

加味十全湯 加味方이 火傷의 조직 손상에 미치는 영향

김희영 · 홍승욱

동국대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

The effects of *Gamisipjeontang-gamibang* on injured tissue after burn elicitation

Hee-Young Kim · Seung-Ug Hong

Objective : The purpose of this study is to examine the effects of Gamisipjeontang-gamibang(GT) on an experimental burn elicitation.

Method : The absorbance of the photo cell mixed with GT at the Abs 560 nm was measured after irradiation for 1 min. In order to know the antioxidant effect on skin cell of mice after burn elicitation, superoxide dismutase(SOD) activity was measured.

Also, in order to know effects on the skin regeneration in the burned mice, we counted the eosinophil in blood from animals via cardiac puncture and observed the histological structure in the epidermal basal layer and the dermal section on the 3rd, 7th and 14th day after burn elicitation. We also studied changes in angiogenesis in the capillary surrounding the basal layer and dermal papilla. The changes of HSP70 distribution and changes of p53 positive reaction were observed to investigate the changes of the stress in the skin as well.

Result : The results indicated that GT has a significant impact on the antioxidant effect on skin cells of mice after burn elicitation by increasing SOD activity in vitro test. GT seems to decrease MIP-2 which induces neutrophil infiltration and promotes the angiogenesis dose-dependently. Furthermore, GT decreased HSP70, the expression of which was induced by elevated temperatures, and p53 which induce a apoptosis after stress.

Conclusion : GT can be applied to burned skin through its antioxidant effect and skin regeneration property.

Key words : Burned skin, SOD activity, HSP70, p53, *Gamisipjeon-tang*

교신저자 : 홍승욱, 419-773 경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지
동국대학교 일산불교한방병원 안이비인후피부과
(Tel : 031) 961-9085, E-mail : heentsu@duih.org)

• 접수 2009/02/24 • 수정 2009/03/24 • 채택 2009/04/08

I. 서 론

화상(火傷)은 “일반적으로 열에 의해 감염된 상처”를 말하며¹⁾, 화상의 손상정도는 온도, 노출기간, 열의 종류, 피부의 두께 등에 의해 좌우되는데, 화상을 유발시키는 최저 온도는 44℃이며, 열에 의한 단백질의 변성, 응고, 효소의 불활성화 등이 피부 조직에서 발생한다²⁾.

화상에 대해 한의학에서는 “本病皆因火毒之邪, 外傷皮膚, 甚者熱邪入裏, 火毒攻心, 耗氣傷陰, 阻滯脈絡, 而致氣陰陽傷之象”³⁾이라 하여 火毒의 邪氣로 皮膚가 傷한 것을 말하며, 심한 경우 熱邪가 안으로 들어가 火毒이 心을 攻하여 耗氣傷陰 하여 脈絡을 막아 氣와 陰陽이 傷하는 형상에 이르는 것이라 하였다.

화상 치료에 있어서 현대의학에서는 guinea pig를 이용한 동물실험에서 화상 유발 후 경장영양을 시켰을 때 과다 대사 이화호르몬의 분비가 감소되고, 면역기능이 증진되며, 장의 방어기능이 유지될 수 있다는 동물실험결과가 발표된 이후^{4,5)}, 화상 환자들에게 화상 손상 후 수 시간 이내에 경장영양을 시행한 결과 환자들에게서 감염의 비율이 줄고, 혈청글루카곤의 농도가 정상화 되었으며, 의미 있게 치료시간을 줄일 수 있었음이 보고되었다⁶⁾. 이처럼 현대의학의 연구에서도 화상 환자에게 초기 영양공급이 화상 환자의 치료에 의미 있는 영향을 주고 있음을 밝혀내고 있다. 따라서 補法에 근거한 韓藥의 경구투여가 화상환자의 치료에 유의한 효과를 보일 것으로 기대해 볼 수 있다.

따라서 화상에 경장요법을 시행하는 것과 유사한 방법으로 한의학에서 대표적인 보제인 十全大補湯을 사용함으로써 환자의 영양상태가 좋아질 것으로 기대하였으며, 화상의 치료를 위해 十全大補湯에 陳皮, 烏藥, 五味子를 加味하여 癰疽, 瘡瘍 등을 치료하는 加味十全湯을 선택하였다. 加味十全湯은 《東醫寶鑑》⁷⁾에서 “膿血出多 陰陽兩虛 十全

大補湯”, “治癰疽潰後, 補氣血, 進飲食, 排膿, 生肌.”라 하여 膿血이 排出되면서 陰陽이 모두 虛할 때 쓰는 처방으로 氣血陰陽을 두루 補하는 十全大補湯을 기본으로 하는 처방이다. 여기에 본 실험에서는 淸熱, 排膿의 효과가 있는 약물인 金銀花, 連翹, 白芷를 加味하여 화상 치유 효과를 더욱 극대화시켜 활용하였다.

본 연구는 加味十全湯 加味方의 superoxide dismutase(SOD) 활성도를 측정하고, 화상유발 생쥐에게 加味十全湯 加味方을 투여했을 때 생쥐의 혈액 내 산호성 백혈구(eosinophil)의 빈도, 화상유발피부에서 일어나는 조직학적 변화 및 HSP70의 분포와 세포자멸사 유도자 p53의 발현 변화에 대한 실험을 시행하였다. 그 결과 加味十全湯 加味方의 화상유발피부에 대한 항산화 및 피부재생효과에 대해 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물

① 동물

오리엔트 (한국)에서 분양 받은 태령 6주된 BALB/c 수컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 20 g된 생쥐를 선별하여 사용하였다.

② 약제처리

정상군(normal), 화상 유발군 (Burn elicited mice, BE군), 화상 유발 후 duoderm 처리군 (duoderm CGF-treated mice, DC군) 그리고 화상 유발 후 加味十全湯 加味方 처리군 (Gamisipjeontang-gamibang treated mice, GT군)으로 나누었으며, 각 군은 다시 화상 유발 후 3, 7 그리고 14일로 구분하였다. 그리고 각 군에 각각 10마리씩 배정하였다.

2) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 마우스의 RAW 264.7 macrophages는 Korean Cell Line Bank (KCLB; Korea)에서 구입하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ incubator에서 10% Fetal Bovine Serum (Sigma, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma)을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위한 항생제로 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다.

3) Duoderm의 처리

직경 11mm의 duoderm CGF (Convatec, USA)를 화상 유발 피부에 실험 기간 동안 DC군에 부착시켰다.

