

원 저

# 牛黃清心元이 중대뇌동맥 결찰로 유발된 뇌허혈에 미치는 영향

조규선, 정승현, 신길조, 이원철  
동국대학교 한의과대학 내과학교실

## The Effects of *Woohwangcheongsim-won* on Reperfusion Following Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats

Gyu-Seon Cho, Seung-Hyun Chung, Gil-Cho Shin, Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

**Objectives :** The purpose of this investigation is to evaluate the effects of *Woohwangcheongsim-won* on reperfusion following MCA occlusion in rats.

**Methods :** To evaluate the effect of *Woohwangcheongsim-won* on reperfusion following MCA occlusion, the volume of cerebral ischemia and edema were measured and the change of the CA1 pyramidal neuron in the hippocampus was investigated by light microscopy. And the changes of several neurotransmitters and enzymes were investigated with the immunohistochemical methods.

**Results :**

1. The volume of the control group, which was ischemic-damaged was 23.6%, and that of the sample group was 13.5%.
2. The voluminal ratio of the right/left hemisphere was 116 in the control group, and that of the sample group was 107.
3. The pyramidal cells of CA1 area in the control group were greatly damaged. The cells were changed into discontinuous and unsystematic forms, and nuclei, and cytoplasm were shrunk. On the other hand, the cells of the sample group were less damaged.
4. On the immunohistochemical methods, the sensitivities of GABA, NOS, DBH in the control group were increased, and those of synapsin and eEF-1 $\alpha$  were decreased as compared with the normal group. NOS and DBH which were negative in the normal group showed positive reaction. On the other hand, the sensitivities of GABA, NOS and DBH in the sample group were decreased, but those of NPY, synapsin, CaMKII and eEF-1 $\alpha$  were increased as compared with the control group.

**Conclusions :** *Woohwangcheongsim-won* reduced the volume of cerebral ischemia and edema, and minimized the damage of pyramidal cells. The mechanism was related to protein synthesis, such as synapsin,  $\alpha$ CaMKII and eEF-1 $\alpha$ , which resist neurotoxicity of glutamate receptors. (*J Korean Oriental Med 2001;22(1):78-89*)

**Key Words:** *Woohwangcheongsim-won*, cerebral ischemia, neuronal cell damage, immunohistochemical methods

## 서론

· 접수 : 2001년 3월 3일 · 채택 : 3월 16일  
· 교신저자 : 조규선, 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2번지  
동국대학교 분당한방병원 6층 의사실  
(Tel. 031-710-3734, Fax. 031-710-3780, E-mail:  
mokkumi@hanmail.net)

뇌허혈 후 신경세포의 손상은 1980년대 초반까지  
는 세포의 항상성을 유지하는 이온펌프와 구성분자

의 이동을 주관하는 에너지 부족으로 인해서 야기되는 것으로 알려져 있었으나, Kirino<sup>1)</sup>가 허혈 수일 후 흰쥐의 해마 CA1 지역에서 발생하는 지연성 신경세포 사망(delayed neuronal death)을 보고하여 신경세포 손상에 다른 기전이 있음을 밝혔다. 1990년대 들어서 분자생물학(molecular biology)과 미량화학(micro-chemistry) 등의 발전은 뇌허혈 후 일어나는 신경전달물질, 효소 및 연결단백질 등의 대사 변화를 알 수 있게 하여 현재 신경세포 손상의 기전을 알아내는데 유용하게 이용되고 있다<sup>2)</sup>. 최근까지의 연구에 의하면 신경세포 손상은 수분에서 수일에 걸쳐 일어나며, 에너지 대사 장애, acidosis, Ca<sup>2+</sup> 항상성의 변화, glutamate 등 흥분성 아미노산, 유리산소기(oxygen free radical), apoptosis, 단백질 합성장애 등의 인자가 복합적으로 작용하는 것으로 보인다<sup>3)</sup>. 이러한 병태생리적 지식을 바탕으로 뇌허혈 급성기에 재관류를 위한 혈전용해와, 신경세포 손상을 감소시킬 수 있는 치료제에 대한 연구가 현재 진행되고 있다.

牛黃清心元은 中風 中臟腑의 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, 淸熱, 開竅, 安神의 효능으로 “諸風, 癱瘓不隨, 語言蹇澀....痰涎壅塞, 精神昏憤” 등을 치료한다. 특히 許浚 등<sup>6)</sup>은 中風 救急藥으로 多用하였으며, 卒中風 급성기의 의식장애 등에 常用되고 있다<sup>8)</sup>.

牛黃清心元의 뇌허혈에 대한 실험적 연구로는 KCN 유발 혼수시간 단축, 저산소환경에서 생존시간 연장효과<sup>9)</sup>, 뇌부종 감소효과<sup>10)</sup> 등이 보고된 바 있으나, 허혈에 의한 신경세포 손상 억제기전에 대해서는 알려진 바가 없었다.

이에 저자는 牛黃清心元이 흰쥐의 뇌허혈에 미치는 영향을 알아보기 위하여 뇌경색의 형태학적 변동과, 광학현미경을 통해 해마 피라미드신경세포의 상해에 대한 방어효과 및 이와 관련된 신경전달물질과 단백질 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

## 실 험

### 1. 재료

#### 1) 동물

동물은 체중 250~350g의 Sprague-Dawley계 흰쥐(대한동물실험센터, 한국)를 대상으로 하였으며, 아무런 처치를 하지 않은 정상군(Normal group) 1마리, 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류시킨 대조군(Control group)과 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류시킨 다음 牛黃清心元을 경구투여한 실험군(Sample group)에 각각 10마리를 사용하였다. 마취 중 발생하는 저체온증을 예방하기 위하여 자동으로 조절되는 보온판을 이용하여 37℃로 체온을 유지시켰다.

#### 2) 약제

실험에 사용된 牛黃清心元은 東醫寶鑑<sup>11)</sup>에 準하였고, 處方 구성과 함량은 다음과 같다(Table 1).

