대한한의학회지 제26권 제2호(2005년 6월)
J Korean Oriental Med 2005;26(2):217-230

원 저

# 淸肺瀉肝湯이 糖尿誘發 흰쥐의 腦虛血損傷에 미치는 影響

정춘근, 김은영, 신정원[1], 손영주[2], 이현삼, 정혁상, 손낙원[1]

경희대학교 한의과대학 해부학교실
경희대학교 동서의학대학원 신경과학교실[1]
상지대학교 한의과대학 부인과학교실[2]

## Effect of *Chungpaesagan-tang* on Ischemic Damage Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion in Diabetic Rats

Chun-geun Jeong, Eun-Young Kim, Jung-Won Shin1, Youngjoo Sohn[2], Hyun-Sam Lee, Hyuk-Sang Jung, Nak-Won Sohn[1]

Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University
Department of Neuroscience, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University [1]
Department of Gynecology, College of Oriental Medicine, Sangji University [2]

**Objectives :** Chungpaesagan-tang (CPSGT), which is frequently used for treating patients of cerebrovascular disease, has not been reported by clinical doctors concerning the effect of neuronal aptosis caused by brain ischemia. To study the effect of CPSGT on focal cerebral ischemia in normal and diabetic rats and SHR, focal cerebral ischemia was induced by transient MCAO, and after onset CPSGT was administrated.

**Methods :** Rats (Sprague-Dawley) were divided into four groups: sham-operated group, MCA-occluded group, CPSGT-administrated group after MCA occlusion, and normal group. The MCA was occluded by intraluminal method. CPSGT was administrated orally twice (1 and 4 hours) after middle cerebral artery occlusion. All groups were sacrificed at 24 hours after the surgery. The brain tissue was stained with 2% triphenyl tetrazolium chloride (TTC) or 1% cresyl violet solution, to examine effect of CPSGT on ischemic brain tissue. The blood samples were obtained from the hearts. Tumor necrosis factor-$\alpha$ level and interleukin-6 level of serum was measured from sera using enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Then changes of immunohistochemical expression of TNF-$\alpha$ in ischemic damaged areas were observed.

**Results :** In NC+MCAO+CP and DM+MCAO+CP, CPSGT significantly ($p<0.001$) decreased the number of neuron cells compared to the control group. CPSGT markedly reduced ($p<0.01$) the infarct size of the forebrain in distance from the interaural line on cerebral ischemia in diabetic rats. CPSGT significantly reduced the TNF-$\alpha$ expression in penumbra region of damaged hemisphere in diabetic rats.

**Conclusions :** CPSGT had a protective effect on cerebral ischemia in SD rats, especially in diabetic rats compared with normal SD rats.

***Key Words:*** Cerebral ischemia, MCAO, diabetes mellitus, TNF-$\alpha$, IL-6, Chungpaesagan-tang

· 접수 : 2005년 5월 9일 · 논문심사 : 2005년 5월 4일
· 채택 : 2005년 5월 25일

· 교신저자 : 손낙원, 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1번지 경희대학교 동서의학대학원 신경과학교실
(Tel.: 031-201-2747, Fax.: 031-204-8119, E-mail: sohnnw@khu.ac.kr)

* 위 논문은 2004년도 보건복지부 정책연구 용역사업인 '한방의료 및 한의약 관련제품에 관한 임상시험을 위한 한방임상센터 운영 및 지원방안 연구' 의 일환으로 이루어졌음.

## 서 론

뇌졸중은 우리 사회의 주요 사망원인 중의 하나이다. 또한 뇌졸중은 발생 이후 각종 후유증을 동반하여 삶의 질이 떨어진다는 점 때문에 뇌졸중이 발생

하기 전의 예방이 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다.

최근의 연구들은 만성 고혈압, 당뇨 그리고 고지혈증 등은 뇌경색을 유발시키는 위험인자이며 이러한 질환을 가진 경우의 뇌경색 환자는 그 예후가 매우 좋지 않음을 보고하고 있다[1]. 치료적인 면에서도 뇌졸중 환자에 대한 약물치료도 뇌졸중의 형태와 정도뿐만 아니라, 고혈압이나 당뇨와 같은 합병증을 고려하여야 한다고 하였다[2]. 당뇨는 뇌경색을 유발 악화시키는 위험인자 중의 하나로서, 임상적으로는 당뇨환자에게 뇌혈관 질환의 발생이 증가하고 당뇨병이 심한 경우에 뇌졸중이 발생하면 경우 사망률이 증가한다[3]. 또한 당뇨환자에게 뇌졸중이 발생하면 신경학적 지표는 당뇨에 의해 심각하게 악화된다[1,3]. 이러한 당뇨환자의 나쁜 예후는 이른바 모세혈관병증, 혈관성 고혈압 그리고 당뇨성 심장병 등의 합병증에 기인한다. 또한 뇌허혈 시 고혈당증은 국소허혈의 동물모델에서 뇌 손상을 증가시킨다고 하였다[4].

본 실험에 사용한 淸肺瀉肝湯은 뇌졸중에 대한 임상 통계 연구에서 가장 빈번히 사용되는 처방 중 하나이다[5]. 淸肺瀉肝湯은 東醫壽世保元[6]에서 太陰人의 肝熱太盛하고 肺燥太枯하여 발생되는 燥熱病證에 斂肺通便시킬 목적으로 創方되어 太陰人의 熱鬱, 鬱痰, 熱痰, 消渴, 中風, 歷節風, 燥熱症 등에 응용되어 왔다. 淸肺瀉肝湯의 효능에 대한 실험연구 보고를 살펴보면, 간질환에 대한 효과[7], 면역반응과 항알레르기 효과[8]가 연구 보고된 바 있으며, 당뇨[9]와 비만[10]에 대하여도 유의한 효과가 있다고 보고된 바 있다. 또한 허혈-재관류 세포 손상 및 염증관련 반응 억제효과에 대하여 보고된 바 있으며[11], 뇌질환에 관해서는 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 미치는 영향이 in vivo 연구로 보고된 바 있으나[12], 실제 임상에서 빈번히 활용되고 있는 점에 비하여 淸肺瀉肝湯의 뇌허혈에 대한 효능을 실험적으로 연구한 보고는 미흡한 실정이다.

