex infarct core)와 뇌경색 경계부위(cortex infarct penumbra) 및 선조체(caudoputamen)에서 동일한 일정면적 ($120,000 \mu\text{m}^2$)내에서의 양성반응 신경세포 수를 측정하였다.

9. Bax 및 HSP70의 관찰

Bax 및 HSP70 발현의 변화를 정량적으로 관

Table 4. Effect of *Hyulbuchookautang* on TTC-stained Infarct Area in Brain Sections of MCAO Rats (mm^2)

	section-1	section-2	section-3	section-4	section-5
Sham	0	0	0	0	0
Control	37.4 \pm 3.1	41.6 \pm 2.2	40.4 \pm 2.1	38.2 \pm 6.0	21.2 \pm 6.8
Sample	35.6 \pm 2.8	38.7 \pm 3.0	33.2 \pm 3.0*	22.4 \pm 4.6*	10.6 \pm 3.0

Sham: Group operated without MCAO

Control: Group operated with temporal MCAO

Sample: Group operated with temporal MCAO and then treated with *HyulBuChookAu-Tang*

Data presented as mean \pm standard error (*: $P < 0.05$ compared with control).

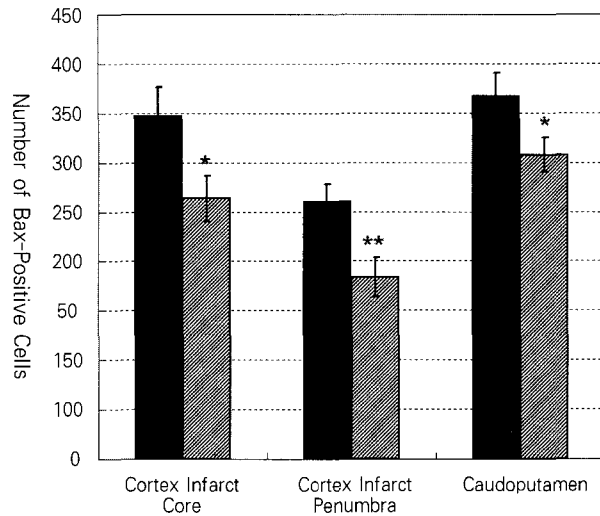


Fig. 5. Effect of *Hyulbuchookautang* on Bax-positive cells in brain regions of MCAO rats. Sample group demonstrated significant (*: $P < 0.05$ compared with control, **: $P < 0.01$ compared with control) decreases of Bax-positive cells in brain regions as compared with the control group. Data presented as mean \pm standard error.

10. 통계분석 방법

통계분석은 Student's t-test와 ANOVA를 사용하였고 $P < 0.05$ 이하를 통계적 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

實驗成績

1. 신경학적 행동지표 성적에 대한 영향

신경학적 행동지표 성적을 MCAO 이후 1일, 3일 및 5일에 측정한 바, Sham군은 1일에서만

0.50 \pm 0.22를 나타내어 일시적인 수술 후유증을 나타내었으나 3일과 5일에서는 완전히 정상을 나타내었다. Control군은 1일에 3.33 \pm 0.33, 3일에 3.83 \pm 0.17 및 5일에 3.67 \pm 0.21을 나타내어 뇌경색 유발에 따른 심한 반대방향 원형돌기 (contralateral circling) 의 신경학적 행동을 나타내었다. Sample군은 1일에 3.17 \pm 0.31, 3일에 3.33 \pm 0.21 및 5일에 3.17 \pm 0.31을 나타내어 여전히 반대방향 원형돌기의 신경학적 행동을 나타내기는 하였으나, 통계학적으로 3일에서 Control군에 비하여 $P < 0.05$ 의 유의성 있는

Table 5. Effect of *Hyulbuchookautang* on TTC-stained Total Infarct Volume of MCAO Rats

	Volume	Decrease %	P-value
Sham	0	-	-
Control	355.8 \pm 29.3	-	-
Sample	288.7 \pm 3.11	18.9	<0.05

Sham: Group operated without MCAO

Control: Group operated with temporal MCAO

Sample: Group operated with temporal MCAO and then treated with *Hyulbuchookautang*

Data presented as mean \pm standard error.

Table 6. Effect of *Hyulbuchookautang* on Bax-Positive Neurons in Brain Regions of MCAO Rats

	Brain Regions		
	Cortex Infarct Core	Cortex Infarct Penumbra	Caudoputamen
Sham	0	0	0
Control	69.7±5.7	52.2±3.4	73.5±4.7
Sample	52.7±4.6*	36.7±4.0**	61.5±3.5*

Sham: Group operated without MCAO

Control: Group operated with temporal MCAO

Sample: Group operated with temporal MCAO and then treated with *Hyulbuchookautang*

Data presented as mean ± standard error (*: P<0.05 compared with control, **: P<0.01 compared with control).