Table 1. The Amount and Composition of Gamisipeontang-gamibang.

| Herbal name | Scientific Name | Amount (g) |
|--------------|---|------------|
| 黃芪 | <i>Astragali Radix</i> | 6.0 |
| 熟地黃 | <i>Rehmanniae Radix Preparat</i> | 4.0 |
| 當歸 | <i>Angelicae gigantis Radix</i> | 4.0 |
| 川芎 | <i>Cnidii Rhizoma</i> | 4.0 |
| 人蔘 | <i>Ginseng Radix</i> | 4.0 |
| 白茯苓 | <i>Poria</i> | 4.0 |
| 白芍藥 | <i>Paeoniae Radix Alba</i> | 4.0 |
| 白朮 | <i>Atractylodis macrocephalae Rhizoma</i> | 4.0 |
| 陳皮 | <i>Citri Pericarpium</i> | 4.0 |
| 烏藥 | <i>Linderae Radix</i> | 4.0 |
| 五味子 | <i>Schizandrae Fructus</i> | 4.0 |
| 桂心 | <i>Cinnamomi Ramulus</i> | 4.0 |
| 甘草 | <i>Glycyrrhizae Radix</i> | 4.0 |
| 金銀花 | <i>Lonicerae Flos</i> | 4.0 |
| 連翹 | <i>Forsythiae Fructus</i> | 4.0 |
| 生薑 | <i>Zingiberis Rhizoma Recens</i> | 3.0 |
| 大棗 | <i>Jujubae Fructus</i> | 2.0 |
| 白芷 | <i>Angelicae dahuricae Radix</i> | 2.0 |
| Total amount | | 69.0 |

4) 加味十全湯 加味方の 제조 및 투여

加味十全湯 加味方 (Gamisipeontang-gamibang) 2첩을 증류수 500 ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여과액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압-농축하여 GT군에 화상 유발 후 매일 2.5 ml/kg/day 량으로 구강투여 하였다. *In vitro*에 사용되는 加味十全湯 加味方 추출물은 감압-농축 후 동결 건조한 것을 사용하였고, DCT assay 결과 加味十全湯 加味方 추출물 10 mg/ml까지는 세포 생존률의 변화가 일어나지 않아 0.5, 1.0, 1.5 그리고 2.0 mg/ml를 첨가량으로 결정하였다.

2. 실험 방법

1) 항산화 효과 조사

加味十全湯 加味方の 항산화능력을 측정하기 위해 Riboflavin을 이용한 활성산소 소거실험을 실시하였다. 우선 photocell에 40 mM buffer 2.6 ml, nitroblue tetrazolium 100 µl, EDTA/cyanide 200 µl, riboflavin 100 µl 그리고 항산화 측정할 농도별 (1 - 10mg) 加味十全湯 加味方 추출물 100 µl을 넣고 3번 섞어주었다. Abs 560 nm에서 autozero를 잡고 light box에서 1분동안 조사한 후 흡광도를 측정하였다. 이 작업을 7번 반복하여 평균값을 계산하였다.

2) 화상 유발 생쥐에서 피부 항염증 효과 조사

① 화상 유발

화상은 우선 생쥐의 등쪽 부위 피부를 면도한 다음 100℃ 용액에 10초간 노출시켜 심부 2도 화상(직경 11 mm)을 유발하였다.

② 조직표본제작

화상 유발 후 3, 7, 14일째에 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후 vascular rinse 와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered

formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 화상부위 피부를 적출한 후 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 μ m 두께의 연속절편으로 제작되었다.

일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경 (BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 상피 기저층내 세포사이공간의 미세구조관찰을 위해 절취된 피부 절편을 1/2 Karnovsky 용액에 선고정한 후 1% OsO₄용액에 후고정하였다. Uranyl acetate에 90분 동안 염색한 후 통상적인 방법으로 epon에 포매하였다. ultramicrotome(LKB, Nova, Germany)으로 60-80nm 두께로 절편을 만든 다음 관찰하였다.

③ 산호성백혈구 (eosinophil) 변화 조사

산호성백혈구의 혈액내 빈도 변화를 조사하기 위해 우선 심장천자 (cardiac puncture)로 채혈한 후, Hinkelmann 용액에 희석한 다음 Neubauer 계산판 (Superior, Germany)으로 계수하였다.

④ 화상 유발 피부 손상의 관찰

㉠ 혈관신생성 변화

화상을 유발한 등쪽 피부를 절개하여 젖힌 후 나타난 혈관을 $\times 4$ 배율로 촬영한다. Optimas 5.2에서 먼저 image 기능의 sharpen low - filter를 사용하여 혈관을 명확하게 한다. 그런 다음 binary morphology에서 invert 기능을 선택하여 모세혈관을 intensity 180-200으로 전환·부각시킨다. Histogram을 통해 동일 영역의 pixel을 계수하였다.

한편 진피유두와 기저층 주변에 분포하는 모세혈관은 심장관류고정없이 조직 적출 후 바로 10% NBF로 고정처리한 후 Wright's stain solution에 30분간 반응 후 관찰하였다.

또한 혈관신생성에 관여하는 IL-8 유사 chemokine인 macrophage inflammatory protein

(MIP)-2 분포 변화를 조사하기위해 항 MIP-2항원을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K (20 μ g/ml, DAKO, Denmark)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum (DAKO)에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 rabbit anti-mouse MIP-2 (1:100, Santa Cruz Biotec)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 72 시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:100, Santa Cruz Biotec)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 24 시간 link 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex (ABC) kit (Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

㉡ 피부내 HSP70의 분포 변화

피부내 스트레스를 조사하기위해 스트레스에 대한 완충적 물질인 열 충격 단백질 (heat shock protein, HSP)의 하나인 HSP70의 분포 변화를 항 mouse anti-mouse HSP70 (1:200, Santa Cruz Biotec) 항체를 이용한 면역조직화학적 염색 후 관찰하였다

㉢ 각질형성세포내 p53의 발현 변화

세포자멸사 유도자 p53의 발현 변화를 조사하기 위해서 항 mouse anti mouse p53 (1:100, Santa Cruz Biotec) 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시한 후 관찰하였다.

3) 영상분석과 통계처리

Relative intensity와 면역조직화학 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2 (Optima Co., USA)를 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 One-way ANOVA를 통하여 분석하였고, Post Hoc Test로서 각 그룹들 사이의 유

의성 있는 차이를 기술하기 위해 Tukey HSD 와 Tamhane을 사용하였다. 통계적 분석은 SPSS 13.0을 사용하여 수행하였으며, P < 0.05의 확률값은 통계적으로 유의성 있는 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. 항산화능

加味十全湯 加味方 추출물의 superoxide dismutase (SOD) activity는 1 mg/ml에서 16±1.7%, 2 mg/ml에서 24±1.3%, 4 mg/ml에서 31±1.8%, 6 mg/ml에서 40±3.3%, 8 mg/ml에서 49±1.9%, 10 mg/ml에서 56±1.3%로 측정되었다 (Fig. 1).

