

Phospholipase A₂ 藥鍼이 腦虛血을 誘發시킨 흰쥐의 神經傳達物質에 미치는 影響

김성민 · 정태영 · 임성철 · 서정철 · 한상원*

대구한의대학교 한의과대학 침구학교실

The Effect of Phospholipase A₂ Herbal-acupuncture on Neurotransmitters against Middle Cerebral Artery Occulsion Rats.

Sung Min Kim, Tae Young Jung, Seong Cheol Leem, Jeong Chul Seo, Sang Won Han*

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University

This experimental studies were performed in order to prove the effect of Phospholipase A₂(PLA₂) Herbal-acupuncture by using rats that had neuronal damage due to the Middle Cerebral Artery Occulsion(MCAO). We observed the change of extracellular concentrations(μ M) of dopamine, DOPAC, HVA, HIAA, glutamate, aspartate, GABA, glycine, taurine, alanine, and tyrosine as extracted by vivo microdialysis, in the PLA₂ Herbal-acupuncture administrated rats(240~260g, Sprague-Dawley) subjected to the MCAO. The dialysates were extracted three times before the MCAO and six times after the MCAO every 20 minutes, and analysed by highperformance liquid chromatography(HPLC). PLA₂ Herbal-acupuncture significantly inhibited glutamate and tyrosine which are stimulant neurotransmitters at brain ischemia, and it significantly decreased glycine, GABA, taurine, and alanine which are inhibitory neurotransmitters at brain ischemia. PLA₂ Herbal-acupuncture may prevent delayed neuronal death(DND) in selectively vulnerable focal areas of the brain effectively.

Key words : Phospholipase A₂(PLA₂), Herbal-acupuncture, Middle Cerebral Artery Occulsion(MCAO), Neurotransmitters

서 론

腦血管疾患(cerebrovascular disease)은 腦血管의 病理學的 異常에 依해 일어나는 意識障礙와 神經學的인 損傷으로 因한 運動 및 感覺障礙 등을 隨伴하는 症候群을 總稱하는 것으로¹⁾, 生活의 西歐化, stress, 運動不足 그리고 高血壓의 積極的인 治療로 因해 出血性 腦血管疾患보다는 虛血性 腦血管疾患의 發生比率이 漸次 增加하고 있는 趨勢^{2,3)}이다.

血行障礙로 因해 腦虛血이 發生하는 部位의 細胞는 수 초내에 機能障礙가 오고, 수 분이 經過한 後에는 非可逆性 損傷을 입게 된다. 그러나 腦虛血 周邊部(ischemia region)의 細胞는 약간의 代謝障礙가 있다가 일정시간이 經過한 後에는 遲延性 神經細胞死(delayed neuronal death, DND)가 發生하므로 빠른 시기에

治療를 하여야 한다^{4,7)}. 現在 全世界的으로 虛血性 腦組織細胞 損傷 機轉에 關하여 활발하게 研究가 進行되고 있으며, 神經傳達物質들에 對한 많은 部分이 糾明되고 있다. 이러한 研究結果를 土臺로 神經細胞 損傷을 抑制하는 새로운 藥物 開發을 爲해 多角的인 治療方法을 摸索하고 있다.

虛血性 腦血管疾患은 中風의 範疇에 屬하며³⁾, 中風 急性期는 大部分 本虛標實과 上盛下虛證이므로, 治療는 本虛證이 있어도 標實證을 爲主로 治療한다. 急即治其標의 原則에 따라 平肝熄風, 清熱滌痰, 化痰通腑, 活血通絡 등의 治法을 多用하는데, 이 때에는 邪氣가 盛하고 症候가 實하기 때문에 빨리 病邪를 除去하기 爲한 治療로, 清心開竅 蘇醒神志 涼解熱毒의 效能이 있는 藥물을 많이 使用하고 있다⁸⁾.