한의학적으로 중풍은 단독으로 발생하는 경우보다 선행질환이나 합병증을 동반하는 경우가 많다. 그러나 지금까지 뇌허혈에 대한 한약물의 효과를 연구하는데 이용되는 동물모델은 이러한 점이 충분히 고려되지 않았다. 이에 저자는 정상흰쥐 및 당뇨흰쥐에 각각 국소뇌허혈을 유발하고 淸肺瀉肝湯 투여하여 淸肺瀉肝湯이 선행질환을 지닌 국소뇌허혈 흰쥐에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰한바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

물과 펠렛사료 (제일사료 주식회사, 대전)는 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실 내의 온도는 21~24℃, 습도는 40~60%로 유지하였고 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다. 실험실 환경에 2주간 적응시킨 후 사용하였으며 실험시의 흰쥐 체중은 250~300g 이었다. 실험군은 4가지로 나누었다. 첫번째 그룹은 대한실험동물센터에서 구입한 체중 180g 전후의 Sprague-Dawley (SD)계 수컷 흰쥐를 사용하여 중대뇌동맥을 폐쇄한 정상대조군 (NC+MCAO)과 이에 청폐사간탕을 투여한 군 (NC+MCAO+CP)으로 나누었다. 당뇨유발은 SD계 흰쥐의 꼬리정맥에 streptozocin (STZ) 60mg/kg을 1회 주사하는 방법으로 뇌허혈 유발 1주일 전에 주사하여 MCAO 수술 당일 날 혈중 glucose 농도가 150mg/dl 인 것만을 선택하였다. 당뇨유발군은 당뇨유발 후 중대뇌동맥을 폐쇄한 당뇨대조군 (DM+MCAO)과 이에 청폐사간탕을 투여한 군 (DM+MCAO+CP)으로 나누었다.

### 2. 약재의 제조 및 투여

실험에 사용한 한약물은 淸肺瀉肝湯[1-4]으로 경희대학교 한의과대학 부속한방병원 (서울, 대한민국)에서 구입하여 사용하였으며, 처방의 내용과 1첩 분량은 Table I과 같다. 淸肺瀉肝湯 5첩 분량인 260g을 증류수 3,000ml와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간동안 전탕한 다음 1차 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 완전 동결건조시켜 물추출 엑기스 58.2g을 얻어 실

**Table 1.** Contents of *Chungpaesagan-tang.*

| 한약명 | 생약명 | 용량 |
|---|---|---|
| 葛根 | *Puerariae Radix* | 16 g |
| 黃芩 | *Scutellariae Radix* | 8 g |
| 藁本 | *Angelicae tenuissimae Radix* | 8 g |
| 蘿蔔子 | *Raphami Semen* | 4 g |
| 桔梗 | *Platycodi Radix* | 4 g |
| 白芷 | *Angelicae Dahuricae Radix* | 4 g |
| 升麻 | *Cimicifugae Rhizoma* | 4 g |
| 大黃 | *Rhei Rhizoma* | 4 g |
| total | | 52 g |

험에 사용하였다. 淸肺瀉肝湯을 투여한 NC+MCAO+CP 군과 DM+MCAO+CP 군은 청폐사간탕 물추출물 193.9mg/100g 씩 1ml 증류수에 녹여서, 정상대조군(NC+MCAO) 및 당뇨유발 후 중대뇌동맥을 폐쇄한 당뇨대조군 (DM+MCAO)은 1ml 증류수를 중대뇌동맥폐쇄 후 1시간과 4시간에 각각 경구투여하였다.

### 3. 뇌허혈손상 유발

중대뇌동맥 폐쇄에 의한 뇌허혈 손상 Belayev 등[13]이 사용한 혈관내봉합사삽입술 (intraluminal method)을 채택하였다.

수술유발과정은 체중 250~300g 사이의 건강한 SD계 흰쥐를 70% $N_2O$와 30% $O_2$가 섞인 혼합가스에 5%의 isoflourane으로 전마취를 하고 수술 중에는 isoflourane농도를 1.5%로 유지하였다. 체온은 feedback-regulated heating pad로 수술 전과정 동안 37.0±0.5℃로 조절하였다. 마취가 된 흰쥐를 수술용 현미경 (Carl Zeiss, Zeiss, Germany)하에서 먼저 전경부의 근육을 정리하여 혈관을 노출시킨 후 우측의 외경동맥 (external carotid artery)과 총경동맥 (internal carotid artery)을 잘 정리하고 외경동맥의 분지인 후두동맥 (occipital artery)과 상갑상동맥 (superior thyroid artery), 을 electric coagulator (Nazme, JAPAN)를 사용하여 절단하였다. 외경동맥의 원위부는 결찰하고, 수술실 (5-0 silk suture)로 고정 고리를 두 개 만들어 놓은 후, 내경동맥과 총경동맥은 수술실 (3-0 silk suture)과 artery clamp (microvascular clip)를 사용하여 혈행을 완전 차단하였다. 미세수술가위 (Microdissecting Spring Scissor)로 외경동맥의 혈관벽을 약간 절개 후 poly-L-lysine 용액 (SIGMA Diagnostics, P8920, 0.1% w/v in water)로 코팅한 끝을 둥글게 만든 봉합사 (4-0 nylon suture, Ethilon, England)를 18-20㎜ 정도 삽입하였다. 삽입 후 내경동맥과 총경동맥을 다시 관류시키고, 외경동맥의 원위부를 절단하였다. 전경부의 피부를 봉합, 소독하고 마취에서 깨어난 후 자유롭게 움직이게 하였다. 중대뇌동맥 폐쇄 120분후 같은 방법으로 재마취하여 봉합사를 후퇴시켜 재관류시켰다.

### 4. 뇌허혈 손상의 해부조직학적 평가

#### 4-1. 실험동물의 희생

실험동물을 4% paraformaldehyde in PBS로 심장관류고정을 시행한 후, 두개골에서 뇌를 적출하고 다시 동일고정액에 12시간 동안 후고정을 실시하였다. 동결로 인한 조직파괴를 방지 (cryoprotection)하기 위하여 이 조직을 다시 20% sucrose를 포함하는 0.1M PB 용액에 24시간 동안 넣어 조직을 가라앉힌 뒤, Tissue-Tek O.C.T. compound로 포매하고 $CO_2$gas 로 급속냉동시킨 후, 동결절편기 (Leica, Cryostat, Japan)로 두께 25㎛의 절편을 만든 다음 0.02 M PBS 용액에 모아서 실험 전까지 stock solution에 보존하였다.

#### 4-2. 뇌허혈 손상 면적 및 체적의 측정

위와같이 처리한 뇌절편을 gelatine coating된 slide에 올려 하루정도 건조시킨 후 각각의 뇌절편을 HE stain하였다. 염색이 끝난 후 각각의 뇌절편은 scanner (Epson, GT-9500, Japan)로 scan하여 컴퓨터(Macintosh, Power PC G3, USA)에 입력한 다음 영상분석용 "NIH Image" software

(NIH, Ver. 1.66, USA)를 사용하여 각 뇌절편에서 뇌허혈 손상 면적을 측정하였다. 뇌허혈 손상 면적 (A)은 부종에 의하여 손상면적이 늘어난 것을 보정하기 위하여, 먼저 정상측 대뇌반구의 면적 (B)을 측정하고 손상 측 대뇌반구 정상조직 면적 (C)을 측정한 다음 정상 측 대뇌반구 면적에서 손상 측 대뇌반구의 정상조직 면적을 감하는 방법 (A = B-C)으로 계산하였다. 총뇌허혈 손상 체적은 아래 식과 같이 계산하였다[14].