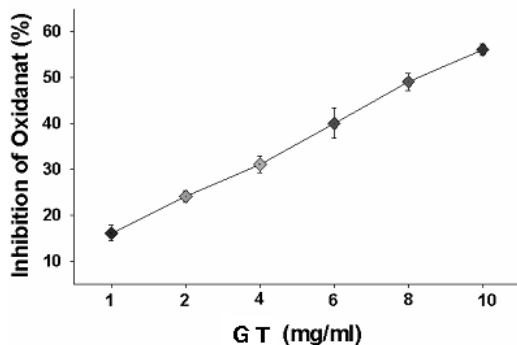


Fig. 1. The anti-oxidant effects of GT

The SOD ability of GT dose-dependantly increased. Abbreviation: SOD, superoxide dismutase GT, *Gamisipjeon-tang*

2. 화상 유발 생쥐의 피부 재생 효과

1) 산호성 백혈구 감소

화상 유발 7일 후 혈액내 산호성 백혈구 수를 조사한 결과, 정상군에 비해 BE군에서는 그 수가 증가한 반면, DC군과 GT군에서는 BE군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다. 371±17개/μl인 정상군에 비해 BE군은 743% 증가한 3128±138개/μl로

측정되었다. 이에 반해 DC군은 BE군에 비해 41% 감소된 1831±76개/μl로, GT군은 BE군에 비해 60% 감소된 1237±68개/μl로 측정되었다(Fig. 2). 한편 GT군은 DC군에 비해서도 유의성 있는 감소를 보였다.

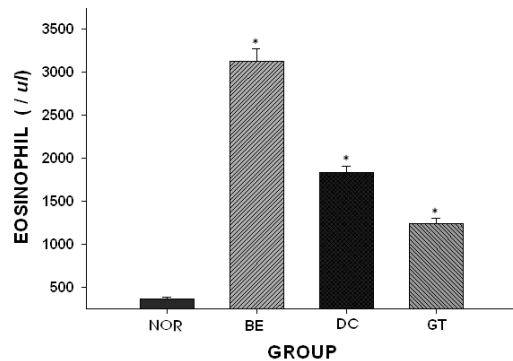


Fig. 2. The decrease of eosinophil in GT at 7 day after burn elicitation.

The number of eosinophil in DC and GT noticeably decreased than BT and these decrease had probability in P < 0.05 of test.

Abbreviation: NOR, No treated mice; BT, Burn elicited mice; DC, duoderm CGF-treated mice after burn elicitation; GT, *Gamisipjeon-tang* treated mice after burn elicitation.

*, P < 0.05 compared with BE.

2) 화상 유발 피부의 손상 치유

① 피부 조직의 진행성 손상 완화

BE군에서는 화상에 의한 외부형태 손상이 확인된 피부에서 시간의 경과에 따라 각각 다른 양상으로 관찰되었다. 화상 유발 후 3일째는 피부 진피까지 혈병이 확장된 피부손상을, 7일째는 일부 화상 유발 경계부위에서 세포분열 증가를, 14일째는 피부 상피세포 과형성이 화상 유발 피부의 중심부로 확장되는 것이 관찰되었다.

DC군과 GT군에서는 BE군과는 다른 양상으로 관찰되었는데, 3일째에서 화상 유발 경계부위에서 혈병 유발 진피로의 세포분열 증가를, 7일째에서

피부 상피세포 과형성을, 14일째에서는 피부 상피세포 과형성 감소가 관찰되었다. 또한 혈병이 존재한 DC군에 비해 GT군은 정상군과 유사한 상피의 층서적 구조와 진피 유두가 확인되었다.

한편 BE군의 14일째 상피 미세구조에서는 세포사이공간의 확장과 상피세포 손상이 관찰되었으나, DC군과 GT군에서는 정상군과 유사한 구조가 관찰되었다. 그러나 DC군은 GT군에 비해 일부 지역에서 기저막 손상이 관찰되었다(Fig. 3).

② 혈관신생성 감소

화상 유발 후 14일째 피부를 절개하여 진피쪽 피부를 영상분석 한 결과 정상군에 비해 BE군에서는 혈관 가지 수가 증가한 반면, DC군과 GT군에서는 BE군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다. 정상군에 비해 BE군은 2448% 증가한 반면, DC군은 BE군에 비해 75%, GT군은 BE군에 비해 89% 감소된 것으로 나타났다(Table II, Fig. 4 - A).

한편 화상 유발 후 14일째 모세혈관 분포는 BE

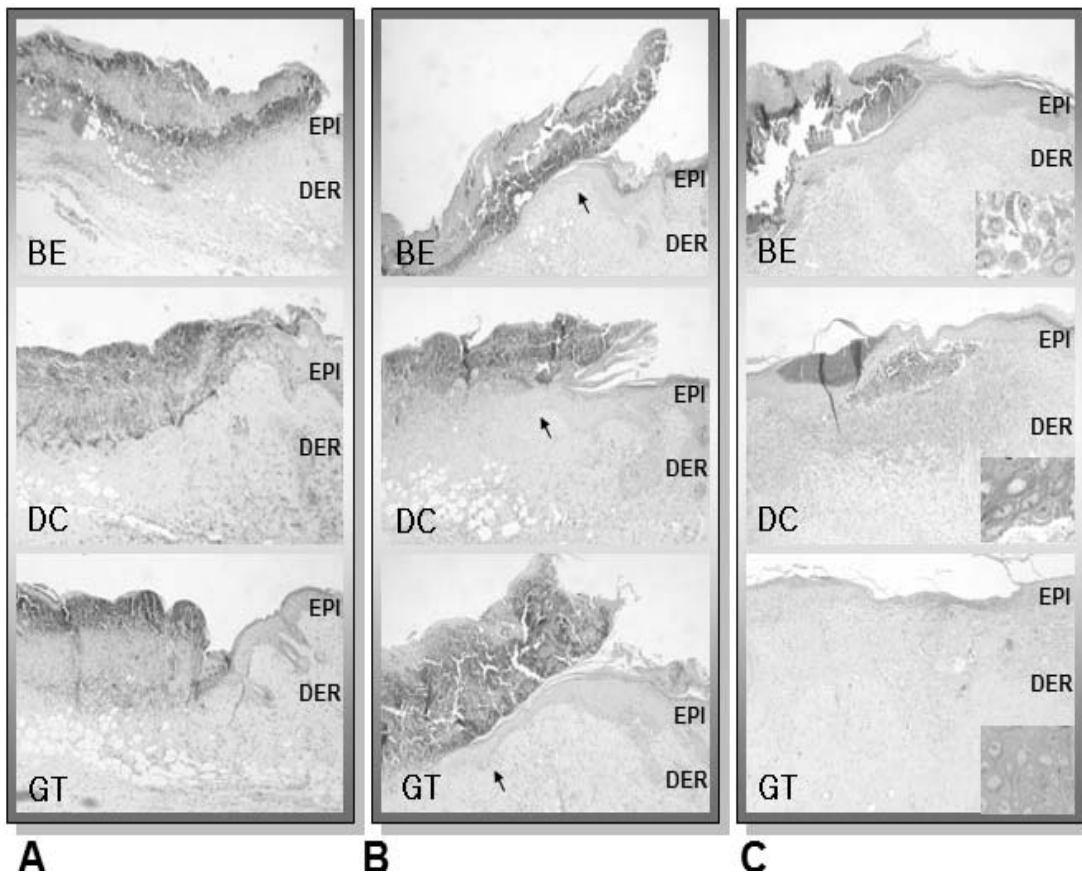


Fig. 3. The cure effect of GT for burn caused histological skin damages (×40).