蜂毒은 꿀벌의 毒囊에 들어있는 約 40여 가지의 有效成分으로 構成된 物質로 蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고, 臨床에서는 鎮痛, 解熱, 消炎, 鎮痙, 免疫 增強 및 抗癌效果 等の 效能이 있는 것으로 알려져 있다^{9,10)}. 蜂毒의 成分 중 phospholipase

* 교신저자 : 한상원, 대구광역시 수성구 상동 165 대구한방병원 침구과

· E-mail : hansw@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2129

· 접수 : 2004/07/13 · 수정 : 2004/08/18 · 채택 : 2004/09/17

A₂(PLA₂)에 대하여 tumor를 억제하는데 相關이 있다고 報告하였으나^{11,12)} 아직까지 中大腦動脈을 閉塞시킨 動物모델을 利用하여 腦虛血過程에서 PLA₂가 神經傳達物質에 미치는 影響에 關한 研究가 부족한 실정이다.

이에 著者は PLA₂ 藥鍼液의 腦卒中 治療機轉을 實驗的으로 研究하기 爲해 人爲的으로 中大腦動脈 閉塞術로 腦虛血을 誘發시킨 흰쥐에게 PLA₂ 藥鍼液을 合谷(LI4)¹³⁾에 注入한 後, 微細透析法(microdialysis) 및 高性能 液體크로마토그래피(HPLC)를 利用하여 腦組織細胞의 神經傳達物質인 mono amine과 amino acid 系列의 含量 變化를 測定하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

실 험

1. 동물 및 재료

1) 동물

動物은 體重 240~260g의 Sprague-Dawley系 雌性 흰쥐(大韓實驗動物센터)를 使用하였고, 물과 펠렛飼料(제일사료 Co., 대전)를 자유롭게 먹도록 하였으며, 飼育室內의 溫度는 21~24℃, 濕度는 40~60%로 維持하였고, 낮과 밤의 週期는 各各 12時間으로 하였으며, 實驗室 環境에 2週間 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

2) 재료

藥鍼液은 Sigma社의 phospholipase A₂를 구입하여 使用하였다.

2. 방법

1) 시약의 조제

본 實驗에 使用된 phospholipase A₂는 주사용 식염수(normal saline)를 가하여 調製하였다.

2) 약침군

흰쥐 8마리를 1個群으로 하여 control group은 腦虛血만 誘發시켰고, sham group은 腦虛血을 誘發시키지 않고, 마취상태에서 같은 부위에 봉합만 하였으며, tail group은 주사용 식염수(normal saline) 0.2ml을 꼬리에 注入하였다. 그리고 合谷(LI4)에 相應하는 實驗動物의 體表 上의 兩側 穴位에 saline group은 주사용 식염수(normal saline)를, sample group은 PLA₂ 藥鍼液을 各各 0.1ml(0.5mg/kg)씩 1回 注入하였다.

3) 미세투석법¹⁴⁾

흰쥐에 sodium pentobarbital(50mg/kg)을 腹腔注射하여 麻酔시킨 後 stereotaxic 手術臺에 固定시켜 頭皮를 切開하였다. 顯微鏡을 利用하여 lambda와 bregma를 基準으로 線組體의 coordinate Ap +0.5, L 3.5, DV -4.5의 位置에 microdialysis probe 設置를 爲한 guide cannula를 設置하였다. Stereotaxic 方法으로 手術을 마친 實驗群은 一週日동안의 恢復期를 지난 後, guide cannula를 通하여 微細透析法을 爲한 microdialysis probe(CMA/11, shaft length : 14mm, dimension : 0.24×3mm, Sweden)를 插入하고, microdialysis system에 連結시켰다. Microdialysis injection pump(CMA/100, Sweden)를 利用하여

1.5μl/min의 流速으로 人工腦脊髓液을 probe에 灌流하였다. 人工腦脊髓液(CSF)은 NaCl 8.66g, KCl 0.224g, CaCl₂·2H₂O 0.206g, MgCl₂·6H₂O 0.163g의 500ml 溶液과 Na₂HPO₄·H₂O 0.214g, NaH₂PO₄·H₂O 0.0054g의 500ml 溶液을 混合하여 만들었다. Bowl cage속의 흰쥐가 자유로이 움직이는 狀態에서 腦의 線組體內의 分析物質을 probe 말단의 半透過性膜의 擴散原理에 依하여 細胞外液을 取하였다. 腦虛血 誘發 前에 20分間隔으로 3回 微細透析液을 取하여 그 平均値를 baseline으로 하였으며, 腦虛血 誘發 後 역시 20分間隔으로 6回 微細透析液을 取하여 中大腦動脈閉塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 前後의 微細透析液을 HPLC(high performance liquid chromatography)를 利用하여 分析하였다.

