

원 저

# 大柴胡湯이 배양신경세포를 이용한 저산소증에 미치는 영향

김지형, 정승현, 신길조, 문일수<sup>1)</sup>, 이원철

동국대학교 한의과대학 심계내과학교실, 동국대학교 의과대학 해부학교실<sup>1)</sup>

## The Effects of *Daesihotang* Extracts on Hypoxic E18 Cortical Neuroblast

Ji-Hyoung Kim, Seung-Hyun Chung, Gil-Cho Shin, Il-Soo Moon<sup>1)</sup>, Won-Chul Lee

Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University and  
Department of Anatomy, College of Medicine, Dongguk University<sup>1)</sup>

**Objectives :** In acute stage of CVA, many patients experience Bugibultong (腑氣不通症) as a symptom. *Daesihotang* is one of the most useful prescriptions for constipated stroke patients. This study investigated the effects of *Daesihotang* extracts on hypoxic E18 cortical neuroblast.

**Methods :** To evaluate the effect of *Daesihotang* extracts on neuronal death caused by hypoxia the neuronal viability and protein expressions of NMDA receptor subunits,  $\alpha$ CaMK II, PDE2, PSD95, densin-180, eEF-1 $\alpha$  and GFAP were investigated.

**Results :** We guessed that *Daesihotang* extracts worked to protect against cell damage through effecting on the protein expression of PSD(post synaptic density), especially increase of  $\alpha$ CaMK II, eEF-1 $\alpha$ , PDE2, PSD95 and densin-180

**Conclusions :** According to the above results, it is supposed that *Daesihotang* is clinically applicable to stroke patients in the acute stage. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(1):63-77)

**Key Words:** *Daesihotang*, hypoxia, E18 cortical neuroblast, PSD

## 서론

신경세포의 죽음에 관여하는 신경전달물질의 기능과 허혈에 의해 신경 조직내에 일어나는 일련의 상호연쇄 대사과정이 밝혀지고 있는데<sup>1)</sup>, 분자생물학의 발전으로 세포막의 수용체나 이온통로 등의 분자적 구조를 알게되어 신경전달물질에 의한 신호전달 및 세포간 또는 세포내 통신 기전에 대한 이해의 폭

이 넓어지게 되었다<sup>2)</sup>. 최근 저산소성 뇌손상의 기전에 대한 연구에서 저산소성-허혈성 뇌조직으로부터 방출되는 흥분성 신경전달물질 특히 글루탐산이 급격하게 신경세포를 손상시킨다고 알려졌으며, 심정지 후에 산소를 재공급하면 세포막 인지질 부위에 산소에서 발생한 자유라디칼과 관련된 재관류성 손상이 나타날 수 있다고 하였다<sup>3)</sup>. 이 중에서 뇌신경세포 손상을 감소시키기 위한 한 방법으로 신경전달물질에 많은 관심이 집중되고 있다.

한의학에서는 뇌손상에 대한 한약의 유효성 검증은 병태생리학적인 연구를 기초로 중대뇌동맥 폐쇄 후 나타나는 뇌실질의 형태학적 변화<sup>4)</sup>, 전뇌허혈시

· 접수 : 2001년 3월 3일 · 채택 : 3월 16일  
· 교신저자 : 김지형, 서울시 강남구 논현동 37-21 동국대학교 강남한방병원  
(Tel. 02-3416-9791, Fax : 02-3416-9780, E-mail : eyap2000@hanmail.net)

뇌순환대사 개선 효과<sup>8)</sup>, 해마형성체 CA1 지역에서의 지연성 신경세포사에 미치는 영향<sup>9)</sup>, GABA, NOS, NPY, glutamate 등의 신경전달물질에 미치는 영향<sup>10)</sup> 등 다양한 실험기법에 의하여 진행되었다.

본 실험에서 사용한 大柴胡湯은 小柴胡湯과 小承氣湯을 加減하여 이루어진 處方<sup>11)</sup>으로, 그 主治症은 少陽轉屬陽明으로 인한 身熱, 不惡寒反惡熱, 大便堅, 小便赤, 譫語, 腹脹, 寒熱 등이다<sup>11)</sup>. 大柴胡湯과 관련된 연구로는 大柴胡湯加味方이 고혈압 및 고지혈증<sup>12)</sup>과 大柴胡湯이 항경련, 진통, 해열, 혈관확장, 혈압강하, 간보호 등<sup>13)</sup>에 미치는 영향이 있으나, 저산소증에서 연접단백질에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 보고된 바 없었다.

이에 저자는 大柴胡湯이 신경세포사방지에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 배양신경세포에 대한 정상 환경과 저산소환경에서의 大柴胡湯 extract가 연접단백질에 미치는 영향을 면역조직화학법으로 NR2A, NR2B, αCaMKII, PDE2, PSD-95, densin-180, eEF-1α 및 GFAP를 관찰한 결과, 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 약재

大柴胡湯은 東醫寶鑑<sup>14)</sup>에 準하여 동국대학교 한의과대학부속 경주한방병원에서 조제된 것으로, 1첩의 분량은 Table 1과 같다. 大柴胡湯의 제조는 2첩을 증류수 1,000ml에 넣어 2시간동안 전탕한 다음 원심분

리 후 여과하고, 그 여액을 rotary evaporator에서 100 ml로 농축하여 동결 건조한 후 大柴胡湯 추출물 25.64g을 얻었다.

### 2. 방법

#### 1) 신경세포배양과 저산소처리

임신 18일(embryonic day 18: E18)된 흰쥐(Sprague-Dawley계)의 대뇌피질신경세포를 大柴胡湯으로 처리하지 않은 대조군과, 배양 시작과 동시에 각각 50, 100, 500, 1,000 및 5,000 $\mu$ g/ml의 농도로 大柴胡湯을 처리한 실험군으로 나누어 Brewer 등<sup>15)</sup>의 방법에 따라 배양하였다. 임신 18일된 어미쥐를 dry ice가 들어 있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 분리하여 E18의 뇌를 적출하였다. 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 HBSS용액(Hank's Balance Salt Solution, GIBCO BRL, USA) 5ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1ml Hank용액으로 옮기고 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 만든 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 분산된 세포를 모으고 세포수를 측정 한 후 약 4,000 cells/mm<sup>2</sup> 되게 B27을 첨가한 plating Neurobasal media(GIBCO BRL)(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I, 0.1 ml 25mM glutamate, 0.1 ml 25mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 5% CO<sub>2</sub> 배양조에서 배양한다 음 2~3일 간격으로 배양액을 feeding Neurobasal

Table 1. The Amount and Composition of Daesihotang Extracts

Species	Part used	Latin name	Weight(g)
<i>Bupleurum falcatum</i> L.	Roots	<i>Bupleuri Radix</i> (柴胡)	16
<i>Scutellaria baicalensis</i> GEORGI.	Roots	<i>Scutellariae Radix</i> (黃芩)	10
<i>Paeonia lactiflora</i> PALL.	Roots	<i>Paeoniae Radix</i> (芍藥)	10
<i>Rheum coreanum</i> NAKAI.	Roots	<i>Rhei Rhizoma</i> (大黃)	8
<i>Poncirus trifoliata</i> RAPIN.	Ungrown Fruit	<i>Ponciri Fructus</i> (枳實)	6
<i>Pinellia ternata</i> BREIT.	Rhizoma	<i>Pinelliae Rhizoma</i> (半夏)	4
<i>Zingiber officinale</i> ROSC.	Roots	<i>Zingiberis Rhizoma</i> (生薑)	4
<i>Zizyphus jujuba</i> MILL.	Fruit	<i>Jujubae Fructus</i> (大棗)	4
Total	62		

media(100ml Neurobasal, 2ml B27 supplement, 0.25ml glutamax I)로 1/3씩 교환하였다.

