

갈근 에탄올추출물의 국소뇌허혈 모델에 대한 뇌신경보호 효과

송정빈^{1#}, 최진규², 이동현², Bhakta Prasad Gaire¹, 이창원¹, 부영민¹, 최호영¹, 김호철^{1*}

1 : 경희대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : (주)뉴메드 한의과학기술연구소

Neuroprotective effect of Puerariae Radix extract on focal cerebral ischemia in mice

Jungbin Song^{1#}, Jin Gyu Choi², Donghung Lee², Bhakta Prasad Gaire¹, Changwon Lee¹,
Youngmin Bu¹, Ho-Young Choi¹, Hocheol Kim^{1*}

1 : Dept. of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

2 : Korea Institute of Science and Technology for Eastern Medicine (KISTEM), NeuMed Inc.

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to evaluate the neuroprotective effect of *Pueraria lobata* extract on focal cerebral ischemia in mice.

Methods : Focal cerebral ischemia was induced by occlusion of the right middle cerebral artery using the intraluminal filament model. ICR male mice underwent 90 minutes of middle cerebral artery occlusion (MCAo) followed by 24 hours of reperfusion. Mice were administered *Pueraria lobata* extract orally at the dose of 300mg/kg just prior to reperfusion. Rotarod test and balance beam test were practiced to assess sensory-motor function 23 hours after MCAo. In rotarod test, the latency to fall on the accelerating rotarod was recorded for 5 min. In balance beam test, the score was graded according to number of slips and latency to cross. The infarct volume was measured 24 hours after MCAo using 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining.

Results : *Pueraria lobata* extract treated group showed significant reduction in infarct volume by 27.3% compared to control group ($p<0.05$). In rotatod test, it also showed significant extension of latency time compared to control group (67.82 ± 15.08 vs. 5.62 ± 1.06 , $p<0.001$). In contrast to performance in rotarod test, that in balance beam test did not improve with *Pueraria lobata* extract treatment.

Conclusions : We conclude that *Pueraria lobata* extract has a significant neuroprotective effect and reduces damage of sensory-motor function in MCAo model. These findings suggest that *Pueraria lobata* could be a potent neuroprotective agent.

Key words : *Pueraria lobata*, neuroprotection, Middle cerebral artery occlusion, rotarod test, balance beam test

서론

뇌혈관 질환 중 하나인 중풍은 갑작스럽게 발생하고, 정상적인 신경학적 기능의 상실을 동반하며, 짧은 시간 내에 급격하게 질병의 경과가 진행된다. 또한 이로 인해 사망의 위험성이 높고 사망에 이르지 않더라도 계속적인 심각한 후유장애로 인하여 사회활동을 할 수 없게 된다¹⁾. 한의학에서 중풍은 약 B.C. 2600년경 『黃帝內經』에서 ‘仆擊, 暴病暴死, 不病卒

死, 非病’ 등의 증상으로 처음 표현되었으며 이후의 많은 학자들이 다양한 시각에서 이 질환에 대한 연구를 하였다²⁾.

중풍 치료는 발병초기 3시간 이내에 혈전을 용해시켜 재관류시키는 방법과 신경세포의 사멸을 막을 수 있는 신경보호제를 사용하는 두 가지 방법이 있다³⁾. 현재 혈전용해제로는 recombinant tissue plasminogen activator (rtPA)가 유일하게 치료제로서 인정되고 있으나⁴⁾, 아직까지 효과적인 신경보호제에 관한 보고는 없는 실정이다³⁾.

