

원 저

九味清心元이 저산소증 유발 배양신경세포에 미치는 영향

한기선, 정승현, 신길조, 문일수¹⁾, 이원철

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 의과대학 해부학교실²⁾

The Effect of *Goomicheongsim-won*(九味清心元) Extracts on E20 Corticells and P7 Cerebellar Cells Exposed to Hypoxia

Ki-Seon Han, Sung-Hyun Jeong, Gil-Cho Shin, Il-Soo Moon¹⁾, Won-Chul Lee

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University,
Department of Anatomy, College of Medicine, Dongguk University²⁾

Objectives: The purpose of this investigation was to evaluate the effect of *Goomicheongsim-won* (九味清心元) Extracts on E20 corticells and P7 cerebellar cells exposed to hypoxia, and the effect on neuronal protection by elimination of *Rhinoceros unicornis* L.(犀角) and/or Orpiment As₂S₃(石雄黄).

Methods: P7 cerebellar cells were grown in various concentrations of KM-A (九味清心元), KM-B (九味清心元 去犀角), KM-C (九味清心元 去石雄黄) and KM-D (九味清心元 去犀角·石雄黄). On 7 DIV (day in vitro), cells were exposed to hypoxia (98% N₂/5% CO₂, 3 hr, 37°C) and normoxia, and then further incubated for 3 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control. E20 cortical cells were grown in various concentrations of KM-A, KM-B, KM-C, and KM-D. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia and normoxia, and then further incubated for 3 and 7 days.

Results:

1. The effect of KM-A on neuronal protection was significantly increased P7 cerebellar granule cells and E20 cortical cells on normoxia and hypoxia.
2. The effect of KM-B on neuronal protection was increased P7 cerebellar granule cells on normoxia, but was significantly decreased P7 cerebellar granule cells on hypoxia. The effect of KM-B on neuronal protection was non-significantly increased E20 cortical cells on normoxia and hypoxia.
3. The effect of KM-C on neuronal protection was non-significantly increased P7 cerebellar granule cells on normoxia and hypoxia and was decreased (p=0.058) on hyperconcentration of the extracts in normoxia. The effect of KM-C on neuronal protection was significantly increased P7 cerebellar granule cells and E20 cortical cells on normoxia and hypoxia (10 DIV), and the effect was E20 cortical cells on normoxia (14 DIV), non-significantly increased E20 cortical cells on hypoxia (14DIV).
4. The effect of KM-D on neuronal protection was increased P7 cerebellar granule cells on normoxia but was not on hyperconcentration of the extracts, was significantly decreased on hyperconcentration of the extracts in hypoxia. The effect of KM-D on neuronal protection was significantly increased E20 cortical cells on normoxia and was significantly increased E20 cortical cells increased on hypoxia (10 DIV).

Conclusions: *Goomicheongsim-won* (九味清心元) extracts had applicable effect on E20 corticells and P7 cerebellar cells exposed to hypoxia. The effect on neuronal protection by elimination of *Rhinoceros unicornis* L.(犀角) and/or Orpiment As₂S₃(石雄黄) was changed. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(1):120-132)

Key Words: *Goomicheongsim-won*(九味清心元), hypoxia, E20 corticells, P7 cerebellar cells

· 접수 : 2001년 10월 22일 · 채택 : 2002년 1월 30일
· 교신저자 : 정승현, 경북 경주시 용강동 357번지 동국대학교 경주한방병원
(Tel. 054-770-1253, E-mail: omdjeong@hanmail.net)

서론

九味清心元은 心胸毒熱을 치료하는 處方으로 牛黃清心元¹⁾의 부분 집합이라고 볼 수 있다^{2,3)}. 그러나, 牛黃清心元의 원 처방은 九味清心元이며 <太平惠民和劑局方>에 誤作되어 大山芋丸과 합쳐졌다는 說⁴⁾도 있다. 牛黃清心元은 中風 陽閉證에 사용되는 처방이며, 清熱·開竅·安神之 效能으로 “諸風。痰癱不隨, 言語蹇澁....痰涎壅塞, 精神昏愦” 등을 치료하는 中風 救急藥으로 常用되고 있어^{2,3)} 九味清心元 또한 中風 救急藥으로 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

허혈성 뇌혈관질환은 뇌손상의 가장 대표적인 질환으로 뇌혈관내 粥狀硬化·塞栓으로 뇌혈류가 감소하여 低酸素證이나 虛血性損傷이 발생한다⁵⁻⁷⁾.

뇌신경세포의 직접적 사망원인은 저산소증이나 허혈성 손상으로 인한 glutamate 수용체의 과다한 활성화에 의한 흥분독성으로^{8,9)}, 그 기전은 정확히 알려지지 않고 있다^{10,11)}. 신경세포사망의 중요한 원인은 Ca²⁺ 이온 통로인 NMDA 수용체의 과다한 활성화로 세포내 Ca²⁺의 농도([Ca²⁺]_i)가 증가되는 것으로 보고되고 있다^{8,9)}. 특히 저산소증에 의한 흥분독성과 세포내 [Ca²⁺]_i은 5분 이내에 정상으로 돌아오나 신경세포의 사망은 수시간~수일이 지나야 일어난다^{12,13)}. 그러므로 뇌허혈이 발생한 후 치료할 수 있는 시간적 여유는 이러한 지연성 세포사에 의하여 제공받는다.

뇌허혈에 대한 실험적 연구로는 牛黃清心元의

KCN 유발 혼수시간 단축 및 저산소환경에서 생존시간 연장효과¹⁴⁾, 뇌부종 감소효과¹⁵⁾, 그리고 중대뇌동맥 결찰로 유발된 뇌허혈 및 배양신경세포를 이용한 저산소증 보호효과¹⁶⁾ 등이 보고된 바 있으나, 九味清心元에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 九味清心元이 저산소증 유발 소뇌과립세포와 대뇌피질 신경세포에 미치는 효과 및 희귀 동물성약재와 유해 광물성 약재의 규제로 사용할 수 없게 된 犀角 및 石雄黃의 제거에 의한 효능변화를 규명하기 위하여 저산소증 유발 배양신경세포의 생존 정도를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 동물

본 연구는 대한동물실험센터에서 구입한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대상으로 실험을 실시하였다. Fig. 5.부터 Fig. 16.의 대조군(control group)은 정상산소환경 및 저산소환경에서 각각의 약재(九味清心元, 九味清心元 去犀角, 九味清心元 去石雄黃, 九味清心元 去犀角·石雄黃)가 투여되지 않은 군으로 하였다.