4-3. 뇌허혈 손상 부위 신경세포의 관찰 및 측정

각각의 조직절편은 광학현미경 (Olympus, VANOX AHBS-3, JAPAN)으로 200배율 하에서 뇌허혈 손상부위에 나타나는 조직학적 변화를 관찰하면서 컴퓨터 (Macintosh, Power PC G3, USA)에 영상을 입력하였다. 입력된 영상을 "NIH Image" software (NIH, Ver. 1.66, USA)를 사용하여 interaural 6㎜ 절편 중 대뇌피질 부위의 일정 면적 (320㎛×466㎛)내에서 20㎛² 이상의 크기를 갖는 신경세포의 수와 크기를 측정하였다 (Fig. 1).

5. 효소결합면역측정법에 의한 혈중 TNF-α와 IL-6의 측정

효소결합면역측정법 (Enzyme-Linked immunoa - bsorbent assay)에는 ELISA kit (R&D Systems, USA)을 사용하여 샌드위치 분석법을 이용하였다. 이 실험에 사용된 모든 재료는 kit에 포함된 것을 사용하였다. 실험과정을 요약하면 다음과 같다.

중대뇌동맥 폐쇄 24시간 후에 각각의 실험동물 심장으로부터 약 1ml의 혈액을 채취하여 2000g에서 1분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 실온에서 2시간 보관하여 혈장을 응고시켰다. 응고된 혈장을 2000g에서 다시 20분간 원심분리하여 혈청을 얻고 실험에 사용되기 전까지 -80℃ 냉동실에 보관하였다. 이를 2배로 희석된 혈장 50㎕로 만들고 TNF-α 및 IL-6의 단일클론 항체 (monoclonal antibody)가 코팅된 microplate에 옮겨 혈장내의 TNF-α 및 IL-6가 micoroplate에 코팅된 단일클론항체와 결합되게 한 후 wash buffer로 충분히 세척하여 반응된 TNF-α 및 IL-6외의 항원들을 제거하였다. 다시 TNF-α 및 IL-6의 효소결합 다클론 항체 (enzyme-linked polyclonal antibody)를 첨가하여 항원항체결합체와 결합되게 한 후 wash buffer로 충분히 세척하고 기질용액을 첨가하였다. 이 효소반응으로

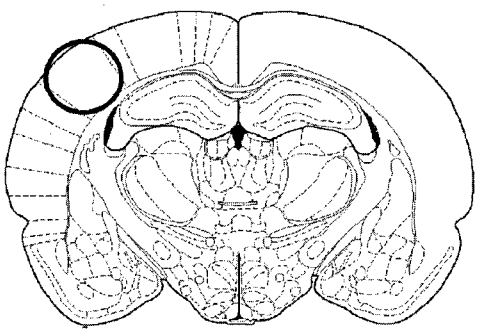

**Fig. 1.** Schematic diagram of coronal section in the rat brain (interaural 6 mm). Cell number and size larger than 20 ㎛² on the circle were evaluated with light microscopy (×200).

TNF-$\alpha$ 및 IL-6와 결합된 곳은 파란색으로 되며, 이 파란색은 정지용액을 첨가하면 노란색으로 변한다. 이렇게 발색된 용액의 농도를 분광광도계로 측정하여 standard curve를 이용하여 결합된 TNF-$\alpha$ 및 IL-6 양을 구하였다.

6. 면역조직화학 염색법

면역조직화학법은 부유법 (floating method)으로 실시하였다. 즉 동결절편 조직을 0.1M PB 용액으로 세척하고, 다시 0.02M PBS 용액으로 15분간씩 3번 세척하여 동결조직 내에 함유된 O.C.T. compound 성분을 제거하였다.

단백질에 의한 비 특이적 면역반응을 막기 위하여 10% normal goat serum (NGS)으로 1시간 동안 (4℃) 전처리하고, 1차 항체를 1% NGS와 1% bovine serum albumin (BSA)이 함유된 PBS용액에 적당한 배율로 희석하여 4℃에서 48시간 반응시킨 후, PBS로 15분간씩 3번 세척하였다. 이어서 2차 항체로서 biotinylated goat-anti rabbit immunoglobulin G 를 PBS 용액에 1:500으로 희석하여 4℃에서 24시간 반응시킨 후 PBS 로 15분간씩 3번 세척하였다. 그 후 조직표본을 사용 30분전에 만들어 놓은 ABC (avidin-biotin peroxidase complex, A : 10$\mu l$, B : 10 $\mu l$ in 1$ml$ PBS) 용액에 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS와 Tris-HCl buffer(TB, 0.05M, pH 7.4) 용액으로 15분간씩 각각 3번 세척하였다.

이어서 TB에 0.05% 3,3′-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)가 혼합된 기질용액에 조직표본을 실온에서 30분간 둔 뒤, 다시 TB에 DAB와 0.03% hydrogen peroxide가 혼합된 기질용액에 5~10분간 두어 발색 반응시킨 후 TB, PBS로 각각 세척하고 봉입하여 검경하였다.

7. 통계처리

실험결과의 분석은 통계프로그램 SPSS® for windows (version 11.0, SPSS, Inc., Chicago, U.S.A.)를 사용하여 청폐사간탕의 뇌허혈에 따른 손상에 따른 관련지표를 Oneway ANOVA를 실시하였으며, Oneway ANOVA에서 유의수준 $p$ value<0.05 이하인 경우 post hoc test 로서 Scheffe's test를 시행하였다.

## 결 과

1. 허혈성 뇌손상 부위 면적의 변화

정상 흰쥐에서 ischemia를 유발한 정상대조군인 NC+MCAO 군과 당뇨흰쥐에서 ischemia를 유발한 당뇨대조군인 DM+MCAO 군에서 허혈성 뇌손상을 살펴본 결과 뇌 전방의 interaural 12mm 절편에서부터 뇌 후방의 interaural 2mm 절편까지 모두에서 나타났다. NC+MCAO 군의 경우 interaural 8mm section에서 infarct 면적이 가장 큰 반면, DM+MCAO 군은 interaural 10mm section에서 가장 많은 뇌손상이 일어났음을 보였다 (Fig. 2, 3).

NC+MCAO 군에서는 interaural 12mm 절편에서부터 interaural 2mm 절편까지 17.84±3.11㎟, 27.47±3.69㎟, 29.72±3.25㎟, 16.89±2.52㎟, 8.8±1.94㎟, 5.88±1.80㎟ 을 나타내었고, NC+MCAO+CP 군에서는 16.5±3.26㎟, 27.01±2.81㎟, 26.00±2.73㎟, 18.92±4.14㎟, 4.99±1.55㎟, 0.93±0.22㎟ 을 나타내어 전체적으로 손상부위의 면적이 감소된 경향을 나타내었으며, 특히 interaural 2mm 에서 통계학적으로 유의한 ($p$<0.05) 뇌손상 면적의 감소를 나타내었다 (Fig. 2).