신경학적 행동지표 성적의 감소를 나타내었다(table 1, Fig. 1 참조).

2. 뇌경색 면적 및 체적에 미치는 영향

각 군의 TTC 염색된 뇌조직 절편에서 뇌경색이 유발된 부위의 면적을 측정할 때, Sham군에서는 뇌경색이 관찰되지 않았다. Control군은 뇌조

직절편 5개에서의 뇌경색 면적이 각각 37.4±3.1 mm², 41.6±2.2 mm², 40.4±2.1 mm², 38.2±6.0 mm² 및 21.2±6.8 mm² 이었으며, 뇌경색의 총체적은 355.8±29.3 mm³ 이었다. Sample군은 각각 35.6±2.8 mm², 38.7±3.0 mm², 33.2±3.0 mm², 22.4±4.6 mm² 및 10.6±3.0 mm²로 세 번째와 네 번째 뇌조직 절편에서 Control에 비하여 P<0.05의

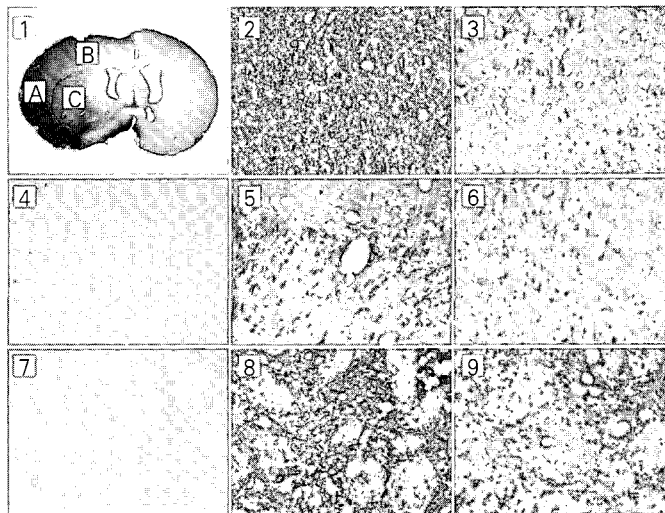


Fig. 6. Immuno-reacted brain sections against Bax on brain regions of MCAO rats. Section 1 shows a whole brain section, A indicates the cortex infarct core region, B indicates the cortex infarct penumbra region, and C indicates the caudoputamen. Section 2: Control, cortex infarct core, Section 3: Sample, cortex infarct core, Section 4: Sham, cortex, Section 5: Control, cortex infarct penumbra, Section 6: Sample, cortex infarct penumbra, Section 7: Sham, caudoputamen, Section 8: Control, caudoputamen, Section 9: Sample, caudoputamen. Sample group demonstrated significant (P<0.05 compared with control, P<0.01 compared with control) decreases of Bax-positive cells in brain regions as compared with the control group.

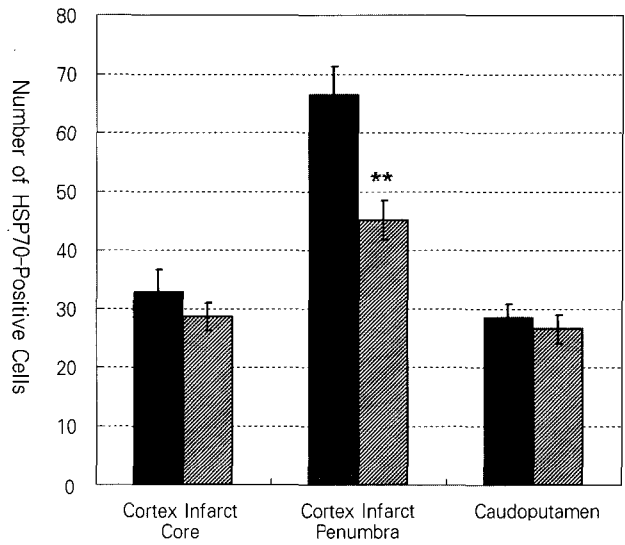


Fig. 7. Effect of *Hyulbuchookautang* on HSP70-positive cells in brain regions of MCAO rats. Sample group demonstrated significant (**: P<0.01) decreases of HSP70-positive cells in the cortex infarct penumbra as compared with the control group. Data presented as mean ± standard error.

유의한 뇌경색 면적의 감소를 나타내었다(Table 2, Fig. 2, 3 참조). 또한 뇌경색의 총체적은 288.7 포가 관찰되었다. Sample군에서는 동일면적 당 ±31.1 mm³으로 Control군에 비하여 18.9% 감소 하였으며, P<0.05의 유의성 있는 뇌경색 총체적의 감소를 나타내었다(table 3, Fig. 3, 4 참조).