2. 약재

실험에 사용된 九味清心元은 東醫寶鑑¹⁷⁾에 準하였고, 處方 구성과 함량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Amount and Composition of Goornicheongsim-won Extracts

Species	Part used	Latin name	Weight(mg/pill)
<i>Typhae latifolia L(baked)</i>	Pollen	<i>Typhae Pollen</i> (蒲黃)	142.0
<i>Rhinoceros unicornis L.</i>	Cornu	<i>Rhinoceri Cornu</i> (犀角)	113.6
<i>Scutellaria baicalensis GEORGI</i>	Root	<i>Radix Scutellariae</i> (黃芩)	85.2
<i>Bos taurus domesticus GMELIN</i>	Gallstone	<i>Calculus Bovis</i> (牛黃)	68.3
<i>Saiga tatarica L</i>	Cornu	<i>Cornu Tataricae</i> (羚羊角)	56.8
<i>Moschus moschiferus L</i>	Resin	<i>Moschus</i> (麝香)	56.8
<i>Dryobalanops aromatica GAERTN. f</i>	Resin	<i>Borneolum</i> (龍腦)	56.8
<i>Orpiment As.S.</i>		<i>Realgar</i> (石雄黃)	45.5
<i>Apis mellifera L.</i>		<i>Mel</i> (蜂蜜)	625.0
Gold		<i>Gold</i> (金箔)	q.s.
Total			1,250.0

3. 九味清心元의 제조와 추출

분쇄시킨 각각의 약재를 12.5ml의 증류수에 넣고 상온에서 진탕추출하고 4℃에서 18시간 더 방치하였다. 각 약재 현탁액을 1.25ml씩 넣고 균질화한 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻고 소량씩 분주하여 -20℃에 보관하였다. 실험 약재를 九味清心元(KM-A), 九味清心元 去 犀角(KM-B), 九味清心元 去 石雄黃(KM-C), 九味清心元 去 犀角·石雄黃(KM-D)으로 분류하였으며, KM-B, KM-C, KM-D의 경우에는 각 약재가 빠진만큼 증류수로 보충하였다.

4. 신경세포배양과 저산소처리

임신 20일(E20)인 흰쥐의 대뇌피질 신경세포(cortical cell)와 출생 후 7일(P7)의 소뇌과립세포(cerebellar granule cell)는 Brewer 등¹⁸⁾의 방법을 응용하여 배양하였으며, 약제는 배양시작과 동시에 처리하였다. 임신쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3-5분간 넣어 마취하고, 자궁을 분리하여 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질조직을 37℃에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리하고 1 mM sodium pyruvate과 10 mM HEPES, pH 7.4가 첨가된 HBSS용액(GibcoBRL) 5 ml로 4-5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1 ml Hank용액으로 옮기고 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6-7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 분산된 세포를 모으고 세포 수를 측정 후 실험에 따라 500-1,500 cells/mm²의 밀도로 B27을 첨가한 plating Neurobasal media(GibcoBRL)(100 ml Neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I, 0.1 ml 25 mM glutamate, 0.1 ml 25 mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 37℃, 5% CO₂ 배양조에서 배양한 다음 2-3일 간격으로 배양액을 feeding Neurobasal media(100 ml Neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I)로 1/3씩 교환하였다. 배양 7일에 CO₂ Water Jacketed Incubator(Forma Scientific)를 이용하여 98% N₂ / 5% CO₂ 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유도하고, 다시 37℃, 5% CO₂ 배양조로 옮겨 실험에 따라 일정기간 계속 배양하였다.

소뇌과립세포의 배양은 출생 후 7일의 소뇌피질조직을 대뇌피질조직과 같은 방법으로 배양하였다.

5. MTT assay

96-well plate에서 신경세포의 배양이 끝나면 새로운 배지 180μl로 바꾸어주고, MTT 200μl를 넣은 후 37℃에서 4시간 더 배양하였다. 원심분리 후(900 × g, 10분) 상등액을 제거하고 ethanol-DMSO (1:10) 용액 150μl를 넣고 20분간 진탕하여 formazan 결정을 용해시킨 후 650 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도(OD₆₅₀)를 측정하였다.

6. LDH assay

96-well plate에서 신경세포의 배양이 끝나면 배양액 20μl를 새로운 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate(NADH 1 mg/ml)를 20μl씩 가한 후, 상온에서 2분간 진탕한 후 37℃에서 30분간 더 진탕하였다. 발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20μl씩 가하여 상온에서 20분간 진탕하고, 0.4 N NaOH를 100μl씩 가하여 상온에서 15분간 더 진탕한 후 ELISA reader로 흡광도(OD₄₅₀)를 측정하였다.

7. 통계처리

모든 실험은 최소한 8배수로 실행하였고, 세포의 생존율은 대조군에 대한 백분율(% of control)로 표시하였다. 통계학적 유의성은 Mann-Whitney U test로 검증하였다.

결 과

1. 신경세포의 배양

대뇌피질 신경세포 및 소뇌과립세포는 배양시작 후 2시간 정도부터 neurite을 생성하기 시작하여 24시간 후에는 신경가지들이 대개 20-30μm까지 자랐다. 대뇌피질 신경세포는 특징적으로 여러 개의 가지돌기를 내었다(Fig. 1A). 반면에 소뇌과립세포는 약 8μm의 작은 세포체(soma)와 한 개 혹은 두 개의 신경가지를 내는 특징이 있었다(Fig. 1B와 inset). 출생 후

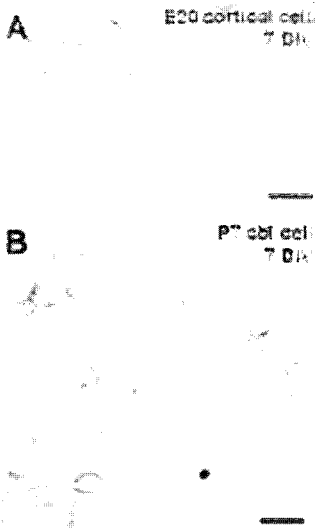


Fig. 1. Neuronal cultures.

The rat embryonic day 20(E20) cortical cells and postnatal 7day (P7) cerebellar cells were dissociated in Neurobasal media as described in Materials and Methods. Typical cultures of E20 cortical neurons(A) and P7 cerebellar granule cells(B) were shown. Neurons with long one or two processes are characteristics of cerebellar granule cells, which is obviously seen in B and inset. Bar, 20 μ m.

7일의 소뇌를 분산하여 배양하면 소뇌과립세포가 대부분을 차지하였으며(Fig. 1B), 신경교세포는 약 10%를 차지하였다. 그러나 serum이 첨가되지 않은 배지 (serum-free media)를 사용하였으므로, 신경세포가 거의 대부분을 차지하였으며 신경교세포의 증식은 일어나지 않았다.

2. 저산소증에 의한 신경세포의 사망

九味清心元이 첨가되지 않은 배지에서 소뇌과립세포 및 대뇌피질 신경세포가 저산소환경(hypoxia)에 의하여 사멸하는 정도를 측정하였다. 7 DIV E20 대뇌피질 신경세포를 98% N₂/5% CO₂에서(37 $^{\circ}$ C) 3시간 처리하고 1, 3, 5, 7일 후에 생존율을 조사하였다(Fig.2).

P7 소뇌과립세포는 처리 4일 후 13.9%, 5일, 7일 후에는 각각 24.4%, 33.6%가 사멸하였다. E20 대뇌피질 신경세포는 저산소 처리 3일 후 19.15%, 5일 후 약 40%가 사멸하였으며, 그 이후 7일까지는 큰 변동

이 없었다(Fig. 3).