저산소처리는 7일 동안 배양한 E18 대뇌피질신경세포를 CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator (Forma Scientific, USA)를 이용하여 98% N<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유도하였다.

2) 대시호탕의 세포독성 및 세포사 방지효과 관찰

大柴胡湯의 세포독성은 각각 Neurobasal 배지에 7일간 배양한 대조군과 실험군의 E18 대뇌피질신경세포를 위상차현미경으로 세포형태를 관찰하고 MTT assay를 이용하여 생존율을 측정하였다.

대시호탕의 세포사 방지효과는 저산소증 유발 후 3일이 경과한 대조군과 실험군의 E18 대뇌피질신경세포를 위와 같은 방법으로 세포형태를 관찰하고 생존율을 측정하였다.

3) MTT assay

MTT assay는 96-well plate에 7일간 배양한 (4,000cell/mm<sup>2</sup>, 100μl medium well) 흰쥐의 E18 대뇌피질신경세포를 이용하였다. 배지를 새로 바꾸어(180 μl) MTT 200 μl를 넣은 후 37℃에서 4시간 동안 배양한 다음 원심분리 후(900 x g, 10분) 용액을 제거하고, ethanol-DMSO(dimethyl sulfoxide)(1:10 용액) 150 μl를 넣고 20분간 진탕하여 formazan 결정을 용해시킨 후 ELISA microplate reader(Sierra Resources International Inc, USA)로 optical density 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 면역세포화학염색

저산소처리 3일 후 배양용기(24 well plate)를 얼음 위에 올려놓고 배양액을 500 μl의 ice-cold D-PBS(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)로 교환해 주었다. D-PBS를 4℃ methanol(500 μl)로 교환하고 5분 정도 후 -20℃ methanol(500 μl)로 다시 교환한 뒤 -20℃에서 20분간 두었다. methanol을 ice-cold D-PBS(500 μl)로 교환하고 15분 후 preblock solution[0.05% triton, 5% normal goat serum in h-PBS(20mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 450mM NaCl)]을 넣고 4℃에서 1시간 처리하였다. 1차 항체(1 : 2,000~5,000)를 넣고 4℃에서 1시간 반응시킨 후, 실온에서 preblock solution으로 20분씩 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase-conjugated 2차 항체(1 : 1,000)를 넣고 다시 1시간 동안 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).

5) 면역염색(immunoblot)

35mm culture dish에 배양한 대뇌신경세포를 수확하여 1 x stop buffer(100 μl/dish)에 넣고 100℃에서 5분간 처리하였다. 각각 20 μg의 단백질을 8% SDS-polyacrylamide 겔 전기영동(SDS-PAGE)하고, nitrocellulose(NC) membrane에 옮겨(100V, 1시간),

**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.

Ponceau S 용액[0.1% (w/v) Ponceau S, 0.1% acetic acid]으로 5분간 염색한 후, 증류수로 탈염색하여 표준분자량의 위치를 확인하였다. NC를 TTBS 용액(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.2% Tween-20, 0.02%  $\text{NaN}_3$ )으로 10분간 세척하고 4℃에서 16~18시간 처리한 후, 1차 항체(1:2,000~5,000)를 넣고 2시간 반응시켰다. NC를 TTBS 용액으로 10분간씩 4회 세척하고, alkaline phosphatase-conjugated 2차 항체(1:2,000)를 넣고 2시간 반응시킨 후 TTBS 용액으로 10분간씩 2회, TBS(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) 용액으로 2회, alkaline phosphatase 완충용액(100mM Tris, pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM  $\text{MgCl}_2$ )으로 한번씩 세척하였다. BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate P-toluedine salt) 및 NBT (p-nitro blue tetrazolium chloride)를 넣고 상온에서 발색시킨 후 증류수로 세척하여 발색을 중지하였다. 정량적 분석은 NIH Scion Image Beta 3b software(Scion, USA)로 immunoblot의 signal을 scan하여 density를 측정하였다.

#### 6) 결과분석

본 실험에서 얻어진 결과의 통계처리와 유의성 검정은 Sigma Plot program 4.0(Sigma, USA)에 의하여 처리하였다.

## 결 과

### 1. 大柴胡湯이 세포독성에 미치는 영향

50 $\mu\text{g/ml}$  농도(concentration of *Daesihotang*, DC50)로 大柴胡湯을 처리한 E18 배양신경세포에서는 vacuole이 형성된 세포가 관찰되었으며, 100 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 vacuole의 크기가 증가한 세포가 흔히 발견되었다(Fig. 1, arrowhead). 또한 1,000 및 5,000 $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 모든 신경세포가 수상돌기가 완전히 없어져 사망한 것으로 추정되었다. 따라서 이후의 실험에서는 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지만 실험대상으로 설정하였다(Fig. 1).

大柴胡湯이 농도별로 첨가된 Neurobasal 배지에 7 DIV 동안 배양한 실험군의 신경세포 생존율을 조사

한 결과, 대조군에 비하여 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$  농도로 大柴胡湯을 처리한 실험군에서는 각각 101.5 $\pm$ 8.1, 97.7 $\pm$ 12.2, 82.7 $\pm$ 1.8%(n=3)의 생존율을 나타내었으며(Fig. 3), 500 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 생존율의 감소는 Mann-Whitney U test에서  $P < 0.05$ 로서 유의한 차이가 있었다(Fig. 3, star).