3. 뇌 부위별 Bax-양성반응 신경세포 수에 미치는 영향

뇌경색이 유발된 뇌부위를 대뇌피질 뇌경색의 중심부, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위 및 선조체 부위로 나누어 Bax-양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정할 바, Sham군에서는 뇌경색이 관찰되지 않았으며, Bax-양성반응을 나타낸 신경세포 또한 관찰되지 않았다. Control군에서는 동일면적 당 대뇌피질 뇌경색의 중심부에서 69.7±5.7 개, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서 52.2±3.4 개 및 선조체 부위에서 73.5±4.7 개의 Bax-양성반응 신경세포

Table 7. Effect of *Hyulbuchookautang* on HSP70-Positive Neurons in Brain Regions of MCAO Rats

	Brain Regions		
	Cortex Infarct Core	Cortex Infarct Penumbra	Caudoputamen
Sham	0	0	0
Control	33.0±3.6	66.5±4.7	28.5±2.3
Sample	28.5±2.4	45.0±3.4**	26.5±2.4

Sham: Group operated without MCAO

Control: Group operated with temporal MCAO

Sample: Group operated with temporal MCAO and then treated with *Hyulbuchookautang*

Data presented as mean ± standard error (**: P<0.01).

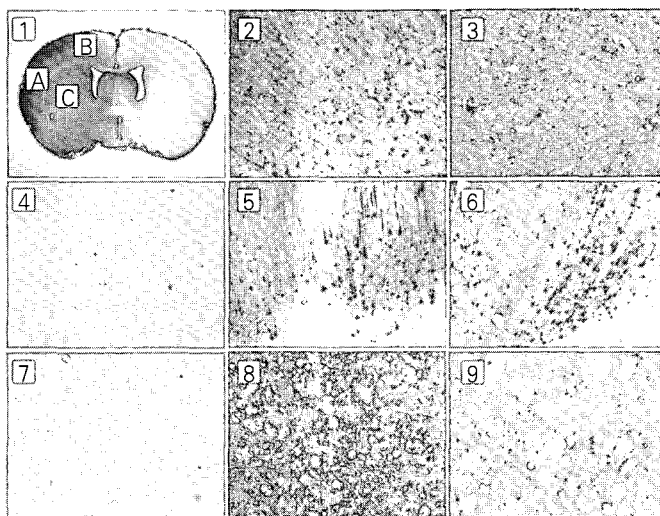


Fig. 8. Immuno-reacted brain sections against HSP70 on brain regions of MCAO rats. Section 1 shows a whole brain section, A indicates the cortex infarct core region, B indicates the cortex infarct penumbra region, and C indicates the caudoputamen. Section 2: Control, cortex infarct core, Section 3: Sample, cortex infarct core, Section 4: Sham, cortex, Section 5: Control, cortex infarct penumbra, Section 6: Sample, cortex infarct penumbra, Section 7: Sham, caudoputamen, Section 8: Control, caudoputamen, Section 9: Sample, caudoputamen. Sample group demonstrated significant ($P<0.01$) decreases of HSP70-positive cells in the cortex infarct penumbra as compared with the control group.

대뇌피질 뇌경색의 중심부에서 52.7 ± 4.6 개, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서 36.7 ± 4.0 개 및 선조체 부위에서 61.5 ± 3.5 개의 Bax-양성반응 신경세포가 관찰되어 Control군에 비하여 각각 $P<0.05$, $P<0.01$ 및 $P<0.05$ 의 유의성 있는 Bax-양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다(Table 4, Fig. 5, 6 참조).

4. 뇌 부위별 HSP70-양성반응 신경세포 수에 미치는 영향

뇌경색이 유발된 뇌부위를 대뇌피질 뇌경색의 중심부, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위 및 선조체 부위로 나누어 HSP70-양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정할 때, Sham군에서는 뇌경색이 관찰되지 않았으며, HSP70-양성반응을 나타낸 신경세포 또한 관찰되지 않았다. Control군에서는 동일 면적 당 대뇌피질 뇌경색의 중심부에서 33.0 ± 3.6

개, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서 66.5 ± 4.7 개 및 선조체 부위에서 28.5 ± 2.3 개의 HSP70-양성반응 신경세포가 관찰되었다. Sample군에서는 동일 면적 당 대뇌피질 뇌경색의 중심부에서 28.5 ± 2.4 개, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서 45.0 ± 3.4 개 및 선조체 부위에서 26.5 ± 2.4 개의 HSP70-양성반응 신경세포가 관찰되어 Control군에 비하여 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서만 $P<0.01$ 의 유의성 있는 HSP70-양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다(table 5, Fig. 7, 8 참조).