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

### 2. 방법

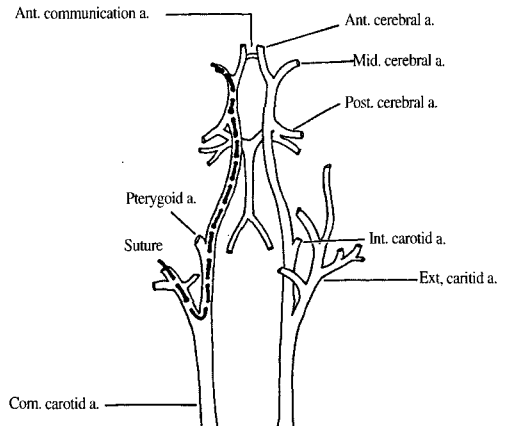
#### 1) 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류 유발

국소적 뇌허혈 유발은 Longa 등<sup>14)</sup>이 언급한 방법을 변형하여 오른쪽 중간뇌동맥(middle cerebral artery: MCA)을 결찰하였다. 즉, 목의 정중선을 절개하여 오른쪽 바깥목동맥(external carotid artery: ECA)을 분리시키고 두개강 바깥에 위치하는 속목동맥(internal carotid artery: ICA)의 유일한 분지인 날개구개동맥(ptyerygoid artery: PPA)을 분리시켰다. PPA의 시작부위를 미세혈관클립으로 결찰하여 혈관 속의 실이 PPA 속으로 들어가지 않게 하였다. 그 다음 ECA의 가지들을 전기인두로 소작시키고, 온목동맥(common carotid artery: CCA)의 기시부위에서 1cm 정도 원위부위를 묶고 절단하였다. 6-0 silk 봉합사로 ECA의 기시부위를 느슨하게 묶고 미세혈관클립을 일시적으로 ECA stump에 위치시킨 다음 ECA의 기시부위를 미세가위를 이용하여 구멍을 내고 한 가닥의 20mm 3-0 nylon 실을 ECA의 기시부로 밀어 넣었다. 혈관 속으로 들어가는 실의 끝 부분은 미세한 sandpaper로 갈

**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> (神麩炒)	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 Liriope</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 Armeniaca</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

아 등글게 하였다. ECA 기시부와 실 사이는 출혈을 방지하기 위하여 6-0 silk 봉합사를 이용하여 3-0 nylon 실을 포함한 ECA를 가볍게 묶은 다음 미세혈관클립을 제거하고 nylon 실을 부드럽게 ICA 속으로 밀어 넣었다. nylon 실이 약 17.5mm 정도 들어가면 faint resistance가 느껴지는데 이로 인해 실의 끝 부분이 두개강 내의 ICA 분지부와 MCA의 기시부위에 도달했음을 알 수 있었다. 이 방법으로 ICA로부터 오는 혈액의 흐름인 앞대뇌동맥(anterior cerebral artery: ACA)과 MCA로 가는 뒤대뇌동맥(posterior cerebral artery: PCA)이 차단된다. 그 후 1시간 동안 MCA를 폐쇄하여 혈액공급을 차단하였으며, 재관류 후 ECA의 기시부를 6-0 silk 봉합사로 묶고 절개된 피부를 봉합하였다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Diagram of cerebrovascular anatomy in rats illustrates extracranial and intracranial vascular relations exploited in this method of reversible occlusion of middle cerebral artery.

2) 牛黃淸心元 투여

대조군은 보통의 조건하에서 3일과 7일 동안 생존시켰다가 희생시켰으며, 실험군은 牛黃淸心元 1丸을 증류수 100ml에 녹여 만든 현탁액을 매일 2회, 1.65 ml/kg씩 3일과 7일 동안 투여한 후 희생시켰다.

3) TTC 염색

뇌허혈 유발 3일 후 실험동물을 단두하여 희생시킨 다음 뇌를 적출하였고, 두께 2mm의 뇌절편을 제작하여 이 절편들을 1% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride(Tetrazolium Red: TTC) 용액에 넣어 염색하였다.

4) 뇌경색 및 뇌부종 부피 측정

뇌경색의 부피는 TTC로 염색한 각각의 절편 사진을 찍어 뇌경색의 부위를 표시하였다. 표시된 부위를 따라서 image analysis system(Optima 5.0, USA)을 이용하여 경색의 면적을 구하고 절편의 두께(2mm)를 곱하여 각 절편의 뇌경색의 부피를 얻은 다음, 이를 합하여 전체 뇌경색의 부피를 구하였다. 전체 뇌의 부피는 각 절편의 절단면 면적을 구하고 절편의 두께를 곱한 후 이를 합하였다. 뇌부피에 대한 뇌경색 부피의 비율은 전체 뇌경색의 부피를 전체 뇌부피로 나눈 후 100을 곱하여 백분율로 표시하였다. 뇌부종은 정상측과 허혈측의 대뇌반구 부피를 위와 같은 방법으로 측정하여 정상측 반구에 대한 허혈측 반구의 비율을 구하고, 이를 뇌부종의 지표로 하였다.

5) 광학현미경용 표본제작

신선한 뇌조직 표본을 얻기 위하여 심장관류고정(cardiac perfusion fixation)을 실시하였다. 즉, 대조군은 뇌허혈 유발 3일과 7일 후, 실험군은 뇌허혈 유발 3일 후 복강으로 sodium pentobarbital(40mg/kg)을 주사하여 마취시킨 다음, 전흉벽을 열어 좌심실에서 대동맥 쪽으로 catheter를 삽입하고 생리식염수 30ml를 주입하면서 우심방의 심방귀 부분을 열어 혈관내의 혈액을 제거하였다. 그리고 10% neutral buffered formalin(pH 7.4, 4℃) 500ml로 관류고정한 다음 뇌를 적출하고, 다시 동일 고정액으로 24시간 동안 후고정하였다. 후고정 후에는 tap water에서 충분히 세척하고, 통상적인 방법으로 탈수과정을 거친 후 paraffin

으로 포매하였으며, 조직절편기(Microtome, American Optical Company, USA)를 이용하여 제작된 연속 조직절편에서 30µm마다 한 장씩 5µm두께의 조직을 취하여 gelatin을 입힌 slide glass에 얹어 신전기(slide warmer)에서 2~4시간 동안 건조시킨 후 염색에 이용하였다.

6) 면역조직화학용 표본제작

뇌허혈 유발 3일과 7일 후 실험동물을 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline(PBS)으로 심장관류고정한 다음 뇌를 적출하고, 동일 고정액으로 12시간 동안 후고정하였다. 동결로 인한 파괴방지(cryoprotection)를 위하여 이 조직을 다시 20% sucrose를 포함하는 0.1M phosphate buffer(PB) 용액에 24시간 동안 넣어 조직이 가라앉은 후 Tissue-Tek O.C.T. compound(Sakura Finetek, USA)로 포매하고 CO<sub>2</sub> gas로 급속냉동시킨 후, 동결절편기(cryostat)를 이용하여 두께 30µm의 절편을 얻어 0.02M PBS 용액에 모았다.