4) 중대뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO)에 의한 흰쥐의 뇌허혈 유발¹⁵⁾

正常群을 除外한 흰쥐를 N₂O(70%)/O₂(30%)와 混合된 3% isoflurane으로 吸入 麻酔시킨 後, 頸部를 切開하여 右側 總頸動脈과 外頸動脈을 結紮하였다. 15分동안 動物을 安定시킨 後, 外頸動脈을 조금 자르고 0.25mm直徑의 nylon monofilament를 內頸動脈쪽으로 約 17mm程度 밀어 넣어 中大腦動脈을 閉塞하였다. 切開된 部位를 縫合한 後 麻酔에서 恢復시켰는데, 手術 및 麻酔 恢復期間동안 溫度調節裝置를 利用하여 直腸內 溫度를 37℃로 維持시켰으며, 腦虛血이 誘發된 흰쥐를 곧바로 microdialysis system에 連結시켰다.

5) HPLC를 이용한 생화학적 분석

(1) Mono Amine 정량법¹⁶⁾

分析하고자 하는 mono amine系의 dopamine, DOPAC(dihydroxy-phenylacetic acid), HVA(homovanillic acid), HIAA(hydroxy indole acetic acid)의 standard를 만들기 爲해 各各의 試藥(Sigma Co., U.S.A.)을 PCA에 溶解시켜서 혼합한 後, 최종 50nM의 外部 標準溶液을 만들었다. 定量하기 爲한 mono amine 10μl를 HPLC(Model 5200A, Guard cell:+400mV, Electrode:-100mV, Electrode:+320mV)를 利用하여 分析하였다. Mobile phase의 造成은 75mM sodium dihydrogen phosphate, 1.7mM OSA, 25μM EDTA, 10% acetonitrile, 0.001% triethylamine, pH 3.0으로 맞추었다. HR-80 column(80×4.6mm, 3μm)을 利用하여 이동상을 1.0ml/min의 流速으로 흘렸다.

(2) Amino acids 정량법¹⁶⁾

分析하고자 하는 Amino acid(Glutamate, Aspartate, Glycine, GABA, Taurine, Alanine, Tyrosine)의 standard를 만들기 爲해 各各의 試藥(Sigma Co.)을 CSF에 溶解시켜서 各各 10μM씩 採取하여 같은 用量으로 섞어서 各各 1.43μM의 外部 標準溶液을 만들었다. 各各의 amino acid를 HPLC로 分析하기전 2分間 螢光誘導化 過程을 거쳤다. 螢光誘導體를 만들기 爲해서는 OPA(O-phthaldehyde) 27mg을 1ml의 methanol에 녹여서 5μl의 β-mercaptan과 0.1M의 sodium tetraborate 9ml을 mixing하여 HCl과 NaOH를 pH 9.3으로 맞추는 後, 遮光하여 서늘한 장소에 보관해 두었다.

HPLC로 定量分析하기 24時間 前에 準備하여 놓은 OPA/β

ME溶液 1ml와 0.1M sodium tetraborate 3ml을 섞어서 working solution을 만들었다. 定量하기 위한 amino acids 15 μ l와 working solution 5 μ l를 mixing한 후, 15 μ l를 HPLC(Waters 474 Scannind Fluorescence Detector, Waters Model 510 Pump, Waters Model U6K)을 이용하여 分析하였다. Mobile phase의 組成은 0.1M Na₂HPO₄ 700ml와 methanol 30ml를 mixing하여 H₂PO₄溶液으로 pH 6.0으로 맞추었다. 1.2ml/min 流速으로 이동상이 나타나게 하였고, column은 4.6 \times 150mm 5 μ l Spherisorb (Waters Co.)를 利用하였다. Pump의 壓力調節과 retention time 및 理想的인 分離를 위해 temperatrue controler를 利用하여 column의 溫度를 30 $^{\circ}$ C로 맞추어서 分析하였다.