考 察

瘀血은 蓄血과 더불어 A.D 200년경 張機가 처음으로 사용한 용어이며 특히 1830년 王淸任은 모든 질병의 원인을 거의 瘀血로 보는 이론을 주장하고 血府逐瘀湯 등의 처방을 창안하여 활용하였다⁴³⁾.

血府逐瘀湯은 桃仁, 紅花, 當歸, 生地黃, 牛膝,

枳實, 赤芍, 桔梗, 川芎, 柴胡, 甘草로 구성되어 있으며 活血祛瘀, 疎肝理氣, 行氣止痛의 효능⁴⁴⁾으로 胸脇疼痛과 頭痛, 內熱煩悶, 失眠多夢, 心悸怔忡 등의 證 즉, 어혈로 인하여 頭部와 胸脇部에 발현되는 병증에 응용되어 왔으며^{3,4)}, 뇌혈관질환, 심근경색, 협심증, 뇌진탕후유증의 두통과 현훈, 월경통과 産後身痛, 유산 후 요통과 출혈증 등에 활용되고 있다⁵⁻⁸⁾.

血府逐瘀湯에 대한 연구보고는 고지혈증등 주로 혈액 및 혈관관련 인자에 대한 연구⁹⁻¹⁷⁾가 다수이며 이외에 면역^{18,19)} 및 肝臟^{20,21)}, 임^{22,23)} 관련 보고와 관절염⁴⁵⁾에 대한 보고가 있고 최근에 뇌중풍의 연관성에 관한 논문이 발표되었다²⁴⁻²⁶⁾.

뇌허혈에 관한 보고는 거풍지보단, 우황청심원, 성향정기산, 석창포, 죽력과 생강즙 등 여러 방제와 약물이 있었으나²⁷⁻³⁶⁾ 血府逐瘀湯과 관련한 보고는 찾을 수 없었기에 血府逐瘀湯이 뇌허혈에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

중풍은 갑작스런 의식장애와 반신불수의 운동장애 및 언어장애를 주증으로 하는데 뇌혈관질환, 뇌종양, 척수종양, 탈수초성질환, 뇌농양, 뇌염 등 대부분이 중풍증상을 나타내지만 그 중에 대표적인 것이 뇌혈관질환(CVA, cerebrovascular accident) 즉 뇌중풍이다¹⁾.

뇌중풍은 크게 뇌출혈과 뇌경색으로 나뉜다. 뇌경색은 죽상경화증으로 인한 혈전증, 두개강 이외의 장소에서 유래한 물질이 뇌혈관을 폐색하는 색전증, 동맥염으로 인한 협착 등과 같이 혈관폐색을 일으켜 발생하는 경우와 고혈압이나 뇌관류압의 저하와 같이 혈관 폐색없이 뇌혈류량의 저하로 오는 경우가 있다¹⁾.

뇌허혈은 전뇌허혈과 국소허혈로 나눌 수 있는데 임상에서 보게 되는 허혈성 뇌혈관질환의 대부분은 후자에 속하며, 이는 주로 내경동맥이나 중대뇌동맥의 폐색으로 인해 발생한다. 중대뇌동맥은 내경동맥의 분지에서 시작하며 중대뇌동맥 첫부분의 폐색은 주요한 신경학적 증상을 야기한다.

중대뇌동맥의 첫부분의 폐색은 윌리스환 원위부 폐색으로 전대뇌동맥과 후대뇌동맥의 혈관문합에 의한 측부순환이 제한되어 발생한다¹⁾.

실험동물을 사용한 뇌허혈모형은 전뇌허혈(global cerebral ischemia)과 국소뇌허혈(focal cerebral ischemia) 모형으로 대별된다⁴⁶⁾. 전뇌허혈은 일반적으로 혈관의 폐쇄에 의하여 유발시킬 수 있으며 전뇌(forebrain) 부위에서 균일한 허혈손상이 유발되므로 뇌해마(hippocampus) CA1 부위에서 뇌허혈에 의한 지연성신경세포사망(delayed neuronal cell death)의 기전을 연구하는데 많이 이용된다^{46,47)}. 하지만 전뇌허혈 모형에서는 뇌경색(infarct)이 유발되지 않는다⁴⁸⁾. 국소뇌허혈 모형은 중대뇌동맥을 폐쇄하여 대뇌피질 및 선조체 부위에 뇌경색을 유발시키는 모형이다. 이 모형은 대뇌피질의 뇌경색 중심부(infarct core)와 경계부위(penumbra) 및 선조체(caudoputamen)에서 각각 신경세포의 분포와 혈류 및 대사적 차이에 의하여 신경세포사망에 시간적, 환경적 특성을 가지면서 확실하게 뇌경색이 유발되고 신경학적 운동기능의 실조까지 동반하므로⁴⁹⁻⁵²⁾, 임상상의 중풍증상과 연관성이 깊어 중풍에 대한 血府逐瘀湯의 효능을 검증하는데 있어서 보다 적합한 실험모형이라고 생각되었다.