A. morphology at 3 day after burn elicitation.

B. morphology at 7 day after burn elicitation (arrow, epidermic hyperplasia).

C. morphology at 14 day after burn elicitation (lower square box, semi-thin section, ×1000).

The burn caused damages in DC and GT were repaired than BE as time goes.

Abbreviation : EPI, epidermis; DER, dermis.

Other abbreviation same as Fig. 2.

Table II. The image analysis of angiogenesis in GT at 14 day after burn elicitation.

| Antibody | Group | | | |
|-----------|---------|-----------|-----------|----------|
| | NOR | BE | DC | GT |
| Angiogram | 1282±60 | 32660±751 | 8029±307* | 3590±95# |
| MIP-2 | 259±10 | 3708±89 | 1852±83* | 681±20* |

(image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-130)

Abbreviation : MIP-2, macrophage inflammatory protein-2. NOR, No treated mice; BE, Burn elicited mice; DC, duoderm CGF-treated mice after burn elicitation; GT, *Gamisipjeon-tang* treated mice after burn elicitation.

*, P < 0,05 compared with BE. #, P < 0,05 compared with DC.

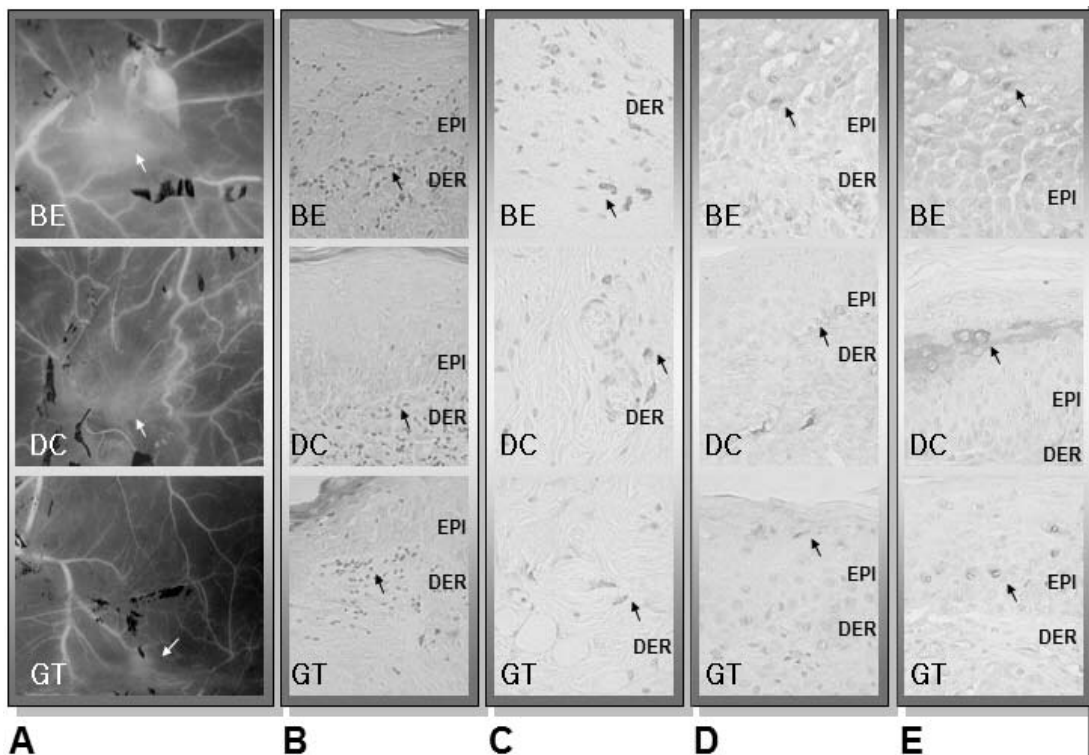


Fig. 4. The Mitigative effects of GT at 14 days after burn elicitation.

- A. Inhibition of angiogenesis (×4). The external distribution of capillary (arrow) were increased in burn elicited mice, but decreased in GT.
- B. Distribution of capillary (Wright's stain, ×400). The distribution of capillary (arrow) in dermal papillae were increased in BE, but decreased in GT.
- C. Decreased MIP-2. The macrophage inflammatory protein (MIP)-2 positive reacted cell (arrow) in GT remarkably decreased (MIP-2 immunohistochemistry, ×400).
- D. Inhibition of skin stress by Gamisipjeon-tang. The heat shock protein 70 (HSP70) positive reacted cell (arrow) in GT remarkably decreased (HSP70 immunohistochemistry, ×400).
- E. Inhibition of apoptosis inducer by Gamisipjeon-tang. The p53 positive reacted cell (arrow) in GT remarkably decreased (p53 immunohistochemistry, ×400).

Other abbreviation same as Fig. 3.

군에서 손상이 심했던 상피주변의 진피 유두와 상피내에서 증가한 것으로 관찰되었다. 이에 반해 DC군과 GT군의 진피 유두에서 모세혈관의 분포가 BE군에 비해 감소하였다(Fig. 4 - B).

화상 유발 후 14일째 angiogenic chemokine 발현을 조사하였는데, 진피유두의 모세혈관주변 세포에서 관찰된 MIP-2 양성반응은 BE군에서 정상군에 비해 1332% 증가한 반면, DC군은 BE군에 비해 50%, GT군은 BE군에 비해 82% 감소된 것으로 나타났다(Table II, Fig. 4 - C).

③ 피부스트레스 인자 HSP70 감소

화상 유발 후 14일째 상피 각질층과 일부 가지층에서 관찰되는 HSP70 양성반응은 세포질과 핵에서 강하게 나타났으며, BE군에 비해 DC군과 GT군에서는 HSP70 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되었다. BE군은 정상군에 비해 1371% 증가한 반면, DC군은 BE군에 비해 59%, GT군은 BE군에 비해 82%로 감소한 것으로 관찰되었다(Table III, Fig. 4 - D).

④ 세포자멸사 유도자 p53 감소

화상 유발 후 14일째 상피 기저층에서 일부 가지층까지 관찰되는 p53 양성반응은 세포질과 핵에서 강하게 나타났으며, BE군에 비해 DC군과 GT군에서는 p53 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되었다. BE군은 정상군에 비해 179% 증가한 반면, DC군은 BE군에 비해 57%, GT군은 BE군에 비해 83%로 감소한 것으로 관찰되었다(Table III, Fig. 4 - E).

Ⅳ. 고 찰

피부는 다른 어떤 장기보다 여러 물리적 요인에 의해 손상을 받는 경우가 많은데, 이러한 물리적 요인에 의한 외상 중 일상생활에서 흔히 발생하는 질환이 화상이다. 화상 환자들은 다른 어떤 화상이나 질병보다 치료과정에서의 통증 정도가 심하고, 치료가 완료된 이후에도 만성적인 통증과 눈에 보이는 흉터, 그리고 기능장애로 인한 후유증에 시달리며, 미래에 대한 불확실성으로 인한 불안, 우울을 겪을 수 있다⁸⁾.