면역조직화학법은 부유법(floating method)을 사용하였다. 먼저 동결절편한 조직을 0.1M PB 용액으로 세척하고, 다시 0.02M PBS 용액으로 15분간씩 3회 세척하여 동결조직내에 함유된 O.C.T. compound 성분을 제거하였다. 그리고 단백질에 의한 비특이적 면역반응을 막기 위하여 10% normal goat serum(NGS)으로 4℃에서 1시간 동안 전처리하고, 1차 항체를 1% NGS와 1% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 PBS 용액에 적당한 배율로 희석하여 4℃에서 48시간 반응시킨 후, PBS 용액으로 15분간씩 3회 세척하였다. 이어서 2차 항체로써 biotinylated goat-anti rabbit immunoglobulin G를 PBS 용액에 1:500으로 희석하여 4℃에서 24시간 반응시킨 후, PBS 용액으로 15분간씩 3회 세척하였다. 그 후 조직을 사용 30분전에 만들어 놓은 ABC(avidin-biotin peroxidase complex, A: 10µl, B: 10µl in 1ml PBS) 용액에 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS와 0.05M Tris-HCl buffer(TB, pH 7.4) 용액으로 각각 15분간씩 3회 세척하였다. 이어서 TB 용액에 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)가 혼합된 기질용액에 실온

에서 30분간 둔 뒤, 다시 TB 용액에 DAB 및 0.03% hydrogen peroxide가 혼합된 기질용액에 5~10분간 두어 발색시킨 후, TB와 PBS 용액으로 세척하고 봉입하여 검경하였다.

실험에 사용한 1차 항체의 희석 비율과 Sources는 다음과 같다(Table 2).

7) 결과분석

실험 결과의 통계와 유의성 검정은 Sigma Plot Program 4.0(Sigma, USA)에 의하여 처리하였다 (P<0.05).

결 과

1. TTC 염색조건

정상군에서는 뇌의 단면 전체가 TTC에 의해 붉게 염색이 되어 뇌세포가 정상임을 알 수 있었다. 대조군에서는 TTC에 의해 염색이 되지 않아 신경세포가 괴사된 것으로 추정되는 부위가 중대뇌동맥이 혈액을 공급하는 caudoputamen의 전체 혹은 대부분으로

나타났고, 이곳을 중심으로 대뇌의 신피질(neocortex)의 많은 부분에서도 나타났으며, 심하게 탈색되어 붉은 빛을 찾아볼 수 없었다. 실험군에서는 대조군에 비하여 범위가 훨씬 줄어들어 신피질과 caudoputamen의 일부에서 상해소견을 나타내었으며, 탈색정도 도 대조군에 비하여 심하지 않았다(Fig. 2).

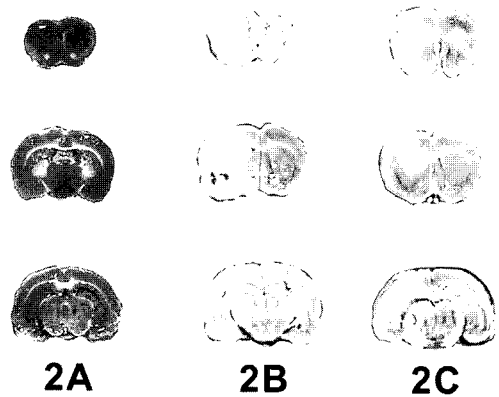


Fig. 2. Coronal section of brain slice. In normal group(2A), brain structures reacted with TTC, so they were well-stained as red in the both hemispheres. In control group(2B), a large part of the right cerebral cortex was infarcted. The damaged brain structures didn't react with TTC and revealed as unstained white area in the right hemisphere. As a result of tissue swelling, the area of the damaged hemisphere was larger than that of the contralateral hemisphere and the midline of both hemispheres was protruded to the left. But in sample group(2C), unstained white area was reduced.

Table 2. Details of the Antisera

Antibody	Host	Dilution	Sources
GABA	Rabbit	1 : 10,000	DiaSorin
NPY	Rabbit	1 : 1,000	Incstar
nNOS	Rabbit	1 : 8,000	DiaSorin
DBH	Rabbit	1 : 500	Eugen Tech
synapsin	Rabbit	1 : 5,000	자체제작*
αCaMKII	Rabbit	1 : 5,000	자체제작
eEF-1α	Rabbit	1 : 5,000	자체제작
PDE2	Rabbit	1 : 5,000	DiaSorin
c-fos	Rabbit	1 : 4,000	DiaSorin
PSD-95	Rabbit	1 : 5,000	자체제작
NR2A	Rabbit	1 : 5,000	자체제작
NR2B	Rabbit	1 : 5,000	자체제작

GABA: gamma amino butyric acid  
 NPY: neuropeptide Y  
 nNOS: neuronal nitric oxide synthase C-terminal  
 DBH: dopamine beta hydroxylase  
 αCaMKII: α-isoform of type II Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase  
 eEF-1α: eukaryotic translation elongation factor-1α  
 PDE2: type II phosphodiesterase  
 PSD-95: postsynaptic density-95  
 NR2A: N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2A  
 NR2B: N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B  
 \* 자체제작한 antiserum은 동국대학교 의과대학 문일수 교수로부터 제공받았다.

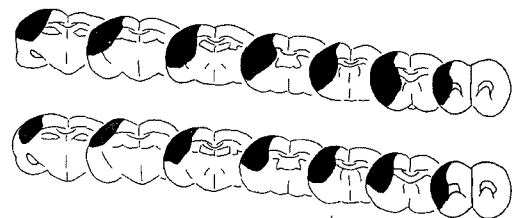


Fig. 3. Schematic diagram of rat cerebral infarct area in the reperfusion following 1 hour MCA occlusion. Animals were sacrificed in 3 days after ischemia. 3A: MCA occlusion elicited rats. 3B: MCA occlusion elicited rats with Uhwangcheongsim-won treatment.