중대뇌동맥폐쇄에 의하여 유발되는 뇌경색은 대뇌피질은 물론 선조체 부위에도 뇌경색을 유발하므로 신경학적 운동장애가 유발된다^{53,54)}. 뇌경색이 유발된 뇌의 부위와 크기 등에 따라 다양한 행동 및 운동장애가 유발되므로 일괄적으로 표현할 수는 없지만, 뇌허혈의 병리생리적 기전과 특정한 신경학적 동향 및 운동장애와의 상관성을 가지고 있는 것은 명확하다^{55,56)}. 그러므로 국소뇌허혈에 의한 뇌경색 실험에서 신경학적 행동지표(neurological score)의 측정은 중요한 의의를 갖는다. 특히 중풍환자의 임상에서 치료 목표의 하나가 중풍환자의 운동 및 행동 실조를 개선하는 것이고, 조직병리학적 검사만으로는 운동기능의 개선을 충분히 검증할 수 없다는 특징을 감안한다

면 더욱 그 의의가 중요해진다. 국소뇌허혈 후 1일, 3일 및 5일에, 반대방향 원형돌기(contralateral circling)를 중심으로 한 신경학적 행동지표에 미치는 영향을 관찰한 바, 뇌경색 유발군은 심한 반대방향 원형돌기의 신경학적 행동을 나타낸 것에 비하여 血府逐瘀湯군은 여전히 반대방향 원형돌기의 신경학적 행동을 나타내기는 하였으나, 통계학적으로 3일에서 뇌경색 유발군에 비하여 유의성 있는 신경학적 행동지표 성적의 감소를 나타내었다. 이는 血府逐瘀湯이 중풍에 의한 운동기능실조의 개선에 효능이 있음을 보여준다.

TTC로 염색된 뇌조직 절편을 육안적으로 관찰하면, 뇌경색 유발군은 대뇌피질은 물론 선조체까지 뇌경색이 명확히 유발되었으나 血府逐瘀湯군에서는 대뇌피질에서의 뇌경색 부위가 감소하였음은 물론 선조체에서의 뇌경색을 완화시킨 것으로 관찰된다. 뇌경색이 유발된 부위의 면적을 측정하여 비교한 바, 血府逐瘀湯군은 세 번째와 네 번째 뇌조직 절편에서 뇌경색 유발군에 비하여 유의한 뇌경색 면적의 감소를 나타내었으며, 뇌경색의 총체적 또한 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 위의 신경학적 행동지표에 대한 결과에 더불어 血府逐瘀湯의 국소뇌허혈에 대한 보호효능을 조직병리학적으로 명확하게 보여주는 결과이다.

Bax는 Bcl-2 (B-cell lymphoma²⁾와 함께 세포자연사를 조절하는 인자이다⁵⁷⁾. Bax는 Bcl-2와 거의 유사한 아미노산 서열을 가지고 있으며, 과도하게 발현될 경우 세포가 자연사 과정을 일으키게 된다. 이러한 Bax는 중추신경계의 신경세포에서 약간 볼 수 있으며 노화와 함께 증가하는 경향을 나타낸다. 이에 비하여 Bcl-2는 세포자연사를 억제하여 세포의 생존을 촉진하며, 성장기의 신경세포에 다량으로 존재하나 노화와 함께 급격히 감소한다. Bcl-2의 세포자연사 억제효능은 Bax와 결합하여 Bax가 세포자연사를 일으키는 기능을 저해하여 나타난다. 그러므로 Bax와 Bcl-2는 세포의 생존과 사망에 상반된 역할을 수행하고 있는 것으로

알려져 있다^{41,58)}. 특히 Bax는 뇌허혈과 같은 다양한 세포 외부로부터의 유해자극에 대하여 신경세포의 손상 가능성 여부를 결정하는 것으로 보고되어 있다⁵⁹⁾. 그러므로 뇌허혈에 의하여 가장 민감하게 신경세포의 자연사가 일어나는 뇌해마 추체 신경세포에서 Bax의 발현은 장차 신경세포가 사망할 것이라는 것을 판별할 수 있는 중요한 지표로 사용되고 있다⁶⁰⁾. 본 실험에서 뇌경색이 유발된 뇌부위를 대뇌피질 뇌경색의 중심부, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위 및 선조체 부위로 나누어 Bax-양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정할 때, 뇌경색 유발군에서는 동일면적 당 대뇌피질 뇌경색의 중심부에서 69.7±5.7개, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서 52.2±3.4개 및 선조체 부위에서 73.5±4.7개의 Bax-양성반응 신경세포가 관찰되었다. 이에 비하여 血府逐瘀湯군에서는 동일면적 당 대뇌피질 뇌경색의 중심부에서 52.7±4.6개, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서 36.7±4.0개 및 선조체 부위에서 61.5±3.5개의 Bax-양성반응 신경세포가 관찰되어 뇌경색 유발군에 비하여 모든 부위에서 유의성 있는 Bax-양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다. 이는 血府逐瘀湯이 뇌허혈에 의한 신경세포의 자연사기전을 억제하는 효능이 있음을 보여주는 결과이다.