3. 배양세포 밀도에 따른 신경세포 생존율

7 DIV E20 대뇌피질 신경세포를 500~2,000 cells/mm²의 밀도로 배양하였는데, 2,000 cells/mm²의 경우 semi-confluency를 이루어 신경가지들이 배양용기의

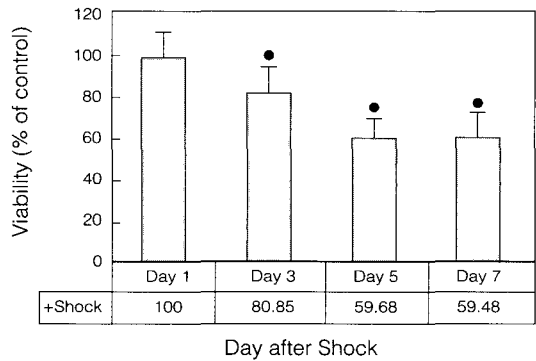


Fig. 2. Survival rate of cortical neurons after hypoxic insult. E20 cortical cells were exposed to hypoxia(98%N₂/5%CO₂, 3hr, 37 $^{\circ}$ C) on 7 DIV, and then further incubated in normoxia for various days. the neuronal viability was measured by MTT assay, and expressed as percentages of control(Day 1). About 19% of cells were dead by day 3, which is statistically very significant. closed circles, p<0.01. n=16.

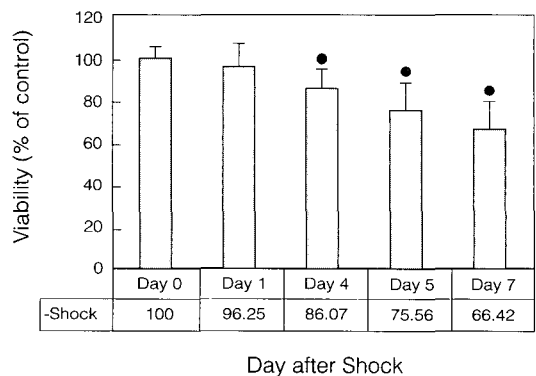


Fig. 3. Survival rate of cortical neurons after hypoxic insult. P7 cerebellar cells were exposed to hypoxia(98%N₂/5%CO₂, 3hr, 37 $^{\circ}$ C) on 7 DIV, and then further incubated in normoxia. On indicated days, neuronal viability was measured by MTT assay and expressed as percentages of control(Day 0, i.e., just before insult). closed circles indicate very significant difference (p<0.01). n=16.

바닥을 거의 덮었다. 각각의 밀도에서 저산소증을 유발한 경우와 유발하지 않은 경우를 shock 후 4일째날 비교한 결과, 500 cells/mm²의 저밀도에서 가장 높은 17%의 차이를 보였으며, 1,000, 1,500 cells/mm²에서는 각각 7.7%, 11.8%의 차이를 보였다(Fig. 4). 저산소

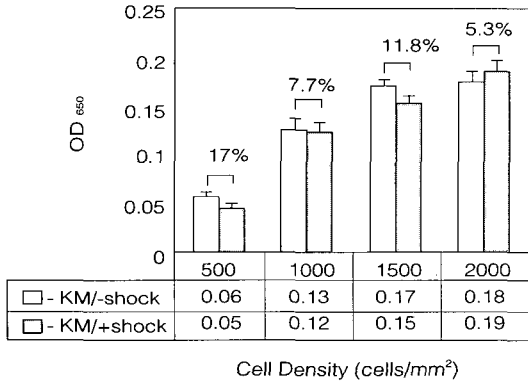


Fig. 4. Cell density-dependent neuronal viability in hypoxia in the absence of KM(E20 cortical cells, -KM, + or - shock).

E20 cortical cells were grown without WC, exposed to hypoxia(98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37°C) on 7 DIV, then further incubated in normoxia for 3 days. The neuronal viability was measured at OD₆₅₀ after MTT assay. n=8.

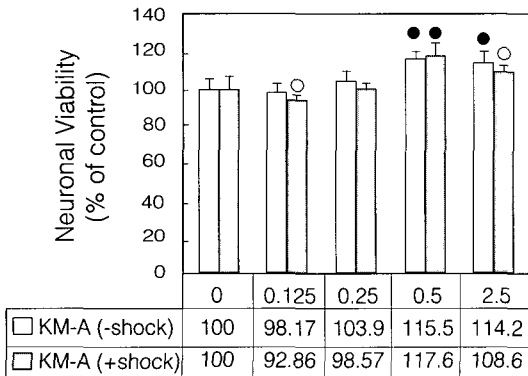


Fig. 5. Effect of KM-A on neuronal protection (cerebellar cells).

P7 cerebellar cells were grown in various concentrations of KM-A. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37°C), and then further incubated for 3 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control(no KM-A added). Closed circle, p<0.01. Open circle, p<0.05. n=8.

환경인 2,000 cells/mm²의 밀도에서는 오히려 더 많은 생존율을 나타내었다. 그 이유는 알 수 없으나, 고밀도에서 이미 필수 영양분의 고갈 등의 이유로 많은 손상을 받았기 때문인 것으로 추측된다. 이러한 추측은 정상산소환경(normoxia)에서 1,500과 2,000 cells/mm² 밀도 사이에서는 생존 세포수가 거의 차이가 없다는 사실이 이를 뒷받침한다.

4. 九味清心元의 신경세포사 방지

1) 저산소증에서 소뇌과립세포사 방지

(1) 九味清心元(KM-A)의 효과

정상산소환경에서 7 DIV P7 소뇌과립세포를 배양과 동시에 九味清心元(KM-A)을 첨가하고 3일째 세포의 생존율을 MTT assay 방법으로 조사하였다(Fig. 5). 실험에 사용한 최고 농도인 2.5 µg/ml까지 KM-A는 신경세포에 대한 독성이 없었으며, 0.5, 2.5 µg/ml 농도에서는 매우 유의성이 있는(p<0.01) 세포보호효과가 있었다.

같은 조건의 배양세포를 저산소 상태로 3시간 동안 처리 후 3일째에 신경세포의 생존율을 조사한 결과

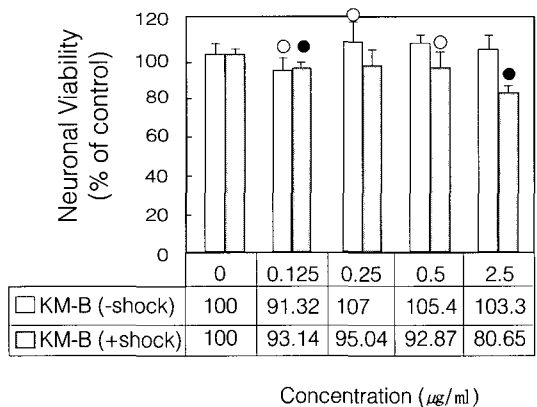


Fig. 6. Effect of KM-B on neuronal protection (cerebellar cells).