*교신저자 : 김호철, 서울특별시 동대문구 경희대로 26 130-701

· Tel : 02-961-0419 · E-mail : hckim@khu.ac.kr

#제1저자 : 송정빈, 서울특별시 동대문구 경희대로 26 130-701

· Tel : 02-961-0419 · E-mail : jbsong@khu.ac.kr

· 접수 : 2012년 10월 15일 · 수정 : 2012년 11월 3일 · 채택 : 2012년 11월 9일

갈근은 한국에서는 칩(*Pueraria lobata* OHWI (콩과 Leguminosae)의 周皮를 제거한 뿌리를 사용하고⁵⁾, 중국에서는 野葛(*Pueraria lobata* (Willd) OHWI 혹은 甘葛藤 *Pueraria thomsonii* BENTH,의 건조된 뿌리를 사용하고 있다⁶⁾. 갈근은 『神農本草經』에 ‘葛根,味甘平,主消渴,身大熱,嘔吐,諸痺,起陽氣,解諸毒,葛谷,主下利十歲已上’이라고 처음 기재된 이후로 많은 의학자들에 의해 연구되어 왔다. 한의학적으로 甘辛, 平하고 解表, 透疹, 生津, 止瀉의 효능이 있어 전통적으로 外感風熱, 麻疹透發不暢, 消渴, 濕熱瀉痢, 脾虛泄瀉 등에 사용하였다⁷⁾. 갈근의 약리작용으로는 해열, 혈압강하, 뇌혈류량 증가, 관상동맥 확장, 항부정맥, 평활근 이완, 혈소판응집 억제작용 등이 연구되어 있다⁸⁻⁹⁾.

신경보호와 관련된 효능은 갈근의 주요 isoflavone 성분인 puerarin과 daidzein을 중심으로 연구되어 왔다. 갈근의 지표성분인 puerarin은 다양한 기전을 통해 신경보호 효과가 있음이 밝혀져 중국에서는 급성 중풍을 치료하는데 널리 약으로 이용되고 있다¹⁰⁾. Puerarin은 *in vitro* 연구에서 glutamate, Ca²⁺ 유입, NO 생성을 억제하며¹¹⁾, acid-sensing ion channel을 차단하여¹²⁾ 신경세포를 보호함이 보고되었다. *in vivo* 연구에서는 국소 뇌허혈 동물 모델인 중대뇌 동맥 폐쇄 모델에서 NMDA receptor의 발현 억제¹³⁾, 세포내 Ca²⁺유입 억제¹⁴⁾, anti-oxidant¹⁵⁾, anti-inflammation¹⁶⁻¹⁸⁾, anti-apoptosis¹⁹⁾, erythropoietin activity 활성화²⁰⁾를 통하여 신경세포를 보호함이 보고되어 있다. 전뇌 허혈 동물 모델인 사혈관폐쇄 모델에서 anti-apoptosis 작용을 통하여 학습기억 능력 향상시켰으며²¹⁾ gerbil을 대상으로 한 2-vessel occlusion 모델에서도 anti-apoptosis, anti-inflammation 작용을 통하여 뇌신경세포를 보호함이 보고되었다²²⁾. Daidzein은 *in vitro* 연구에서 PPAR γ activation을 통하여 신경세포를 보호하며²³⁾ estrogen receptor를 통하여 세포자멸사를 막는 것이 보고되어 있다²⁴⁾. 갈근추출물의 경우 양측 경동맥을 폐쇄하여 중풍을 유발한 쥐에서 해마, 선조체의 norepinephrine, dopamine의 농도를 증가시켜 항우울 작용이 있음이 보고되어 있는데²⁵⁾ Kenmei Mizutani 등²⁶⁾에 의하면 중풍으로 인한 뇌 손상으로부터 운동 기능을 회복하는 데에 뇌 내 norepinephrine, dopamine을 조절하는 것이 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다. 실험로 동물 모델에서 중풍 유발 후 중추의 노르아드레날린 신경전달을 증가 시킴으로써 운동장애가 회복되었다는 보고가 있다²⁷⁾.

