

# 牛黃清心元이 저산소증 유발 배양신경세포에 미치는 영향

조규선, 정승현, 신길조, 문일수\*, 이원철

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 의과대학 해부학교실\*

## The Effects of *Woohwangcheongsim-won* on Hypoxic E18 Cortical Neuroblast

Gyu-Seon Cho, Sung-Hyun Chung, Gil-Cho Shin, Il-Soo Moon, Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University  
Department of Anatomy, College of Medicine, Dongguk University\*

**Objectives** : The purpose of this investigation is to evaluate the effects of *Woohwangcheongsim-won* on neuronal death of hypoxic E18 cortical neuroblast.

**Methods** : To evaluate the effect of *Woohwangcheongsim-won* on neuronal death caused by hypoxia, the survival rate of E18 cortical neuroblast was measured with MTT assay and the changes of several synaptic proteins and enzymes were investigated with the immunoblot assays.

**Results** : The E18 cortical neuroblasts were added 50, 100, 500, 1,000, and 5,000 $\mu$ g/ml *Woohwangcheongsim-won*. They showed neurotoxicity, when the concentration of *Woohwangcheongsim-won* was above 1,000 $\mu$ g/ml.

The E18 cortical neuroblasts, which were added 50, 100, and 500 $\mu$ g/ml *Woohwangcheongsim-won*, were exposed 98% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> for 3 hours to induce hypoxia. 3 days later, the survival rate of 50 $\mu$ g/ml *Woohwangcheongsim-won* was 141.5% when compared to the control group.

On the immunoblot assays, the expressions of  $\alpha$ CaMKII, NR2A, NR2B, PDE2, PSD-95, and eEF-1 $\alpha$  were increased in normoxia, but those of NR2A, NR2B were decreased in hypoxia when compared to the control group.

**Conclusions** : The data shows that the effects of *Woohwangcheongsim-won* on neuronal death of hypoxic E18 cortical neuroblast is a significant result.

**Key Word** : *Woohwangcheongsim-won*, hypoxic cortical neuroblast, immunoblot

## I. 緒 論

뇌허혈이 발생하는 부위의 신경세포는 뇌혈류의 감소에 따라 전기적 대뇌피질장애, 전기적 부전, 이온펌프부전 등의 장애가 오고, 수분이 경과한 후에는 비가역성 손상을 입게 된다. 그러나 뇌허혈 주변(penumbra region)의 신경세포는 약간의 대사장애만 있다가 일정시간이 경과한 후에 지연성 신경세포사가 발생하는 것으로 알려졌다.<sup>1</sup>

최근 연구에 따르면 이러한 신경세포의 죽음을 초래하는 기전이 치료될 수 없는 것이 아니고 혈류를 회복시키거나 세포내로 칼슘유입을 막는 등 초기 중재를 통해 신경세포를 사망으로부터 피하게 할 수 있는 가능성이 제시되었다. 그리고 신경조직을 손상시키는 신경전달물질의 기능과 허혈에 의해 신경 조직내에 일어나는 일련의 상호 연쇄 대사과정이 밝혀짐에 따라 뇌허혈의 급성기에 뇌손상을 경감시키고자 재관류를 위한 혈

전용해제와 신경세포 손상을 최소화시킬 수 있는 적절한 신경보호제 등 여러 방어적 약물제재에 대한 연구가 진행되고 있다.<sup>2,3</sup>

牛黃清心元은 中風, 中臟腑 陽閉證에 사용되는 處方으로<sup>4</sup> <太平惠民和劑局方><sup>5</sup>에 처음 수록되었으며, 清熱, 開竅, 安神의 효능으로 “諸風, 痰癱不隨, 語言蹇澁, 痰涎壅塞, 精神愠憤” 등을 치료한다. 최근의 보고에 의하면 牛黃清心元은 뇌혈관질환의 의식장애 등에 대한 임상적 효과가 있으며,<sup>6</sup> 실험적 연구로서 흰쥐에서의 혼수시간 단축,<sup>7</sup> 뇌부종 및 뇌허혈 면적 감소 작용<sup>8</sup> 등이 있다고 알려졌다

접수 : 2001년 6월 30일 채택 : 2001년 7월 21일  
교신저자 : 정승현 (경북 경주시 용강동 357 동국대학교 경주한방병원 3내과, 전화 : 054-770-1577, H·P : 011-505-2382, E-mail : omdjeong@hanmail.net)

으나 in vitro에서 뇌허혈과 저산소증 유발 후 신경세포의 생존율에 미치는 영향에 대하여는 알려진 바가 없다.

이에 저자는 배양한 흰쥐의 대뇌피질 신경세포에 저산소증을 유발시킨 다음 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 계산함으로써 牛黃清心元의 세포사망 방지효과를 조사하였고, 면역염색법 (immunoblot)을 이용하여 여러 효소, 신경전달물질 수용체, 연접단백질의 표현에 미치는 영향을 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

## II. 實 驗

### 1. 약재

실험에 사용된 牛黃清心元은 東醫寶鑑<sup>2)</sup>에 準하였으며, 처방 구성과 내용은 다음과 같다(Table 1).

단, 중금속을 함유한 鑛物性 약재인 朱砂와 石雄黃을 제거한 후 사용하였다.

### 2. 신경세포배양과 저산소증 유발

임신 18일(embryonic day 18: E18)의 Sprague-Dawley계 흰쥐 대뇌피질 신경세포를 牛黃清心元을 처리하지 않은 대조군과, 배양 시작과 동시에 각각 50, 100, 500, 1,000 및 5,000 µg/ml의

농도로 牛黃清心元을 처리한 실험군으로 나누어 Brewer 등<sup>10)</sup>의 방법에 따라 배양하였다. 즉, E18 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고 자궁을 분리하여 뇌를 적출한 다음, 대뇌피질조직을 37℃에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1mM sodium pyruvate와 10mM HEPES (N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid], pH 7.4)가 첨가된 HBSS 용액(Hank's Balance Salt Solution, GIBCO BRL, USA) 5ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1ml Hank 용액으로 옮기고 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur

Table 1. The Amount and Composition of Uhwangcheongsim-won

| Species                                   | Part used | Latin name                              | Weight(mg/pill) |
|---|-----------|---|-----------------|
| <i>Dioscorea japonica</i> DECNE           | Root      | <i>Rhizoma Dioscoreae</i> (山藥)          | 280.0           |
| <i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH(baked) | Root      | <i>Radix Glycyrrhizae</i> (甘草炒)         | 200.0           |
| <i>Panax ginseng</i> C.A. MEY.            | Root      | <i>Radix Ginseng</i> (人蔘)               | 100.0           |
| <i>Typhae latifolia</i> L(baked)          | Pollen    | <i>Typhae Pollen</i> (蒲黃炒)              | 100.0           |
| <i>Trictium sativum</i> L(baked)          | Seed      | <i>Massa Medicata Fermentata</i> (神麴炒)  | 100.0           |
| <i>Rhinoceros unicornis</i> L.            | Cornu     | <i>Rhinoceri Cornu</i> (犀角)             | 80.0            |
| <i>Glycine max</i> MERR(baked)            | Seed      | <i>Glycine Semen Germinatum</i> (大豆黃卷炒) | 70.0            |
| <i>Cinnamomum cassia</i> PRESL            | Cortex    | <i>Cortex Cinnamomi</i> (肉桂)            | 70.0            |
| <i>Equus asinus</i> L(baked)              | Gelatin   | <i>Asini Gelantium</i> (阿膠炒)            | 70.0            |
| <i>Paeonia lactiflora</i> PALL            | Root      | <i>Radix Paeoniae</i> (白芍藥)             | 60.0            |
| <i>Liriope platyphylla</i> WANG           | Root      | <i>Radix Liriopeis</i> (麥門冬)            | 60.0            |
| <i>Scutellaria baicalensis</i> GEORGI     | Root      | <i>Radix Scutellariae</i> (黃芩)          | 60.0            |
| <i>Angelica gigas</i> NAKAI               | Root      | <i>Radix Angelicae</i> (當歸)             | 60.0            |
| <i>Ledebouriella divaricata</i> HIROE     | Root      | <i>Radix Ledebouriellae</i> (防風)        | 60.0            |
| <i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ    | Root      | <i>Rhizoma Atractylis</i> (白朮)          | 60.0            |
| <i>Bupleurum falcatum</i> L               | Root      | <i>Radix Bupleuri</i> (柴胡)              | 50.0            |
| <i>Platycodon grandiflorum</i> A. DC.     | Root      | <i>Radix Platycodi</i> (桔梗)             | 50.0            |
| <i>Prunus armeniaca</i> L                 | semen     | <i>Semen Armeniacae Amarum</i> (杏仁)     | 50.0            |
| <i>Poria cocos</i> WOLF                   | Mycelium  | <i>Poria</i> (白茯苓)                      | 50.0            |
| <i>Cnidium officinale</i> MAKINO          | Root      | <i>Rhizoma Cnidii</i> (川芎)              | 50.0            |
| <i>Bos taurus domesticus</i> GMELIN       | Gallstone | <i>Calculus Bovis</i> (牛黃)              | 48.0            |
| <i>Saiga tatarica</i> L                   | Cornu     | <i>Cornu Tataricae</i> (羚羊角)            | 40.0            |
| <i>Moschus moschiferus</i> L              | Resin     | <i>Moschus</i> (麝香)                     | 40.0            |
| <i>Dryobalanops aromatica</i> GAERTN. f   | Resin     | <i>Borneolum</i> (龍腦)                   | 40.0            |
| <i>Ampelopsis japonica</i> MAKINO         | Root      | <i>Radix Ampelopsis</i> (白蘞)            | 30.0            |
| <i>Zingiberis officinale</i> ROSC(baked)  | Root      | <i>Rhizoma Zingiberis</i> (乾薑炮)         | 30.0            |
| <i>Zizyphus jujuba</i> MILL               | Fruit     | <i>Jujubae Fructus</i> (大棗)             | 230.0           |
| <i>Apis mellifera</i> L.                  |           | <i>Mel</i> (蜂蜜)                         | 1,600.0         |
| Gold                                      |           | <i>Gold</i> (金箔)                        | q.s.            |
| Total                                     |           |   | 3,750.0         |

pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 분산된 세포를 모아 그 수를 측정 한 후 약 4,000cells/mm<sup>2</sup> 되게 B27이 첨가된 plating Neurobasal media(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I, 0.1ml 25mM glutamate, 0.1ml 25mM 2-mercaptoethanol, GIBCO BRL, USA)에 접종하여 5% CO<sub>2</sub> 배양조에서 배양한 다음, 2~3일 간격으로 배양액을 feeding Neurobasal media(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I, GIBCO BRL, USA)로 1/3씩 교환하였다. 저산소증 유발은 대조군과 실험군의 E18 대뇌피질신경세포를 배양 7일에 CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator(Forma Scientific, USA)를 이용하여 98% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 환경에서 3시간 처리하였다.

### 3. 牛黃清心元의 세포독성 및 세포사 방지효과 관찰

牛黃清心元의 세포독성은 각각 Neurobasal 배지에 7일간 배양한 대조군과 실험군의 E18 대뇌피질신경세포를 위상차현미경을 이용하여 세포형태를 관찰하고 MTT assay를 이용하여 생존율을 측정하였다. 牛黃清心元의 세포사 방지효과는 저산소증 유발 3일 후 대조군과 실험군의 E18 대뇌피질신경세포를 위와 같은 방법으로 세포형태를 관찰하고 생존율을 측정하였다.

### 4. MTT assay

MTT assay는 96-well plate에 배양한 E18 대뇌피질신경세포(4,000cell/mm<sup>2</sup>, 100μl medium well)를 이용하였다. 배지를 새로 바꾸어(180μl) MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 200μl

**Table 2.** Details of the Antisera

| Antibody   | Host   | Dilutions of First Antibodies | Dilutions of Second Antibodies | Sources  |
|------------|--------|-------------------------------|--------------------------------|----------|
| NR2A       | Rabbit | 1 : 5,000                     | 1 : 1,000                      | 자체제작*    |
| NR2B       | Rabbit | 1 : 5,000                     | 1 : 1,000                      | 자체제작     |
| αCaMKII    | Rabbit | 1 : 5,000                     | 1 : 1,000                      | 자체제작     |
| PDE2       | Rabbit | 1 : 5,000                     | 1 : 1,000                      | DiaSorin |
| PSD-95     | Rabbit | 1 : 5,000                     | 1 : 1,000                      | 자체제작     |
| densin-180 | Rabbit | 1 : 5,000                     | 1 : 1,000                      | 자체제작     |
| eEF-1α     | Rabbit | 1 : 5,000                     | 1 : 1,000                      | 자체제작     |
| GFAP       | Rabbit | 1 : 2,000                     | 1 : 1,000                      | Sigma    |

GFAP: glial fibrillary acidic protein

\* 자체제작한 antiserum은 동국대학교 의과대학 문일수 교수로부터 제공받았다.