P7 cerebellar cells were grown in various concentrations of KM-B. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37°C), and then further incubated for 3 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control(no KM-B added). closed circle, p<0.01. Open circle, p<0.05. n=8.

0.125 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 약간의 감소가 있었으나, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 17.6%의 증가를 나타내었으며 ($p<0.01$), 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 8.6%의 증가를 나타내었다($p<0.05$). 이는 KM-A가 정상산소환경 및 저

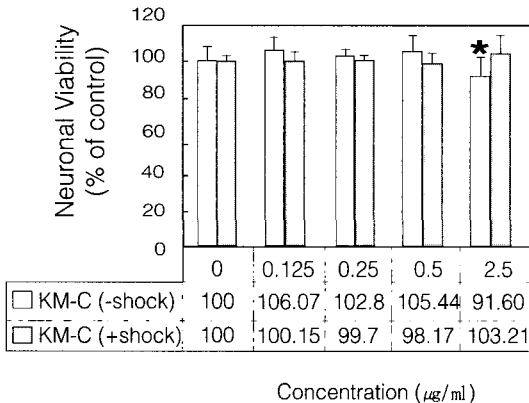


Fig. 7. Effect of KM-C on neuronal protection (cerebellar cells). P7 cerebellar cells were grown in various concentrations of KM-C. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37°C), and then further incubated for 3 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control (no KM-C added).*, $p=0.058$. n=8.

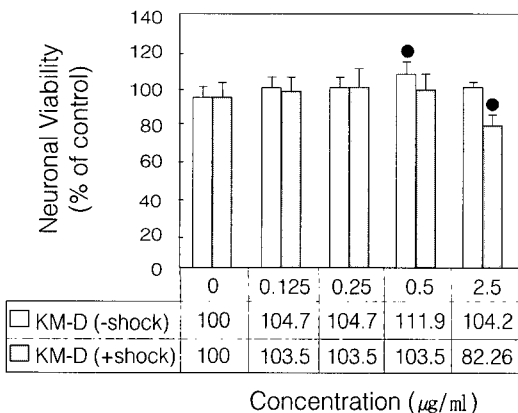


Fig. 8. Effect of KM-D on neuronal protection (cerebellar cells). P7 cerebellar cells were grown in various concentrations of KM-D. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37°C), and then further incubated for 3 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control (no KM-D added). Closed circle, $p<0.01$. n=8.

산소환경에서 신경세포 보호효과가 있음을 의미한다.

(2) 九味清心元 去犀角(KM-B)의 효과

정상산소환경에서 KM-A와 같은 조건으로 7 DIV P7 소뇌과립세포를 배양과 동시에 九味清心元 去犀角(KM-B)을 첨가하고 3일째 세포의 생존율을 MTT assay 방법으로 조사하였다(Fig. 6). 0.25-2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 세포보호효과가 있었으며, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성있는 효과가 있었다($p<0.05$, Fig.6). 그러나 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서는 오히려 약간의 세포독성이 있었다($p<0.05$).

같은 조건의 배양세포를 저산소 상태로 3시간 동안 처리한 후 3일째에 신경세포의 생존율을 조사한 결과 KM-B는 세포보호효과가 없었으며, 오히려 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 8.7%, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 19.3%의 세포사를 증가시켰다($p<0.01$). 이는 KM-B가 정상산소환경에서 어느 정도 세포를 보호하나, 저산소환경에서는 오히려 독성이 있음을 의미한다.

(3) 九味清心元 去石雄黄(KM-C)의 효과

정상산소환경에서 KM-A와 같은 조건으로 7 DIV P7 소뇌과립세포를 배양과 동시에 九味清心元 去石雄黄(KM-C)을 첨가하고 3일째 세포의 생존율을 MTT assay 방법으로 조사하였다(Fig. 7). 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 약간(2.8-6%)의 보호작용이 있었으나, 유의성은 없었다. 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 독성(8.4%)이 나타났으며, Mann-Whitney U test 결과 $p=0.058$ 로서 거의 유일한 수준을 나타내었다(Fig. 7).

같은 조건의 배양세포를 저산소 상태로 3시간 동안 처리한 후 3일째에 신경세포의 생존율을 조사한 결과 KM-C는 대조군에 비하여 큰 차이가 없었다(Fig. 7). 특이한 점은 저산소증을 유도하지 않은 경우 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포독성이 나타났으며, 저산소증을 유도한 경우 KM-C를 첨가하지 않은 대조군에 비하여 통계적 유의성은 없었으나, 약간(3.2%)의 보호작용이 있었다(Fig. 13, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ columns).

(4) 九味清心元 去犀角·石雄黃(KM-D)의 효과
 정상산소환경에서 KM-A와 같은 조건으로 7 DIV P7 소뇌과립세포를 배양과 동시에 九味清心元 去犀角·石雄黃(KM-D)을 첨가하고 3일째 세포의 생존율을 MTT assay 방법으로 조사하였다(Fig. 8). KM-D는 정상산소환경에서 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 까지 7.7-11.9%의 신경세포 보호효과가 있었으며, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도(11.9%)에서는 현저한 유의성이 있었다($p<0.01$). 그러나 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 효과가 떨어져 4.2%의 증가를 나타내었다(Fig.8).

같은 조건의 배양세포를 저산소 상태로 3시간동안 처리한 후 3일째에 신경세포의 생존율을 조사한 결과 KM-D는 대조군에 비하여 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 3.5~3.9%의 생존율 상승효과를 보였으나, 유의성은 없었으며, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 독성이 있어 17.7%($p<0.01$)의 생존율 감소를 보였다(Fig.8). 이는 KM-D는 정상산소환경에서는 세포 보호효과가 있으나, 저산소증에서는 특별한 효과가 없고 오히려 고농도에서는 독성이 있음을 보여준다.

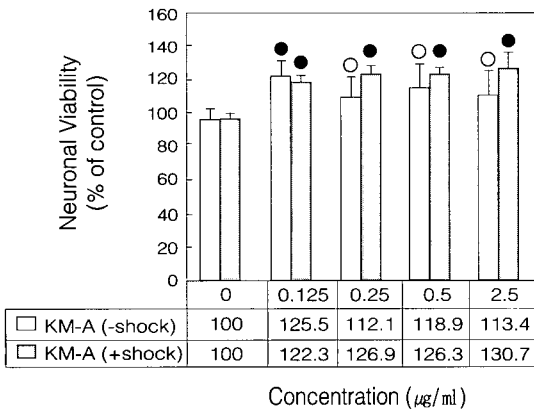


Fig. 9. Effect of KM-A on neuronal protection (cortical cells, 3 DIV after shock). E20 cortical cells were grown in various concentrations of KM-A. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37°C), and then further incubated for 3 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control (no KM-A added). Closed circle, $p<0.01$. Open circle, $p<0.05$. n=8.