**Table 3.** Cerebral Infarct/Total Volumes(mm<sup>3</sup>) of Rats Following the MCA Occlusion

Treatment	Infarct volume	Total volume	Infarct percentage(%)
Normal	0	821	0
Control	200±14 <sup>a)</sup>	847±10	23.6
Sample	112±10	830±8	13.5*

a) Mean ± Standard Error  
 Normal: Normal rat(n=1)  
 Control: MCA occlusion elicited rats(n=3)  
 Sample: MCA occlusion elicited rats with *Uhwangcheongsim-won* treatment(n=3)  
 \* P<0.05 compared with control group

**Table 4.** Cerebral Edema of Rats Following the MCA Occlusion

Treatment	Rt. hemisphere volume	Lt. hemisphere volume	Rt/Lt ratio (%)
Normal	411	411	100
Control	456±12 <sup>a)</sup>	392±13	116
Sample	431±10	402±6	107*

a) Mean ± Standard Error  
 Normal: Normal rat(n=1)  
 Control: MCA occlusion elicited rats(n=3)  
 Sample: MCA occlusion elicited rats with *Uhwangcheongsim-won* treatment(n=3)  
 \* P<0.05 compared with control group

**Table 5.** Antibody Binding Patterns in CA1 Area of Hippocampus

	Normal	Control	Sample
GABA	+	++	+
NPY	+	+/-	+
nNOS	-	+	+/-
DBH	-	++	+
synapsin	++	+	++
αCaMKII	+	-	+/-
eEF-1α	+++	+	++
PDE2	+/-	+/-	+/-
c-fos	-	-	-
PSD-95	-	-	-
NR2A	-	-	-
NR2B	-	-	-

- : negative  
 +/- : very weak positive  
 + : weak positive  
 ++ : moderate positive+++ : strong positive

2. 뇌경색의 부피 변화

대조군에서는 약 23.6%의 상해부위를 관찰할 수 있었고, 실험군에서는 약 13.5%의 상해부위를 관찰할 수 있었다(Table 3).

3. 뇌부종의 부피 변화

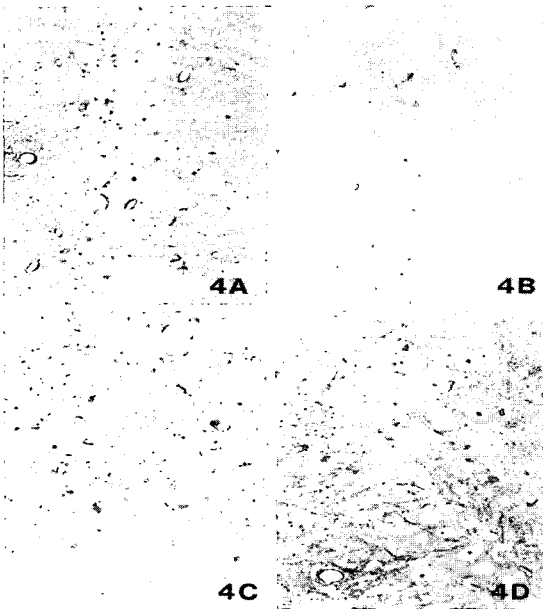
대조군의 허혈측 대뇌반구의 부피는 정상측보다 약 16% 정도 커졌고, 이로 인하여 오른쪽 대뇌반구가 왼쪽으로 치우쳐져 나타났다. 실험군의 허혈측 대뇌반구의 부피는 정상측보다 약 7% 정도 커진 것으로 나타났다(Table 4).

4. 광학현미경적 소견

정상군의 흰쥐 해마의 CA1 지역을 1μm 두께로 semithin section하여 toluidine blue로 염색한 결과 다극성 신경세포층을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A). 신경세포층은 3~5층의 피라미드신경세포가 연속적으로 배열되어 있었으며, 이들 세포들은 크고 둥글며 밝게 염색되는 핵과, 진하고 분명하게 염색되는 핵인을 가지고 있었다. 그리고 상대적으로 짙게 염색되는 세포질과 많은 돌기를 가지고 있었으며, 이 돌기들은 주로 치구(dentate gyrus) 부위로 가지를 뻗고 있었다.

허혈유발 3일 후 대조군에서는 허혈측 해마의 CA1 지역에서 피라미드신경세포 수가 많이 줄어 있었으며, 세포층도 정상군에 비하여 불연속적이었다. 이들 세포의 일부에서는 전체적으로 어둡게 염색되고, 핵과 세포질이 위축되어 나타났으며, 다른 세포에서는 핵과 세포질이 부풀어있는 등 선택적 괴사의 형태를 나타내었다(Fig. 4B). 허혈유발 7일 후에는 대부분의 세포가 괴사되어 정상적인 피라미드신경세포를 거의 찾아볼 수 없었다(Fig. 4C).

허혈유발 3일 후 실험군에서는 허혈측 해마의 CA1 지역 피라미드신경세포 수가 대조군에 비하여 늘어났고, 세포층도 정상군에는 미치지 못하지만 대조군보다 규칙적으로 배열되어 나타났다. 그러나 핵이 응축되거나 세포질이 팽창된 세포가 피라미드층을 비롯하여 전층에서 많이 발견되었다(Fig. 4D).

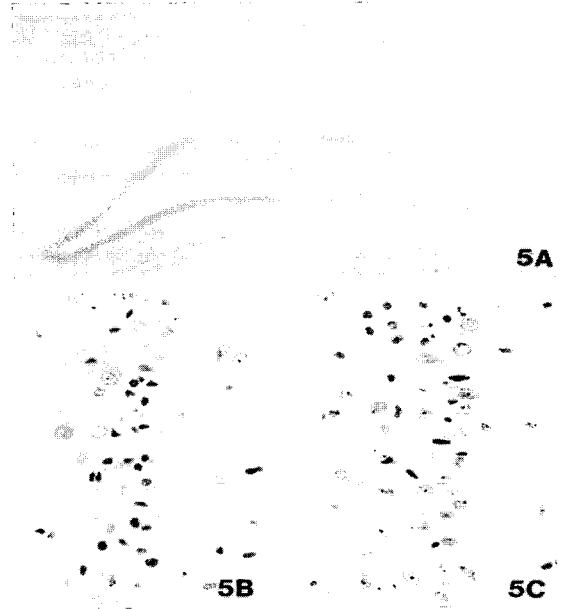


**Fig. 4.** Semithin stain of hippocampal CA1 area. A: normal group, B: control group(3 days after MCA occlusion), C: control group(7 days after MCA occlusion), D: sample group(3 days after MCA occlusion with *Uhwangcheongsim-won*: WC). toluidine blue stain.  $\times 200$ .