갈근의 주요 성분인 puerarin과 daidzein이 신경보호 효과가 있으며 갈근 추출물이 뇌 내 norepinephrine과 dopamine 농도를 증가시킨다는 이전의 연구는 갈근 추출물이 중풍으로 인한 뇌세포 사멸로부터 신경세포를 보호하며 감각 운동 실조를 개선할 가능성이 있음을 시사한다. 본 연구에서는 이러한 가능성을 객관적으로 검증하기 위하여 중대뇌동맥 폐쇄 모델을 이용하여 국소 뇌허혈 유발한 후 갈근을 투여하고 뇌경색 비율을 측정하여 신경보호 효과를 확인하였으며 rotarod test와 balance beam test를 수행하여 감각운동 실조를 개선하는지를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1.1. 동물

실험동물은 (주)샘타코(한국)에서 구입한 체중 29-31g ICR 수컷 생쥐를 사료와 물을 자유롭게 공급하면서 일주일간 실험 환경에 적응시켰으며, 실험 12시간 전에 절식시켜 실험에 사용하였다. 사육실 내의 온도는 22.0±2.0℃, 습도는 55±5%로 유지하였고 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다.

1.2. 약재

실험에 사용된 갈근(*Pueraria lobata*)은 경북 영천에서 채취한 것을 경희대학교 한의과대학 김호철 교수의 동정을 받아 (Voucher No.12082702) 사용하였다

2. 실험방법

2.1. 시료의 조제

갈근 100g을 세절하여 70% EtOH을 용매로 수욕상에서 3시간 추출하였다. 추출액은 여과하였으며 감압농축기를 사용하여 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 총 24.5g의 70% EtOH 추출액을 얻었다.

2.2. 국소뇌허혈의 유발과 시료의 투여

국소뇌허혈 모델은 *Zea longa* 등의 방법²⁸⁾을 응용하여 사용하였다. 먼저, 12 mm의 4-0 나이론 봉합사(Dafilon, Malaysia)를 실리콘(Xantopren, Bayer Dental, Germany)으로 코팅하여 지름이 0.20 mm가 되게 제작하여 실험에 사용하였다. 생쥐를 70% N₂O와 30% O₂가 섞인 혼합가스에 5%의 이소플루란(isoflurane)으로 전신마취를 한 후, 목 전방 부위 중앙의 피부를 절개하고 오른쪽 경동맥과 외경동맥(ECA)을 주위조직과 신경들로부터 분리하였다. 외경동맥 분지인 상부갑상선동맥과 후두동맥을 전기소작기로 소작하고 내경동맥의 분지인 익돌근구개동맥을 전기소작한 뒤, 외경동맥을 자르고 probe를 외경동맥에서 내경동맥으로 삽입하되 총경동맥분지에서 약 10 mm정도 삽입한 후 실로 고정하였다. 피부절개부위를 다시 봉합한 후 마취에서 자연회복시켰다. 유발 90분 후 같은 방법으로 재마취하여 probe를 후퇴시켜 재관류시켰다. 재관류 직전에 시료를 한번 경구 투여하였으며, 대조군은 같은 부피의 20% DMSO를 경구 투여하였다. 모든 수술과정은 이소플루란을 2%로 유지하면서 수술현미경하에서 시행하였으며, 체온이 37±0.5℃ 이하로 떨어지지 않도록 체온 유지장치를 이용하였다. 실험군은 중대뇌동맥을 폐쇄하여 뇌허혈을 유발한 대조군, 뇌허혈 유발 후 갈근 추출물을 경구 투여한 갈근군, 혈관내 봉합사 삽입과정을 제외한 모든 수술과정을 시행한 Sham군으로 구분하였으며, 각 실험군은 5 마리씩으로 구성하였다.

2.3 뇌손상 조직의 염색

뇌허혈 유발 24시간 후에 경추탈골 시키고, 2분 이내에 뇌를 적출한 후 mouse brain matrix를 이용하여 2 mm 두께로 4개의 절편으로 나누었다. 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)가 들어 있는 16 well plate에 조직을 충분히 담그고 37℃에서 30분 동안 염색하였다.