를 넣은 후 37℃에서 4시간 배양한 다음 원심분리 후(900 x g, 10분) 용액을 제거하고, ethanol- DMSO(ethanol: dimethyl sulfoxide, 1:10 용액) 150μl를 넣고 20분간 진탕하여 formazan 결정을 용해시킨 후 ELISA microplate reader(Sierra Resources International Inc, USA)로 optical density 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. 면역세포화학염색

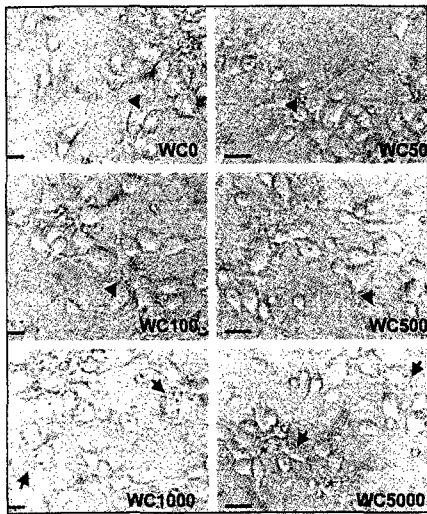
저산소증 유발 3일 후 배양용기(24 well plate)를 얼음 위에 올려놓고 배양액을 ice-cold D-PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline, 0.1g/L CaCl<sub>2</sub>, 0.2g/L KCl, 0.2g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1g/L MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 8.0g/L NaCl, 2.16g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) 500μl로 교환하였다. D-PBS를 4℃ methanol (500μl)로 교환하고, 5분 후 -20℃ methanol(500μl)로 다시 교환한 뒤 -20℃에서 20분간 방치하였다. methanol을 ice-cold D-PBS(500μl)로 교환하고, 15분 후 preblock solution [0.05% triton, 5% normal goat serum in h-PBS(20mM NaPO<sub>4</sub>, pH7.4, 450mM NaCl)]을 넣고 4℃에서 1시간 동안 처리하였다. 1차 항체(1:2,000~5,000)를 넣고 4℃에서 1시간 반응시킨 후, 실온

에서 preblock solution으로 20분씩 3회 세척하였다. 다음으로 alkaline phosphatase-conjugated 2차 항체(1:1,000)를 넣고 1시간 반응시킨 후, D-PBS로 15분씩 3회 세척하고, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate P-toluedine salt(BCIP)와 p-nitro blue tetrazolium chloride(NBT)를 넣어 발색시켰다.

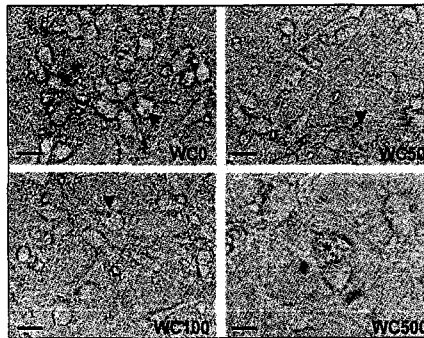
실험에 사용한 항체의 희석 비율과 Sources는 다음과 같다(Table 2).

### 6. 면역염색(immunoblot)

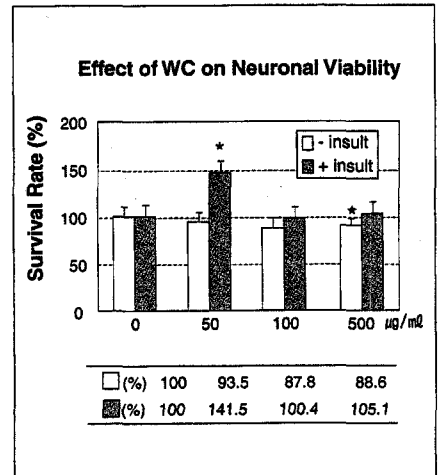
35mm culture dish에 배양한 신경세포를 수확하여 1 x stop buffer(100μl /dish)를 넣고 100℃에서 5분간 처리하였다. 각각 20μg의 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)하여 nitrocellulose(NC) membrane에 옮기고(100V, 1시간), Ponceau S 용액[0.1% (w/v) Ponceau S, 0.1% acetic acid]으로 5분간 염색한 후, 증류수로 탈염색하여 표준분자량의 위치를 확인하였다. NC를 TTBS(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.2% Tween-20, 0.02% NaN<sub>3</sub>) 용액으로 10분간 세척하고 4℃에서 16~18시간 처리한 후, 1차 항체(1:2,000~5,000)를



**Fig. 1.** Effects of WC on the neuronal morphology before hypoxic shock. Embryonic day 18(E18) cortical cells of the fetal rat(Sprague-Dawley) brain were dissociated, cultured for 7 days in vitro(DIV) in the normoxic environment(37°C, 5% CO<sub>2</sub>) as described in detail in Materials and Methods, and observed under a phase-contrast light microscope. Small and large vacuoles were marked as arrowheads and arrows, respectively. Bar, 20 µm. Numbers indicate concentrations of WC in µg/ml.



**Fig. 2.** Effects of WC on the neuronal morphology after hypoxic shock. E18 cortical cells were dissociated, cultured in the Neurobasal medium as described in detail in Materials and Methods. On 7 DIV cells were incubated in the hypoxic environment(98% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) for 3 hours, then further cultured for 3 days and observed under a phase-contrast light microscope. Vacuoles are marked as arrowheads, and a neuron with many vacuoles as an asterisk. Bar, 20 µm. Numbers indicate concentrations of WC in µg/ml.



**Fig. 3.** Effects of WC on the neuronal viability. E18 cortical neurons (7 DIV) were incubated in the hypoxic environment(98% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) for 3 hours, then further incubated in normoxia for 3 days in the Neurobasal medium with various concentrations of WC. Cell viability was calculated after an MTT assay and expressed as percentages of control. Empty bar, normoxia. Filled bar, hypoxia. Asterisk, p<0.05 (n=5). Star, P=0.053 (n=5)

넣고 2시간 반응시켰다. NC를 TTBS 용액으로 10분씩 4회 세척하고, alkaline phosphatase-conjugated 2차 항체 (1:1,000)를 넣고 2시간 반응시킨 후, 각각 TTBS 용액으로 10분씩 2회, TBS(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>) 용액으로 2회, alkaline phosphatase 완충용액 (100mM Tris, pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>)으로 1회 세척하였다. 다음으로 BCIP와 NBT를 넣고 상온에서 발색시킨 후 증류수로 세척하여 발색을 중지하였다. 정량적 분석은 NIH Scion Image Beta 3b software(Scion, USA)로 immunoblot의 signal을 scan하여 밀도를 측정하였다.