DM+MCAO 군에서는 interaural 12mm 절편에서부터 interaural 2mm 절편까지 29.63±3.74㎟, 32.28±2.90㎟, 27.74±2.26㎟, 24.01±2.71㎟, 10.35±0.96㎟, 4.52±1.64㎟을 나타내었고, DM+MCAO+CP 군에서는 10.14±2.09㎟, 24.92±2.15㎟, 24.68± 3.54㎟, 11.86±3.62㎟, 0.89±0.56㎟, 0.00±0.00㎟을 나타내어 전체적으로 뇌손상 면적이 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 interaural 12 mm, 4 mm ($p$<0.01)와 6mm, 2mm ($p$<0.05)에서는 통계학적으로도 유의한 감소를 보였다 (Fig. 3).

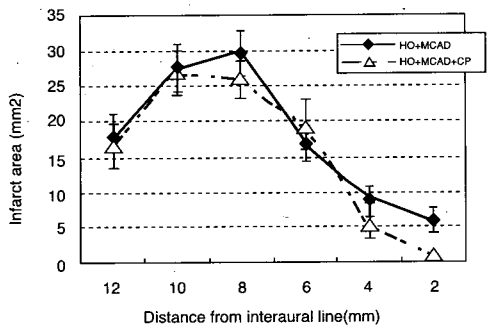


**Fig. 2.** Infarct areas in brain section 12 mm to 2 mm from interaural line. NC+MCAO, MCA occluded rats of SD-rats; NC+MCAO+CP, Chungpaesagan-Tang administrated rats after MCAO. Error bars indicate standard error of the mean. * $p<0.05$ compared to the NC+MCAO group.

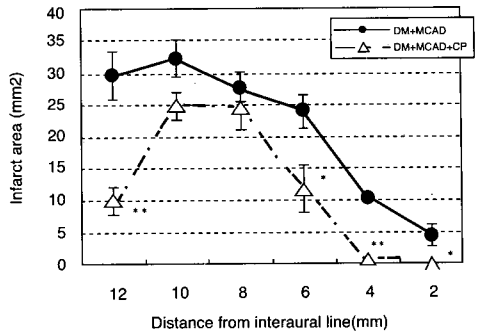


**Fig. 3.** Infarct areas in brain section 12 mm to 2 mm from interaural line. DM+MCAO, MCA occluded rats of diabetic rats; DM+MCAO+CP, Chungpaesagan-Tang administrated rats after MCA O. Error bars indicate standard error of the mean. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared to the DM+MCAO group, respectively

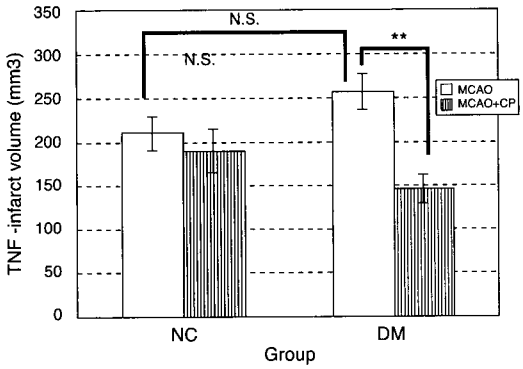


**Fig. 4.** Total infarct volume of each group. NC+MCAO, MCA occluded rats of SD-rats NC+MCAO+CP, Chungpaesagan-Tang administrated rats after MCAO. DM+MCAO, MCA occluded rats of diabetic rats; DM+MCAO+CP, Chungpaesagan-Tang administrated rats after MCAO. Error bars indicate standard error of the mean. ** $p<0.01$ compared to the each control group.

2. 허혈성 뇌손상 부위 체적의 변화

중대뇌동맥을 폐쇄한 NC+MCAO 군의 뇌허혈 손상 체적은 210.00±18.70㎣ 이었으며, DM+MCAO 군은 257.04±20.32㎣ 로 당뇨를 유발한 쥐가 정상 쥐보다 허혈성 뇌손상 체적이 약간 증가하였으나 유의성을 보이진 않았다. 청폐사간탕을 처리한 NC+MCAO+CP 군이 허혈성 뇌손상 체적은 188.79±24.39㎣ 로 NC+MCAO 군에 비하여 감소하였으나 유의하지 않았다 (Fig. 4). DM+MCAO+CP 군의 허혈성 뇌손상 체적은 144.97± 16.55㎣로 DM+MCAO 군에 비하여 유의한 감소 ($p<0.01$)를 나타내었다 (Fig. 4).

3. 허혈성 뇌손상 부위 신경세포 수의 변화

허혈성 뇌손상을 입지 않은 정상적인 대뇌피질에서 나타나는 신경세포 수는 172.60±6.30개이었고, 허혈성 뇌손상 부위와 정상부위 사이의 경계구역에서 나타나는 신경세포의 수는 중대뇌동맥을 폐쇄한 NC+MCAO 군 및 DM+MCAO 군 모두 ischemia가 유발되지 않은 정상측 (intact)에 비해 세포수가 현저