2) 저산소증에서 대뇌피질신경세포사 방지 효과
 (1) 九味清心元(KM-A)의 효과

7 DIV E20 대뇌피질 신경세포를 배양과 동시에 九味清心元(KM-A)을 첨가하고 날짜별로 세포의 생존율을 LDH assay 방법으로 조사하였다. 정상산소환경

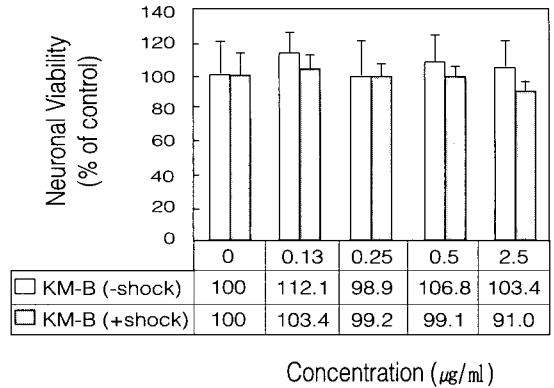


Fig. 10. Effect of KM-B on neuronal protection (cortical cells, 3 DIV after shock). E20 cortical cells were grown in various concentrations of KM-B. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37°C) and then further incubated for 3 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control (no KM-B added). n=8.

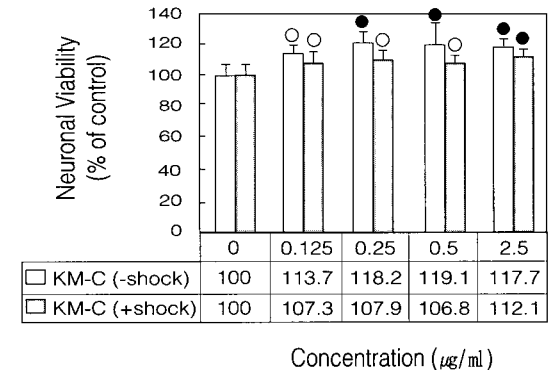


Fig. 11. Effect of KM-C on neuronal protection (cortical cells, 3 DIV after shock). E20 cortical cells were grown in various concentrations of KM-C. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37°C), and then further incubated for 3 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control (no KM-C added). Closed circle, $p<0.01$. Open circle, $p<0.05$. n=8.

에서 KM-A를 0.125-2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 실험군은 대조군에 비하여 10 DIV의 경우 12.1-25.5%의, (Fig. 9), 14 DIV에는 2.1-6.6%의 생존율의 증가를 나타내었다(Fig. 13).

같은 조건의 세포를 저산소 상태로 3시간 동안 처리한 후 3일째에 22.3-30.7%의 생존율을 증가($p < 0.01$)를 (Fig. 9), 7일째에는 8.3-11.7%의 생존율 증가($p < 0.01$)를 보였는데, 통계학적으로 매우 유의성이 있었다(Fig. 13). 이는 KM-A가 정상산소환경 및 저산소환경에서 대뇌피질신경세포의 보호효과가 있음을 의미한다.

(2) 九味清心元 去犀角(KM-B)의 효과

7 DIV E20 대뇌피질 신경세포를 배양과 동시에 KM-B를 첨가하고 날짜별로 세포의 생존율을 LDH assay 방법으로 조사한 결과, 10 DIV의 정상산소환경 하에서는 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도에서 12.1%의 증가를 보였으나 유의성은 없었으며, 0.25-2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 특별한 효과가 나타나지 않았다(Fig. 17). 14 DIV에서는 실험에 사용한 0.125-2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 특별한 효과가 나타나지 않았다(Fig. 14).

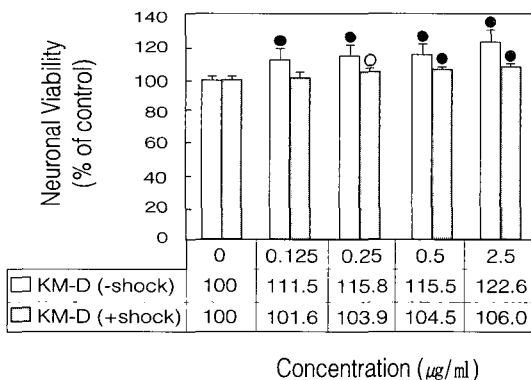


Fig. 12. Effect of KM-D on neuronal protection (cortical cells, 3 DIV after shock).

E20 cortical cells were grown in various concentrations of KM-D. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37°C), and then further incubated for 3 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control (no KM-D added). Closed circle, $p < 0.01$. Open circle, $p < 0.05$. n=8.

같은 조건의 세포를 저산소 상태로 3시간 동안 처리한 후 3일째에 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 특별한 변화가 없었으며, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 약 9%의 감소를 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 10). 7일째에도 대조군에 비하여 특별한 변화가 나타나지 않았다

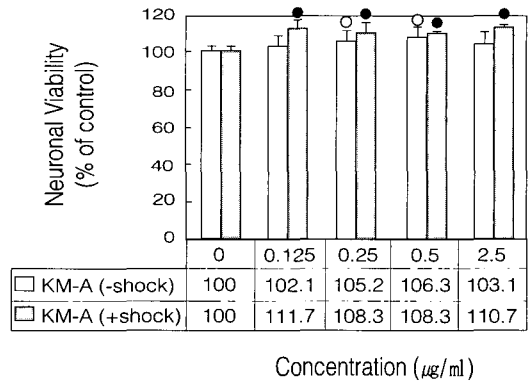


Fig. 13. Effect of KM-A on neuronal protection (cortical cells, 7 DIV after shock).

E20 cortical cells were grown in various concentrations of KM-A. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37°C), and then further incubated for 7 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control (no KM-A added). Closed circle, $p < 0.01$. Open circle, $p < 0.05$. n=8.

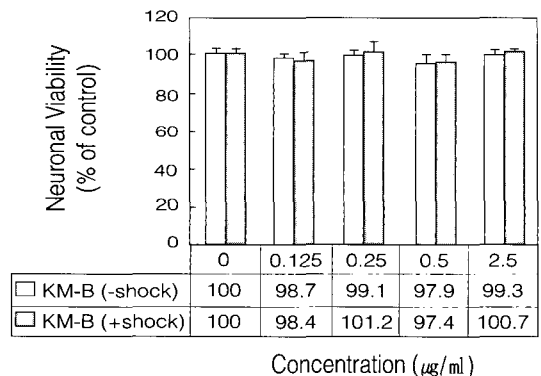


Fig. 14. Effect of KM-B on neuronal protection (cortical cells, 7 DIV after shock).

E20 cortical cells were grown in various concentrations of KM-B. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37°C), and then further incubated for 7 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control (no KM-B added). n=8.

(Fig. 14). 따라서 KM-B는 정상 및 저산소환경에서 대뇌피질신경세포의 보호효과가 없음을 보여준다.

(3) 九味清心元 去石雄黃(KM-C)의 효과

7 DIV E20 대뇌피질 신경세포를 배양과 동시에 KM-C를 첨가하고 날짜별로 세포의 생존율을 LDH assay 방법으로 조사하였다. 10 DIV의 정상산소환경 하에서는 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도에서 13.7%의 유의성 있는($p<0.05$) 증가를 보였으며, 0.25-2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 17.7-19.1%의 매우 유의성 있는($p<0.01$) 생존율 증가를 나타내었다(Fig. 11). 14 DIV에서는 실험에 사용한 0.125-2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 특별한 효과가 나타나지 않았다(Fig. 15).