### 2. 세포사 방지에 미치는 영향

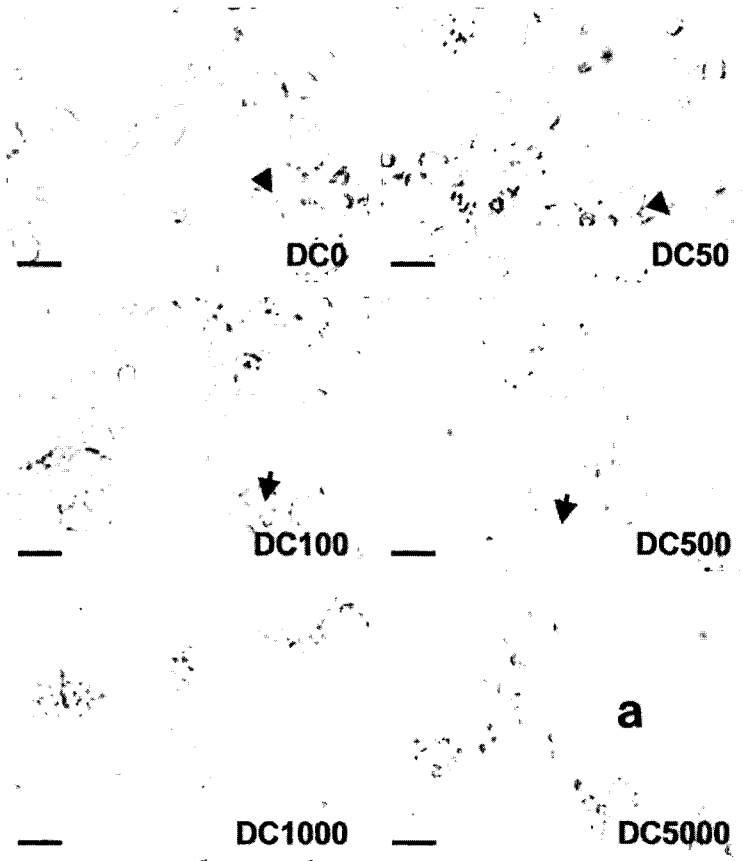
大柴胡湯이 저산소증을 유발한 E18 배양신경세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 이용하여 조사하였다. 위상차현미경으로 신경세포의 형태를 관찰한 결과 大柴胡湯을 50 $\mu\text{g/ml}$  처리한 실험군에서는 작은 vacuole이 일부 세포에서 관찰되었으나(Fig. 2, arrowhead), 대조군에 비하여 형태학적으로 큰 변화를 나타내지 않았고, 100 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 실험군에서는 vacuole이 많이 형성되어 사망한 것으로 추정되는 세포가 흔히 발견되었다(Fig. 2, asterisk).

저산소증을 유발한 배양세포를 MTT assay를 이용하여 생존율을 측정한 결과 大柴胡湯이 첨가되지 않은 대조군에 비하여 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$  농도로 大柴胡湯을 처리한 실험군에서는 각각 98.7 $\pm$ 21.4, 99.0 $\pm$ 29.8, 66.7 $\pm$ 20.1%(n=8)의 생존율을 나타내었다(Fig. 3).

### 3. 연접단백질에 미치는 영향

#### 1) NMDA 수용체의 변화

NMDA 수용체를 구성하는 단백질인 NR2A는 정상산소환경에서 大柴胡湯을 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 실험군과 대조군은 표현에 큰 변화가 없었으나 500 $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 129.6%로 표현이 증가하였다. 그러나 저산소환경에서는 50, 100 $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 실험군은 139.6, 129.8%, 대조군은 137.8, 129.7%로 표현이 증가되기는 하였으나 실험군과 대조군이 큰 차이가 없었다. 500 $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 실험군은 241.8%, 대조군은 161.2%로 실험군이 대조군에 비해 표현이 크게 증가하였다. NMDA 수용체를 구성하는 NR2B 아단위의 경우 정상산소환경에서는 실험군과 대조군이 표현 변화의 차이가 크



**Fig. 1.** Effects of *Daesihotang* 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. Numbers indicate concentrations of *Daesihotang* in micrograms per ml. Empty bar, before compensated with neuronal viability. Filled bar, after compensated with neuronal viability. Numbers, concentration of *Daesihotang*(DC) in  $\mu\text{g/ml}$ .

지는 않았으나, 저산소환경에서는 50, 500 $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 실험군에서 각각 154.7, 163.3%로 표현이 증가하였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 91.6%로 약간 감소하였다(Fig. 4).

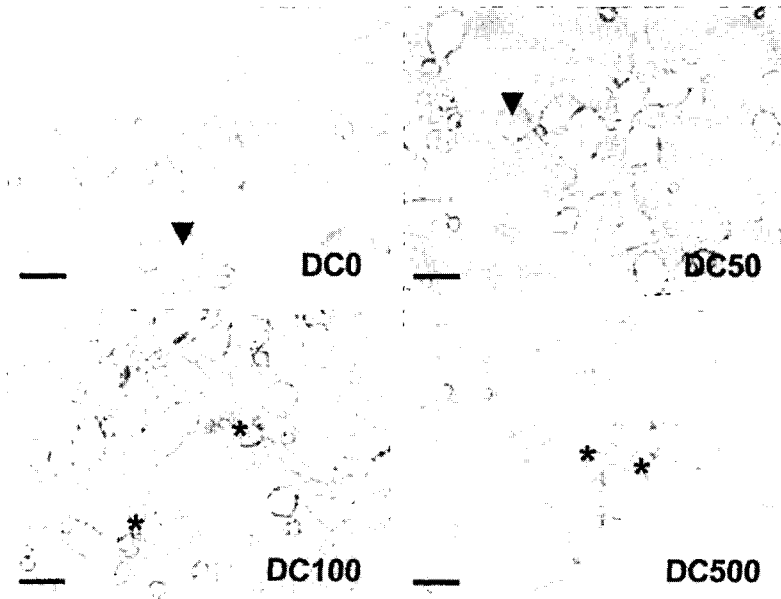
2)  $\alpha\text{CaMKII}$  및 PDE2의 변화

$\alpha\text{CaMKII}$ 는 정상산소환경에서 大柴胡湯에 의한 유의한 변화가 없었다. 그러나 저산소환경에서는 실험군에서 표현이 약간 증가하여 신경세포수를 보정하였을 경우 100 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 72.4%로 표현이 감

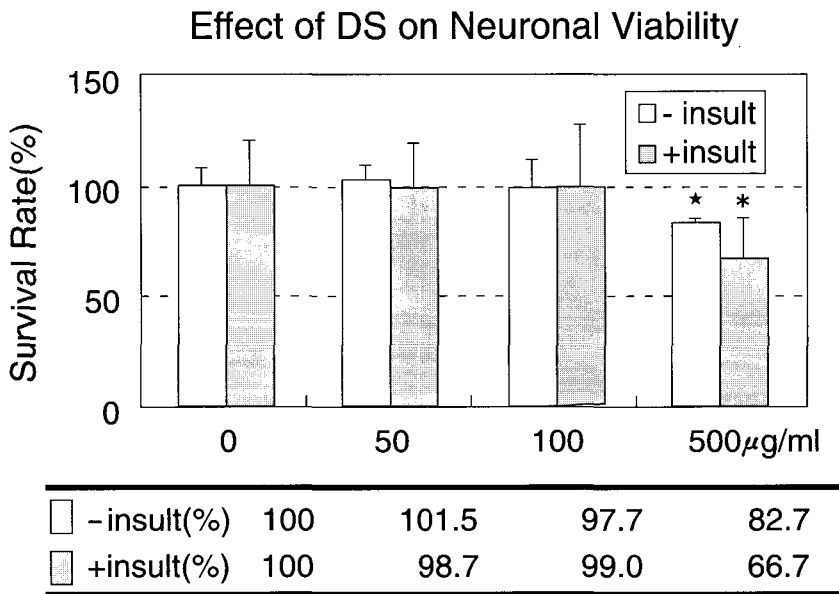
소하였고, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 각각 110.3, 136.4%로 표현이 증가하였다.