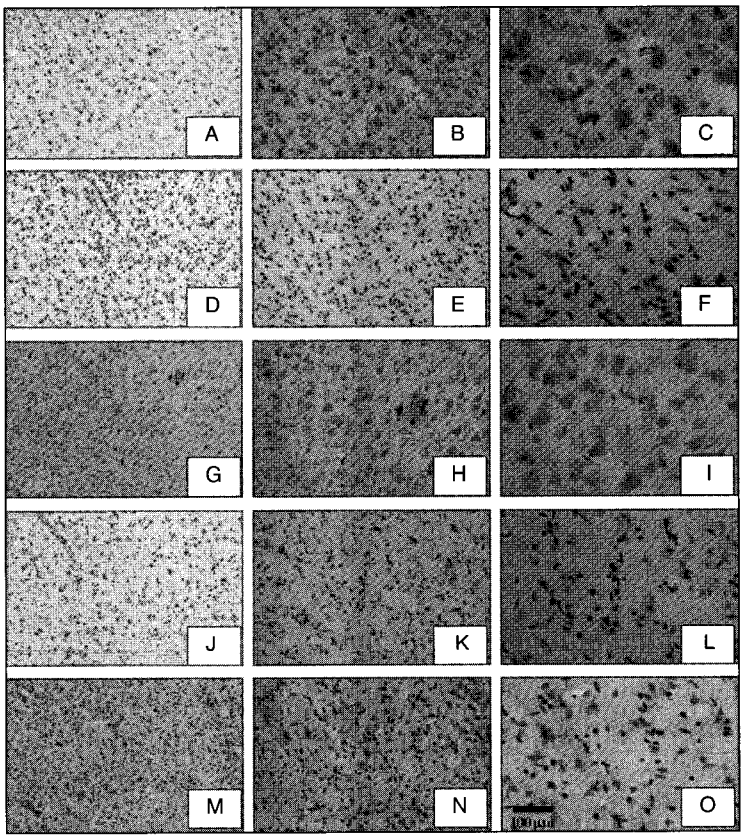


**Fig. 5.** Each Section Demonstratesthe MCA Occluded Cortex Stained by Cresyl Violet (magnification A, D, G, J, M : 100×; B, E, H, K, N : 200X; C, F, I, L, O : 400×). (A-C) shows the neuron cells in the normal brain cortex. (D-F) MCA occluded group in SD rats (NC+MCAO). (G-I) Chungpaesagan-tang administrated group after MCAO in SD rats (NC+MCAO+CP). (J-L) MCA occluded in diabetic rats (DM+MCAO). (M-N) Chungpaesagan-tang administrated group after MCAO in diabetic rats (DM+MCAO+CP).

**Table 2.** The Number of Neuron Cells and Cell Size

| | Number of neuron cells | Size of neuron cells ($\mu m^2$) |
|---|---|---|
| Intact | 172.60±6.30 | 53.66±1.47 |
| NC+MCAO | 97.33±3.18 | 37.80±1.24 |
| NC+MCAO+CP | 159.50±8.50*** | 39.25±1.72 |
| DM+MCAO | 81.00±4.00 | 38.23±3.83 |
| DM+MCAO+CP | 135.00±3.79*** | 46.57±3.83 |

NC+MCAO, MCA occluded rats of SD-rats NC+MCAO+CP, Chungpaesagan-Tang administrated rats after MCAO. DM+MCAO, MCA occluded rats of diabetic rats; DM+MCAO+CP, Chungpaesagan-Tang administrated rats after MCAO. Data presented mean ± standard error. *** $p<0.001$ compared to the each control group.

한 감소 (각각 $p<0.01$)을 나타내었다. 청폐사간탕을 투여한 NC+MCAO+CP 군의 신경세포 수는 159.50±8.50 개로 NC+MCAO 군의 97.33±3.18 개에 비하여 유의성 ($p<0.001$) 있는 신경세포 수의 손상 억제를 나타내었다 (Table II, Fig. 5). 당뇨흰쥐에 있어서는 청폐사간탕을 투여한 DM+MCAO+CP 군의 신경세포 수는 135.00±3.79 개이었으며 DM+MCAO 군의 81.00±4.00 개에 비하여 매우 유

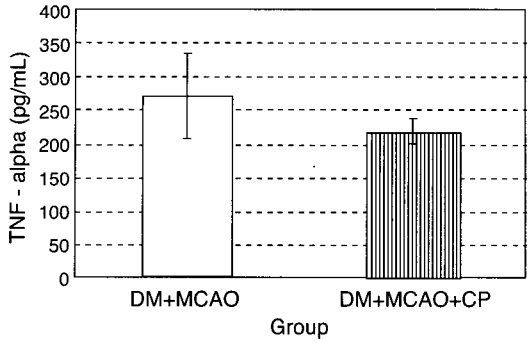


**Fig. 6.** Effects of Chungpaesagan-Tang on the level of serum TNF-¥á in the MCA occluded rats. DM+MCAO group is MCA occluded rat with diabetes. DM+MCAO+CP group is Chungpaesagan-Tang administrated rat after MCA occlusion. Error bars indicate standard error of the mean.

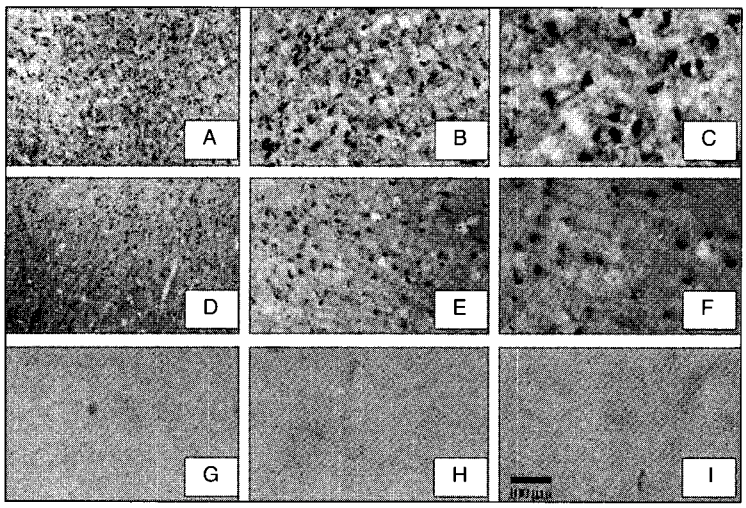


**Fig. 7.** The effect of Chungpaesagan-tang treatment on focal cerebral ischemia induced TNF-$\alpha$ expression (magnification A, D, G: 100×; B, E, F: 200×; G, H, I: 400×). Tissue sections were immunostained with antibodies against TNF-$\alpha$ as described under Materials and methods. (A-C) Ischemic section shows expression of TNF-$\alpha$ in diabetic rats. (D-F) The brain section from the rats treated with Chungpaesagan-tang shows very little TNF-$\alpha$ expression in diabetic rats. (G-I) Normal brain section showing no expression of TNF-$\alpha$.

의성 ($p$<0.001) 있는 신경세포 수의 손상 억제를 나타내었다 (Table II, Fig. 5).

4. 허혈성 뇌손상 부위 신경세포 크기의 변화

허혈성 뇌손상을 입지 않은 정상적인 대뇌피질에서 나타나는 신경세포 크기는 53.66±1.47㎛² 이었고, 허혈성 뇌손상 부위와 정상부위 사이의 경계구역에서 나타나는 신경세포의 수는 중대뇌동맥을 폐쇄한 NC+MCAO 군 및 DM+MCAO 군 모두 ischemia가 유발되지 않은 정상측 (intact)에 비해 세포크기가 위축을 나타내었다. 청폐사간탕을 투여한

NC+MCAO+CP 군의 신경세포 크기는 39.25±1.72 ㎛²로 NC+MCAO 군의 37.80±1.24㎛² 에 비하여 덜 위축하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다 (Table II, Fig. 5). 당뇨흰쥐의 경우에도 청폐사간탕을 투여한 DM+MCAO+CP 군의 신경세포 크기는 46.57±3.83㎛ 2이 었 으 며 DM+MCAO 군 의 38.23±3.83 ㎛2에 비하여 신경세포 크기가 덜 위축되었으나 유의하지는 않았다 (Table II, Fig. 5).