HSP70은 스트레스 유발 단백질(stress-induced proteins)의 일종으로, heat-shock gene은 열충격이나 허혈 또는 각종 스트레스 등 변성단백질을 생산하는 모든 스트레스에 대한 반응으로 그 발현이 증가되며, 식물이나 이스트, 박테리아 및 모든 포유류 세포에서 발견된다⁶¹⁾. 특히 HSP70은 열, 중금속, 독소, 허혈 등 여러 스트레스에 대한 반응으로 합성된다⁶²⁾. 생산된 HSP70 단백질은 변성단백질과 결합한 다음, ATP hydrolysis에 의하여 유도되는 대사과정내에서 변성단백질의 효소적 역할과 3차구조의 복원을 시도한다. 즉 변성단백질이 HSP70의 발현을 자극하며, HSP70은 변성단백질의 구조와 기능을 복원하는 것으로 알려져 있다^{63,64)}.

국소뇌허혈 후 뇌혈류량이 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 하였다⁶⁵⁾. 이러한 뇌경색 바깥영역에서의 HSP70 발현은 뇌허혈의 경계영역을 규정하거나 뇌허혈 영역 중에서 단백질변성구역(zone of protein denaturation)을 결정하는 지표로 사용된다^{65,66)}. 본 실험에서 뇌경색이 유발된 뇌부위를 대뇌피질 뇌경색의 중심부, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위 및 선조체 부위로 나누어 HSP70-양성반응을 나타낸 신경세포 수를 측정할 때, 뇌경색 유발군에서는 동일면적 당 대뇌피질 뇌경색의 중심부에서 33.0±3.6개, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서 66.5±4.7개 및 선조체 부위에서 28.5±2.3개의 HSP70-양성반응 신경세포가 관찰되었다. 이에 비하여 血府逐瘀湯 군에서는 동일면적 당 대뇌피질 뇌경색의 중심부에서 28.5±2.4개, 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서 45.0±3.4개 및 선조체 부위에서 26.5±2.4개의 HSP70-양성반응 신경세포가 관찰되어 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서만 유의성 있는 HSP70-양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 血府逐瘀湯이 대뇌피질 뇌경색의 경계부위를 축소시키는 효능을 보여주는 것으로 이는 血府逐瘀湯에 의하여 뇌경색 부위가 확장되는 것이 억제되었음을 나타내는 것이다.

이상의 결과들로 보아 血府逐瘀湯은 뇌허혈손상에 대하여 보호효능을 가지고 있으며, 뇌허혈에 의한 신경세포의 자연사를 억제하고 뇌경색 유발 및 확장의 억제 효능에 의하여 신경학적 운동 및 행동지표의 개선을 나타내는 것으로 고찰된다.

향후 血府逐瘀湯이 어혈로 인한 중풍의 치료효과에 미치는 영향에 대하여 임상적인 연구가 필요하다고 생각된다.

結 論

血府逐瘀湯이 국소뇌허혈에 의한 뇌경색에 미치는 효능을 연구하기 위해서, 실험동물에 일시적인 중대뇌동맥의 폐쇄에 의하여 대뇌피질과 선조체 일부에 뇌경색을 유발시킨 후 血府逐瘀湯의 물추출물을 투여한 다음 신경학적 행동지표 성적, 뇌경색의 크기 및 총체적, 뇌 부위별 Bax 및 HSP70 양성반응 신경세포 수의 변화를 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 血府逐瘀湯은 투여 3일후 유의한 신경학적 행동지표 성적 감소를 나타내었다.
2. 血府逐瘀湯은 투여 5일후 유의한 뇌경색 면적의 감소를 나타내었다.
3. 血府逐瘀湯은 투여 5일후 유의한 뇌경색 총체적의 감소를 나타내었다.
4. 血府逐瘀湯은 대뇌피질 뇌경색의 중심부와 경계부위 및 선조체 부위 모두에서 유의한 Bax-양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다.
5. 血府逐瘀湯은 대뇌피질 뇌경색의 경계부위에서 유의한 HSP70-양성반응 신경세포 수의 감소를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 血府逐瘀湯은 국소뇌허혈에 의한 뇌경색과 신경세포손상에 대하여 보호효능이 있는 것으로 판단된다.