### III. 結果

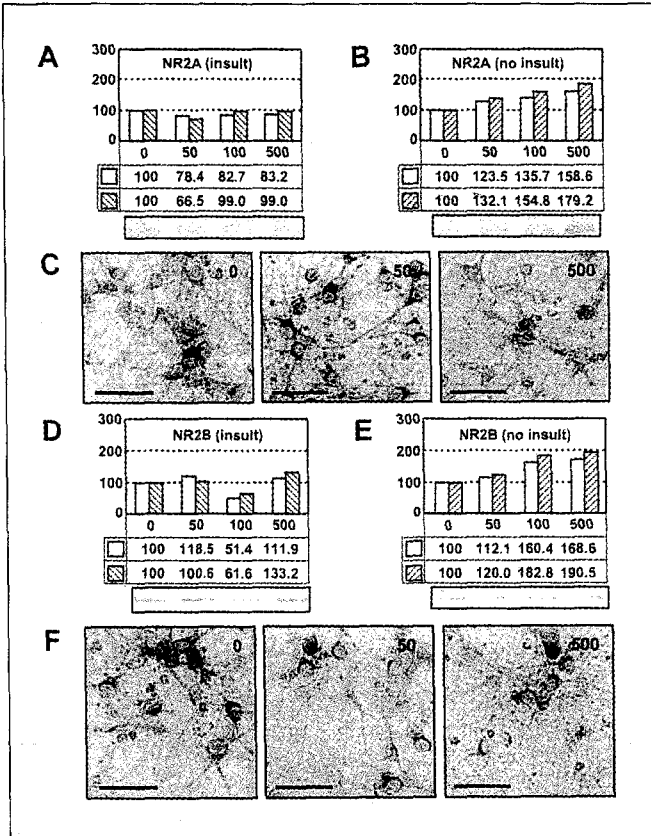
#### 1. 牛黃清心元의 세포독성에 대한 영향

위상차현미경으로 7 DIV 동안 배양한 E18 대뇌피질신경세포의 형태를 관찰한 결과, 실험군에서는 vacuole이 형성된 세포수가 牛黃清心元 농도에 비례하여 증가하였고(Fig. 1, arrowhead), 1,000 및 5,000 µg/ml에서는 vacuole의 크기도 증가하였는데(Fig. 1, arrow), 특히 5,000 µg/ml에서는 vacuole 형성이 심화되어 신경세포의 전체 형태를 분간하기 어려운 경우도 흔하게 발견되었다(Fig. 1, asterisk). 따라서 이후의 실험에서는 500 µg/ml의 농도까지만 실험 대상으로 설정하였다.

MTT assay 결과, 실험군은 대조군에 비하여 50, 100, 500 µg/ml의 농도에서 각각 93.5±8.6, 87.8±8.9, 88.6±8.7%(n=3)의 생존율을 나타내었다(Fig. 3). 500 µg/ml에서의 생존율 감소는 Mann-Whitney U test에서 p=0.053으로 확률적으로 유의한 차이가 있었다(Fig. 3, star).

#### 2. 세포사 방지에 대한 효과

위상차현미경으로 저산소증 유발 후 3일이 경과한 E18 대뇌피질신경세포의 형태를 관찰한 결과, 실험군에서는 50 µg/ml의 농도에서 작은 vacuole이 일부 세포에서 관찰되었으나(Fig. 2, arrowhead), 대조군에 비하여 형태학적으로 큰 변화는 나타나지 않았고, 100 및



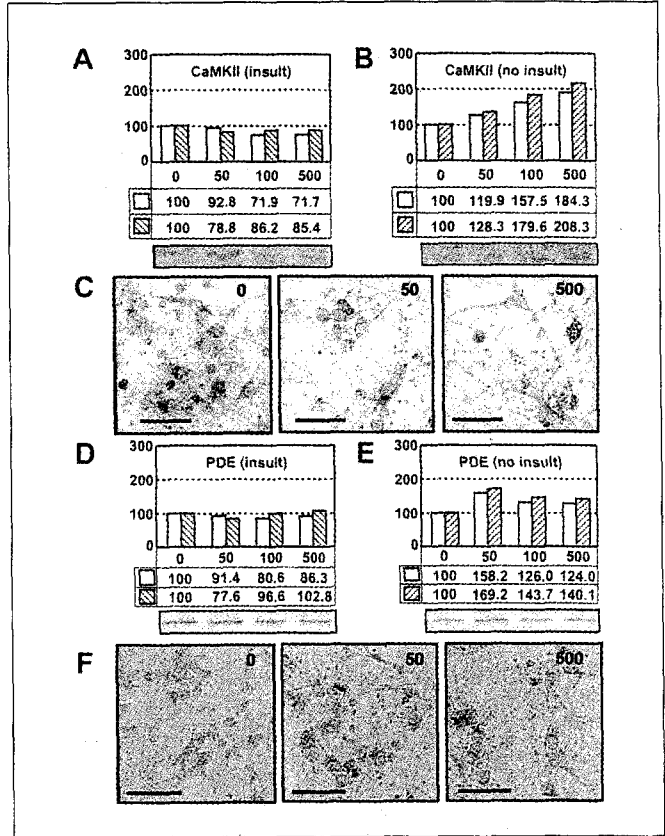
**Fig. 4.** Effects of WC on the protein expression of NMDA receptor subunits.

E18 cortical neurons (7 DIV) were shocked in the hypoxia as in Fig. 12, then, returned to normoxia for 3 days. Cells were scraped, solubilized in 1 x gel loading buffer, and electrophoresed in an 8% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were transferred to a nitrocellulose (NC) membrane and immunoblotted with specific antibodies. A: NR2A immunoblot of the hypoxic sample. The bands were scanned and signal intensities were expressed as percent - ages of control. B: NR2A immunoblot of the normoxic sample. C: immunocytochemistry of the hypoxic neurons with an anti-NR2A antibody. D: NR2B immunoblot of the hypoxic sample. E: NR2B immunoblot of the normoxic sample. F: immunocytochemistry of the hypoxic neurons with an anti-NR2B antibody. Empty bar, before compensated with neuronal viability. Filled bar, after compensated with neuronal viability. Bar, 20µm. Numbers, concentration of WC in µg/ml.

500µg/ml에서는 vacuole이 많이 형성되어 사망한 것으로 추정되는 세포가 흔하게 발견되었다(Fig. 2, asterisk).

MTT assay 결과, 실험군은 대조군에 비하여 50, 100, 500µg/ml의 농도에서 각각 141.5±16.4, 100.4±6.1, 105.1

±10.9%(n=5)의 생존율을 나타내었다 (Fig. 3). 50µg/ml에서의 생존율을 증가하는 Mann-Whitney U test에서 p<0.05로서 확률적으로 유의한 차이가 있었다 (Fig. 3, asterisk).