### 5. 혈액 내 TNF-α 및 IL-6 의 변화

혈액 중 순환하는 mature 형태의 TNF-α의 양을 효소결합면역측정법으로 측정한 결과, 일반흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄군인 NC+MCAO 군과 이에 대한 청폐사간탕 투여군인 NC+MCAO+CP 군은 별다른 차이를 보이지 않았으며, 당뇨흰쥐의 경우에는 중대뇌동맥을 폐쇄한 DM+MCAO 군의 혈액 내 TNF-α 양은 271.39±64.31pg/ml 이었으며, 청폐사간탕을 투여한 NC+MCAO+CP 군에서는 218.67±18.22 pg/ml로 대조군인 DM+MCAO 군에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 유의하지 않은 것으로 나타났다 (Fig. 6). 혈액 내 IL-6 의 변화에 있어서는 청폐사간탕을 투여한 NC+MCAO+CP 군 및 DM+MCAO +CP 군 모두에 있어서 유의하지 않은 것으로 나타났다.

### 6. TNF-α 면역조직화학 염색에 따른 변화

면역조직화학적 방법을 이용하여 중대뇌동맥 폐쇄 후 경계영역에서의 TNF-α 발현을 관찰한 결과 정상흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄에 있어서는 거의 발현되지 않았으며, 당뇨흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄의 경우 뚜렷한 발현을 보였다. 당뇨흰쥐의 청폐사간탕을 투여한 DM+MCAO+CP 군의 경우 대조군에 비하여 TNF-α 의 면역반응이 현저히 약화된 것을 볼 수 있었다 (Fig. 7).

## 고 찰

뇌허혈이 발생되면 일단 뇌로 가는 혈관의 혈류량이 감소되는 대체로 두개의 기전으로 신경세포 손상을 야기하는데 첫째는 에너지 고갈이고 둘째는 이차적으로 생기는 염증반응이다. 뇌허혈이 발생되면 신경세포의 탈분극이 일어나고 synaptic glutamate가 유리되어 세포 외 glutamate 농도가 증가한다[15]. 또한 ATP의 감소로 인한 능동수송의 역전은 세포 외 glutamate의 축적을 가속시킨다[16]. 세포외 glutamate의 축적은 양이온의 세포 내 과유입을 초래하는데 $Ca^{2+}$의 세포 내 유입이 증가하여 특히 $Ca^{2+}$ 의존성 protease, lipase와 각종 modulator의 활동이 촉발된다. 결국 free radical이 생산되어 세포벽 등 세포 구조물을 파괴하여 신경세포가 죽게 된다고 알려져 있다[17].

이차적인 염증 반응은 백혈구 류주[18], 사이토카인의 증가[19], 케모카인과 혈구유착분자의 활성화 및 성상세포의 활성화[20]이다. 이러한 염증반응의 초기 과정에는 뇌경색이 유발된 부위에 중성호성백혈구 (neutrophil)나 염기호성백혈구 (eosinophil)와 같은 혈액에서 유래된 과립성백혈구 (granulocyte)가 기용 (recruitment)되고, 후기에는 허혈부위와 주변부위 (boundary zone)에 T 림프구 (T cell)들과 포식세포 (macrophage)들이 침윤 (infiltration)된다. 염증반응에서 뇌경색 유발부위로 염증세포의 이주과정을 보면 그 첫 단계로 중성호성백혈구 (neutrophil)의 기용현상이 일어나고 있는데, 이 현상에는 뇌조직 내의 여러 단백질들 즉, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1), integrin, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1, platelet-activating factor 등이 작용하는데, 이들은 백혈구 (leukocyte)를 혈관 내에서 경색부위로 불러 모으는 작용을 한다. 그 다음 단계로는 림프구 (lymphocyte)가 경색부위로 이주하고 다음으로 포식세포 (macrophage)가 경색부위로 이주한다. 이로 인하여 다시 혈류를 회복하더라도 신경세포 손상은 회복할 수 없게 되는 것이다.

뇌허혈 발생 후 신경세포의 형태학적 변화를 살펴보면 정상흰쥐의 경우 뇌허혈손상 부위 면적은 청폐사간탕 투여군이 interaural 2mm 절편에서, 당뇨흰쥐

의 경우 청폐사간탕 투여군은 interaural 12mm, 6mm, 4mm 및 2mm에서 당뇨대조군에 비하여 통계학적으로도 유의한 감소를 보였다. 뇌손상 부위 체적의 경우 정상흰쥐보다 당뇨흰쥐에 있어서 청폐사간탕이 유의한 감소효과를 갖는 것으로 나타났다. 대뇌피질에서의 신경세포 수에 있어서 정상흰쥐 및 당뇨흰쥐의 경우 모두에서 유의한 손상 억제를 나타내었다. 하지만 허혈성 뇌손상에 따른 신경세포 크기의 위축은 억제하는 경향을 보였으나 정상흰쥐 및 당뇨흰쥐에 있어서 유의한 효과는 없는 것으로 나타났다.

TNF-$\alpha$는 뇌허혈이 발생 후에 내부염증반응에 관여하는 cytokine의 하나로 뇌신경세포 손상을 가속화하는 염증세포의 침윤을 용이하게 하고[21] 한편으로는 조직손상의 회복에도 관여하는 인자로 알려져 있다[22]. 최근 연구에 의하면 TNF-$\alpha$를 억제하면 뇌허혈 발생부위 면적이 줄어든다고 하여[23] TNF-$\alpha$억제가 뇌허혈의 처치에 중요한 관건이 된다고 하였다. Serum내 TNF-$\alpha$의 량은 뇌허혈 유발 후 6시간 내지 12시간 사이에 최대치가 되고 24시간에는 급격한 일시적 감소를 보여 거의 정상치에 이르는 진행양상을 보이는 것이 일반적이다[24]. 본 실험에서 비교적 TNF-$\alpha$가 적게 검출되었는데 이는 중대뇌동맥 폐쇄 후 24시간 후에 혈액을 채취하였기 때문이라고 생각된다. 일반적으로 STZ에 의한 당뇨유발 흰쥐는 serum의 TNF-$\alpha$ 농도가 많이 상승하게 된다. 이는 당뇨가 염증이 잘 유발될 수 있으며 염증발생 시 급격한 손상이 올 수 있음을 시사한다. 본 실험에서도 당뇨를 지닌 뇌허혈 모델에서의 TNF-$\alpha$ 농도가 매우 증가하였다. 이는 당뇨군의 뇌허혈 발생이 다른 군에 비해 많이 발생한 경향성과도 연관성이 있다고 생각된다. 이번 실험 결과로 당뇨를 지닌 국소뇌허혈 모델에서 淸肺瀉肝湯이 가지는 뇌신경세포손상 보호효과가 TNF-$\alpha$의 억제와 관련돼 항염증효과와 밀접한 관련있다고 생각된다.