參考文獻

1. 김영석. 임상중풍학. 서울: 서현당. 1997: 303-308, 326-327, 353.
2. 王 清任. 醫林改錯. 上海: 上海科學技術出版社. 1996: 19.
3. 上海中醫學院. 方劑學. 香港: 상무인서관. 1977: 177.
4. 廣東中醫學院. 新編中醫學概要. 香港: 상무인서관. 1976: 299-300.
5. 陸乾人. 血府逐瘀湯加味治療冠心病84例. 中國

- 中西醫結合雜誌. 1995; 15(1): 44-45.
6. 張麗容. 血府逐瘀湯治療婦科病309例分析. 中國中西醫結合雜誌. 1991; 11(8): 486.
 7. 鄧世發. 血府逐瘀湯加味治療瘀血性高血壓短痛初探. 中醫雜誌. 1985; 5: 50-53.
 8. 王益全. 血府逐瘀湯治療外傷頭痛的體會. 中醫雜誌. 1982; 1: 67-69.
 9. 최순자. 혈부축어탕이 STZ 당뇨병 랫드의 고지혈증에 미치는 영향. 성남: 경원대 대학원. 2005.
 10. 정승원. 대동맥 평활근 세포에서 혈부축어탕이 NO 생성과 전체 단백질 발현 양상에 미치는 영향. 익산: 원광대 한의학전문대학원. 2004.
 11. 주왕석. 혈부축어탕과 그 구성약물군이 Alloxan 당뇨 백서의 혈청 조성 및 항산화 효과에 미치는 영향. 서울: 동국대 대학원. 2002.
 12. 문명곤. 혈부축어탕이 흰쥐의 혈소판 응집억제와 혈구수에 미치는 영향. 부산: 동의대 대학원. 2001.
 13. 허재혁, 박진영, 양준모, 장호연, 이인, 문병순. 혈부축어탕이 대동맥 평활근 세포에서 NO생성에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2003; 24(2): 166-178.
 14. 김영선. 혈부축어탕이 혈전생성관련인자에 미치는 영향. 성남: 경원대 대학원. 2000.
 15. 백광현. 혈부축어탕이 흰쥐의 실험적 고지혈증에 미치는 영향. 부산: 동의대 대학원. 1998.
 16. 방혜정. 혈부축어탕이 Triton X-100 주사로 유도된 생쥐의 고지혈증에 미치는 영향. 서울: 동국대 대학원. 1997.
 17. 최승훈. 혈부축어탕이 혈전증과 피하혈증에 미치는 영향. 대한동의병리학회지. 1987; 2: 26-42
 18. 최유경. 혈부축어탕이 대식세포의 oxLDL 생성능에 미치는 영향. 성남: 경원대 대학원. 2002.
 19. 홍희탁, 김형열, 이태균, 남경수. 혈부축어탕이 면역기능에 미치는 영향. 대한한방부인과 학회지. 1996; 9(1): 177-289.
 20. 양수광. 혈부축어탕이 STZ 유도 당뇨병 상태의 간 기능에 미치는 영향. 성남: 경원대 대학원. 2005.
 21. 김영목. 혈부축어탕이 Thioacetamide에 의한 백서간손상에 미치는 영향. 익산: 원광대 대학원. 1984.
 22. 정윤관. 혈부축어탕이 CT105로 유도된 신경아세포암 세포주의 신경보호 및 재생효과에 관한 연구. 서울: 동국대 대학원. 2003.
 23. 이진화. 혈부축어탕이 암전이 억제에 미치는 영향. 서울: 경희대 대학원. 1999.
 24. 정성재. 혈부축어탕이 뇌세포의 arachidonic acid 대사 유전자 발현에 미치는 영향. 성남: 경원대 대학원. 2004.
 25. 김용. 혈부축어탕이 교원효소로 유발된 흰쥐의 출혈성 뇌졸중에 미치는 영향.계천: 세명대 대학원. 2004.
 26. 심문기. 혈부축어탕이 중풍관련인자에 미치는 영향. 성남: 경원대 대학원. 2003.
 27. 정성욱, 장규태, 김장현. 일시적 국소뇌허혈 흰쥐모델에서 거풍지보단의 뇌손상 및 인지 기능 보호효과. 대한한의학회지. 2005; 26(2): 52-62.
 28. 조기호, 지남규, 정우식, 박성욱, 문상관, 고창남, 김영석, 배형섭. 무증후성 뇌경색환자에 대한 청혈단의 중풍예방효과. 대한한의학회지. 2005; 26(2): 77-84.
 29. 정춘근, 김은영, 신정원, 손영주,이현상, 정혁상, 손낙원. 청폐사간탕이 당뇨유발 흰쥐의 뇌허혈손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2005; 26(2): 217-230.
 30. 김대영. 차전근과 차전엽의 흰쥐 일시적 국소뇌허혈에 대한 신경보호 효과에 관한 연구. 서울: 경희대 동서의학대학원. 2005.
 31. 김경선. 천궁의 구강투여 및 약침시술이 흰쥐 MCAO로 유발된 국소뇌허혈에 대한 콜