3. 통계처리

實驗結果의 統計的 有意性은 ANOVA(One-Way Analysis of Variance)와 post-hoc LSD(Least Significant Difference) test(17)를 利用하여 檢證하였으며, P<0.05 水準인 것을 有意하다고 認定하였다.

성 적

1. Dopamine 함량 변화

Sample 群의 base line dopamine 含量은 11.6 \pm 3.0(100) μ M이었고, MCAO 施術後 F1, F2, F3, F4, F5, F6의 dopamine 含量은 各各 528.3 \pm 167.0(8276.8 \pm 3191.1), 418.3 \pm 138.8(5246.7 \pm 2473.8), 218.3 \pm 105.7(2353.8 \pm 1020.7), 28.0 \pm 19.7(397.8 \pm 179.4), 32.2 \pm 24.2(298.2 \pm 173.1) 및 64.7 \pm 58.1(689.7 \pm 521.6) μ M로 F3, F4, F6은 tail 群에 비하여 有意性(P<0.05)있게, F5는 Tail 群에 비하여 매우 有意性(P<0.01)있게 감소하였으며, F3, F4는 saline 群에 비하여 有意性(P<0.05)있게 감소하였으며, control 群에 비하여 F4는 有意性(P<0.05)있게, F5, F6은 현저하게 有意性(P<0.01)있는 감소를 보였다(Fig. 1).

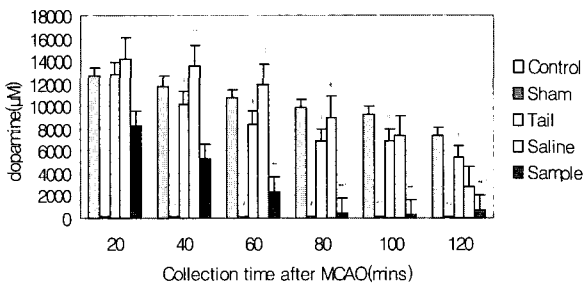


Fig. 1. Effect of Phospholipase A₂ on extracellular levels of dopamine in MCAO rats. The concentration(nM) of extracellular dopamine at the right striatum of rats subjected to MCAO, which was collected three times before MCAO(baseline) and six times after MCAO at 20 mins intervals in rat and analyzed by HPLC. a) : Mean \pm Standard Error Numbers in parenthesis are relative values to baseline. # : Statistically significant as compared with control group (# : P < 0.05, ## : P < 0.01) \$: Statistically significant as compared with sham group (\$: P < 0.05, \$\$: P < 0.01) * : Statistically significant as compared with tail group (* : P < 0.05) + : Statistically significant as compared with saline group (+ : P < 0.05)

2. DOPAC 함량 변화

Sample 群의 base line DOPAC 含量은 569.6 \pm 189.8(100) μ M 이었고, MCAO 施術後 F1, F2, F3, F4, F5, F6의 DOPAC 含量은 各各 416.6 \pm 190.6(93.9 \pm 30.0), 479.2 \pm 143.8(115.9 \pm 30.8), 486.3 \pm 138.4(126.8 \pm 39.9), 446.3 \pm 145.7(135.5 \pm 61.7), 424.0 \pm 145.6(76.3 \pm 13.5) 및 190.0 \pm 69.4(57.7 \pm 10.6) μ M로 F2는 control 群에 비하여 有意性(P<0.05)있게 증가하였다(Fig. 2).