PDE2는 정상산소환경 실험군에서는 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 111.0, 122.6, 151.0%로 표현이 증가하였으며, 저산소환경 실험군에서는 50, 500 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 103.8, 133.3%로 표현이 증가하였고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 85.3%로 표현이 약간 감소하였다(Fig. 5).

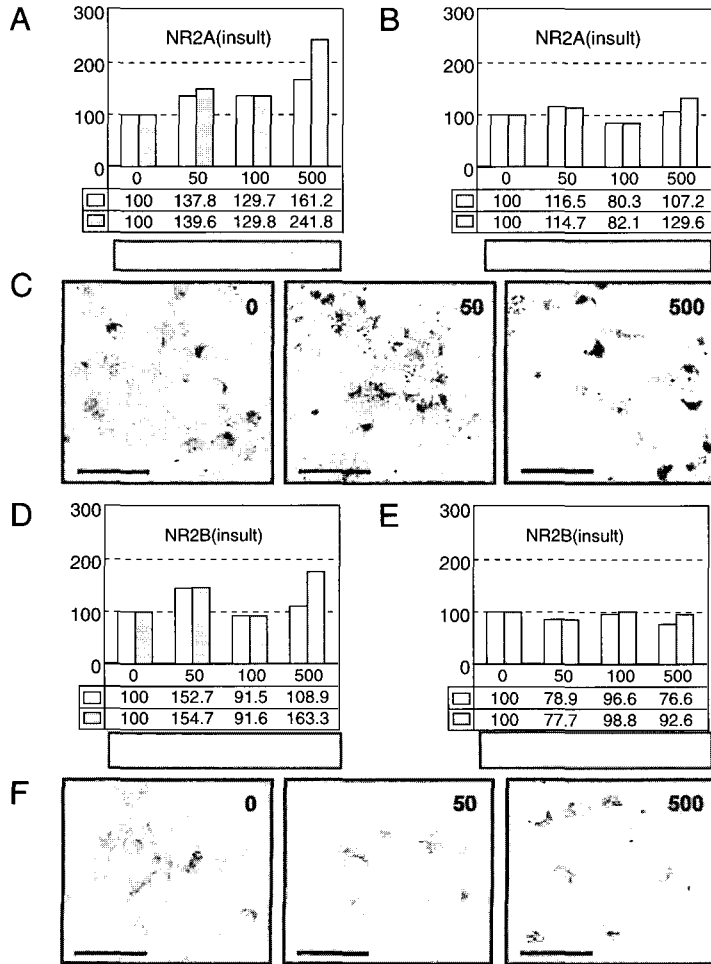
3) PSD-95 및 densin-180의 변화



**Fig. 2.** Effects of *Daesihotang* 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 hrs, 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. Numbers indicate concentrations of *Daesihotang* in micrograms per ml. Bar, 20  $\mu$ m. Numbers, concentration of *Daesihotang* in  $\mu$ g/ml.



**Fig. 3.** Effects of *Daesihotang* 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 hrs, then further incubated in normoxia for 3 days in the Neurobasal medium with various concentrations of *Daesihotang*. 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=8). Star, P<0.05 (n=3). DS, *Daesihotang*.

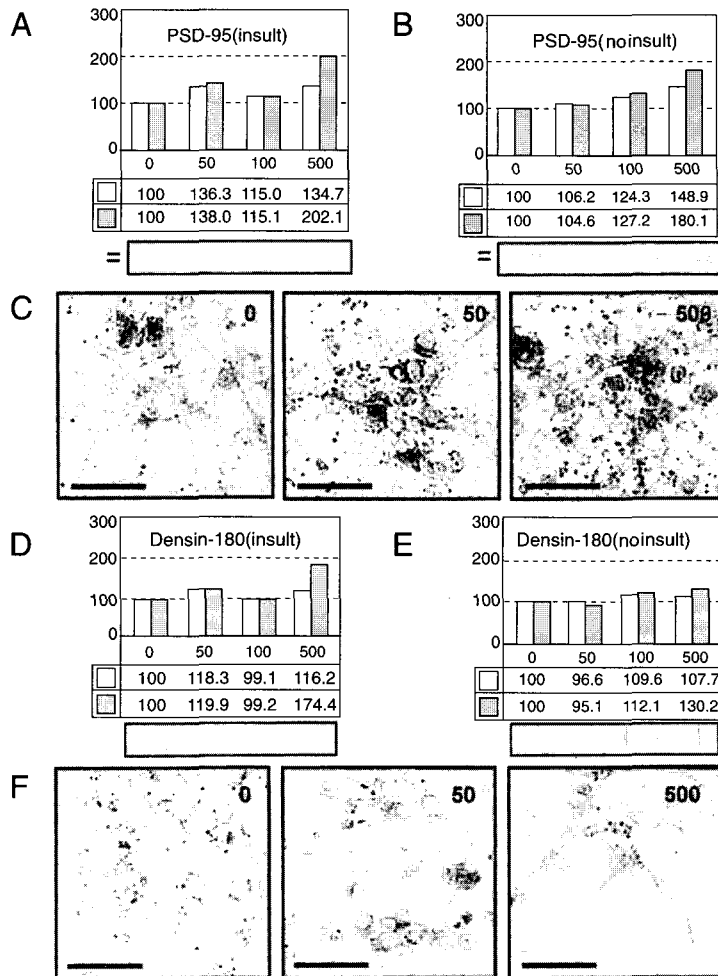


**Fig. 4.** Effects of *Daesihotang* on the protein expression of NMDA receptor subunits. E18 cortical neurons (7 DIV) were shocked in the hypoxia as in Fig. 3, then, returned to normoxia for 3 days. Cells were scraped, solubilized in 1 x gel loading buffer, and electrophoresed in an 8% SDS-polyacrylamide 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 percentages of control. B, NR2B 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 *Daesihotang* in microgram/ml.

PSD-95는 정상 및 저산소환경에서 大柴胡湯에 의하여 표현이 매우 증가하였다. 정상산소환경 실험군에서 大柴胡湯 50, 100, 500 µg/ml 농도에서 각각 104.6, 127.2, 180.1%의 표현증가를, 저산소환경 실험군에서는 각각 138.0, 115.1, 202.1%로 표현이 증가하

였다.

Densin-180의 경우 정상산소환경에서 대조군에 비하여 50µg/ml의 농도에서 95.1%로 약간의 표현감소를, 100, 500 µg/ml 농도에서는 각각 112.1, 130.2%로 표현이 증가하였으며, 저산소환경에서는 100µg/ml에



**Fig. 5.** Effects of *Daesihotang* on the protein expression of PSD-95 and densin-180

E18 cortical neurons (7 DIV) were shocked in the hypoxia as in Fig. 5, 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, PSD-95 immunoblot of the hypoxic sample. The bands were scanned and signal intensities were expressed as percentages of control. 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  $\mu$ m. Numbers, concentration of *Daesihotang* in microgram/ml.