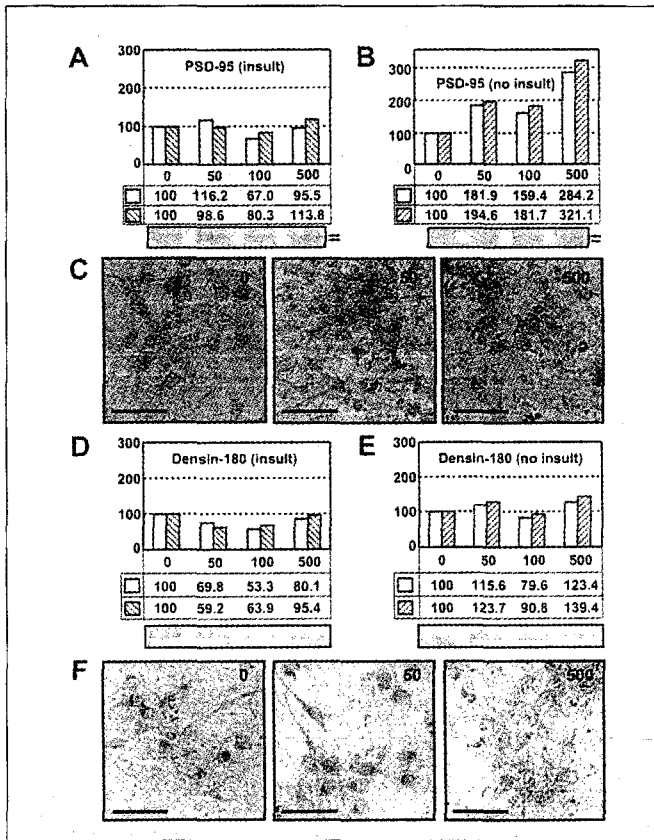


**Fig. 5.** Effects of WC on the protein expression of αCaMKII and PDE2.

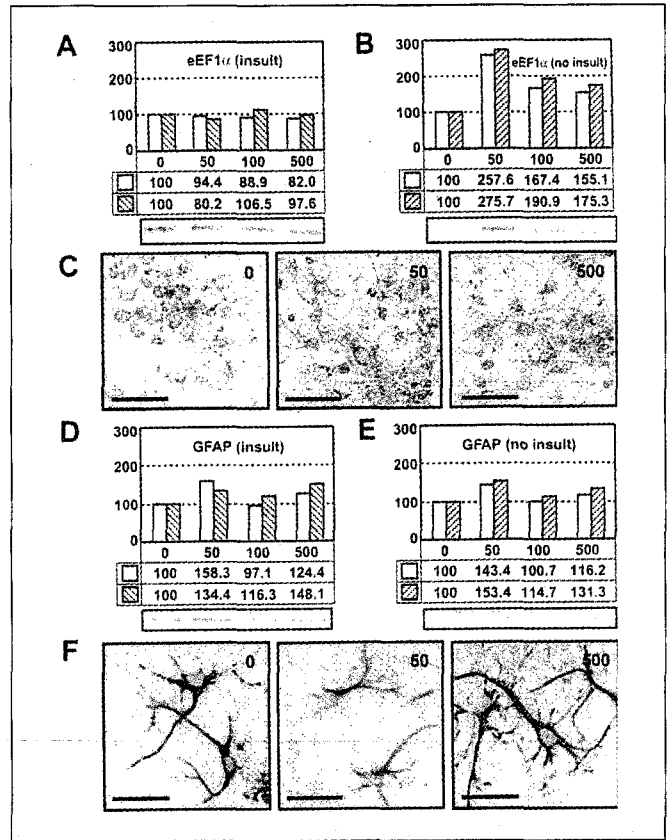
A: αCaMKII immunoblot of the hypoxic sample. B: αCaMKII immunoblot of the normoxic sample. C: immunocytochemistry of the hypoxic neurons with an anti-αCaMKII antibody. D: PDE2 immunoblot of the hypoxic sample. E: PDE2 immunoblot of the normoxic sample. F: immunocytochemistry of the hypoxic neurons with an anti-PDE2 antibody. Empty bar, before compensated with neuronal viability. Filled bar, after compensated with neuronal viability. Bar, 20µm. Numbers, concentration of WC in µg/ml.

### 3. 연접단백질의 표현에 미치는 영향

NR2A와 NR2B 아단위는 정상산소 환경(normoxia)에서 농도의존적으로 표현(expression)이 증가되어 500µg/ml에서 대조군에 비하여 각각 179.2 및



**Fig. 6.** Effects of WC on the protein expression of PSD-95 and densin-180. A: PSD-95 immunoblot of the hypoxic sample. B: PSD-95 immunoblot of the normoxic sample. C: immunocytochemistry of the hypoxic neurons with an anti-PSD-95 antibody. D: Densin-180 immunoblot of the hypoxic sample. E: Densin-180 immunoblot of the normoxic sample. F: immunocytochemistry of the hypoxic neurons with an anti-densin-180 antibody. Empty bar, before compensated with neuronal viability. Filled bar, after compensated with neuronal viability. Bar, 20 µm. Numbers, concentration of WC in µg/ml.



**Fig. 7.** Effects of WC on the protein expression of eEF-1α and GFAP. A: eEF-1α immunoblot of the hypoxic sample. B: eEF-1α immunoblot of the normoxic sample. C: immunocytochemistry of the hypoxic neurons with an eEF-1α antibody. D: GFAP immunoblot of the hypoxic sample. E: GFAP immunoblot of the normoxic sample. F: immunocytochemistry of the hypoxic neurons with an anti-GFAP antibody. Empty bar, before compensated with neuronal viability. Filled bar, after compensated with neuronal viability. Bar, 20 µm. Numbers, concentration of WC in µg/ml.

190.5%의 표현을 나타내었다(Fig. 4B,E). 저산소 환경(hypoxia)에서 NR2A 아단위는 50, 100, 500 µg/ml에서 각각 66.5, 99.0, 99.0%, NR2B 아단위는 각각 100.6, 61.6, 133.2%의 표현을 나타내었다(Fig. 4A,C,D,F).

αCaMKII는 정상산소환경에서 농도의존적으로 증가하여 500 µg/ml에서 208.3%의 표현을 나타내었다(Fig. 5B). 그러나 저산소환경에서는 농도의존적으로 감소하여 500 µg/ml에서는

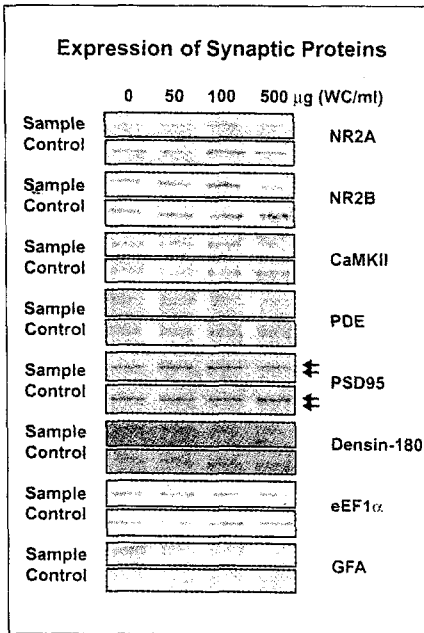
85.4%의 표현을 나타내었다(Fig. 5A). PDE2는 정상산소환경에서 50, 100, 500 µg/ml에서 각각 169.2, 143.7, 140.1%의 증가를 나타내었으며(Fig. 5E), 저산소환경에서는 각각 77.6, 96.6, 102.8%로, 저농도에서 감소하였다가 고농도에서 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5D,F).

PSD-95는 정상산소환경에서 표현이 매우 증가되어 50, 100, 500 µg/ml에서 각각 194.6, 181.7, 321.1%의 증가를

나타내었으나(Fig. 6B), 저산소환경에서는 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 6A,C).

Densin-180은 정상산소환경에서는 50, 500 µg/ml에서 각각 123.7, 139.4%의 증가를 보였으며, 100 µg/ml에서는 90.8%의 표현을 나타내었다(Fig. 6E). 저산소환경에서는 50, 100, 500 µg/ml에서 각각 59.2, 63.9, 95.4%의 표현을 나타내었다(Fig. 6D,F).

eEF-1α는 정상산소환경에서는 50,



**Fig. 8.** A summary of immunoblots with antibodies specific to various synaptic proteins with or without hypoxic insults (Sample and Control, respectively). PSD-95 double bands were marked as arrows. Numbers, concentration of WC in  $\mu\text{g/ml}$ .