화상은 대부분 우발적으로 나타나며 원인은 열탕화상, 화염화상, 전기화상이 대부분이고, 화학물질에 의한 화상도 간혹 나타나고 있으며, 화상의 합병증으로는 창상감염이 가장 많이 나타난다⁹⁻¹¹⁾. 즉, 화상은 원래 무균상태이나 화상환자의 피부는 정상적인 방어기능이 파괴되고, 화상부위의 환경이 균의 성장에 좋은 배지가 되며, 면역기능이 저하되어 다른 외상보다 감염의 위험이 높아¹²⁾ 수 시간 내에 포도상구균을 위시한 혼합감염을 일으키는데 연쇄상구균이나 녹농균 감염 등은 심한 경우 사망의 원인이 되기도 한다. 또한 상처나 인접부위 감염 외에도 십이지장 궤양이나 신장염, 폐염, 뇌막염 등을 일으킬 수 있고, 심한 반흔은 불구 및 만성 궤양을 일으켜 후에 악성화 될 수도 있다¹³⁾.

화상은 열에 의한 피부변화의 정도에 따라서 제 1도에서 3도, 혹은 4도까지의 단계로 나눈다. 제 1도 화상(표피층)은 보통 일광이나 60.0℃ 정도의

Table III. The image analysis of epidermal damages in GT at 14days after burn elicitation.

| Antibody | Group | | | |
|----------|-------|---------|----------------------|---------------------|
| | NOR | BE | DC | GT |
| HSP70 | 126±6 | 1854±60 | 757±11 [*] | 327±8 [#] |
| p53 | 188±9 | 5261±97 | 2276±24 [*] | 885±20 [#] |

(image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-130)

Abbreviation : HSP70, heat shock protein 70.

Other abbreviation same as Table II.

열에 의해 국소가 붉어지고 따끔따끔하며 붓기도 하지만 며칠 안에 회복된다. 제 2도 화상(표피, 천·심진피층)은 발적, 부종이 뚜렷하고 수 시간 또는 24시간 이내에 크고 작은 수포가 형성된다. 자각적으로는 작열감, 동통이 심하고, 심부 2도 화상의 경우에는 수포가 터지면서 미란면에서 다량의 분비액이 나오며 색소침착, 색소탈실, 반흔이 남는다. 제 3도 화상이 되면, 국소는 괴사되고 피부는 밀랍같이 연한 갈색을 띠며 만저도 아픔을 느끼지 못하고, 2주일쯤 지나면 딱지가 벗겨져 케양면이 나타난다. 표피가 재생되지 못하기 때문에 자연치유는 되지 않으며, 비후성 반흔이 생기게 되는데, 이 때문에 변형이나 구축, 운동제한이 생겨 식피술을 실시하게 된다. 제4도 화상은 손상이 근골조직에까지 침습한 것으로 조직이 탄화되어 검게 변한 경우이다¹⁴⁾.

화상으로 인한 손상이 나타났을 때 공통적으로 나타나는 일차적인 증상은 혈관내로부터 단백질과 체액이 간질로 빠져나와 심한 부종을 형성하는 것이다¹⁵⁾. 또한 화상에 의한 국소 손상은 카테콜라민이나 코티졸의 분비를 증가시키고, interleukines, prostaglandins, cytokines 등의 염증매개물질을 활성화시켜 백혈구를 자극하게 된다. 이것은 다시 TNF α , IL-6, IL-1 등의 사이토카인과 단백질분해효소, 산화제 등을 분비하고, 이로 인해 호중구와 단핵구들이 세포내 NADP 의존 산화계를 활성화시켜 산소유리기를 생성하고, 이 산소유리기가 세포막의 불포화지질을 과산화시킴으로써 투과성을 증가시켜 세포사를 초래한다고 한다. 이 과정은 또한 혈관 투과성 증가, 국소적 및 전신적 염증 조장, 간질성 기질의 손상, 식세포의 식작용 저해, 세포내 DNA 변형등을 초래하여 지속적인 장기손상을 유발하게 된다¹⁶⁾. 손상조직으로부터 비정상적으로 유리된 염증유발물질들은 면역글로블린과 혈청의 보체 성분들을 교란시켜 neutrophil의 기능을 손상시키고, 임파구를 감소시켜 면역기능을 억제하

게 되며, 이로 인하여 패혈증으로 발전하기 쉽다¹⁷⁾. 일차적인 순환계의 산화적 손상은 여러 경로를 통해 타장기에 이차적인 손상을 줄 뿐만 아니라, 이차적인 염증반응에 선행하여 간조직 내의 glutathion 의 함량과 catalase 활성의 감소를 유발하여 산소유리기 해독계의 기능 감소에 의해 산소유리기 생성계와 해독계 효소간의 불균형을 초래하여 간조직의 산화적 손상을 일으킬 수 있다^{18,19)}. 이처럼 화상은 일차적 보호장벽으로서의 피부층을 붕괴시킴으로써 이차적으로 높은 감염율을 유도하는 원인이 되며, 이것으로부터 많은 내부 장기부전이 유발되어 사망에까지 이르게 되는 과정을 거치게 된다²⁰⁾.

화상에 대해 한의학에서는 “本病皆因火毒之邪, 外傷皮膚, 甚者熱邪入裏, 火毒攻心, 耗氣傷陰, 阻滯脈絡, 而致氣陰陽傷之象”²¹⁾, “燒傷系熱毒灼盛傷皮肉導致熱盛傷陰 熱毒內攻 臟腑不和陰陽不衡失調 後期爲毒邪漸退 久病導致氣血兩虧 或陰傷爲敗 因此諸症進生”²²⁾이라 하여, 火毒으로 인하여 피부에 外傷을 입고 熱邪가 안으로 入하여 火毒이 陰液을 傷하게 하여 脈絡이 막히고 氣血陰陽이 傷하게 되는 것이라고 하였다.

화상의 辨證과 豫後에 대해서는 청대 《洞天奧旨》²³⁾에서 “火燒瘡遍身燒傷如黑者難救 或燒輕而不致黑者猶可療也, 然皮焦肉卷 疼痛難熬 有百計千方用之而不驗者 以火毒內攻而致不得法也, 故燒傷之症, 必內外同治, 則火毒易解之”라 하여 火燒瘡이 심하여 黑色을 띠면 難治라 하였고, 火毒이 안으로 攻하면 內外同治하여야한다고 하였다.

화상의 한의학적 치료에 대하여 문헌적으로 《醫宗金鑑》²⁴⁾에서 “湯燙火燒 皮爛疼起挑破 使毒輕 煩燥作嘔 防毒陷 便秘 神昏氣喘亡.....初用清涼膏塗之 解毒止痛 不致臭爛 次以罌粟膏塗之 痛止生膿時換 黃連膏貼 之收斂 火毒攻裏者 宜四順清冷飲服之 務令二便通利則熱毒必解”라 하여 清涼膏로 解毒止痛하고, 罌粟膏로 痛止生膿하고 黃連膏로

收斂하고, 火毒이 내부로 들어가면 四順清涼飲을 內服하여 通利熱毒하도록 하였다. 최근 연구에 의하면 古典에서 밝혀진 四順清涼飲의 투여가 화상으로 유발된 폐부종 및 급성 염증반응을 감소시키고 있음이 실험적으로 증명되었으며²⁵⁾, 연구에 의하여 單味로서 桑白皮를 복용하거나²⁶⁾, 大黃, 沒藥 등을 塗布하는 것이 화상치료에 효과가 있음을 보여주고 있다^{27,28)}. 이 이외에도 임상적으로 慈雲膏, 卵黃油 등 韓方外用劑를 사용하여 화상의 치료를 도우고 있음을 보여주고 있었다^{29,30)}.