같은 조건의 세포를 저산소 상태로 3시간 동안 처리한 후 3일째에 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 6.8-7.9%의 유의성 있는($p<0.05$) 증가를 보였으며, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 12.1%의 매우 유의성 있는($p<0.01$) 증가를 나타내었다(Fig. 11). 7일째에는 실험에 사용한 0.125-2.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도범위에서 4.3-7.2%의 매우 유의성 있는($p<0.01$) 증가를 나타내었다(Fig. 15). 따라서 KM-C는 정상 및 저산소환경에서 대뇌피질신경세포의

보호효과가 있음을 알 수 있었다.

(4) 九味清心元 去犀角·石雄黃(KM-D)의 효과

7 DIV E20 대뇌피질 신경세포를 배양과 동시에 KM-D를 첨가하고 날짜별로 세포의 생존율을 LDH assay 방법으로 조사하였다. 10 DIV의 정상산소환경 하에서 0.125-2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 KM-D는 11.5-22.6%의 매우 유의성 있는($p<0.01$) 증가를 보였으며(Fig. 12), 14 DIV의 경우에는 세포생존율의 큰 증가는 없었으나 0.25 및 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 3.6 및 4.3%의 유의성 있는($p<0.05$) 증가를 보였다(Fig. 16).

같은 조건의 세포를 저산소 상태로 3시간 동안 처리한 후 3일째에 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서는 거의 효과가 없었으며, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 3.9%의 유의성 있는($p<0.05$) 증가를 보였으나, 0.5-2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 4.5~6.0%의 매우 유의성 있는($p<0.01$) 증가를 보였다(Fig. 12). 저산소증 유도 후 7일째에는 실험에 사용한 0.125-2.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도범위에서 특별한 효과가 나타나지 않았으나, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 3.3%의 통계학적으로 매우 유의성 있는($p<0.01$) 증가를 나타내었다(Fig. 16). 따라서 KM-D는 배양초기에는 정상 및 저

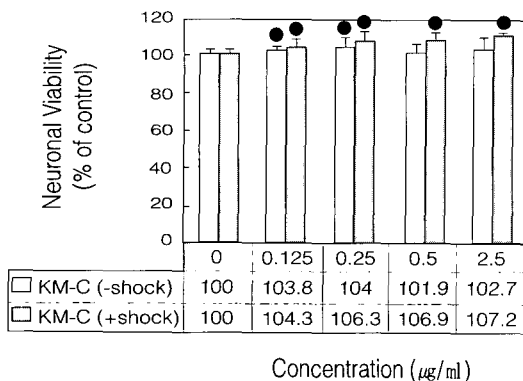


Fig. 15. Effect of KM-C on neuronal protection (cortical cells, 7 DIV after shock).

E20 cortical cells were grown in various concentrations of KM-C. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37 °C), and then further incubated for 7 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control (no KM-C added). Closed circle, $p<0.01$. n=8.

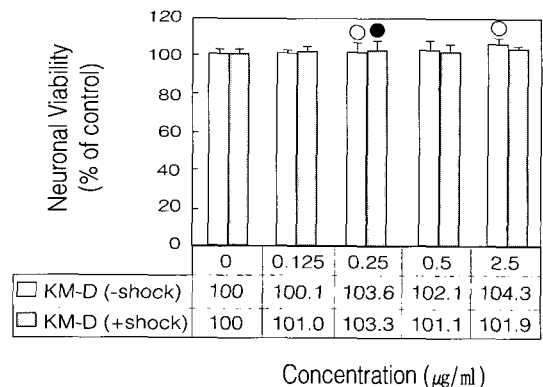


Fig. 16. Effect of KM-D on neuronal protection (cortical cells, 7 DIV after shock).

E20 cortical cells were grown in various concentrations of KM-D. On 7 DIV, cells were exposed to hypoxia (98%N₂/5%CO₂, 3 hr, 37 °C), and then further incubated for 7 days. Neuronal viabilities were expressed as percentages of control (no KM-D added). Closed circle, $p<0.01$. Open circle, $p<0.05$. n=8.

산소환경에서 세포사 방지효과가 일부 있으나, 배양 후기에는 거의 보호효과가 없음을 보여준다.

고 찰

中風의 원인으로 火, 氣, 濕, 痰 등이 있다. 그 중 급성기의 중풍치료로 祛風, 清熱, 治痰 등이 대표적이다. 九味清心元은 牛黃清心元 처방 중에서 아홉가지 藥味만 가려 뽑아 이루어진 처방으로, 주로 心包의 熱邪를 淸解하여 心胸毒熱, 上焦熱을 치료하는데 응용된다¹⁹⁾. 현재 임상에서 九味清心元을 많이 사용하고 있지 않으며 실험 연구 또한 없었으나, 牛黃清心元의 기본 처방으로서 九味清心元에 대한 연구가 필요하다.

九味清心元은 蒲黃·犀角·黃芩·牛黃·羚羊角·麝香·龍腦·石雄黃·金箔으로 구성되어 있다. 그 중에서 犀角은 '멸종위기에 처한 야생 동·식물의 국제거래에 관한 협약'(CITES, 일명 Washington 협약)에 의하여, 石雄黃은 '식품의약품안전청의 한약제재의 주성분 및 함량 검토 기준'에 의하여 사용이 금지되었다. 그러므로, 九味清心元은 현재 희귀 동물성 약재와 유해 광물성 약재의 규제로 인하여 원방 그대로 사용할 수 없게 되었다.

牛黃清心元은 淸熱·開竅·安神之 效能이 있어^{2,3)}, 다용되나, 사용약물이 많고 비교적 고가이며, 사용약물 중 금지약물이 있어 제한성이 있다. 이에 저자는 九味清心元을 선택하여 뇌세포 보호작용 및 금지약물을 배제한 효능을 검증하고자 본 실험을 시행하였다.

저산소증의 경우 뇌신경세포의 직접적 사망원인의 하나는 glutamate 수용체의 과다한 활성화이다^{8,9)}. 축삭 말단에는 glutamate가 milimolar 단위로 존재한다¹⁹⁾. 정상적인 연결 신호전달에서는 세포의 glutamate의 농도가 국소적이며 짧은 시간 동안만 높아진다. 그러나 glutamate에 과다하게 노출되면 신경세포 손상을 초래하는데 이러한 독성을 흥분독성이라고 한다^{20,21)}. glutamate 흥분독성은 허혈 뿐만 아니라, 외상 혹은 발작과 같은 병리학적 조건에서 신경세포 사망의 원인이 된다^{9,22-24)}. 허혈상태에서는 glutamate uptake

carrier의 reverse operation에 의하여 세포의 glutamate의 농도가 매우 높아지는데, 이는 Ca²⁺ 이온 통로인 NMDA 수용체의 과다한 활성을 초래하여 세포내 [Ca²⁺]_i의 농도를 증가시키고 신경세포의 사망을 초래하는 것으로 알려져 있다⁸⁾.