2.4 뇌손상 조직의 부피 측정

염색된 4개의 조직을 디지털 카메라로 촬영한 후 이미지

분석프로그램인 옵티마스 6.5 (Optimas 6.5, Bioscan)를 이용하여 뇌경색 면적을 측정하였다. 뇌경색 비율(%)을 아래 수학적식으로 계산하였다.

$$\text{뇌경색 비율(\%)} = \left[\frac{A-B}{A} \times 100 \right]$$

A: 정상 우반구의 부피(mm³)

B: 손상 반구의 정상 부위 부피 (mm³)

2.5. 행동학적 평가

2.5.1. Rotarod test

운동 기능의 조정, 감각운동 조화와 자발운동을 관찰하기 위해 Rogers 등²⁹⁾과 Zhang 등³⁰⁾의 방법을 응용하여 뇌허혈 유발 후 23시간에 실시하였다. rotarod의 회전속도가 0에서 60 rpm까지 5분간 회전하는 가속회전법을 사용하였고, 뇌허혈이 유발된 생쥐를 봉의 가운데에 균형을 잡아 놓은 후, 회전을 시작한 시간부터 생쥐가 떨어질 때까지의 시간(latency time)을 측정하여 평가하였다. 각 생쥐마다 5회 실시하여 최고치와 최저치를 제외한 중간 3개 값의 평균을 수치로 사용하였다.

2.5.2. Balance beam test

뒷발의 운동기능을 측정함과 동시에 균형감각, 전정기능 등을 관찰하기 위하여 Soblosky 등의 방법³¹⁾을 응용하여 뇌허혈 유발 후 23시간에 실시하였다. 먼저 너비 3 cm, 길이 150 cm의 나무로 된 봉을 바닥에서 약 50 cm 높이에 걸쳐 놓고, 생쥐를 봉의 중심에 균형을 잡게 놓은 후 30초간 생쥐의 행동을 보고 3명의 관찰자가 그 점수를 매겼으며 점수의 평가기준은 다음과 같다. 0점: 봉에서 균형을 유지할 수 없는 상태, 1점: 30초간 균형을 잡고 봉의 길이 방향으로 몸을 트는 상태, 2점: 2점에 몸을 트 상태에서 봉의 길이 방향으로 걷는 스텝의 50% 이상이 미끄러지는 상태, 3점: 2점에서 50% 이하로 미끄러지는 상태, 4점: 3점에서 50% 이하로 미끄러지는 상태, 5점: 4점에서 1스텝 정도 미끄러지는 상태, 6점: 5점에서 미끄러지는 스텝이 없이 자유롭게 걷는 상태로 정하여 실시하였다. 생쥐마다 매 3회 실시하여 평균값을 데이터로 사용하였다.

2.6. 통계처리

데이터는 mean±SEM으로 나타내었으며, 대조군과 실험군의 평균차이는 Student t-test로 검정하여 p<0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. MCAo에서 뇌손상 억제 효과

TTC로 뇌조직을 염색하면 허혈성 손상으로 인하여 조직이 사멸한 부위는 염색이 되지 않아 흰색으로 나타나며, 정상 부위의 조직은 염색이 되어 흑색으로 나타난다. 갈근 추출물을 투여한 군(B)의 뇌조직을 살펴보면 대뇌피질과 선조체의 세포사멸 부분이 대조군(A)에 비하여 작은 것을 육안으로 알 수 있다(Fig.1). 뇌경색 비율은 20% DMSO를 투여한 대조군에서 35.46±2.11%로 관찰되었고, 갈근 추출물 300 mg/kg를 경구투여한 군에서 25.7±3.99%로 관찰되었다. 갈근 추출물은 대조군에 비해 뇌경색 비율을 27.3% 줄여주어 유의한 신경보호 효과를 나타내었다 (p<0.05)(Fig.2).



Fig. 1. Representative coronal brain section stained with 2% 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 24h after MCAo. Dark pink part indicates normal part and white part indicates infarct part. *Pueraria lobata* extract 300mg/kg (p.o.) treated mouse (B) shows reduction of infarct area compared to control mouse (A).