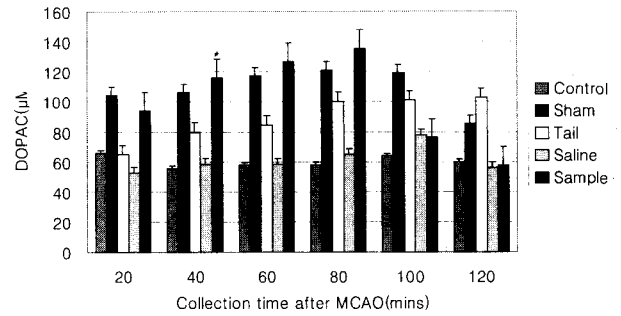


Fig. 2. Effect of Phospholipase A₂ on extracellular levels of DOPAC in MCAO rats. The concentration(nM) of extracellular DOPAC at the right striatum of rats subjected to MCAO, which was collected three times before MCAO(baseline) and six times after MCAO at 20-mins intervals in rat and analyzed by HPLC. a) : Mean \pm Standard Error Numbers in parenthesis are relative values to baseline. # : Statistically significant as compared with control group (# : P < 0.05)

3. HIAA 함량 변화

Sample 群의 base line HIAA 含量은 2349.2 \pm 511.1(100) μ M 이었고, MCAO 施術後 F1, F2, F3, F4, F5, F6의 HIAA 含量은 各各 1223.7 \pm 216.1(64.3 \pm 13.7), 1415.3 \pm 262.9(66.7 \pm 7.9), 1489.3 \pm 358.3(66.6 \pm 6.9), 1453.7 \pm 468.9(67.9 \pm 6.1), 1679.2 \pm 436.5(73.9 \pm 7.1) 및 1249.7 \pm 487.0(67.9 \pm 12.1) μ M으로 有意性있는 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

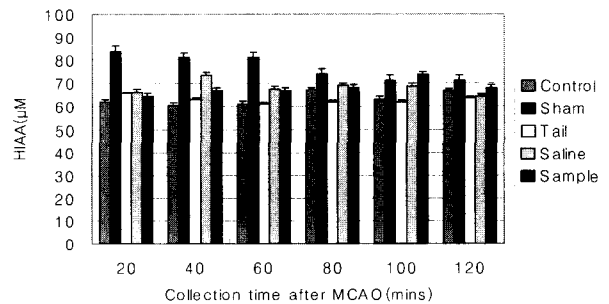


Fig. 3. Effect of Phospholipase A₂ on extracellular levels of HIAA in MCAO rats. The concentration(nM) of extracellular HIAA at the right striatum of rats subjected to MCAO, which was collected three times before MCAO(baseline) and six times after MCAO at 20-mins intervals in rat and analyzed by HPLC. a) : Mean \pm Standard Error Numbers in parenthesis are relative values to baseline.

4. HVA 함량 변화

Sample 群의 base line HVA 含量은 1408.5 \pm 146.2(100) μ M이었고, MCAO 施術後 F1, F2, F3, F4, F5, F6의 HVA 含量은 各各 900.9 \pm 128.2(64.7 \pm 6.7), 980.7 \pm 156.6(71.6 \pm 9.0), 1013.0 \pm 167.1

(73.4±9.1), 985.4±154.9(74.1±8.5), 1119.1±166.6 (81.3±8.6) 및 1131.5±220.0(80.2±8.4)μM으로 F1은 sham 群에 비하여 有意性(P<0.05)있게 증가하였고, F2, F6은 control 群에 비하여 有意性(P<0.05)있게 증가하였다(Fig. 4).

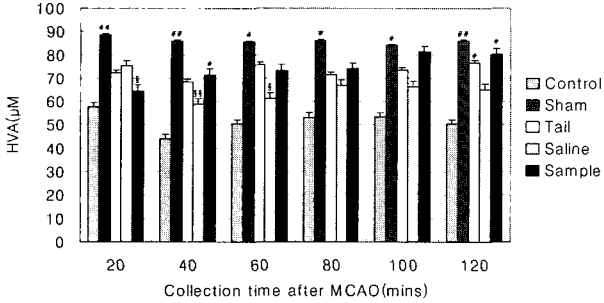


Fig. 4. Effect of Phospholipase A₂ on extracellular levels of HVA in MCAO rats. The concentration(μM) of extracellular HVA at the right striatum of rats subjected to MCAO, which was collected three times before MCAO(baseline) and six times after MCAO at 20-mins intervals in rat and analyzed by HPLC. a) : Mean ± Standard Error Numbers in parenthesis are relative values to baseline. # : Statistically significant as compared with control group (# : P < 0.05, ## : P < 0.01) \$: Statistically significant as compared with sham group (\$: P < 0.05,\$\$: P < 0.01)