특히 허혈에 의한 높은 세포의 glutamate의 농도와 [Ca²⁺]_i은 5분 이내에 정상으로 회복되나 신경세포의 사망은 수 시간에서 수 주가 지나야 일어난다⁸⁾. 이는 허혈 기간 동안에 glutamate의 과다한 유리가 신경세포 사망에 필요하지만 이것이 직접적인 원인이 아니라 이 기간 동안에 NMDA 수용체의 활성화와 [Ca²⁺]_i의 증가에 의한 후기 활성이 중요한 역할을 함을 시사하며, 이러한 지연성 신경세포사망은 허혈손상 후 치유할 수 있는 시간적 여유를 제공한다.

지연성 신경세포의 사망은 NMDA 수용체 길항제 (antagonist)를 허혈 손상후에 처리하여도 방지할 수 있을 뿐 아니라¹⁰⁾, 최근의 보고에 의하면 길항제 MK801를 48시간 전에 처리하여도 지연성 신경세포사 방지효과가 있다고 한다²⁵⁾. 이러한 결과는 허혈 손상후 NMDA 수용체의 활성화와 [Ca²⁺]_i의 증가에 의한 단백질의 표현이 세포사에 중요한 역할을 함을 시사하는데²⁵⁾, 이 기간중에 세포사에 관여하는 단백질의 표현을 억제하는 것은 세포사 방지에 매우 중요하다.

하지만 지연성 세포사의 정도는 뇌손상의 정도와 발생부위에 따라 크게 달라¹²⁾, 수시간 이하로 걸리기도 하고 어떤 경우에는 수일에서 수 주 걸리기도 하나²⁶⁻²⁸⁾, 같은 조건에서 에너지 부족이 심할수록 손상 받는 데 걸리는 시간이 짧다²⁹⁾.

따라서 본 연구에서는 牛黃清心元의 subset로 구성되는 九味清心元의 효과를 조사하고, 규제 약제를 첨가하지 않았을 경우 어떠한 변화가 나타나는지를 저산소증 모델에서 소뇌피립세포와 대뇌피질신경세포를 이용하여 조사하였다.

저산소증(98% N₂/ 5% CO₂ 3시간) 대뇌 및 소뇌신경세포는 세포사의 정도에 차이가 있었다. 대뇌신경세포는 1, 3, 5, 7일 날짜별로 100, 80.85, 59.68, 59.48% 생존율을 보였는데, 3~4일 경에 가장 많이

사망하고 7일에는 더 이상 사망하지 않았다. 소뇌신경세포는 대뇌신경세포와 같이 3~4일에 가장 많이 사망하였으나, 대뇌신경세포에 비하여 사망비율이 낮았다. 이는 신경세포의 종류에 따라 저산소증에 의한 손상의 정도가 달라짐을 의미하며 소뇌신경세포가 덜 손상받음을 보여준다.

또한 대뇌신경세포는 1,500 cells/mm²의 세포농도에서 세포손상과 그 방지효과를 가장 잘 관찰할 수 있었다. 신경세포배양에서 세포의 밀도는 배지내 여러 가지 영양분 및 성장호르몬의 농도에 영향을 미쳐 세포의 생존에 관여한다³⁰. 이러한 미세한 환경의 차이는 저산소증에 의한 세포손상을 증폭할 수 있기 때문에 배양세포의 밀도는 손상정도를 측정하는데 중요하다. 그러므로 본 연구는 대뇌 및 소뇌신경세포의 지연성세포사를 3일과 7일째, 1,500 cells/mm²의 세포농도에서 살펴보았다.

KM-A는 소뇌과립세포 및 대뇌피질 신경세포 모두 정상 및 저산소환경에서 유의성있는 세포 보호효과가 있었다.

소뇌과립세포의 경우 KM-B는 정상산소환경에서 어느 정도 세포를 보호하였지만, 저산소환경에서 오히려 세포 생존율을 유의성 있게 감소시켰다. KM-C는 정상 및 저산소환경에서 세포 생존율을 유의성 있게 증가시키지는 못하였고, 2.5ug/ml의 고농도의 정상산소환경에서 약간(p=0.058) 생존율을 저하시켰다. KM-D는 정상산소환경에서 세포 보호효과가 있었으며, 저산소환경에서는 특별한 효과가 없거나 고농도에서는 오히려 유의성 있게 저하시켰다.

대뇌피질 신경세포의 경우 KM-B는 정상 및 저산소환경에서 세포 생존율을 유의성 있게 증가시키지 못하였으며, KM-C는 10 DIV에서 정상산소환경에서는 유의성이 있는 생존율의 증가를 나타내었고, 14 DIV의 정상산소환경에서 특별한 효과가 없었으며 저산소환경에서 유의성 있게 증가되었다. KM-D는 배양 초기의 정상 및 저산소환경에서 세포사 방지효과가 일부 있었으나, 배양후기에는 거의 보호효과가 없었다.

저산소증 연구에 주로 사용되는 태뇌 혹은 분만

후 흰쥐의 소뇌과립세포 및 대뇌피질 신경세포는 1983년 이후 광범위하게 사용되었으며^{31,32}, 실험동물에서 일어나는 뇌허혈의 상황을 이해하는데 많은 실마리를 제공하고 있다³³. 하지만, 저산소증에 대한 연구의 목표는 생체에서 실제로 일어나는 병리변화를 이해하는 것이다. In vitro system은 허혈 연구에 대한 실마리를 제공할 수 있으나, 결론을 생체 상태로 단순히 확대될 수 없다. 배양실험에서 변수인 혈류·혈관의 부재는 허혈에 대한 해석을 용이하게 하지만 손상과정의 중요한 요소가 제외될 수 있다³⁴. 모든 조직은 허혈성 손상을 겪는데, 지연성 세포사를 겪는 신경세포 배양과 뇌조직이 같은 기전을 겪지 않는다. Brain slice는 생체 조직과 가깝고 거의 유전자 변화가 없다. 하지만 brain slice는 낮은 ATP values와 상승된 호기성의 당분해와 같은 보상된 대사상태(compromised metabolic state)에 있으며 허혈 손상에 민감하다³⁴. Brain slice는 생체 조직과 형태적으로 다르며, slice 자체의 준비 중 어떤 stress-related mRNA와 immediate early genes의 전사를 유발시킨다. 이것의 결과는 알려지지 않지만, 허혈의 민감도를 변화시킬 수 있다³⁵.

그러므로 신경세포배양 실험만으로 저산소증에서 九味清心元에 의한 신경세포사 방지 기전을 알 수 없지만 지연성으로 사망하는 신경세포사의 기전인 apoptosis에 관여하는 단백질의 표현을 억제하던가^{37,38}, 이 약재들의 전처리에 의하여 표현된 단백질들이 어떤 경로를 통하여 apoptosis를 원천적으로 봉쇄하였을 가능성이 있다^{1,25,36,39}.