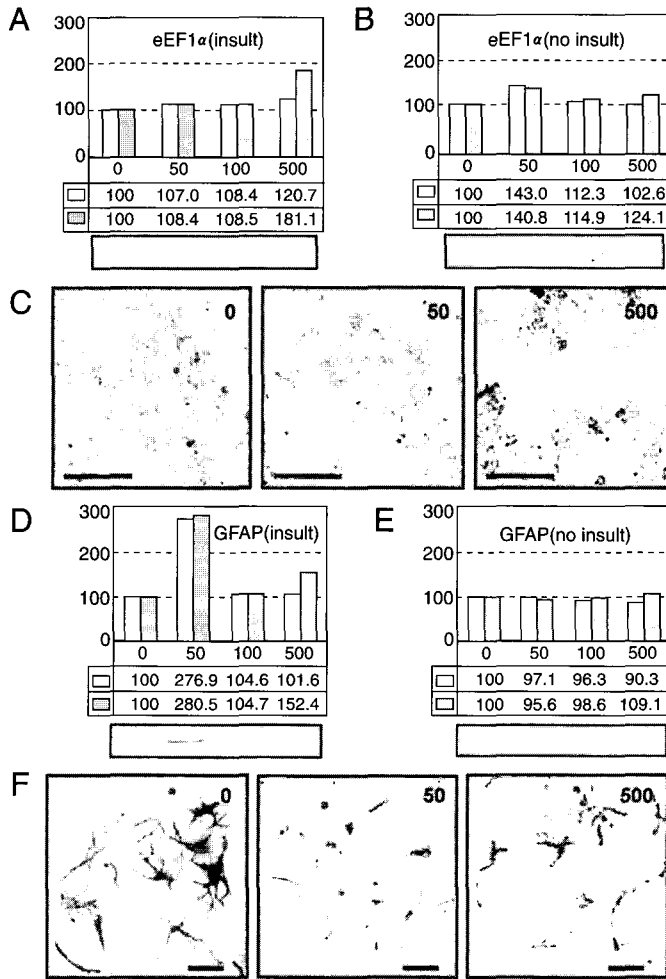
서는 99.2%로 약간의 표현감소를, 50, 500 $\mu$ g/ml의 농도에서는 119.9, 174.4%로 표현이 증가하였다(Fig. 6).

#### 4) eEF-1 $\alpha$ 의 변화

eEF-1 $\alpha$ 는 정상산소환경에서는 표현이 약간 증가하여 실험군 50, 100 및 500  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에

비하여 각각 140.8, 114.9 및 124.1%로 증가하였으며, 저산소환경에서는 50, 100 $\mu$ g/ml 농도에서 각각 108.4%, 108.5%로 대조군의 107.0, 108.4%와 표현의 차이가 거의 없었으나, 500  $\mu$ g/ml에서는 181.1%로 표현이 증가하였다(Fig. 7).





**Fig. 6.** Effects of *Daesihotang* on the protein expression of eEF-1 $\alpha$  and GFAP  
 E18 cortical neurons (7 DIV) were shocked in the hypoxia as in Fig. 5, 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, eEF-1 $\alpha$  immunoblot of the hypoxic sample. The bands were scanned and signal intensities were expressed as percentages of control. B, eEF-1 $\alpha$  immunoblot of the normoxic sample. C, immunocytochemistry of the hypoxic neurons with an eEF-1 $\alpha$  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 $\mu$ m. Numbers, concentration of *Daesihotang* in microgram/ml.

5) GFAP 변화

별야교세포에 특이적으로 표현되는 아교섬유산성 단백질(glial fibrillary acidic protein: GFAP)의 경우 정상산소환경에서는 실험군과 대조군 모두 표현의 변화가 없었으나, 저산소환경에서는 실험군 50, 100,

500 $\mu$ g/ml 농도에서 각각 280.5, 104.7, 152.4%로 표현이 증가하였다(Fig. 7).

### Expression of Synaptic Proteins

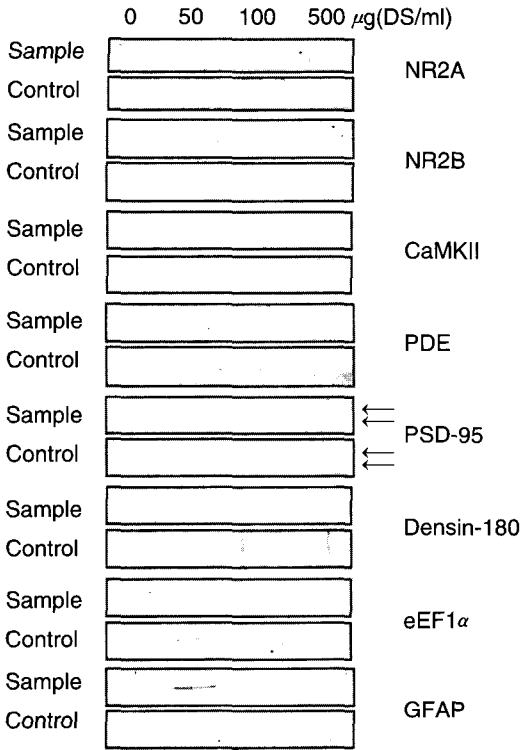


Fig. 7. A summary of immunoblots with antibodies specific to various synaptic proteins with or without hypoxic insults(Treated and Control, respectively). PSD-95 double bands were marked as arrows. Numbers, concentration of *Daesihotang* in microgram/ml.

### 고찰

임상에서 中風 급성기의 많은 환자가 腑氣不通症을 동반하므로 초기에 적절한 通腑瀉下法의 운용이 매우 중요한데<sup>16,17)</sup>, 大小便不利를 해소할 경우 유의성 있는 증상 호전을 관찰할 수 있다<sup>17)</sup>.

급성기 中風환자에서 肝陽暴亢, 痰熱腑實로 大小便閉 등의 熱實證이 나타나는 경우 寒下法이 응용<sup>18)</sup> 되는데, 그 중에서 대표적 처방으로 內瀉熱結, 疏肝解鬱, 和解功裏, 外解少陽 등의 효능이 있는 大柴胡湯을 응용할 수 있다.

아울러 실험 연구를 통해 大柴胡湯方的 혈압강하

작용과 고지혈증 억제효과<sup>19)</sup>, 항경련, 진통, 해열, 혈관 확장, 혈압강하, 간보호 작용이 있음<sup>19)</sup>이 밝혀졌다. 그러나 저산소증에서 신경세포사방지 및 뇌내의 단백질변화에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

허혈과 저산소증은 연접의 기능에 변화를 일으켜 선택적으로 신경세포를 사망하게 한다. 약한 허혈과 저산소는 연접의 기능을 강화하지만 심한 허혈과 저산소 손상은 연접기능을 약화시키고 세포사망을 초래한다. 신경세포사망은 손상 후로부터 3일까지 지연성으로 일어나는데<sup>19)</sup>, 그 기전은 잘 알려져 있지 않다. 일시적 대뇌허혈과 저산소는 세포의 glutamate와 세포내 칼슘의 증가, 유전자 표현의 유도, 자유기의 생성, 단백질 인산화효소의 변화 및 단백질합성의 저해 등을 유발하지만, 허혈과 저산소 환경에서 전반적인 단백질합성의 저해에도 불구하고 일부 단백질은 세포내의 국한된 장소에서 합성이 계속 증가된다. 이는 스트레스 환경에서 신경세포가 살아남기 위하여 정상적인 환경에서의 단백질합성을 중단하고, 스트레스에 대응하는데 필요한 단백질을 만드는 것으로 이해된다.