또한 鍼灸治療에 있어서 피부의 氣血을 잘 소통하게 해준다면 자연스럽게 患部가 치료될 수 있으므로, 五臟六腑, 榮衛, 氣血, 十二經脈의 表에 있는 부위이며 外邪侵襲을 저지하는 제1방어선을 이루는 十二皮膚에 刺針을 하여 치료효과를 증대시킬 수 있다.³¹⁾

加味十全湯은 十全大補湯에 烏藥, 陳皮, 五味자가 加味된 처방으로 外科瘡瘍을 치료하는 약 중 內服하는 補法의 처방이다. 十全大補湯의 역대문헌을 살펴보면 《太平惠民和劑局方》³²⁾에서 “治男子婦人諸虛不足 惡露七傷 不進飲食 久病虛損 時發潮熱 其攻骨脊 救急疼痛 夜夢遺精 面色萎黃..... 失氣虛弱 惡心煩悶.”이라 기재된 이후 《凍原十腫醫書》³³⁾, 《丹溪心法附與》³⁴⁾ 및 근래의 서적들에서도 이를 이용하여 다양한 효능을 밝히고 있어 婦人科 疾患, 肝係疾患, 外科 및 皮膚科 疾患에서 다양하게 이용되고 있다³⁵⁻³⁷⁾. 이러한 十全大補湯에 行氣止痛, 溫腎散寒하는 효능이 있는 烏藥, 理氣健脾, 燥濕化痰하는 작용이 있는 陳皮, 斂肺止汗 澀精止瀉, 生津止渴, 肺虛喘咳收斂의 효능이 있는 五味子³⁸⁾등이 배합되어 加味十全湯이 구성된다. 《東醫寶鑑》⁷⁾에서 “膿血出多 陰陽兩虛 十全大補湯”, “治癰疽潰後, 補氣血, 進飲食, 排膿, 生肌.”라 하여 加味十全湯이 膿血이 排出되면서 陰陽이 모두 虛할 때 쓰는 처방임을 보여주고 있다. 또한 여기에 祛風解表, 止痛, 消腫排膿하는 효능의 白芷와 清熱

解毒消腫, 涼散風熱하는 효능의 金銀花 및 清熱解毒, 消腫散結, 清心瀉火하는 효능의 連翹를 加味하여¹³⁾ 氣血陰陽을 補하고, 동시에 清熱, 排膿, 消腫, 生肌의 효능을 강화하였다. 특히 連翹는 항산화, 항균, 항염증 작용이 우수하여³⁹⁾ 화상으로 유발된 피부의 염증을 빨리 가라앉히고, 면역력이 떨어진 피부에 항균력을 증강시킬 수 있을 것으로 기대되며, 白芷는 피부재생에 관여하는 콜라겐의 생성을 유도하는 작용이 있어⁴⁰⁾ 화상으로 인한 흉터의 재생에 도움을 줄 것으로 기대된다.

본 연구는 화상유발 생쥐의 피부에서 加味十全湯 加味方의 항산화 효과와 피부재생효과를 검증하는 실험으로서 superoxide dismutase(SOD) 활성도, 산호성 백혈구(eosinophil)의 혈액 내 빈도, 화상유발피부의 조직학적 변화, 스트레스에 대한 완충적 물질인 열 충격 단백질 (heat shock protein, HSP)의 하나인 HSP70의 분포 변화 및 세포고사 유도자 p53의 발현 변화 등에 대한 실험을 시행하였다.

앞선 연구에서 화상유발동물모델과 화상유발환자 모두에서 과산화 음이온기는 병태생리학적으로 의미가 있음이 밝혀졌다^{41,42)}. 과산화 음이온, 과산화수소, 수산기 및 과산화아질산염과 같은 유도된 산소유리기는 세포막의 기능을 손상시켜 순환장애틀 일으키는데, SOD를 포함한 항산화 시스템은 염증, 재관류 혹은 화상에 대한 반응으로 야기된 과산화이온에 의한 손상으로부터 세포와 조직을 보호하게 된다⁴²⁾. 몇몇 사람들은 활성화된 SOD로 인하여 화상 후에 혈장, 조직, 적혈구에서의 SOD 활성이 점차적으로 감소하고 있다고 보고하였다. 본 연구는 加味十全湯 加味方의 항산화능력을 측정하기 위해 Riboflavin을 이용한 활성산소 소거실험을 실시하였는데, 일련의 연구 결과 GT 농축액에서 SOD 활성이 증가함을 보여주고 있으며, 加味十全湯 加味方은 화상으로부터 세포 조직을 보호하는 항산화효과를 가진 것으로 판단된다.

또한 화상 유발 7일 후 혈액내 산호성 백혈구 수를 조사한 결과, 정상군에 비해 BE군에서는 그 수가 증가한 반면, DC군과 GT군에서는 BE군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다. DC군은 BE군에 비해 41% 감소를, GT군은 BE군에 비해 60% 감소된 수치를 보여, GT군은 DC군에 비해서도 유의성 있는 감소를 보였음을 알 수 있다. 염증 유발 시 증가하는 산호성 백혈구의 수가 감소되는 것으로부터 加味十全湯 加味方에 의해 염증이 완화되고 있음을 추측할 수 있다.

일반적으로 신체의 1차적 보호 장벽인 피부 상피에서는 외부로부터 가해지는 여러 가지 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위해 스트레스 단백질의 합성 증가를 유도하며, 열 충격 단백질(HSP)군이 대량 합성되게 된다⁴³⁾. 특히 인체 내에서 벌어지는 항원제시, 세포성장, 분화, 진화 및 노화와 같은 생리학적 사건들은 모두 HSP의 합성으로 인하여 일어난다⁴⁴⁾. 특히 HSP70은 72,000mol의 질량을 가지고 있으며 HSP72, 73, glucose regulated protein(GRP)75, 78 등이 이 단백질 군에 속하며 대부분의 생물체에서 발견되는 스트레스 저항 단백질로써 허혈, 열, 저혈당, 바이러스 감염, 경련, 중금속 오염 등 다양한 형태의 스트레스 상황에서 농도가 증가하는 것으로⁴⁵⁻⁴⁷⁾ 세포내 변성된 단백질은 열성단백질 인자를 자극하여 HSP70유전자의 전사를 유도하여 HSP70을 생성한다. HSP70은 원핵과 진핵세포의 세포질에서 생성되어 핵과 세포질에서 모두 분포하며 다양한 스트레스 상황에서는 그 위치가 세포질에서 핵, 특히 핵소체에 축적되며 회복기에 들어서면 다시 세포질로 돌아간다⁴⁸⁾. 이와 같이 HSP70은 세포상해에 저항이 있는 지역에서 주로 발견되어, HSP70이 방어기전으로써의 역할을 하는 것으로 사료된다.