본 연구에서는 배양한 신경세포에서 저산소증 모델을 이용하여 전통적으로 한의학에서 처방하고 있는 九味清心元의 신경세포 사망방지 효능이 있음을 검증하였다. 또한 사용금지된 犀牛角 石雄黃을 제외하였을 경우 九味清心元의 유효성에 정상산소환경 및 저산소환경에서 변화가 있음을 검증하였다. 이와 같은 연구는 금지약제에 대한 대체방안을 강구하기 위하여 체계적인 효능검증에 필요하다고 생각되며, 약제의 작용기전은 향후 분자생물학적 수준에서 체계적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결론

저자는 九味清心元이 저산소증 유발 소뇌과립세포와 대뇌피질 신경세포에 미치는 효과 및 희귀 동물성약재와 유해 광물성 약제의 규제에 사용할 수 없게 된 犀角 및 石雄黃의 제거에 의한 효능변화를 규명하기 위하여 저산소증 유발 배양신경세포의 생존 정도를 측정하여 다음과 같은 유의한 결과를 얻었다.

1. 九味清心元은 정상 및 저산소환경의 소뇌과립세포 및 대뇌피질 신경세포의 생존율을 유의성 있게 증가시켰다.

2. 九味清心元 去犀角은 소뇌과립세포를 정상산소환경에서 어느 정도 보호하였지만, 저산소환경에서는 유의성 있는 생존율 감소효과를 나타내었다. 대뇌피질 신경세포의 생존율은 정상 및 저산소환경 모두에서 유의성 있는 증가가 없었다.

3. 九味清心元 去石雄黃은 정상 및 저산소환경에서 소뇌과립세포의 생존율을 유의성 있게 증가시키지 못하였고, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도의 정상산소환경에서 약간($p=0.058$) 생존율을 저하시켰다. 대뇌피질 신경세포의 생존율은 10 DIV의 정상 및 저산소환경에서 유의성 있게 증가되었고, 14 DIV의 정상산소환경에서 특별한 효과가 없었으며 저산소환경에서 유의성 있게 증가되었다.

4. 九味清心元 去犀角·石雄黃은 정상산소환경에서 소뇌과립세포의 생존율을 증가시켰으나, 저산소환경에서 특별한 효과가 없는데, 고농도에서는 오히려 유의성 있게 저하시켰다. 대뇌피질 신경세포의 생존율은 정상산소환경에서 유의성 있게 증가되었고, 10 DIV의 저산소환경에서 유의성 있게 증가되었다.

참고문헌

1. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北:旋風出版社. 1975:1-3,25,26.
2. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:醫聖堂.

- 1998:611-6.
3. 윤길영. 동의임상방제학. 서울:명보출판사. 1985:71, 234.
4. 張果. 醫說(付 續醫說). 上海科學技術出版社. 1984:卷 1;10,11.
5. WK Min, YS Kim, JY Kim, SP Park, CK Suh. Atherothrombotic cerebellar infarction vascular lesion-MRI correlation of 31 case. Stroke. 1999;30(11):2376-81.
6. Matti Hillbom, Heikki Numminen, Seppo Juvela. Recent heavy drinking of alcohol and embolic stroke. Stroke. 1999;30(11):2307-12.
7. Thomas Mooe, Bert-Ove Olofsson, Birgitta Stegmayr, Peter Eriksson. Ischemic stroke - Impact of a recent myocardial infarction. Stroke. 1999;30(5):997-1001.
8. Szatkowski M, Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. Trends Neurosci. 1994;17(9):359-65.
9. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron. 1988;1:623-34.
10. Brain Meldrum, John Garthwaite. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. TiPs. 1990;11:379-87.
11. Jan Platenik, Nobuyuki Kuramoto, Yukio Yoneda. Molecular mechanism associated with long-term consolidation of NMDA signals. Life Sciences. 2000;67:335-64.
12. Peter Lipton. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. Physiological reviews. 1999;79(4):1432,1435,1450.
13. Hartley DM, Choi DW. Delayed rescue of N-methyl-D- aspartate receptor-mediated neuronal injury in cortical culture. J. Pharm. Exp. Ther. 1989;250:752-8.
14. 홍석. 牛黃清心元이 백서의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1993.
15. 조태순, 이선미, 이은방, 조성익, 김용기, 신대회, 박대규. 신牛黃清心元의 뇌허혈 및 중추신경계에 대한 약효. 약학회지. 1998;41(6):817-28.
16. 조규선. 牛黃清心元이 중간대뇌동맥 결찰로 유발된

- 뇌허혈 및 배양신경세포를 이용한 저산소증에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2000.
17. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:대성문화사. 1981:171-3.
 18. 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;35:567-76.
 19. Curtis DR, Johnston GAR. Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergeb. Physiol.* 1974;69:98-188.
 20. Olney JW, Sharpe LG. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science.* 1969;166:386-8.
 21. Olney JW, Ho OL, Rhee V. Cytotoxic effects of acidic and sulfur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* 1971;14:61-70.
 22. Olney JW. Inciting excitotoxic cytochrome among central neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1986;203:631-45.
 23. Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *TIPS.* 1990;11:379-87.
 24. Choi DW. Bench to Bedside: the glutamate connection. *Science.* 1992;258:241-3.
 25. Roger T, Balu C, Kimberley H, Joseph T, Paul M, Trevor A, Jon PD. Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals. *J Neurosci* 2000;20(19):7183-92.
 26. DU C, R HU, CA Cseransky, CY HSU, DW Choi. Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996;16:195-201.
 27. Kirino T, A Tamura, K Sano. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 1984;64:139-47.
 28. McGEE-RUSSELL SM, AW Brown, JB Brierly. A combined light and electron microscope study of early anoxic- ischemic cell change in rat brain. *Brain Res.* 1970;20:193-200.
 29. Kirin T, K Sano. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol.* 1984;62:201-8.
 30. Young TH, Huang JH, Hung SH, Hsu JP. The role of cell density in the survival of cultured cerebellar granule neurons. *J Biomed Mater Res.* 2000;52(4):748-53.
 31. Dawson VL, VM Kizushi, PL Huang, SH Snyder, TM Dawson. Resistance to neurotoxicity in primary cultures. *J. Neurosci.* 1993;13:2651-61.
 32. Myers RE. A unitary theory of causation of hypoxic brain pathology. In: S. Fahn, JNDavis, and LP Rowland. *Advances in Neurology. Cerebral Hypoxia and Its consequences.* 1979;26:195-213.
 33. Rothman S. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J. Neurosci.* 1984;4:1884-91.
 34. Lipton P, TS Whittingham. Energy metabolism and brain slice function. In: *Brain Slices*, R. Dingledine. NewYork Academic. 1984:113-54.
 35. Zhou Q, H ABE, TS Nowak. Immunocytochemical and in situ hybridization approaches to the optimization of brain slice preparations. *J. Neurosci. Methods.* 1995;59:85-92.
 36. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;1665(1-2):55-63.
 37. Boutilier, R.G. St-Pierre, J., Surviving hypoxia without really dying. *Comp. Biochem. Physiol.* 2000;126:481-90.
 38. Kenneth JB, Ying Xia, Gabriel GH. Mechanism underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiology.* 2000;62:215-49.
 39. Mary BK. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science.* 2000;290:750-52.