100, 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 275.7, 190.9, 175.3%의 증가를 보였으며 (Fig. 7B), 저산소환경에서는 각각 80.2, 106.5, 97.6%로 약간의 감소를 보였다 (Fig. 7A,C).

GFAP는 정상 및 저산소환경에서 모두 증가되었다 (Fig. 7D,E,F).

상기 단백질의 표현을 종합하여 Fig. 8에 나타내었다.

#### IV. 考 察

牛黃清心元은 中風, 中臟腑의 陽閉證에 사용되는 대표적인 處方으로<sup>4</sup> 전체적인 藥性은 涼하고 五臟六腑에 모두 歸經하며, 清熱瀉火, 解毒, 開竅化痰, 養血生津, 補脾胃, 安神 등의 效能이 있다.<sup>11</sup>

牛黃清心元의 主治症으로 <東醫寶鑑

>에서는 “卒中風, 不省人事, 痰涎壅塞, 精神昏愦 語言蹇澀, 口眼喎斜, 手足不隨”라고 하였고, 최근에는 졸중풍 급성기의 의식장애에 주로 응용되고 있으며,<sup>6</sup> 이외에도 허혈성 심장질환,<sup>12</sup> 고열, 경련<sup>13</sup> 등에 사용된다.

牛黃清心元에 대한 실험적 연구로서는 남<sup>11</sup>의 심박동수 저하, 항경련, 진정효과, 고<sup>12</sup>의 심근허혈 유발 후 좌심실압 증가, 홍<sup>7</sup>의 혼수시간 단축, 무산소 부하시 생존시간 증가, 홍 등<sup>14</sup>의 혈관확장작용, 이<sup>15</sup>의 혈압강하효과, 조 등<sup>8</sup>의 뇌부종, 충혈 감소 등이 있으며, 임상연구로서 이 등<sup>16</sup>의 현탁액, 환제 등 제형에 따른 효능 차이 분석, 김 등<sup>6</sup>의 중풍환자의 의식장애 개선효과 등이 있었으나, 저산소증 유발 후 배양신경세포에서의 생존율에 미치는 영향에 대한 연구는 없었다. 이에 저자는 배양한 E18 대뇌피질 신경세포를 이용하여 牛黃清心元의 세포독성과, 저산소증 유발 후 신경세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하였다.

牛黃清心元이 저산소증을 유발한 신경세포의 생존율에 미치는 영향을 보기 위하여 약물의 효능과 독성 검증에 비교적 널리 쓰이고 있는 Brewer 등<sup>10</sup>의 배양법을 변형하여 임신 18일 (embryo 18days: E18) 흰쥐의 대뇌피질신경세포를 B27이 첨가된 Neurobasal 배지에 배양하였다. 먼저 牛黃清心元의 세포독성을 보고자 대뇌피질신경세포를 50, 100, 500, 1,000 및 5,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 牛黃清心元이 첨가된 배지에 7 DIV (days in vitro) 동안 배양하여 위상차현미경으로 신경세포의 형태를 관찰하였다. 그 결과 牛黃清心元 농도에 비례하여 vacuole이 형성된 세포가 증가하였고, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  이상에서는 vacuole의 크기도 증가하였는데, 특히 5,000  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 vacuole의 형성이 심화되어 전체적

인 형태를 분간하기 어려웠다. vacuole의 형성은 신경세포손상의 형태학적 특징으로 17, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 세포독성이 있는 것으로 보인다.

牛黃清心元이 저산소증을 유발한 신경세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 관찰한 결과, 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서의 생존율은 141.5%로 대조군에 비하여 저산소증에 의한 신경세포 사멸을 현저하게 감소시켰고, 100 및 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 대조군과 차이를 보이지 않았지만 牛黃清心元이 첨가되지 않았을 경우보다 생존율이 증가하였는데, 이는 아마도 牛黃清心元 자체의 독성 때문인 것으로 보인다.

저자는 신경세포의 생존율을 높인 기전에 대하여 주변 환경변화에 가장 민감하게 반응하는 신경세포의 신호전달부위인 연접 (synapsis)에 주목하였다. 최근의 보고에 의하면 연접에는 여러 단백질대사 기구들이 존재하고, 이 부위에서 직접 단백질이 합성되기도 하며, 특히 연접 후 세포막 내면 (postsynaptic membrane)에 밀착해 있는 고전자밀도 소기관인 연접 후 치밀질 (postsynaptic densities: PSD)에는 여러 효소, 신경전달물질 수용체, 연접신호전달단백질, 세포접합분자 및 scaffold 단백질 등이 존재하여 환경변화에 따른 대응을 하고, 허혈로 인한 신경세포 사망에도 관여한다.<sup>18,19</sup> 牛黃清心元의 세포사망 방지효과가 이들 연접단백질의 변화와 관련성이 있을 것으로 생각되어 이의 변화를 면역염색법 (immunoblot)을 이용하여 관찰하였다. 면역염색법은 단백질을 전기영동한 후 이에 대한 항체로써 항원-항체 복합체를 형성시킨 다음 발색반응을 거쳐 signal density를 scan함으로써 정량화할 수 있는 방법이다.<sup>20</sup>

NMDA 수용체는 NR1과 NR2 아단

위로 구성되며, 신경세포가 가지 (dendritic spine)에서  $Ca^{2+}$ 에 의한 신호 전달을 가능하게 하는 주요 이온통로를 형성하고<sup>21</sup>, tyrosine kinase나  $\alpha$ CaMK II에 의하여 조절을 받는다.<sup>22</sup> 이중 NR2는 다시 NR2A, NR2B, NR2C, NR2D의 아단위로 나누어지며, 전뇌(whole brain)에서는 NR2A와 NR2B가 주로 발현된다.<sup>23</sup> 정상적으로 NMDA 수용체는 중추신경계의 흥분성 신경전달물질에 의한 특이적 기능 수행에 중추적 역할을 담당하고 있으며, 특히 학습과 기억에 연관된 신경원의 장기적 반응의 항진(long-term potentiation)을 형성하는데 필수적으로 작용한다.<sup>24</sup> 하지만 일시적 허혈 후에는 신경연접의 효율을 극대화하기 위하여 NMDA 수용체가 증가되는데, 이는 신경세포를 지연성 사망에 이르게 하는 가장 중요한 요소의 하나로써 작용한다고 알려져 있다.<sup>25</sup> 이 실험에서 NR2A와 NR2B의 표현(expression) 변화를 관찰한 결과, 牛黃清心元은 정상산소환경에서 농도의존적으로 이들의 표현을 증가시켜 500 $\mu$ g/ml에서 대조군에 비하여 각각 179.2 및 190.5%의 증가를 나타내었는데, 이는 牛黃清心元에 이들의 표현을 증가시키는 성분이 존재함을 시사한다. 그러나 저산소환경에서는 NR2A의 표현이 감소되었으며, 특히 신경세포사망 방지효과가 큰 50 $\mu$ g/ml에서는 현저하게 (66.5%) 감소되었다. 이는 저산소환경에서 과다분비되는 glutamate에 의한 흥분독성을 방지하기 위하여 그 수용체인 NR2A가 감소되는 것으로 보인다. NR2B도 100 $\mu$ g/ml에서 표현이 현저하게(61.6%) 감소되었으며, 이 역시 흥분독성에 대한 대응으로 추측된다. 이러한 결과는 NR2A가 결여된 흰쥐에서 국소 허혈에 의한 손상부위가 감소되고<sup>26</sup>,

NR2B의 특이적 저해제인 eliprodil이 저산소에 의한 신경세포손상을 방지한다는 보고와<sup>27</sup> 일치한다. 최근의 보고에 의하면 연접 후 세포막에서 clathrin에 매개되는 endocytosis가 일어나며<sup>28</sup>, 세포막에 존재하는 수용체는 이 이전에 의하여 숫자가 줄어들고, 전체 수용체의 양도 줄어드는 것으로 추측된다.