본 실험에서도 화상 유발 후 상피 가지층에서 각질층까지 HSP70 양성반응이 증가하였으며, 이러

한 HSP70의 양성반응은 핵내에서 강하게 나타났다. 결과적으로 BE군에 비해 DC군과 GT군에서는 HSP70 양성반응세포가 감소된 것이 관찰됨으로서 加味十全湯 加味方 투여시 세포의 스트레스가 감소되었음을 추측할 수 있다.

한편 p53은 genome의 수호자 역할을 하며, p53의 세포내 발현 증가는 세포주기를 G1 phase에서 멈추게 하여 손상된 DNA의 회복시간을 제공한다. 그러나 genome의 손상이 심하여 DNA 회복에 실패하게 되면 p53은 세포자멸사의 유도자로서 활동을 시작하게 된다. 세포자멸사는 상피 중간층에서 가장 빨리 나타나며 기저층 상부의 각질형성세포는 integrin과 표피성장인자 수용체에 의해 유발된 생존 신호가 없어지면 p53 의존성 세포자멸사가 발생하는 것으로 추정되고 있다⁴⁹⁾. 본 실험에서도 p53 양성반응이 상피 가지층에서 가지층까지 상피의 핵에서 강한 양성 반응을 보였다. 이는 화상에 의한 p53 의존성 세포자멸사의 증가를 의미하는 지표가 된다. 즉, BE군에 비해 DC군과 GT군에서는 p53 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되는데, 이는 곧 손상된 부위에서의 세포 자멸사의 감소를 의미하여 손상된 DNA가 복구되고 있음을 보여주는 것이다. 특히 DC군은 BE군에 비해 57%, GT군은 BE군에 비해 83%로 p53이 감소한 것으로 보아 DC군 보다 GT군에서 DNA의 복구가 좀 더 빠르게 이루어지고 있었음을 알 수 있다.

본 연구 결과에 의하면, 피부에 화상이 유발되면 피부에서 시간의 경과에 따라 각 각 다른 양상으로 관찰되는데, 화상 유발 후 3일째는 피부 진피까지 혈병이 확장된 피부손상을, 7일째는 일부 화상 유발 경계부위에서 세포분열 증가를, 14일째는 피부 상피세포 과형성이 화상 유발 피부 중심부로 확장이 일어난다. 그러나 DC군과 GT군에서는 BE군과는 다른 양상으로 관찰되었는데, 3일째에서 화상 유발 경계부위에서 혈병 유발 진피로의 세포분

열 증가를, 7일째에서 피부 상피세포 과형성을, 14 일째에서는 피부 상피세포 과형성 감소가 관찰되었다. 또한 혈병이 존재한 DC군에 비해 GT군은 정상군과 유사한 상피의 층서적 구조와 진피 유두가 확인되었으며, 화상 유발 후 14일째 피부를 절개하여 진피쪽 피부를 영상분석 한 결과. 정상군에 비해 BE군에서는 그 혈관 가지 수가 증가한 반면, DC군과 GT군에서는 BE군에 비해 유의성 있는 감소를 보여 加味十全湯 加味方 투여시 상처가 빠르게 치유되고 있음을 알 수 있다.

결국 加味十全湯 加味方은 화상이 유발된 생쥐의 피부 조직의 손상을 완화시키고, 손상을 회복시키는데 도움을 주며, 현대의학에서 경장요법이 보여주는 것과 유사한 효과를 가진 것으로 보여진다. 따라서 韓醫學的 補法에 근거한 韓藥의 경구투여는 화상 환자의 회복을 돕기 위한 보조적인 치료제로서 응용될 수 있을 것으로 사료되며, 추후에 이와 유사한 효과를 가질 것으로 예측되는 다른 약물들의 효과가 추가적으로 검증된다면 임상에서의 활용도가 보다 높아질 것으로 생각된다.

이상의 연구는 심부 2도 화상에서 나타나는 加味十全湯 加味方의 효과를 밝혀냈으나, 기혈 손상이 더욱 심할 것으로 추측되는 3도 이상의 중증 화상에서 나타나는 영향에 대한 부분이 부족하므로 이후에 이에 대한 연구가 이루어진다면 더욱 유용할 것으로 생각된다.

V. 결 론

加味十全湯 加味方의 항산화 효과와 피부재생효과를 검증하기 위해 행해진 본 연구는 superoxide dismutase(SOD) 활성도, 산호성 백혈구(eosinophil)의 혈액 내 빈도, 화상유발피부의 조직학적 변화, 스트레스에 대한 완충적 물질인 HSP70의 분포 변화 및 세포자멸사 유도자 p53의 발현 변화 등을 관찰

함으로써 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味十全湯 加味方은 농도의존적으로 SOD activity를 증가시켰다.
2. 加味十全湯 加味方은 화상 유발 생쥐의 혈액내 산호성백혈구 수를 감소시켰다.
3. 加味十全湯 加味方 투여시 화상유발 생쥐의 피부에서 진행성 손상이 보다 빨리 복구 되고, 피부손상완화효과(정상군과 유사한 상피의 층서적 구조와 진피 유두)가 있는 것을 관찰 할 수 있었다.
4. 加味十全湯 加味方 투여시 화상 유발 후 발생되는 염증의 완화 효과(혈관 가지 수 감소, 모세혈관의 분포 감소, MIP-2 양성반응 감소)를 확인 할 수 있었다.
5. 加味十全湯 加味方은 화상 유발 후 발생하는 피부내 스트레스단백질인 HSP70 양성반응을 감소시켰으며, 화상유발 세포의 세포자멸사를 감소(p53 양성반응의 감소)시켰다.

이상의 실험 성적을 근거로 加味十全湯 加味方은 화상 유발 생쥐의 피부에서 항산화, 항염증 효과가 있으며, 화상으로 인한 피부조직의 손상을 완화시키고, 손상된 조직을 보다 빠르게 회복시키는 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. 김진복. 최신외과학. 삼신문화사. 1995:285-316.
2. 안성구, 지혜구, 황상민, 정준, 장경훈.. COMMON SKIN DISEASE. 퍼시픽출판사. 2005:539-41.
3. 劉輔仁. 實用皮膚科學. 인민위생출판사. 1984: 278-9.
4. Gianotti O, Nelson JL, Alexander JW. Post