연접후치밀질(postsynaptic density, PSD)은 연접후 세포막 내면에 존재하는 단백질복합체로서, 효소, 신경전달물질 수용체, 연접신호전달 단백질, 세포접합분자 및 scaffold 단백질 등이 존재한다<sup>20)</sup>. 아직 그 기능이 잘 알려지지 않았지만 PSD는 연접활성에 따른 연접신호전달의 변화, 정보의 저장 등에 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다<sup>20,21)</sup>.

신경해부학적 연구방법중의 하나인 면역조직화학법은 신경전달물질이나 이의 합성에 관련된 효소단백질, 신경조직의 각 세포에만 있는 표지단백질 등 신경세포 내에서 중요한 작용을 하는 물질의 위치와 상태를 알기 위한 방법으로 항원-항체면역반응을 이용한다. 또한 항원의 양이 적을 경우에는 항원-항체 복합체에 대한 2차 항체를 이용하여 이를 증폭시켜 더욱 뚜렷하게 관찰할 수 있다<sup>21)</sup>.

이에 저자는 大柴胡湯이 세포사방지에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 흰쥐의 대뇌피질 신경세포를

배양하여 大柴胡湯의 세포독성과 저산소 처치 후 신경세포의 세포사방지에 대한 효과를 살펴보고, 그 이전에 있어 연접활성의 조절에 관여하는 여러 가지 단백질 및 효소 즉,  $\alpha$ CaMKII, NR2A, NR2B, PSD95, densin-180, eEF-1 $\alpha$ , PDE2, GFAP 등의 분포변화를면역조직화학법을 통해 관찰하였다.

배양한 E18 대뇌피질 신경세포를 통해 大柴胡湯의 세포독성을 조사한 결과 1,000 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서는 대부분의 신경세포가 수상돌기가 완전히 없어져 사망한 것으로 추정되었으며, 大柴胡湯이 첨가된 Neurobasal 배지에 7 DIV 동안 배양한 실험군의 생존율은 大柴胡湯이 첨가되지 않은 대조군과 비교하면 50, 100, 500 $\mu$ g/ml의 大柴胡湯을 처리하였을 때 각각 101.5 $\pm$ 8.1, 97.7 $\pm$ 12.2, 82.7 $\pm$ 1.8%( $P$ <0.05,  $n$ =3, Mann-Whitney U test)의 생존율을 나타내었다. 500 $\mu$ g/ml 농도에서 생존율의 감소는 확률적으로 유의한 차이가 있었다.

大柴胡湯이 첨가된 Neurobasal 배지에 7 DIV 동안 배양한 E18 대뇌피질 신경세포를 98% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>에서 3시간동안 처리하여 저산소증을 유도한 후 정상 산소 환경에서 다시 3일 동안 배양한 후 생존율을 조사한 결과, 50, 100, 500  $\mu$ g/ml 농도로 大柴胡湯을 처리한 실험군이 대조군에 비교하여 각각 98.7 $\pm$ 21.4, 99.0 $\pm$ 29.8, 66.7 $\pm$ 20.1%( $P$ <0.05,  $n$ =8, Mann-Whitney U test)의 생존율을 나타내어 유의한 세포사 방지효과를 나타내지 않았다.

다음으로 면역조직화학법을 통해 大柴胡湯에 의하여 연접단백질들이 어떻게 변화하는지를 관찰하였다.

NMDA 수용체는 높은 칼슘 투과성, 전압의존성 마그네슘 차단, slow gating kinetics를 특징으로 하는 수용체<sup>23)</sup>로, 현재 분자생물학적 방법에 의하여 다섯 개의 아단위 유전자(NR1, NR2A-D)가 존재하는 것으로 밝혀졌으며, NMDA 수용체 아단위 NR1과 NR2의 결합에 의하여 그 특성이 결정되는 것<sup>23)</sup>으로 알려져 있다. NMDA 수용체들을 포함하는 신경연접후 가지돌기(dendrite)의 중요한 구조물이 PSD이며 이들은 연접조절에 관여하며 연접후 세포막에 강력히 부착되어 전자현미경 하에서 전자밀도가 높은 세포골

격단백질의 구조물로 보여진다. PSD에는 NMDA수용체, actin, tubulin, neurofilament, fodrin, MAP2 등과 함께 여러 종류의 단백질 인산화효소가 포함되어 있다<sup>9)</sup>. PSD에 대한 분자적 구성이 정확하게 밝혀지지 않았지만 연접전달의 조절에 중요한 역할을 하는 역동적 구조물로 생각되고 있다<sup>24)</sup>. 그러므로 여러 가지 연접단백질이 大柴胡湯에 의하여 어떻게 변화하는지를 정상 산소환경에서 大柴胡湯을 처리하지 않은 대조군과 大柴胡湯을 농도별로 처리한 실험군, 저산소 환경에서 大柴胡湯을 처리하지 않은 대조군과 大柴胡湯을 농도별로 처리한 실험군으로 나누어 조사하였다.

저산소증을 유발한 배양신경세포의 손상기전을 알아보기 위해 지연성 세포손상의 매개체로서 중요한 역할을 하는 칼슘이온에 특이적 투과성을 갖는 NMDA 수용체 아단위인 NR2A와 NR2B의 활성 정도를 조사하였다. NR2A 및 NR2B는 glutamate 수용체를 구성하는 단백질로서 허혈과 저산소증에서 감소되는 것이 세포사 방지에 도움이 된다는 보고<sup>25)</sup>가 있다. 그리고, NR2A가 결여된 생쥐의 경우 국소 허혈에 의한 뇌손상부위가 현저히 감소하고<sup>25)</sup>, 일시적 대뇌허혈에서 두 아단위의 표현과 기능이 해마의 CA1 및 치상회 부위에서 감소되며<sup>26,27)</sup>, NR2B 특이적 저해제인 eliprodil이 저산소와 허혈에 의한 신경세포 손상을 방지한다<sup>28)</sup>. 본 연구에서 NR2A와 NR2B 아단위는 모두 정상산소환경에서는 大柴胡湯의 처리에 의하여 표현변화가 크지 않았으나, 저산소환경에서는 500 $\mu$ g/ml 농도에서 NR2A의 경우 대조군에 비하여 2.4배, NR2B는 1.6배로 표현이 증가되었다. 이러한 결과는 위의 보고를 살펴볼 때 신경세포 손상방지에 유의한 효과를 나타내지 않는 것으로 나타나 동물실험을 포함한 관련 연구가 필요할 것으로 사료된다.