$\alpha$ CaMKII와 PDE2의 변화를 보면 牛黃清心元은 정상산소환경에서 농도의존적으로  $\alpha$ CaMKII의 표현을 증가시켜 500 $\mu$ g/ml에서는 대조군에 비하여 208.3%로 증가하였으나, 저산소환경에서는 조금(14.6%) 감소되었다. Morio-ka 등<sup>29</sup>에 의하면 배양한 해마 신경세포에서 과다한 glutamate를 처리하면  $\alpha$ CaMKII의 기능이 55% 감소된다고 하였는데, 牛黃清心元은 저산소환경에서  $\alpha$ CaMKII 표현을 유지시켜 단백질합성을 증가시킴으로써 신경세포 손상방지에 기여하는 것으로 보인다. 한편 牛黃清心元은 정상산소환경에서 PDE2의 표현을 증가시켰으나, 저산소환경에서는 변화가 거의 없었다. PDE2는 cGMP를 불활성화시키는 효소로서<sup>30</sup>, 저산소증에서의 역할에 대하여는 거의 알려진 바가 없다. 그러나 허혈 전처리에 의하여 PDE2의 활성이 증가되는<sup>31</sup> 것으로 보아 저산소증에서 세포사망방지 역할을 하는 것으로 보이며, 牛黃清心元이 이 효소의 표현을 유지시켜 세포사 방지에 기여하는 것으로 추측된다.

PSD-95와 densin-180의 변화에 있어 牛黃清心元은 정상산소환경에서 PSD-95의 표현을 현저하게 증가시켰고, 저산소환경에서는 큰 변화가 없었다. PSD-95는 단백질합성조절제(protein modifier)로서 PDZ domain을 통하여 NMDA 수용체를 포함한 다수의 연접 단백질들과 결합하여 연접신호 전달기

구를 구성한다<sup>32</sup>. 저산소환경에서의 PSD-95 역할에 대해 알려진 바는 거의 없으나, 일시적 허혈 후 PSD-95와 NR2A, NR2B의 결합이 감소되는<sup>33</sup> 것으로 보아 허혈에 의한 연접구조의 변화를 최소화하는 것으로 보인다. densin-180은 뇌에 특이적으로 표현되며 세포 접합분자로 작용하는 것으로 생각되는데<sup>34</sup>, 牛黃清心元은 정상산소환경에서 densin-180의 표현을 조금 증가시켰으나, 저산소환경에서는 저농도(50,100 $\mu$ g/ml)에서는 감소를, 고농도(500 $\mu$ g/ml)에서는 정상수준을 나타내었다. 현재로서는 이러한 현상이 신경세포사 방지에 어떤 역할을 하는지는 알 수 없으나, 연접의 미세구조와 연접전후세포막의 접합에 영향을 미친 것으로 추정된다.

eEF-1 $\alpha$ 의 변화를 보면 牛黃清心元은 정상산소환경에서 이의 표현을 현저하게 증가시켰으며, 저산소환경에서도 eEF-1 $\alpha$ 의 표현을 정상수준으로 유지시켰다. eEF-1 $\alpha$ 는 peptide 합성에서 aminoacyl-tRNA를 ribosome에 결합시키는 역할을 하는 단백질합성의 필수인자로서<sup>35</sup>, F-actin과 결합하여 bundling을 형성하고, microtubule을 절단하는 활성을 갖는 것으로 알려져 있는 등<sup>35</sup> 세포골격을 재구성하는데 조절 역할을 하는 것으로 생각되는데, 뇌허혈 유발 후에는 glutamate 수용체들의 흥분독성에 의하여 eEF-1 $\alpha$ 의 합성이 저해되는 것으로 알려져 있다<sup>36</sup>. 즉, 정상상태에서 일어나고 있던 단백질합성을 저해하고 새로운 단백질을 합성하는 과정으로서<sup>37</sup>, 증가된 eEF-1 $\alpha$ 에 의하여 연접에서 국소적으로 세포사 방지에 필요한 단백질의 합성이 일어남을 시사한다.

GFAP의 변화에 있어 牛黃清心元은 정상 및 저산소환경에서 이의 표현을 증가시켰다. GFAP는 성상교세포의 inter-



mediate filament의 core protein의 특이적 구성물로서,<sup>38</sup> GFAP 표현 증가와 별아교세포(astrocyte) 증식은 허혈과 저산소증에 의한 뇌손상의 특징적인 병리학적 소견이다.<sup>39</sup> 배양 별아교세포에서 무산소 손상(anoxic injury)은 부분적으로 L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels에 의한 것으로 보고되고 있는데,<sup>40</sup> 자세한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않으나 저산소환경에 대한 대응으로 보여진다.

이상의 결과를 종합하면 牛黃清心元은 저산소환경에서 흰쥐의 대뇌피질신경세포 사망을 감소시켰는데 이는 glutamate의 대표적 수용체인 NR2A와 NR2B의 억제에 큰 역할을 한 것으로 보인다. 이외에도 牛黃清心元은 특이적으로 PSD-95, PDE2 등에도 현저한 변화를 가져왔는데 이들이 뇌허혈에 어떠한 영향을 미치는가는 아직 알려져 있지 않으므로, 향후 이들의 변화에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 結 論

牛黃清心元이 저산소증 유발 신경세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양한 E18 대뇌피질신경세포를 이용하여 牛黃清心元의 세포독성, 저산소증 유발 후 세포사망 방지에 미치는 영향 및 여러 효소, 신경전달물질 수용체, 연접단백질의 표현에 미치는 영향을 면역염색법을 이용하여 연구한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. E18 대뇌피질신경세포를 이용하여 牛黃清心元의 세포독성을 조사한 결과 1,000 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서는 세포독성이 있는 것으로 관찰되었다.

2. 牛黃清心元이 저산소증 유발 E18

대뇌피질신경세포의 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과 실험군은 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 141.5%의 생존율을 나타내어 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였고, 100 및 500 $\mu$ g/ml의 농도에서는 별 차이가 없었다.

3. 면역염색적 소견으로는 실험군은 정상산소환경에서 대조군에 비하여 NR2A, NR2B,  $\alpha$ CaMKII, PDE2, PSD-95, eEF-1 $\alpha$ 의 표현이 증가되었으며, 저산소환경에서 NR2A, NR2B의 표현이 감소되었다.