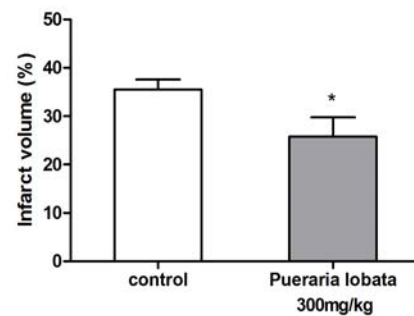


Fig. 2. Neuroprotective effect of *Pueraria lobata* extract in mice. The infarct volume was significantly reduced by 27.3% after oral administration of *Pueraria lobata* extract 300mg/kg compared with the control. Values are mean±SEM for 5 mice. * significantly different from control, *p <0.05, by Student t-test.

2. 행동학적 평가

2.1. Rotarod test

Rotarod test 결과, 대조군에서는 5.62±1.06초 동안의 유지시간을 보였고, 갈근 추출물 300 mg/kg을 경구투여한 군에서는 67.82±15.08초의 유지시간을 보여 대조군에 비해 유의하게 감각 운동 기능의 실조에 대한 보호 효과를 보였다 (p<0.001) (Fig.3).

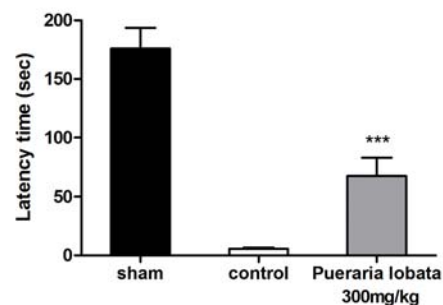


Fig. 3. Latency time on rotarod performance. The latency time to fall off the rotarod was measured. 23 h after MCAo. The latency time of *Pueraria lobata* group was significantly extended compared to that of control group. Values are mean±SEM for 5 mice. *** significantly different from control, ***p <0.001, by Student t-test.

2.2. Balance beam test

Balance beam test 결과, 대조군은 0.77 ± 0.14 점을 기록하였고, 갈근 추출물 300 mg/kg를 투여한 군은 1.00 ± 1.00 점을 기록하여 두 군은 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4).

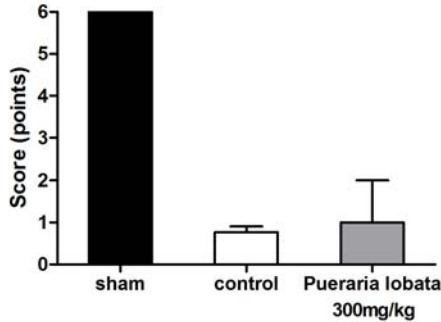


Fig. 4. Scores on balance beam test. The scores were graded 23 h after MCAo. Performance did not improve significantly with *Pueraria lobata* extract treatment. Values are mean \pm SEM for 5 mice. Data obtained were analyzed by Student t-test.

고찰

국소뇌허혈 동물모델인 중대뇌동맥 폐쇄 모델을 이용하여 갈근 추출물의 신경보호 효과와 감각운동 기능에 끼치는 영향에 대하여 평가한 결과 갈근 추출물은 허혈성 뇌손상으로부터 뇌경색 비율을 유의하게 감소시켰으며 감각운동 기능의 지표인 유지시간(latency time)을 연장시켰다.