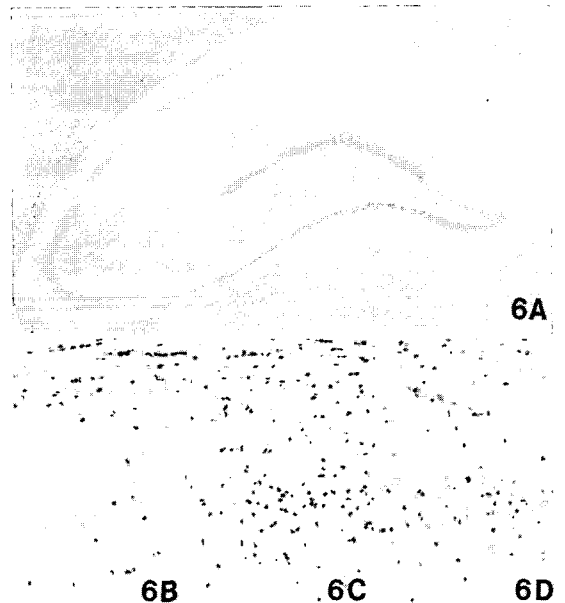
5. 면역조직화학적 소견

정상군에서 GABA, NPY,  $\alpha$ CaMKII는 양성반응을 나타내었으며, synapsin, eEF-1 $\alpha$ 는 강한 양성반응을, PDE2는 약한 양성반응을 나타내었다. 양성반응은 주로 피라미드신경세포의 세포체에서 관찰되었으며, 일부는 세포막을 중심으로 세포 주변부위에서 양성반응을 나타내었다. PDE2의 경우 해마에서 아주 약한 염색소견을 보였으나 피질부위에서 전반적으로 강한 양성반응을 나타내었다.

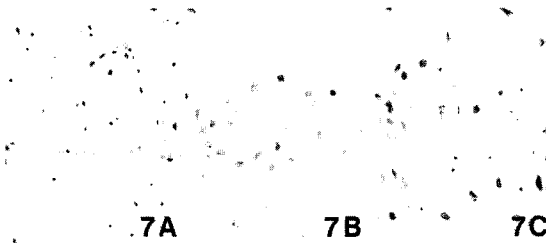
대조군에서 NOS, synapsin, eEF-1 $\alpha$ 는 양성반응을 나타내었고, GABA, DBH는 강한 양성반응을, NPY, PDE2는 약한 양성반응을 나타내었다. 이들 중 GABA는 정상군에 비하여 반응성이 증가되었고, synapsin, eEF-1 $\alpha$ 는 반응성이 감소되었으며, 정상군에서 음성반응을 나타내던 NOS, DBH는 양성반응을 나타내었다. 이들의 반응양상은 정상군과 거의 같았으나, 그 반응성은 항체에 따라 여러 가지로 변화되



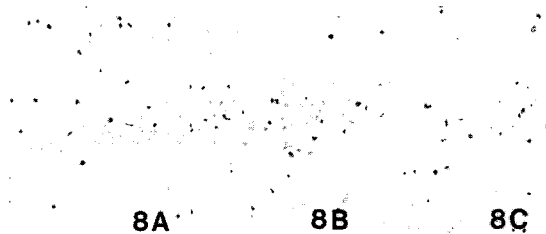
**Fig. 5.** Immunocytochemical staining for synapsin in hippocampus. A: normal group  $\times 40$ , B: 3 days after MCA occlusion  $\times 400$ , C: 3 days after MCA occlusion with WC.  $\times 400$ .



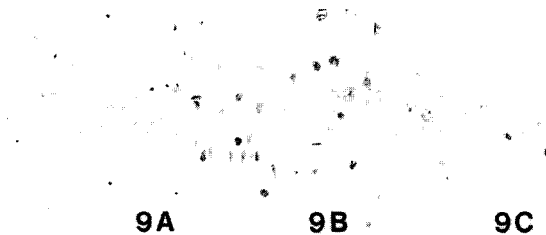
**Fig. 6.** Immunocytochemical staining for PDE2 in hippocampus. A: normal group  $\times 40$ , B: normal group  $\times 200$ , C: 7 days after MCA occlusion  $\times 200$ , D: 7 days after MCA occlusion with WC.  $\times 200$ .



**Fig. 7.** Immunocytochemical staining for PSD-95 in hippocampus. A: normal group  $\times 200$ , B: 7 days after MCA occlusion  $\times 400$ , C: 7 days after MCA occlusion with WC.  $\times 400$ .



**Fig. 8.** Immunocytochemical staining for NOS in hippocampus. A: normal group  $\times 200$ , B: 7 days after MCA occlusion  $\times 200$ , C: 7 days after MCA occlusion with WC.  $\times 200$ .



**Fig. 9.** Immunocytochemical staining for eEF-1 $\alpha$  in hippocampus. A: normal group  $\times 200$ , B: 7 days after MCA occlusion  $\times 400$ , C: 7 days after MCA occlusion with WC.  $\times 400$ .

어 나타났는데, 많은 피라미드신경세포가 상해소견을 보이면서 없어지는 상태에서 약한 반응들을 관찰할 수 있었다.

실험군에서 GABA, NPY, DBH는 양성반응을 나타내었고, synapsin, eEF-1 $\alpha$ 는 강한 양성반응을, NOS, CaMKII, PDE2는 약한 양성반응을 나타내었다. 이들 중 GABA, DBH, NOS는 대조군에 비하여 반응성이 감소되었으며, NPY, synapsin,  $\alpha$ CaMKII, eEF-1 $\alpha$ 은 반

응성이 증가하였는데, 주로 세포질을 중심으로 하여 양성반응을 나타내었으며, 세포막 주변부위까지 양성반응이 퍼져서 나타나는 경우도 관찰할 수 있었다 (Table 5, Fig. 4-9).