- injury hypermetabolic response and magnitude of translocation : prevention by early enteral nutrition. *Nutrition*, 1994; 3:225-31.
5. Saito H, Troki O, Alexander JW. The effect of route of nutrient administration on the nutritional state, catabolic hormone secretion, and gut mucosal integrity after burn injury. *J Parenter Enteral Nutr*, 1987;11:1-7.
 6. Chiarelli A, Enzi G, Casadei A. Veri early nutrition supplementation in burned patients. *Am J Clin Nutr*, 1990;51:1035-9.
 7. 許俊. 東醫寶鑑. 법인문화사. 1999:1426.
 8. 박영숙, 김은희. 화상환자가 지각하는 통증과 불안에 관한 연구. *한국보건의과학회지*. 2001; 15(1):83-95.
 9. 채명석, 전병민, 이진용, 홍관희, 김상호. 화상 환자 528예에 대한 임상적 고찰. *대한외상학회지*. 1998;11(2):264-72.
 10. 조수현, 최승인. 화상환자에 대한 임상적 고찰. *대한외과학회지*. 1998;54(3):305-12.
 11. 안영호, 최우익, 조준, 박찬상, 유병대, 이동필. 화상 환자의 임상적 고찰. *대한응급의학회지*. 1998;9(2):303-10.
 12. 강소욱, 이해자, 이숙향. 입원화상환자의 특성과 항생제 사용 현황. *한국임상약학회지*. 2002; 12(2):55-64.
 13. 이유신. *임상피부과학*. 여문각. 1998:290.
 14. 강진성. *최신성형외과학*. 계명대학교출판부. 1995:435.
 15. Tanaka H, Lund T, Wiig H 외. High does vitamin C counteracts the negative interstitial fluid hydrostatic pressure and early edema generation in thermally injured rats. *Burns*, 1999;25:569-74.
 16. 서길준, 이중의, 윤여규, 신상도, 김성혜, 표창해, 정성은. 백서의 화상 모델에서의 Vitamin C의 항산화 효과. *대한응급의학회지*. 1999;10 (3):335-42.
 17. Suzanne C. Smeltzer, Brenda G, bBare. *Textbookn of medical, Surgical Nursing*, 9th ed. Lippincott, 2000:1506-7.
 18. 김한수, 조현국, 김상수, 배주한, 서현규. 피부 화상에 의한 간 조직의 Oxygen free radical 생성계 효소와 해독계 효소의 활성변화. *대한물리치료학회지*. 1999;11(3):115-21.
 19. 박래준, 김한수, 배주한, 이현기, 최재원, 이동호. 피부화상이 간의 유해산소 생성계 및 해독계 효소 활성에 미치는 영향. *대한물리치료학회지*. 2002;14(1):63-73.
 20. hansbrough J, Zapata-sirvent R, Petwrsom V, Wang X, Bender E, Claman H. N, Boswick J. Characterization of the immunosuppressive effect of burned tissue in an animal model. *J Surg Res*, 1984; 37:383-93.
 21. 劉輔仁. *實用皮膚科學*. 인민위생출판사. 1984: 278-9.
 22. 허극창. *中醫外科傷科名著集成(外科症治全書)*. 華夏出版社. 1997:271.
 23. 陳士澤. *洞天奧旨*. 中醫古籍出版社. 1992:151-2.
 24. 吳謙. *醫宗金鑑*. 대성문화사. 1991:448.
 25. 최진용, 강병수, 조현국. 피부화상으로 유도된 급성 부종성 폐손상에 대한 사순청량음의 효능. *대한본초학회지*. 2002;17(2):85-93.
 26. 조현국, 이영만, 강병수, 전경희, 박원학. 피부 화상으로 유도된 급성 부종성 폐손상에 대한 상백피의 효능. *대한본초학회지*. 2003;18(3): 195-202.
 27. 김성배, 강병수. 腫大黃의 皮膚塗布로 인한 白鼠의 火傷 皮膚組織과 血清 內 호중구

- Chemokine의 生成抑制 효과. 대한본초학회지. 2000;15(2):25-30.
28. 남성우, 이복규, 조현국. 특정전자과 조사와 몰약의 도포에 의한 화상피부의 치유 촉진효과. 대한본초학회지. 2003;18(4):263-68.
 29. 지규용. 화상치료제의 조직학적 수복효과 연구. 동의생리병리학회지. 2002;16(4):774-81.
 30. 공태영, 박태열. 紫雲膏(A)를 이용한 火傷治療 및 皮膚疾患 治療例. 韓醫外治療法學會誌. 2000;2(1):53-8.
 31. 원승환, 위종성, 최은주, 권기록. 수부의 표재성 2도화상의 침치료 1례에 관한 임상적 고찰. 대한침구학회지. 2005;22(1):13-7.
 32. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 선풍출판사. 1975:9.
 33. 李凍原. 凍原十腫醫書. 대성문화사. 1983: 658-9.
 34. 朱震亨. 丹溪心法附與. 대성문화사. 1982:22.
 35. 전국한외과대학 비계내과학교수 공저. 脾係內科學. 그린문화사. 1991:384.
 36. 전국한외과대학 간계내과학교수 공저. 肝係內科學. 동양의학연구원. 1989:651.
 37. 두호경. 東醫腎係學. 동양의학연구원. 1991:1200.
 38. 전국한외과대학본초학교수. 本草學. 영림사. 2000.
 39. 서부일, 박지하, 노성수. 의성개나리 열매인 連翹의 자원 가치와 자원화 활용 방안. 한약응용학회지. 2008;8(1):53-68.
 40. 진무현, 정민환, 임영희, 이상화, 강상진, 조완구. 백지의 콜라겐 생성 촉진 물질. 생약학회지. 2004;35(4):315-9.
 41. Saitoh D, Shirani KZ, Cioffi WG, Kizaki T, Ohno H, Okada Y, Mason AD Jr., Pruitt BA Jr. Changes in the tissue and plasma superoxide dismutase (SOD) levels in a burned rat model. Tohoku J Exp Med. 2001;193:27-36.
 42. Saitoh D, Ookawara T, Fukuzuka K, et al. Characteristics of plasma extracellular SOD in burned patients. Burns. 2001;27:577-81.
 43. De Maio A. The heat-shock response. *New Horiz*. 1995;2:198-207.
 44. G. Multhoff. Heat shock protein 70 (HSP70): Membrane location, export and immunological relevance. *Methods*. 2007; 43:229-37.
 45. Gonzalez M. F., Shiraishi K., Hisanaga K., Sagar S. M., Mandabach M., Sharp F. R. Heat shock protein as markers of neuronal injury. *Mol. Brain Res*. 1989; 6:93-100.
 46. Vass K., Beger M. L., Nowak T. S., Jr Lassmann H. Induction of stress protein HSP70 in nerve cell after status epilepticus in the rat. *Neurosci Lett*. 1989;100:259-64.
 47. Beredt K., Hu B. R., Weiloch T. Initiation of protein synthesis and heat shock protein-72 expression in the rat brain following severe insulin induced hypoglycemia. *Acta Neuropathol*. 1989; 86:259-64.
 48. Valazquez J. M, and Lindquist S. H. Hsp 70 - Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell*. 1984;36:655-62.
 49. Norris D. A, Middleton M. H, Whang K, Schleicher M, McGovern T, Bennion S. D, David-Bajar K, Davis D, Duke R. C. Human keratinocytes maintain reversible anti-apoptotic defenses in vivo and in vitro. *Apoptosis*. 1997;2(2):136-48.