갈근 추출물은 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 재관류 직전 300mg/kg의 농도로 1회 경구 투여하였을 때 27.3%의 유의한 신경보호 효과를 나타내었다. 10~20분간 허혈을 유발시키면 중심부에서 신경세포들이 산발적으로 죽으며, 1시간 유발 시 중심부에 경색이 형성된다. 또한 2~3시간 유발 했을 때는 영구적으로 허혈을 유발시키는 경우와 같은 정도로 조직이 손상된다³²⁻³³. 경색 부위의 세포 사멸은 중심부에서 주변부로 확대되어 경색 유발 12시간 이후에는 80%의 신경세포들이 사멸된다³⁴. 때문에 초기에 신경보호제를 투여하여 뇌경색 주변부 영역의 세포사멸을 막는 것이 중요하다. 중대뇌동맥 폐쇄 24시간 후에 뇌조직을 관찰하였을 때 재관류 직전 갈근을 투여한 경우 대뇌피질과 선조체의 세포사멸이 현저하게 억제되었다. 이러한 결과는 갈근 추출물이 신경보호제로 작용하여 세포자살로부터 뇌경색 주변부 영역의 신경세포를 보호한 것을 의미한다. 본 연구 결과는 갈근 성분인 puerarin이 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 NF- κ B의 활성을 억제¹⁷하고 재관류 손상에 관여하는 inducible nitric oxide synthase(iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 염증 인자의 발현을 억제¹⁶하여 신경세포를 보호한 이전의 연구와 일치한다.

갈근 추출물은 중풍 유발 23시간 이후 측정된 rotarod test에서 감각운동 기능의 지표인 유지시간(latency time)을 대조군에 비해 유의하게 연장시켰다. 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 뇌허혈이 유발된 쥐는 감각운동 기능의 증가가 손상되어 운동기능 조정(motor coordination), 감각운동 조화(sensory

motor integration), 자발 운동(spontaneous locomotion) 기능이 저하된다³⁵. Rotarod test는 감각운동 기능을 평가하는 대표적인 행동실험으로 뇌허혈이 유발된 쥐는 더 빠른 시간에 균형을 잃고 떨어지게 되어 유지시간이 정상 쥐에 비하여 짧다. 갈근 추출물이 유지시간을 연장시킨 것은 시냅스전달(synaptic transmission)에 관련된 대뇌피질과 caudoputamen의 손상을 막아³⁰ 뇌허혈로 인한 감각운동 기능의 실조를 개선함을 의미한다.

Rotarod test와 달리 balance beam test에서는 갈근 추출물을 투여한 군과 대조군 사이에 유의한 점수 차이를 보이지 않았다. Balance beam test의 경우 주로 쥐의 뒷발(hindlimb)의 운동 기능을 평가하는 행동실험인데 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서는 뒷발의 감각운동기능을 담당하는 피질 영역의 손상정도가 약하며 또한 자연적으로 회복되는 속도가 빠르다고 보고되어 있다³⁶. Puurunen 등³⁶의 연구에서는 MCAo 유발 후 2일째부터 6일간 매일 balance beam test를 수행하였을 때 2, 3일째에만 control group과 sham group간의 점수(points)에 유의한 차이가 있고 그 이후에는 두 군 간의 유의한 차이는 보이지 않았다. 이를 바탕으로 추측하였을 때 대조군의 뒷발 감각운동 기능을 담당하는 피질영역의 손상 정도가 약하기 때문에 갈근 투여군과 대조군 사이에 유의한 점수 차이를 보이지 않았을 가능성이 있다.

본 연구에서 수행한 중대뇌동맥 폐쇄 모델은 임상에서 빈번하게 유발되는 중풍환자와 병태, 임상증상의 측면에서 가장 유사한 모델이어서 뇌허혈 연구에 많이 이용되고 있다³⁷. 또한 중풍의 임상 증상이 운동기능 장애와 같은 감각운동신경의 이상과 관계가 크기 때문에 조직학적 평가와 더불어 rotarod, balance beam test 등과 같은 행동평가를 수행하는 것은 효과적인 신경보호제를 개발하는데 중요하다³⁸. 때문에 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서의 조직학적 평가와 행동평가에서 모두 효능을 보인 갈근 추출물은 중풍 치료에 있어서 효과적인 신경보호제가 될 가능성이 있다고 생각된다.