IL-6는 아직도 논란의 여지가 많은 것으로 nueroprotective 한 효과와 neurotoxic 한 효과가 동시에 보고되고 있다. 인간과 설치류의 cerebral ischemia 에서 IL-6 plasma levels 은 증가한다고 하였고[25,26] intraventricular IL-6 injection은 ischemia을 감소시키고[27,28], various types of cerebral injuries에 대해서 neuroprotective effects한 효과가 있다[29,30], IL-6는 이번 실험에서 유의한 농도가 검출되지 않았다. 일반적으로 cytokine이 영구적 폐쇄 방법보다 일시적 폐쇄 방법에서 더 적게 검출된 것을 볼 때, 일시적 중뇌동맥 폐쇄 방법에서도 IL-6의 시간의존적 검출방법을 통해 IL-6의 발현양상을 연구할 필요가 있다고 생각된다.

Ischemic stroke의 발생은 비당뇨환자보다 당뇨환자에서 더 많다. 또한 ischemic stroke의 신경학적 결과는 먼저 가지고 있었던 당뇨에 의해 심각하게 악화된다[1,3]. 이러한 결과를 설명하는 기전은 microangiopathy, arteriosclerosis, atheroma formation, 그리고 cerebral autoregulation의 실조와 같은 long-standing diabetes와 관련된 변화, 혹은 hyperglycemia와 같은 당뇨와 유관한 factor와 관련된 변화와 관련이 있다. 이와 다른 연구결과가 있다고 하더라도[31] 선행된 연구에서 일반적으로 serum glucose의 증가는 국소 뇌허혈 후의 뇌경색의 크기와 신경학적 지표에 대한 이롭지 못한 영향을 준다[4,32].

당뇨를 가진 군의 뇌허혈에서 지연사가 증가한다는 보고가 있다. 지연사는 주로 뇌허혈 중심부의 주위의 ischemic penumbral zone에서 일어난다. 뇌허혈 중심부는 주로 괴사가 일어난다. 동시에 당뇨에 의해 더 악화된 뇌허혈의 과정은 ischemic penumbral zone와 mid zone의 지연사와 관련이 있다. 즉, 재관류에 의한 일시적 국소 뇌허혈 모델에 지연사 뿐만 아니라 괴사가 일어난다. 이 경우 당뇨가 있을 경우는 뇌손상이 명백히 악화된다[33,34]. 국소뇌허혈 후의 세포사의 기전은 복잡하고 불명확하다. 이러한 손상하의 세포사의 형태는 잘 알려져 있지 않지만 괴사와 지연사가 일반적으로 이 과정에 관여한다고 생각되어왔다. 같은 조건에서 당뇨가 있는 대뇌조직의 중심영역과 경계영역은 비당뇨그룹보다 명백히 크다. 일반적으로 대뇌손상은 국소뇌허혈에

의해 발생하는데 이는 심한 뇌허혈 중심영역과 low-perfusing 주변영역으로 구성되어있다[35]. 허혈시간이 길어질수록 괴사는 중심영역의 대뇌조직에서 발생하고 중심영역의 주변인 경계영역은 상대적으로 덜 심하다. 그런데 이러한 경계영역은 만약 치료가 몇 시간 내에 이루어진다면 구할 가능성도 있다. 그렇지 않으면 이러한 주변영역은 새로운 괴사영역으로 발전할 가능성도 있다[36]. 대체로 당뇨군에서 국소뇌허혈 (재관류)후 세포사의 형태는 비당뇨군의 세포사와 유사하다. 그렇지만 그 둘 사이의 차이점은 뇌허혈 경계영역의 지연사가 명백히 악화되었다는 것과 중심영역에서의 괴사의 진행이 가속화되었다는 것이다. 당뇨가 지연사를 증가시키는 이유는 아마도 acidosis, Ca overload 그리고 oxidative stress와 관련이 있을 것으로 생각된다. 고혈당증에서는 세포내 acidosis와 연관되어 극적으로 lactate치가 상승한다. 세포내 pH는 유의하게 낮아지고, 그것은 결과적으로 endonuclease 활성을 증가시킨다[37]. 이것으로 endonulclease activation이 증가한다. 세포내 acidosis는 세포 Ca overload를 유발하고 이것은 cell demise의 원인이 되어 결국 지연사나 괴사가 된다. 만성 고혈당과 뇌허혈은 두 가지 모두 뇌조직의 oxidative 상태의 불균형을 유발한다. 이러한 oxidative 불균형은 STZ-당뇨에서 뇌허혈이 유발될 때 더욱 심각해진다[38].

Hyperglycemia에 의한 이러한 악화는 여러 factor와 연관되어있다. 그러한 factor에는 glucose store의 증가에 따른 anaerobic 기전에 의한 tissue lactic acidosis의 진행, 뇌혈류의 감소, 초기 microvascular pathology 그리고 blood-brain-barrier의 altered permeability등이 있다[4,39].

본 연구결과 당뇨를 지닌 흰쥐에서 infarct의 발생이 증가하는 경향성을 보였다. 이를 각 면적으로 살펴보면 보통 흰쥐는 타 연구들과 발생양상이 유사하였으나, 당뇨흰쥐의 경우 interaural 12mm에서의 infarct 면적이 다른 것에 비해 유의하게 크게 나타나 뇌허혈손상시 전두엽 쪽의 손상이 많이 생겼음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 당뇨를 가진 경우 기저핵 부위의 광범위한 손상을 통해 운동신경능력의 현저한 저하가 보다 증가될 수 있음을 보여주며, 합병증이나 선행질환을 지닌 환자의 뇌허혈이 그 예후가 좋지 않다는 기존의 보고들[1,3,4]과도 부합하는 결과로 사료된다.

淸肺瀉肝湯은 보통 흰쥐 및 당뇨흰쥐에 유발된 뇌허혈을 선행질환에 상관없이 어느 정도 일정한 크기로 유지시켜주는 효과가 있었다. 즉 전 모델에서 淸肺瀉肝湯을 투여한 군은 뇌허혈 크기가 어느 정도 이상으로는 증가하지 않았다. 이는 위에서 언급한 바와 같이 뇌허혈 후의 치료대상은 중심영역보다는 경계영역, 괴사보다는 지연사의 방지에 있음을 고려하여볼 때, 약물이 효과적일 수 있는 경계영역에서의 뇌신경세포손상 대해 淸肺瀉肝湯이 효과적으로 작용하였다고 볼 수 있다. 특히 당뇨흰쥐의 중풍에서 뇌경색을 가장 많이 줄여주는 효과가 있었다. 당뇨흰쥐에서 특징적으로 전두엽 쪽에 많이 발생한 뇌허혈을 매우 유의하게 감소시켰다. 또한 TNF-α도 유의하게 감소시켜 淸肺瀉肝湯의 효과가 cytokine에 관련된 염증반응 감소시켜 뇌허혈 손상에 대한 보호작용을 하는 것으로 생각된다.