## 고 찰

牛黃清心元은 中風 中臟腑의 陽閉證에 사용되는 대표적인 處方으로<sup>4)</sup>, 陳師文<sup>5)</sup>의 <太平惠民和劑局方>에 처음 수록되었으며, 牛黃清心元의 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>12)</sup>. 牛黃清心元의 主治症으로 <東醫寶鑑><sup>6)</sup>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, 졸중풍 급성기 의식장애에 주로 응용되고 있으며<sup>8)</sup>, 이외에도 허혈성 심장질환<sup>13)</sup>, 고열, 경련<sup>14)</sup> 등에 사용할 수 있다. 牛黃清心元에 대한 실험적 연구로서는 고<sup>15)</sup>의 평활근 이완효과, 남 등<sup>12)</sup>의 심박동수 저하, 진통, 진정, 항경련, 수면 시간 연장효과, 홍<sup>9)</sup>의 KCN으로 유발된 혼수시간 단축, 무산소 부하시 생존시간 증가, 홍 등<sup>16)</sup>의 혈관확장작용, 이노작용, 고<sup>13)</sup>의 적출심장의 관류장치 하에서 심근 허혈 유발 후 좌심실압 증가 및 이완기 심근 능력 증가, 백<sup>17)</sup>의 흰쥐에서 학습능력 증가, 이<sup>18)</sup>의 고혈압에 양방 고혈압 치료제와 병용투여시 단독투여군보다 혈압강하효과 증가, 조 등<sup>10)</sup>의 뇌부종, 총혈 감소, 문<sup>19)</sup>의 NOS 유전자 발현 촉진, VCAM-1 유전자 발현 억제, 세포분열주기 억제효과 등이 있으며, 임상연구로서 이 등<sup>20)</sup>의 현탁액, 환제 등 제형에 따른 효능 차이 분석, 김 등<sup>8)</sup>의 중풍환자의 의식장애 개선 효과 등이 있었으나, 뇌허혈 유발 후 신경세포 손상에 미치는 영향에 대해 신경전달물질과 단백질 등을 관찰한 연구는 없었다. 뇌허혈은 뇌조직이 그 기능을 유지할 수 없을 정도로 혈류량이 감소된 상태로 정의된다<sup>3)</sup>. 뇌허혈 후 신경세포 손상기전은 시기에 따라 두 가지로 나누어 볼 수 있는데, 초기 신경세포 손상은 혈류 제한을 받은 조직의 산소와 포도당 고갈에 따른 에너지 대사 이상, 세포막 투과성 변화에 따



른  $Ca^{2+}$  등 양이온의 대량 유입, acidosis, 세포 부종, 단백질 변성 및 신경연접부위의 glutamate 축적 등에 의해 이루어지며, 세포는 결국 괴사하게 된다<sup>21)</sup>. 후기 신경세포 손상은 일시적 허혈 3~4일 후 해마의 CA1 지역, 기저핵 등의 부위에서 일어나는 지연성 신경세포 괴사(delayed neuronal death)으로서<sup>22)</sup>, glutamate의 흥분독성(excitotoxicity), 단백질 합성장애, 열충격 단백질(heat shock protein) 유전자 발현장애, 유리산소기 및 apoptosis 등이 관계되는 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>.

한편, 뇌허혈 급성기에 발생하는 뇌부종은 허혈 수분 후 세포막의 energy-dependent ion pump의 기능소실로 세포외 공간(extracellular space)으로부터 이온과 수분 등이 세포내 공간(intracellular space)으로 과도하게 유입되는 초기 과정과, 수시간에서 수일 후 혈액-뇌장벽(blood-brain barrier)의 파괴가 시작되면서 모세혈관 투과성이 변화되어 혈액 내의 수분과 거대분자들이 세포외 공간으로 물리적으로 확산되어 발생하는 후기 과정으로 나뉘며<sup>24)</sup>, 부종 범위가 확대될 경우 허혈 주변부(ischemic penumbra)에서도 혈류장애를 초래할 수 있으므로, 이의 파급을 막는 것은 매우 중요하다. 이에 저자는 牛黃清心元이 뇌허혈에 미치는 영향을 보고자 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류시킨 동물표본을 이용하여 허혈유발 후 뇌경색의 부피와 뇌부종 등 형태학적 변동과, 해마 피라미드신경세포의 지연성 신경세포 상해에 대한 방어 효과를 관찰하였다. 실험에 사용된 牛黃清心元은 東醫寶鑑<sup>6)</sup>에 準하여 處方을 구성하였으며, 중금속을 함유한 鑛物性 약재인 朱砂와 石雄黃을 제거한 후 사용하였다. 먼저 牛黃清心元이 뇌허혈에 미치는 영향을 보기 위하여 Longa 등<sup>11)</sup>의 방법을 변형하여 흰쥐에 뇌허혈을 유발한 다음 TTC로 염색하였다. TTC 염색 결과 허혈유발군인 대조군에서는 caudoputamen의 대부분과 이곳을 중심으로 신피질(neocortex)의 많은 부분이 염색이 되지 않아 백색으로 나타났으며, 실험군에서는 신피질 일부와 caudoputamen의 일부에서만 상해소견을 나타내는 등 대조군에 비하여 범위가 많이 줄어들었고, 상해부위의 탈색정도도

심하지 않았다. 뇌경색의 부피를 측정된 결과 대조군에서는 대뇌반구의 약 23.6%를 점유하고 있었으나, 실험군에서는 약 13.5%로 감소되어 유의성 있는 감소효과를 나타내었다. 뇌허혈로 인한 뇌부종을 양측 대뇌반구를 비교하여 관찰한 결과, 대조군의 허혈측 대뇌반구는 정상측보다 약 16% 정도 부피가 커졌고, 실험군에서는 정상측보다 약 7% 정도만 커져 유의성 있는 감소효과를 나타내었다. 이는 牛黃清心元 투여로 치명적 손상을 받은 허혈 중심부와 정상 관류가 이루어지는 조직 사이에 존재하는 허혈 주변부의 상당 부분이 구제된 것으로 추정할 수 있다.

그리고 牛黃清心元이 해마 CA1 지역의 피라미드 신경세포 손상에 미치는 영향을 광학현미경을 통하여 관찰한 결과, 3일 경과 후의 대조군에서는 신경세포 수가 많이 줄고, 세포층도 불연속적이며 일부 세포는 핵과 세포질의 위축 혹은 종창 등 선택적 괴사의 형태를 나타내었고, 7일 경과 후에는 거의 모든 세포가 괴사된 것을 관찰할 수 있었다. 실험군에서는 대조군에 비하여 세포 수가 늘고 세포층도 더 규칙적으로 배열되어 있음을 관찰할 수 있었으며, 이는 牛黃清心元이 해마 CA1 지역의 신경세포 괴사방지에 효과가 있는 것으로 추정된다.

한편, 최근에는 분자생물학(molecular biology), 미량화학(microchemistry) 등의 발전과 단백질 순수분리 기법의 발달에 따라 뇌허혈 후 일어나는 신경전달물질과 그 수용체, 효소 및 연접단백질 등의 대사 변화를 알 수 있게 되었다<sup>25)</sup>. 본 연구에서는 牛黃清心元의 신경세포 괴사방지에 대하여 면역조직화학법(immunohistochemical method)을 이용하여 GABA, NPY, synapsin 등 신경전달물질과 그 과정에 관여하는 단백질의 변화를 관찰해 보았다. 면역조직화학법은 신경전달물질 등에 대한 항체를 만들어 항원-항체 복합체를 형성시킨 후 발색반응을 거쳐 광학현미경 등으로 관찰함으로써 이들 물질의 위치와 반응성을 알기 위한 기법으로<sup>25)</sup>, 이 실험에서는 항원-항체 복합체에 대한 2차 항체를 이용하여 반응성을 증폭시켜 관찰하였다.