5. Glutamate 함량 변화

Sample 群의 base line glutamate 含量은 2.6±0.44(100)μM이었고, MCAO 施術後 F1, F2, F3, F4, F5, F6의 glutamate 含量은 각각 6.8±1.97(284.9±88.7), 5.3±2.34(190.7±62.9), 70±3.75(136.3±29.7), 9.0±5.78(167.7±38.1), 10.4±5.85(175.0±23.5) 및 17.7±8.56(155.8±70.5)μM로 control 群에 비하여 F1, F5, F6은 有意性(P<0.05)있게, F2, F3, F4는 현저하게 有意性(P<0.01)있는 감소를 보였다(Fig. 5).

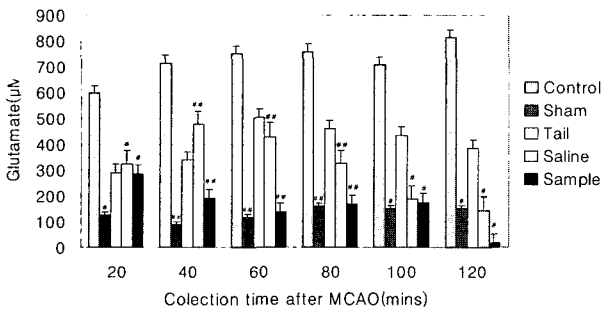


Fig. 5. Effect of Phospholipase A₂ on extracellular levels of glutamate in MCAO rats. The concentration(μM) of extracellular glutamate at the right striatum of rats subjected to MCAO, which was collected three times before MCAO(baseline) and six times after MCAO at 20-mins intervals in rat and analyzed by HPLC. a) : Mean ± Standard Error Numbers in parenthesis are relative values to baseline. # : Statistically significant as compared with control group (# : P < 0.05, ## : P < 0.01)

6. Aspartate 함량 변화

Sample 群의 base line aspartate 含量은 0.9±0.2(100)μM이었고, MCAO 施術後 F1, F2, F3, F4, F5, F6의 aspartate 含量은 각각 3.0±1.6(291.2±30.1), 1.8±0.5(291.4±190.7), 2.7±0.9(330.6±91.3),

5.0±1.7(259.8±76.7), 4.4±1.8(231.2±96.6) 및 4.2±1.4(281.0±126.6)로 유의한 차이는 없었다(Fig. 6).

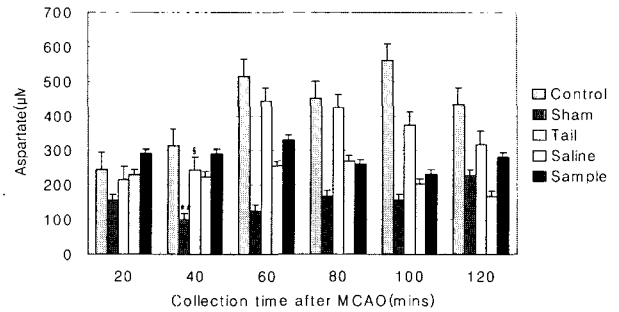


Fig. 6. Effect of Phospholipase A₂ on extracellular levels of aspartate in MCAO rats. The concentration(μM) of extracellular aspartate at the right striatum of rats subjected to MCAO, which was collected three times before MCAO(baseline) and six times after MCAO at 20-mins intervals in rat and analyzed by HPLC. a) : Mean ± Standard Error Numbers in parenthesis are relative values to baseline. # : Statistically significant as compared with control group (## : P < 0.01) \$: Statistically significant as compared with sham group (\$: P < 0.05)