이상에서 牛黃清心元은 저산소증을 유발한 신경세포의 사망을 감소시키는 효과가 있었으며, 연접단백질에 유의한 영향을 미치는 것으로 관찰되었다.

## V. 參考文獻

1. Arai H, Passonneau JV, Lust WD. Energy metabolism in delayed neural death of CA1 neurons of hippocampal following transient ischemia in the gerbil. *Brain Dis.* 1986;1:263-78.
2. 이광우, 정희원. 임상신경학. 서울:고려의학. 1997:393,397,399.
3. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg.* 1992;77(3):337-54.
4. 김영석. 중풍(뇌졸중). 중풍학술대회논문집. 1995:1-56
5. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北: 旋風出版社, 1975:3,25,26
6. 김동용, 오승환, 안일희, 이연정, 이형균, 이승무, 나성수. 의식장애를 동반한 졸중풍 급성기 환자에서 우황청심원 투여에 관한 고찰, 대한한의학회지. 1994; 15(1):203-210
7. 홍석. 우황청심원이 백서의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1993
8. 조태순, 이선미, 이은방, 조성익, 김용기, 신대회, 박대규. 신우황청심원의 뇌허혈

및 중추신경계에 대한 약효. 약학회지. 1998;41(6):817-828

9. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 대성문화사, 1981:171-173
10. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res.* 1993;35(5):567-576
11. 남상경, 이경섭. 우황청심원과 소합향원의 효능에 대한 연구. 경희의학. 1990;19: 220-237
12. 고창남. 우황청심원이 흰쥐의 적출심장에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1997
13. 신재용. 方藥合編解說. 서울: 성보사, 1988:100
14. 홍남두, 김남재, 김규섭. 우황청심원의 순환기계에 미치는 영향. 생약학회지. 1988;18(4):241-248
15. 이영빈. 고혈압에 우황청심원과 Hydralazine, Atenolol, Captopril 및 Furosemide의 병용투여에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1992
16. 이원철, 김영석, 배형섭, 구본홍. 우황청심원의 제형별 임상에 관한 연구. 대한한의학회지. 1990;11(2):102-105
17. Petito CK, Pulsinelli WA. Sequential development of reversible and irreversible neuronal damage following cerebral ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1984;43(2):141-153
18. Sheng M, Wyszynski M. Ion channel targeting in neurons. *Bioessays.* 1997;19(10):847-853
19. Kennedy MB. The postsynaptic density. *Curr Opin Neurobiol.* 1993;3 (5):732-737
20. Cudmore SB, Gurd JW. Postnatal age and protein tyrosine phosphorylation at synapses in the developing rat brain. *J Neurochem.* 1991;57:1240-1248
21. Mizuta I, Katayama M, Watanabe M, Mishina M, Ishii K. Developmental expression of NMDA receptor subunits and the emergence of glutamate neurotoxicity in primary cultures of murine cerebral cortical neurons. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54(7):721-725
22. Omkumar RV, Kiely MJ, Rosenstein AJ, Min KT, Kennedy MB. Identifi-

- fication of a phosphorylation site for calcium/calmodulin dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem.* 1996;271(49):31670-31678
23. 고희신, 김우택. 저산소 상태에서 백서 해마절편 N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) 수용체 아단위 2A(NR2A) 및 2B(NR2B)의 발현에 대한 연구. *소아과.* 1996;39(9):1295-1308
  24. Barrionuove G, Brown T H. Associative long-term potentiation in hippocampal slices. *Prog Natl Acad Sci.* 1983;80;7347-7351
  25. MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. NMDA receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature.* 1986;321:519-522
  26. Morikawa E, Mori H, Kiyama Y, Mishina M, Asano T, Kirino T. Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the epsilon1 (NR2A) subunit of NMDA receptor. *J Neurosci.* 1998;18(23):9727-9732
  27. Reyes M, Reyes A, Opitz T, Kapin MA, Stanton PK. Eliprodil, a non-competitive, NR2B-selective NMDA antagonist, protects pyramidal neurons in hippocampal slices from hypoxic/ischemic damage. *Brain Res.* 1998;782(1-2):212-218
  28. Man YH, Lin JW, Ju WH, Ahmadian G, Liu L, Becker LE, Sheng M, Wang YT. Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron.* 2000;25(3):649-662
  29. Morioka M, Fukunaga K, Nagahiro S, Kurino M, Ushio Y, Miyamoto E. Glutamate-induced loss of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1995;64(5):2132-2139
  30. Butt E, Beltman J, Becker DE, Jensen GS, Rybalkin SD, Jastorff B, Beavo JA. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases with cyclic AMP analogs: topology of the catalytic sites and comparison with other cyclic AMP-binding proteins. *Mol Pharmacol.* 1995;47(2):340-347
  31. Lochner A, Genade S, Tromp E, Opie L, Moolman J, Thomas S, Podzuweit T. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in ischemic preconditioning. *Mol Cell Biochem.* 1998;186(1-2):169-175
  32. Kornau HC, Seeburg PH, Kennedy MB. Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol.* 1997;7(3):368-373
  33. Takagi N, Logan R, Teves L, Wallace MC, Gurd JW. Altered interaction between PSD-95 and the NMDA receptor following transient global ischemia. *J Neurochem.* 2000;74(1):169-178
  34. Apperson, ML, Moon, IS, and Kennedy, MB. Characterization of Densin-180, a New Brain-Specific Synaptic Protein of the O-Sialoglycoprotein Family. *J Neurosci.* 1996;16:6839-6852
  35. Suda M, Fukui M, Sogabe Y, Sato K, Morimatsu A, Arai R, Motegi F, Miyakawa T, Mabuchi I, Hirata D. Overproduction of elongation factor 1 alpha, an essential translational component, causes aberrant cell morphology by affecting the control of growth polarity in fission yeast. *Genes Cells.* 1990;4(9):517-527
  36. Martin P, Nastiuk KL, Daniel N, Girault JA, Czernik AJ, Glowinski J, Nairn AC, Premont J. Glutamate-dependent phosphorylation of elongation factor-2 and inhibition of protein synthesis in neurons. *J Neurosci.* 1997;17(10):3445-3454
  37. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science.* 1994;265:1883-1885
  38. O' Callaghan JP. Assessment of neurotoxicology use of glial fibrillary acidic protein as a biomaker. *Biomed Environ Sci.* 1991;4:197-206
  39. Fortuna S, Pestalozza S, Lorenzini P, Bisso GM, Morelli L, Michalek H. Transient global brain hypoxia-ischemia in adult rats: neuronal damage, glial proliferation, and alterations in inositol phospholipid hydrolysis. *Neurochem Int.* 1997;31(4):563-569
  40. Haun SE, Murphy EJ, Bates CM, Horrocks LA. Extracellular calcium is a mediator of astroglial injury during combined glucose-oxygen deprivation. *Brain Res.* 1992;593:45-50