실험 결과 대조군에서는 정상군에 비하여 GABA

의 반응성이 증가되었고, synapsin, eEF-1 $\alpha$ 의 반응성은 감소되었으며, 정상군에서 음성반응을 나타내던 NOS와 DBH는 양성반응을 나타내었다.

GABA는 자연단백질 성분인 L-glutamic acid가 GAD(glutamate decarboxylase)의 작용을 받아 생성되며, 뇌허혈 후 glutamate의 방출과 동시에 유출되어 Cl<sup>-</sup>의 투과성 증가, K<sup>+</sup>의 전도 증가 및 Ca<sup>2+</sup> 전도 감소로써 neuronal death를 야기하는 과흥분성에 대하여 신경세포의 항상성을 지켜주는 역할을 한다<sup>27)</sup>. Synapsin은 phosphoprotein으로서  $\alpha$ CaMKII에 의하여 인산화되며, synaptic vesicle을 actin으로부터 자유롭게 만들어 세포 형질막의 활성화 부위로 이동할 수 있게 해준다<sup>27)</sup>. Moretto 등<sup>28)</sup>은 배양신경세포에서 저산소증 유발 21시간 후 synapsin의 인산화를 관찰하였으며 이 기전이 저산소에 의해 유발된 세포 괴사에 관계된 것으로 추정하였다. eEF-1 $\alpha$ 는 peptide 합성에서 aminoacyl-tRNA를 ribosome에 결합시키는 역할을 하는 단백질합성의 필수인자로서<sup>29)</sup>, F-actin과 결합하여 bundling을 형성하고, microtubule을 절단하는 활성을 갖는 것으로 알려져 있는 등<sup>30)</sup> 세포골격을 재구성하는데 조절 역할을 하는 것으로 사료되는데, 뇌허혈 유발 후에는 glutamate 수용체들의 흥분독성에 의하여 eEF-1 $\alpha$ 의 합성이 저해되는 것으로 알려져 있다<sup>31)</sup>. NOS는 신경 NOS, 상피 NOS, 대식세포 NOS 등 세 가지 isoform이 있으며, 이들 중 신경 NOS는 glutamate 수용체가 자극 받으면 Ca<sup>2+</sup>이 세포 내로 들어가 calmodulin과 결합하여 활성화되어 NO가 합성된다<sup>32)</sup>. 신경계통에서 NO는 신호전달물질 및 신경조절물질로서의 작용이 있으며, 허혈 후 재관류 과정에서 과도하게 생성되면 신경독성을 나타낸다<sup>33)</sup>. DBH는 dopamine을 가수분해시켜 noradrenaline으로 전파시키는 역할을 하며, noradrenaline 저장소포와 같이 발견된다<sup>34)</sup>.

이 실험에서 synapsin, eEF-1 $\alpha$ 의 반응성 감소는 피라미드신경세포 수의 현저한 감소와, glutamate의 과도한 흥분독성으로 인한 단백질합성 저해 때문으로 추정할 수 있으며, NOS의 증가는 허혈 후 NO가 과도하게 합성되어 신경독성물질로서 작용하였기 때문

으로 추측된다.

실험군에서는 GABA, DBH, NOS는 대조군에 비하여 반응성이 감소되었고, NPY, synapsin,  $\alpha$ CaMKII, eEF-1 $\alpha$  등은 반응성이 증가하였다.

NPY는 LDH, ACTH, vasopressin 등의 혈중량 조절 및 시상하부의 정중용기에 고농도로 존재하는 점<sup>35)</sup>으로 보아 신경내분비학적 기능을 갖고 있을 것으로 추측되며, Mizushima 등<sup>36)</sup>은 허혈 부위에서의 감소된 양상을, Allen 등<sup>37)</sup>은 허혈 주변부에서의 증가된 양상을 보고하였다.  $\alpha$ CaMKII는 NMDA 수용체를 통하여 유입된 Ca<sup>2+</sup>에 의하여 활성화되는 효소로서, 연결 후 신호전달기구의 조절에 가장 중요한 단백질로 생각되고 있으며<sup>34)</sup>, 이 효소의  $\alpha$ -isoform은 전체 PSD (postsynaptic density) 단백질의 20-30%를 차지하고 있다<sup>38)</sup>.  $\alpha$ CaMKII의 감소는 대뇌 허혈에서 보고된 바가 있고<sup>39)</sup>, 이 효소가 결여된 흰쥐에서 경색의 크기가 증가하는 것으로 보아<sup>40)</sup>, 허혈에 의한 세포손상 방지에 필수적인 것으로 보인다.

이 실험에서 eEF-1 $\alpha$ 의 반응성 증가는 신경세포의 연결에서 국소적으로 세포사 방지에 필요한 단백질합성이 일어남을 시사하고, synapsin,  $\alpha$ CaMKII의 증가는 glutamate 수용체들의 흥분독성에 저항하여 단백질합성이 증가되는 것으로 추측해 볼 수 있으며, NPY의 증가는 자세한 기전은 알려져 있지 않으나 neuroprotecting의 한 과정으로 추정된다. NOS의 감소는 신경독성물질로서 작용하는 NO의 합성을 억제하여 신경세포 손상을 감소시키는 것으로 추측된다.

이상의 결과를 종합하면 牛黃清心元은 흰쥐의 가역성 뇌허혈로 유발된 뇌경색과 부종의 부피를 감소시켰고, 해마 CA1 지역의 피라미드신경세포 손상을 감소시키는 보호효과를 나타내었다. 신경세포 손상을 감소시킨 것은 synapsin,  $\alpha$ CaMKII, eEF-1 $\alpha$  등이 증가되어 glutamate 수용체들의 흥분독성에 저항하여 단백질합성이 증가된 것으로 주된 기전을 추측해 볼 수 있었는데, 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 결론

牛黃清心元이 뇌허혈에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄 후 재판류시킨 표본을 이용하여 뇌경색의 부피·뇌부종 등의 형태학적 변화와, 광학현미경으로 해마의 피라미드신경세포 상해에 대한 방어효과 및 이와 관련된 신경전달물질, 효소, 단백질을 면역조직화학적 기법을 이용하여 관찰하였다.