$\alpha$ CaMKII( $\alpha$ -isoform of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase)는 Ca<sup>2+</sup>에 의해서 활성화되는 효소로서 대뇌의 경우 alpha isoform이 전체 PSD 단백질의 20-30%를 차지한다<sup>29)</sup>. 이 효소는 NMDA 수용체를 통하여 유입된 Ca<sup>2+</sup>에 의하여 활성화되며

연접후 신호전달 단백질 가운데  $Ca^{2+}$ 에 의해서 조절되는 가장 중요한 단백질로 추측된다<sup>30</sup>. 배양한 해마 신경세포에서 과다한 glutamate를 처리하면  $\alpha$ CaMKII의 기능이 반감되며 이러한 감소는  $Ca^{2+}$  ionophore인 ionomycin을 처리하여도 일어난다<sup>31</sup>.  $\alpha$ CaMKII 기능의 감소는 대뇌허혈에서도 일어나며<sup>32</sup>,  $\alpha$ CaMKII를 제거한 생쥐에서는 허혈에 의한 뇌경색 부위의 크기가 크게 증가하는 것으로 보고<sup>33</sup>되었다. 그러므로  $\alpha$ CaMKII는 허혈과 저산소증에 의한 세포 손상의 방지에 필수적인 것으로 해석된다.

본 연구에서 배양신경세포를 이용한 저산소환경에서  $\alpha$ CaMKII의 양이 정상수준으로 유지되었다. 이는 大柴胡湯이 저산소 환경하에서  $\alpha$ CaMKII의 양을 유지시켜 신경세포 손상을 차단하는데 기여할 것으로 사료된다<sup>34</sup>.

한편 大柴胡湯은 정상산소환경에서 Type II (cGMP-stimulated) phosphodiesterase (PDE2)를 증가시키고, 저산소환경에서도 정상수준으로 유지시키던가 약간 증가시켰다. PDE2는 cGMP를 GMP로 바꾸는 효소로서 cGMP에 활성화되는 효소(예, cGMP의 존성 인산화효소)이다. cGMP의 존성 단백질인산화효소는(PKG)는 연접의 활성화에 필수적인 역할을 하는데, 아직 허혈과 저산소증에서의 역할에 대하여는 거의 알려진 바가 없으나, 허혈을 유발하기 전에 약한 허혈을 유발하면 PDE2의 활성이 증가되고, 이에 따라 허혈손상이 감소된다는 보고<sup>35</sup>가 있다. 그러므로 大柴胡湯에 의하여 이 효소가 증가되어 허혈과 저산소증에서 세포사 방지에 도움을 주는 것으로 사료된다.

정상 산소 환경에서 大柴胡湯은 PSD-95의 표현을 매우 증가시켰다. PSD-95는 PDZ domain을 갖는다<sup>36</sup>. PDZ domain은 단백질-단백질 결합을 일으키는 역할을 하여 NR2A 및 NR2B 등 연접신호전달 단백질을 연접에 위치하게 하며, 미세구조를 형성하게 한다<sup>37</sup>. PSD-95의 증가가 저산소환경에서 어떻게 신경세포를 보호하는지는 밝혀지지 않았으나, 저산소환경에 의하여 내재화(endocytosis)된 NMDA 수용체와 결합하여 이 수용체를 격리시키는 것으로 보인다.

세포접합분자 역할을 하는 것으로 추정되는 densin-180도 정상 및 저산소환경에서 大柴胡湯에 의하여 표현이 증가되었는데, 증가된 densin-180이 연접의 미세구조를 안정화시켜 세포사 방지에 도움을 주는 것으로 생각된다.

eukaryotic translation elongation factor 1  $\alpha$ (eEF-1 $\alpha$ )는 펩티드 합성에서 aminoacyl- tRNA를 ribosome에 결합시키는 역할을 하는 단백질합성의 필수인자이다. 정상 및 저산소환경하에서 大柴胡湯은 eEF-1 $\alpha$ 의 표현을 증가시켰다. 허혈과 저산소증에서 glutamate 수용체들의 과다한 활성화에 의하여 일반적인 단백질합성은 저해되지만 스트레스를 극복하기 위한 새로운 단백질은 합성이 유도되는데<sup>38</sup>, 大柴胡湯은 eEF-1 $\alpha$ 를 증가시켜 연접에서 국소적으로 세포사방지에 필요한 단백질의 합성을 유도 또는 증가시킬 것으로 보인다. 한편 eEF-1 $\alpha$ 는 펩티드 합성뿐 아니라 actin bundling을 형성하고 microtubule을 절단하는 활성도 가져 세포골격을 재구성하는 역할을 하는 것<sup>39</sup>으로 알려졌다. 그러므로 大柴胡湯은 저산소환경하에서 연접의 미세구조변화를 조절하는 역할을 할 것으로 생각된다.

별아교세포(astrocyte)는 혈관 및 연질막과 같은 결합조직 구조에 붙어 있고 신경조직 사이에서 지지작용을 한다. 또한 신경원에 탈분극이 일어날 때 세포외액으로 나오는  $K^+$ 을 흡수해 세포외액에  $K^+$  농도가 높아지는 것을 막아주며, 세포외액의 산성도를 조절하는 역할도 한다고 알려져 있다. 또한 손상된 신경조직이 있을 때 증식하여 손상이 확산되는 것을 막아주는 역할도 한다<sup>40</sup>고 생각된다. 아교섬유산성단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP)은 별아교세포의 아교미세섬유를 구성하는데<sup>41</sup> 이들의 증가는 허혈과 저산소증에 의한 뇌손상의 특징적인 병리학적 소견이다<sup>40</sup>. 본 연구에서도 大柴胡湯은 정상산소환경에서는 GFAP의 표현변화가 없었으나, 저산소환경에서는 표현을 크게 증가시켰다. 이는 저산소 손상에 대한 별아교세포의 일반적인 반응인 것으로 생각된다.

이상에서 大柴胡湯을 배양액에 첨가하는 신경세포 배양 모델에서 유의성있는 세포사 방지효과를 관찰

하지는 못하였다. 그러나 신경세포배양 모델에서 大柴胡湯의 세포사 방지효과는  $\alpha$ CaMKII의 유지가 가장 중요한 역할을 할 것이라는 증거를 보였다. 아울러 大柴胡湯이 eEF-1 $\alpha$ , PDE2, PSD95, densin-180의 표현을 증가시켜 연결에서 국소적으로 세포사방지에 필요한 단백질을 합성하고 세포골격의 재구성을 통한<sup>39)</sup> 연결구조의 변화가 허혈과 저산소증에서 세포사 방지에 도움을 주는 것으로 추정할 수 있었다.

## 결론

E18 대뇌피질 신경세포를 배양하여 大柴胡湯의 세포독성과 저산소 처치 후 신경세포에 대한 세포사 방지효과를 살펴보고 그 기전에 있어 신경전달물질, 신경전달물질수용체 및 연결단백질에 미치는 영향에 대하여 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 배양한 E18 대뇌피질 신경세포에서 大柴胡湯의 세포독성을 조사한 결과 1,000 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서는 대부분의 신경세포가 수상돌기가 완전히 없어져 사망한 것으로 추정되었으며, MTT assay를 통하여 생존율을 측정한 결과 500 $\mu$ g/ml 농도에서 82.7 $\pm$ 1.8%(P<0.05, n=3, Mann-Whitney U test)로 나타났다.