결론

갈근 추출물이 중대뇌동맥 폐쇄 모델에서 신경보호효과와 감각 운동기능의 회복 효과가 있는지를 알아보기 위해서 뇌경색 비율을 관찰하고 rotarod test와 balance beam test를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 갈근 추출물을 300 mg/kg의 용량으로 유발 90분 후 경구 투여한 결과 대조군에 비하여 뇌경색 비율을 27.3% 감소시켜 유의한 뇌신경 보호효과를 보였다.
2. 갈근 추출물은 Rotarod test에서 감각운동기능 실조에 대한 유의한 보호효과가 관찰되었지만 balance beam test에서는 유의한 차이를 보이지 않았다.

갈근 추출물은 중대뇌동맥 폐쇄 후 발생하는 뇌세포 사멸로부터 신경세포를 보호하며 뇌손상으로 인한 감각 운동 기능의 실조를 억제하기 때문에 중풍 치료에 있어서 효과적인 신경보호제가 될 가능성이 있다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업의 연구비 지원(과제고유번호: B110072)을 받아 수행되었음

이 논문은 2012년도 2단계 두뇌한국21사업에 의하여 지원되었음

참고문헌

1. The Korean Neurosurgical Society. Neurosurgery. Seoul : Joongang. 2002 : 263.
2. Kim Y. Clinical stroke. Seoul : Seowondang. 1997 : 305.
3. Kim H. Neuoprotective herbs for stroke therapy in traditional eastern medicine. *Neurol Res.* 2005 ; 27 : 287-301.
4. Wardlaw, JM, Warlow, CP. Systematic review of evidence on thrombolytic therapy for acute ischaemic stroke. *Lancet.* 1997 ; 350 : 607-14.
5. Korean Association of Pharmacy Education, Handbook of The Korean Pharmacopoeia. Soeul : Moonsung. 1998 : 1023.
6. the Pharmacopoeia Commission of the Ministry of Health of the People's Republic of China, The Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Beijing : Huaxuegongye. 2000 : 273-4.
7. Textbook Compilation Committee of college of Korean Medicine. Herbology. Seoul: Younglim. 1991 : 148-9.
8. Kim H. Textbook of Herbal Pharmacology, Seoul : Jipmoondang. 2004 : 92-4.
9. Lee S, Ahn D, Shin M. Clinical Application of medicinal herb. Seoul : Seongbosa. 1982 ; 370-2.
10. Tan Y, Liu M, Wu B. Puerarin for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009 ; (1) : CD004955.
11. Xu X, Zheng X. Potential involvement of calcium and nitric oxide in protective effects of puerarin on oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 113(3) : 421-6.
12. Gu L, Yang Y, Sun Y, Zheng X. Puerarin inhibits acid-sensing ion channels and protects against neuron death induced by acidosis. *Planta Med.* 2010 ; 76(6) : 583-8.
13. Zhang R, Guo HN, Wu HQ, Cheng HX, Wang HQ. Effect of puerarin on the expression of NMDA receptor in the hippocampus CA1 region after focal cerebral ischemia in rats, *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2011 ; 42(1) : 52-5.
14. Zhang R, Guo HN, Wu HQ, Cheng HX, Wang HQ. Protective effect of puerarin against calcium overload after focal cerebral ischemia injury in rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2010 ; 30(6) : 1268-71.
15. Wang PY, Wang HP, Li GW. Protective effect of pueraria flavonoid on the cerebral ischemic reperfusion injury in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2006 ; 31(7) : 577-9.
16. Chang Y, Hsieh CY, Peng ZA, Yen TL, Hsiao G, Chou DS, Chen CM, Sheu JR. Neuroprotective mechanisms of puerarin in middle cerebral artery occlusion-induced brain infarction in rats. *J Biomed Sci.* 2009; 16(1): 9 doi: 10.1186/1423-0127-16-9
17. Ding MP, Feng F, Hu HT. Effects of puerarin on expression of nuclear factor kappaB after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2007 ; 32(23) : 2515-8.
18. Pan HP, Li G. Protecting mechanism of puerarin on the brain neurocyte of rat in acute local ischemia brain injury and local cerebral ischemia-reperfusion injury. *Yakugaku Zasshi.* 2008 ; 128(11) : 1689-98.
19. Xu X, Zhang S, Zhang L, Yan W, Zheng X. The Neuroprotection of puerarin against cerebral ischemia is associated with the prevention of apoptosis in rats. *Planta Med.* 2005 ; 71(7) : 585-91.
20. Gao L, Ji X, Song J, Liu P, Yan F, Gong W, Dang S, Luo Y. Puerarin protects against ischemic brain injury in a rat model of transient focal ischemia. *Neurol Res.* 2009 ; 31(4) : 402-6.
21. Wu HQ, Guo HN, Wang HQ, Chang MZ, Zhang GL, Zhao YX. Protective effects and mechanism of puerarin on learning-memory disorder after global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Chin J Integr Med.* 2009 ; 15(1) : 54-9.
22. Zhu L, Luo CF, Yuan M, Chen MS, Ji H. [Molecular mechanism of protective effect of puerarin solid lipid nanoparticle on cerebral ischemia-reperfusion injury in gerbils]. *Zhong Yao Cai.* 2010 ; 33(12) : 1900-4.
23. Hurtado O, Ballesteros I, Cuartero MI, Moraga A, Pradillo JM, Ramírez-Franco J, Bartolomé-Martín D, Pascual D, Torres M, Sánchez-Prieto J, Salom JB, Lizasoain I, Moro MA. Daidzein has neuroprotective effects through ligand-binding-independent PPAR γ activation. *Neurochem Int.* 2012 ; 61(1) : 119-27.
24. Schreihof DA, Redmond L. Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury in vitro. *Neuroscience.* 2009 ; 158(2) : 602-9.
25. Yan B, Wang DY, Xing DM, Ding Y, Wang RF, Lei F, Du LJ. The antidepressant effect of ethanol extract of radix puerariae in mice exposed to cerebral ischemia reperfusion. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004 ; 78(2) : 319-25.