1. 뇌경색의 부피에 있어서 대조군은 전체 대뇌반구의 약 23.6%를 차지하였고, 실험군은 약 13.5%를 차지하여 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

2. 뇌부종의 부피에 있어서 대조군은 정상 대뇌반구에 비하여 약 16% 증가하였고, 실험군은 약 7% 증가하여 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

3. 광학현미경적 소견으로는 대조군은 허혈유발측 해마 CA1 지역의 피라미드신경세포가 가장 많은 상해를 입었고, 실험군은 대조군보다 상해 정도가 감소되었다.

4. 면역조직화학적 소견으로는 대조군에서 GABA는 정상군에 비하여 반응성이 증가되었고, synapsin, eEF-1 $\alpha$ 는 반응성이 감소되었으며, 정상군에서 음성 반응을 나타내던 NOS와 DBH는 양성 반응을 나타내었다. 실험군에서 GABA, DBH, NOS는 대조군에 비하여 반응성이 감소되었고, NPY, synapsin,  $\alpha$ CaMKII, eEF-1 $\alpha$ 는 반응성이 증가되었다.

### 참고문헌

1. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982;239(1):57-69.
2. Allen GV, Cheung RT, Cechetto DF. Neurochemical changes following occlusion of the MCA in rats. *Neuroscience.* 1995;68(4):1037-1050.
3. 대한신경외과학회. *신경외과학*. 서울:중앙문화사. 1997:15-17,276-278.
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. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:대성문화사. 1981:171-173.
7. 康命吉. 濟衆新編. 서울:여강출판사. 1992:44.
8. 김동용, 오승환, 안일희, 이언정, 이형균, 이승무, 나성수. 의식장애를 동반한 졸중풍 급성기 환자에서 우황청심원 투여에 관한 고찰, *대한한의학회지.* 1994;15(1):203-210.
9. 홍석. 우황청심원이 백서의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1993.
10. 조태순, 이선미, 이은방, 조성익, 김용기, 신대회, 박대규. 신우황청심원의 뇌허혈 및 중추신경계에 대한 약효. *약학회지.* 1998;41(6):817-828.
11. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20(1):84-91.
12. 남상경, 이경섭. 우황청심원과 소합항원의 효능에 대한 연구. *경희의학.* 1990;19:220-237.
13. 고창남. 우황청심원이 흰쥐의 적출심장에 미치는 영향. *경희대학교 대학원.* 1997.
14. 신재용. 方藥合編解說. 서울:성보사, 1988:100.
15. 고용석. 우황청심원이 평활근에 미치는 영향. *경희대학교 대학원.* 1977.
16. 홍남두, 김남재, 김규섭. 우황청심원의 순환기계에 미치는 영향. *생약학회지.* 1988;18(4):241-248.
17. 백지성. 우황청심원이 NOS inhibitor에 의한 흰쥐의 학습 및 기억장애에 미치는 영향. *경희대학교 대학원.* 1999.
18. 이영빈. 고혈압에 우황청심원과 Hydralazine, Atenolol, Captopril 및 Furosemide의 병용투여에 관한 실험적 연구. *경희대학교 대학원.* 1992.
19. 문상관. 우황청심원이 인체내피세포의 NOS 및 세포 부착인자 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 분자생물학적 연구. *경희대학교 대학원.* 2000.
20. 이원철, 김영석, 배형섭, 구분홍. 우황청심원의 제형별 입상에 관한 연구. *대한한의학회지.* 1990;11(2):102-105.
21. Walter J Jorosgetz, Michael A Moskowit. Emerging treatments for stroke in humans. *TiPS.* 1996;17:227-233.
22. Kirino T, Tamura A, Sano K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol (Berl).* 1984;64:139-147.
23. Iijima T. The pathophysiology of ischemic neuronal

- injury. Masui. 1998;47(6):662-677.
24. 정용욱, 문일수, 고복현. 허혈성 흰쥐 해마에서 NMDA 수용체 아단위 NR2B와 세포골격단백질 MAP-2의 변화. 동국논집, 1996;15:115-131.
  25. 박경아, 이원택. 의학신경해부학. 서울:고려의학. 1996:127.
  26. 서유현. 신경전달물질. 서울:민음사. 1992:267-344.
  27. Huttner WB, Schiebler W, Greengard P, De Camilli P. Synapsin I(protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. J Cell Biol. 1983;96(5):1374-1388.
  28. Moretto MB, de Mattos-Dutra A, Arteni N, Meirelles R, de Freitas MS, Netto CA, Pessoa-Pureur R. Effects of neonatal hypoxia on the in vitro phosphorylation of synapsin 1 in rat synaptosomes. Neurochem Res. 1999;24(10):1269.
  29. Tuhackova Z, Ullrichova J, Hradec J. Regulation of the activity of eukaryotic peptide elongation factor 1 by autocatalytic phosphorylation. Eur J Biochem. 1985;146(1):161-166.
  30. 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.
  31. 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.
  32. 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.
  33. Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RMJ, Moncada S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. Eur J Pharmacol. 1989;172:413-416.
  34. Zygmunt L, Kruk, Christopher J, Pycocok. 신경전달물질과 약물. 서울:하나의학사. 1996:88,133,213.
  35. Parker SL, Carroll BL, Kalra SP, Stpierre S, Fournier A, Crowley WR. Neuropeptide Y Y-2 receptors hypothalamic in neuroendocrine areas are up-regulated by estradiol and decreased by progesterone cotreatment in the ovariectomized rat. Endocrinology. 1996;137(7):2896-2900.
  36. Mizushima H, Sasaki K, Shimazu M, Arai Y, Matsumoto K, Shioda S, Nakai Y. Time-dependent changes of vasoactive substances in rat cerebral ischemia. Brain Res Bull. 1994;34(6):541-545.
  37. Allen GV, Cheung RT, Cechetto DF. Neurochemical changes following occlusion of the middle cerebral artery in rats. Neuroscience. 1995;68(4):1037-1050.
  38. Miller SG, Kennedy MB. Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. J Biol Chem. 1985;260(15):9039-9046.
  39. Shackelford DA, Yeh RY, Hsu M, Buzsaki G, Zivin JA. Effect of cerebral ischemia on calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity and phosphorylation. J Cereb Blood Flow Metab. 1995; 15(3):450-461.
  40. Waxham MN, Grotta JC, Silva AJ, Strong R, Aronowski J. Ischemia-induced neuronal damage: a role for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. J Cereb Blood Flow Metab. 1996;16(1):1-6.