- 린성 신경보호효과 연구. 나주. 동신대 대학원. 2004.
32. 오병렬. 가미시호탕이 뇌허혈시 Glutamate receptor, free radical, apoptosis 및 뇌손상 보호에 미치는 영향. 대전: 대전대 대학원. 2004.
33. 이현삼. 양격산화탕이 정상혈류, 당뇨혈류, 고혈압혈류에 유발된 일시적 국소뇌허혈에 미치는 영향에 대한 연구. 서울: 경희대 동서의학대학원. 2004.
34. 안종석. 가미계혈등탕이 뇌허혈시 Glutamate receptor와 Free radical 및 뇌손상 보호에 미치는 영향. 대전: 대전대 대학원. 2003.
35. 김진형. 가미육미지황탕이 뇌손상에 미치는 영향. 대전: 대전대 대학원. 2003.
36. 부영민. 참당귀의 일시적 국소뇌허혈에 대한 신경 보호효과. 서울: 경희대 동서의학대학원. 2003.
37. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20: 84-91.
38. 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.
39. Whishaw IQ, Mittleman G, Bunch ST, Dunnett SB. Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudate-putamen lesions in rats. *Behav Brain res*. 1987; 24: 125-138.
40. 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.
41. Chen J, Zhu RL, Nakayama M. Expression of the apoptosis-effector gene, BAX, is upregulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem*. 1996; 67: 64-71.
42. 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*. 1993; 13: 105-115.
43. 임준규, 안규석, 문준전. 어혈의 병리에 관한 문헌적 고찰. *동서의학지*. 1980; 5(1): 43.
44. 박선동, 주왕석, 고원도. 혈부축어탕과 그 구성약물군이 Alloxan 당뇨 백서의 혈청조성 및 항산화효과에 미치는 영향. *본초학회지*. 2002; 17(1): 93-118.
45. 제정진. 혈부축어탕이 Adjuvant 유발 관절염에 미치는 영향. 서울: 경희대 대학원. 1993.
46. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*. 1989; 28: 1627-1642.
47. Swan JH, Meldrum BS. Long term development of selective neuronal loss and the mechanism of protection by 2-amino-7-phosphonohepatnoate in a rat model of incomplete forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1988; 8: 64-78.
48. Smith ML, Auer RN, Siesjo BK. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol*. 1984; 64: 319-332.
49. 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*. 1994; 125: 3-10.
50. Kaplan B, Brint S, Tanabe J, Jacewicz M, Wang XJ, Pulsinelli W. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to

- reversible focal cerebral ischemia. *Stroke*. 1991; 22: 1032-1039.
51. Li Y, Chopp M, Jiang N, Zhang ZG, Zaloca C. Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1995; 26: 1252-1258.
 52. Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1992; 23: 552-559.
 53. Garcia JH, 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*. 1995; 26: 627-635.
 54. Markgraf CG, Green EJ, Hurwitz BE, Morikawa E, Dietrich WD, McCabe PM, Ginsberg MD. Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*. 1992; 575: 238-246.
 55. Wahl F, Allix M, Plotkine M, Boulu RG. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1992; 23: 267-272.
 56. Yamamoto M, Tamura A, Kirino T, Shimizu M, Sano K. Behavioral changes after focal cerebral ischemia by left middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*. 1998; 452: 323-328.
 57. Nicholson DW. Mechanisms of apoptotic control. *Nature*. 2000; 407: 810-816.
 58. Gillardon F, Wickert H, Zimmermann M. Up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 is associated with kainate-induced apoptosis in mouse brain. *Neurosci Lett*. 1995; 192: 85-88.
 59. Hara A, Iwai T, Niwa M. Immunohistochemical detection of BAX and BCL-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 1996; 711: 249-253.
 60. Welch WJ. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1993; 339: 327-333.
 61. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*. 1990; 248: 850-854.
 62. Bruce BD, Churchich J. Characterization of the molecular-chaperone function of the heat-shock-cognate-70-interacting protein. *Eur J Biochem*. 1997; 245: 738-744.
 63. Gebauer M, Zeiner M, Gehring U. Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity. *FEBS Lett*. 1997; 417: 109-113.
 64. Nowak TS Jr, Jacewicz M. The heat shock/stress response in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol*. 1994; 4: 67-76.
 65. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 1994; 36: 557-565.
 66. 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*. 1993; 619: 334-338.