26. Mizutani K, Sonoda S, Karasawa N, Yamada K, Shimpo K, Chihara T, Takeuchi T, Hasegawa Y, Kubo KY. Effects of exercise after focal cerebral cortex infarction on basal ganglion. *Neurol Sci*, 2012 doi : 10.1007/s10072-012-1137-3
27. Aichner F, Adelwöhrer C, Haring HP. Rehabilitation approaches to stroke. *J Neural Transm Suppl*, 2002 ; (63) : 59-73.
28. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989 ; 20(1) : 84-91.
29. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*, 1997 ; 28(10) : 2060-5
30. Zhang L, Chen J, Li Y, Zhang ZG, Chopp M. Quantitative measurement of motor and somatosensory impairments after mild (30 min) and severe (2 h) transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurol Sci*, 2000 ; 174(2) : 141-6.
31. Soblosky JS, Matthews MA, Davidson JF, Tabor SL, Carey ME. Traumatic brain injury of the forelimb and hindlimb sensorimotor areas in the rat: physiological, histological and behavioral correlates. *Behav Brain Res*, 1996 ; 79(1-2) : 79-92.
32. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*, 1995 ; 26(4) : 627-34
33. 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(8) : 1032-9.
34. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 1999 ; 79(4) : 1431-568.
35. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat; 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981 ; 1 : 53-60.
36. Puurunen K, Jolkkonen J, Sirviö J, Haapalinna A, Sivenius J. An alpha(2)-adrenergic antagonist, atipamezole, facilitates behavioral recovery after focal cerebral ischemia in rats. *Neuropharmacology*, 2001 ; 40(4) : 597-606.
37. Myron D, Ginsberg M, Raul B. Rodent model of cerebral ischemia. *Stroke*, 1989 ; 20 : 1627-42.
38. DeVries AC, Nelson RJ, Traystman RJ, Hurn PD. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci Biobehav Rev*, 2001 ; 25(4) : 325-42.