## 참고문헌


1. Wolf PA, D' Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WB. Probability of stroke: a risk profile from the Framingham Study. Stroke. 1991 ;22(3):312-8.
2. Harms H, Wiegand F, Megow D, Prass K, Einhaupl KM, Dirnagl U. Acute treatment of hypertension increases infarct sizes in spontaneously hypertensive rats. Neuroreport. 2000;11(2):355-9.
3. Roussel S, Pinard E, Seylaz J. Effect of MK-801 on focal brain infarction in normotensive and hypertensive rats. Hypertension. 1992; 19(1):40-6.
4. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of

cerebral ischemia. Stroke. 1989;20(12):1627-42.
5. 권도익, 고창남, 조기호, 기영석, 배형섭, 이경섭. 한방병원 심계내과 입원환자에 대한 임상연구. 경희의학. 1996;7:273-85.
6. 李濟馬. 東醫壽世保元. 서울:행림출판사. 1986:7-13, 115, 137-8.
7. 김정제, 안병국, 홍원식, 이상인, 김완희, 이학인, 안덕균, 신민규. 간질환에 대한 한방치료제에 관한 연구. 청폐사간탕의 치료효과에 관한 실험적 연구. 경희한의대논문집. 1978;1:9-14.
8. 김달래 炸, 송일병. 태음인 청심연자탕과 청폐사간탕의 면역반응과 항 알레르기 효과에 관한 실험적 연구. 경희한의대논문집. 1991;14:131-60.
9. 구진숙. 청폐사간탕(淸肺瀉肝湯)이 Streptozotocin으로 유발된 흰쥐의 실험적 당뇨에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지.1997;11(1):227-48.
10. 송미연, 김성수, 신현대. 식요법(節食療法) 시행 후 태음인비만에 대한 청폐사간탕(淸肺瀉肝湯)과 태음조위탕(太陰調胃湯)의 임상적 연구. 한방재활의학과학회지. 1998;8(1):34-56.
11. 홍성길, 김윤진, 조동욱, 강상모. 허혈/재관류 세포 손상에서 청폐사간탕의 보호효과. 한국한의학연구원논문집. 2000;5(1):111-7.
12. 오연환, 박인식, 신길조, 이원철. 청폐사간탕이 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(2):161-74.
13. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. Stroke. 1996;27(9):1616-22.
14. 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):290-3.
15. Drejer J, Benveniste H, Diemer NH, Schousboe A. Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. J Neurochem. 1985;45(1):145-51.
16. zatkowski M, Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. Trends Neurosci. 1994;17(9):359-65.
17. Hock NH. Neuroprotective agents in acute ischemic stroke. J Cardiovasc Nurs. 1998;13(1) :17-25.
18. Barone FC, Schmidt DB, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Feuerstein GZ, Clark RK, Lee EV, Griswold DE, Sarau HM. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. Stroke. 1992;23(9):1337-47.
19. Endres M, Scott G, Namura S, Salzman AL, Huang PL, Moskowitz MA, Szabo C. Role of peroxynitrite and neuronal nitric oxide synthase in the activation of poly(ADP-ribose) synthetase in a murine model of cerebral ischemia-reperfusion. Neurosci Lett. 1998248(1):41-4.
20. resham GE, Fitzpatrick TE, Wolf PA, McNamara PM, Kannel WB, Dawber TR. Residual disability in survivors of stroke--the Framingham study. N Engl J Med. 1975;293(19):954-6.
21. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. Stroke. 1994;25(7):1481-8.
22. Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-

binding factor and attenuation of peroxide and Ca2+ accumulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(20):9328-32.

23. Nawashiro H, Martin D, Hallenbeck JM. Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. J Cereb Blood Flow Metab. 1997;17(2):229-32.
24. Pan W, Kastin AJ, Bell RL, Olson RD. Upregulation of tumor necrosis factor alpha transport across the blood-brain barrier after acute compressive spinal cord injury. J Neurosci. 1999;19(9):3649-55.
25. Fassbender K, Rossol S, Kammer T, Daffertshofer M, Wirth S, Dollman M, Hennerici M. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. J Neurol Sci. 1994;122(2):135-9.
26. Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. Stroke. 2000;31(10):2325-9.
27. Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1998;18(2) :176-9.
28. Matsuda S, Wen TC, Morita F, Otsuka H, Igase K, Yoshimura H, Sakanaka M. Interleukin-6 prevents ischemia-induced learning disability and neuronal and synaptic loss in gerbils. Neurosci Lett. 1996;204(1-2):109-12.
29. Ali C, Nicole O, Docagne F, Lesne S, MacKenzie ET, Nouvelot A, Buisson A, Vivien D. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20(6):956-66.
30. Suzuki S, Tanaka K, Nagata E, Ito D, Dembo T, Fukuuchi Y. Cerebral neurons express interleukin-6 after transient forebrain ischemia in gerbils. Neurosci Lett. 1999;262(2):117-20.
31. Nedergaard M, Gjedde A, Diemer NH. Hyperglycaemia protects against neuronal injury around experimental brain infarcts. Neurol Res. 1987;9(4):241-4.
32. Bomont L, MacKenzie ET. Neuroprotection after focal cerebral ischaemia in hyperglycaemic and diabetic rats. Neurosci Lett. 1995;197(1):53-6.
33. Wang GX, Li GR, Wang YD, Yang TS, Ouyang YB. Characterization of neuronal cell death in normal and diabetic rats following exprimental focal cerebral ischemia. Life Sci. 2001;69(23):2801-10.
34. Siesjo BK, Katsura K, Kristian T. The biochemical basis of cerebral ischemic damage. J Neurosurg Anesthesiol. 1995;7(1): 47-52.
35. Schiff SJ, Somjen GG. The effect of graded hypoxia on the hippocampal slice: an in vitro model of the ischemic penumbra. Stroke. 1987;18(1):30-7.
36. Hession C, Osborn L, Goff D, Chi-Rosso G, Vassallo C, Pasek M, Pittack C, Tizard R, Goelz S, McCarthy K, et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: direct expression cloning and functional interactions. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(5):1673-7.
37. Furlong IJ, Ascaso R, Lopez Rivas A, Collins MK. Intracellular acidification induces apoptosis by stimulating ICE-like protease activity. J Cell Sci. 1997;110 ( Pt 5):653-61.

38. ragno M, Parola S, Brignardello E, Mauro A, Tamagno E, Manti R, Danni O, Boccuzzi G. Dehydroepiandrosterone prevents oxidative injury induced by transient ischemia/ reperfusion in the brain of diabetic rats. Diabetes. 2000;49(11):1924-31.

39. Duverger D, MacKenzie ET. The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. J Cereb Blood Flow Metab. 1988;8(4): 449-61.