2. 大柴胡湯이 첨가된 Neurobasal 배지에 7 DIV 동안 배양한 E18 대뇌피질 신경세포를 저산소증을 유도한 후 정상산소 환경에서 다시 3일 동안 배양한 후 생존율을 조사한 결과 50, 100, 500 $\mu$ g/ml 농도로 大柴胡湯을 처리한 실험군은 대조군에 비교하여 각각 98.7 $\pm$ 21.4, 99.0 $\pm$ 29.8, 66.7 $\pm$ 20.1%(P<0.05, n=8, Mann-Whitney U test)의 생존율을 나타내어 신경세포 보호기능을 관찰할 수 없었다.

3. 大柴胡湯이 연결단백질에 미치는 영향을 immunoblot 분석으로 조사한 결과, 정상산소 환경에서 大柴胡湯을 처리한 실험군은 대조군에 비하여 NR2A, NR2B,  $\alpha$ CaMKII, eEF-1 $\alpha$ , PDE2, PSD-95의 표현이 약간 증가되었으며, 저산소환경에서 大柴胡湯을 처리한 실험군은 대조군에 비하여  $\alpha$ CaMKII는 약간의 표현증가를, NR2A, NR2B, PSD95, eEF-1 $\alpha$ 는 표현이 크게 증가되어 일관된 신경세포 보호기능을 관

찰할 수 없었다.

위의 결과를 살펴볼 때, 大柴胡湯이 유의한 신경세포 보호기능을 나타내지는 않으나 임상에서 中風 급성기 肝氣不通에 유의하게 사용되고 있으므로 향후 동물실험에서 연결단백질에 미치는 영향에 대한 비교검증이 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 이광우, 정희원. 임상신경학. 서울:고려의학. 1997: 393,397,399.
2. Iijima K, Kogure K. Prevention of delayed neural death in gerbil hippocampus by iron channel blockers. Stroke. 1988;19:1003-1007.
3. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia reversible and irreversible type of ischemic cell damage. Prog Brain Res. 1985;63:39-58.
4. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. J Neurosurg. 1992;77(3):337-354.
5. 박경아, 이원택. 의학신경 해부학. 서울:고려의학. 1996:104,127.
6. 해리슨내과학 편찬위원회. 내과학(2). 서울:정담. 1997:2409.
7. 조규선, 이원철, 윤상협. 흰쥐의 중대뇌동맥 폐쇄후 대조환 투여가 대뇌반구 및 시상위축에 미치는 영향. 한방성인병학회지. 1998;4(1):163-175.
8. 정승현, 신길조, 이원철. 六一順氣湯 抽出物이 생쥐의 전뇌허혈에 미치는 影響. 동국대학교 한의학연구소논문집. 1999;7(2):149-154.
9. 정완우. 祛風至寶丹이 Mongolian Gerbil의 가역성 전뇌허혈에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2000.
10. 예경옥, 박치상, 이은주, 송지혜, 김미려, 조정숙, 김영호, 박창국, 양재하. 星香正氣散이 뇌허혈을 유발시킨 백서의 신경전달물질에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000;21(1):116-125.
11. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울:成輔社, 1991:1212-1213.
12. 한승동, 박치상, 박창국, 박순달. 大柴胡湯加味方이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1998;19(2):159-182.

13. 丁海哲. 大柴胡湯의 效能에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1982.
14. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:法仁文化社, 1999:950-953,968.
15. 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.
16. 沈國男, 于振宣, 崔秀梅. 中醫內科臨床新法. 北京:科學技術文獻出版社. 1995:601-603.
17. 김영석. 임상중풍학. 서울:서원당. 1997:431.
18. Busto R, Dietrich WD, Globus MY-T, Valdes T, Scheinberg P, Ginsberg MD, Small differences in intra-ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1987;7:720-738.
19. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982; 239:57-69.
20. Kennedy MB. The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci.* 1997 Jun; 20(6):264-268.
21. Kennedy MB. Signal transduction molecules at the glutamatergic postsynaptic membrane. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998 May;26(2-3):243-257.
22. Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the NMDA receptor. *nature.* 1991;354(6348) :31-37.
23. Monr H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 1994;12(3):529-540.
24. Siekevitz P. The postsynaptic density: a possible role in long-lasting effects in the central nervous system. *proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82(10):3494-3498.
25. 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 Dec 1;18(23):9727-9732.
26. Hsu JC, Zhang Y, Takagi N, Gurd JW, Wallace MC, Zhang L, Eubanks JH. Decreased expression and functionality of NMDA receptor complexes persist in the CA1, but not in the dentate gyrus after transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998 Jul;18(7):768-775.
27. Zhang L, Hsu JC, Takagi N, Gurd JW, Wallace MC, Eubanks JH. Transient global ischemia alters NMDA receptor expression in rat hippocampus: correlation with decreased immunoreactive protein levels of the NR2A/2B subunits, and an altered NMDA receptor functionality. *J Neurochem.* 1997 Nov;69(5):1983-1994.
28. 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 Jan 26;782(1-2):212-218.
29. Miller SG, Kennedy MB. Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. *J Biol Chem,* 1985; 260:9039-4631. Lisman J. The CaMKII hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci.* 1994;17(10):406-412.
30. Lisman J. The CaMKII hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci.* 1994;17(10):406-412.
31. 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.
32. 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 May; 15(3):450-461.
33. Waxham MN, Grotta JC, Silva AJ, Strong R, Aronowski J (1996) Ischemia-induced neuronal damage: a role for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996 Jan;16(1):1-6.
34. Uno H, Kobayashi H, Handa Y, Kabuto M, Kubota T. Alterations of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in ischaemia-induced neuronal death and neuronal protection against ischaemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neurochir (Wien)* 1999;141(3):

- 287-294.
35. 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 Sep;186(1-2):169-175.
  36. Cho KO, Hunt CA, Kennedy MB. The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila discs-large tumor suppressor protein*. *Neuron* 1992;9(5):929-942.
  37. Kornau HC, Seeburg PH, Kennedy MB. Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol* 1997 Jun;7(3):368-373.
  38. Marin 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 May 15;17(10):3445-3454.
  39. Suda M, Fukui M, Sogabe Y, Sato K, Morimatsu A, Arai R, Motegi F, Miyakawa T, Mabuchi I, Hirata D. Overproduction of elongation factor 1alpha, an essential translational component, causes aberrant cell morphology by affecting the control of growth polarity in fission yeast. *Genes Cells* 1999 Sep;4(9):517-527.
  40. Burtrum D, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic brain injury stimulates glial fibrillary acidic protein mRNA and protein expression in neonatal rats. *Exp Neurol* 1994 Mar;126(1):112-118.