7. GABA 함량 변화

Sample 群의 base line GABA 含量은 0.2±0.1(100)μM이었고, MCAO 施術後 F1, F2, F3, F4, F5, F6의 GABA 含量은 각각 30.8±14.6(8366.5±4661.0), 38.0±20.1(13682.7±6729.2), 22.9±12.7(10977.3±5895.1), 15.7±11.1(2726.0±1842.0), 22.2±16.3(2834.0±1877.2) 및 27.0±17.5(3426.4±2936.3)μM로 F2는 tail 群에 비하여, F3, F4는 control 群에 비하여 有意性(P<0.05)있게 감소하였으며, F5, F6은 control 群에 비하여 현저하게 有意性(P<0.01)있는 감소를 보였다(Fig. 7).

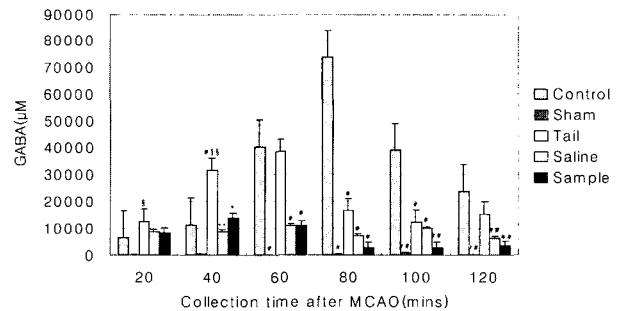


Fig. 7. Effect of Phospholipase A₂ on extracellular levels of GABA in MCAO rats. The concentration(μM) of extracellular GABA at the right striatum of rats subjected to MCAO, which was collected three times before MCAO(baseline) and six times after MCAO at 20-mins intervals in rat and analyzed by HPLC. a) : Mean ± Standard Error Numbers in parenthesis are relative values to baseline. # : Statistically significant as compared with control group (# : P < 0.05, ## : P < 0.01) \$: Statistically significant as compared with sham group (\$: P < 0.05,\$\$: P < 0.01) * : Statistically significant as compared with tail group (* : P < 0.05)

8. Glycine 함량 변화

Sample 群의 base line glycine 含量은 1.3±0.5(100)μM이었고, MCAO 施術後 F1, F2, F3, F4, F5, F6의 glycine 含量은 각각 8.2±4.3(357.3±125.5), 11.0±7.7(314.8±88.8), 12.3±6.9(599.3±339.3),

9.7±4.8(158.0±1902.0), 11.5±4.9(428.5±158.3) 및 14.9±6.4(356.0±108.0)μM로 control 군에 비하여 F5와 F4, F6는 각각 매우 有意性(P<0.01, P<0.001)있게 감소하였다(Fig. 8).

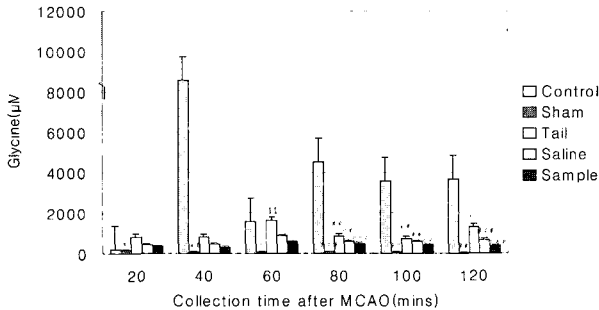


Fig. 8. Effect of Phospholipase A₂ on extracellular levels of glycine in MCAO rats. The concentration(μM) of extracellular glycine at the right striatum of rats subjected to MCAO, which was collected three times before MCAO(baseline) and six times after MCAO at 20-mins intervals in rat and analyzed by HPLC. a) : Mean ± Standard Error Numbers in parenthesis are relative values to baseline. # : Statistically significant as compared with control group (# : P < 0.05, ## : P < 0.01, ### : P < 0.001) § : Statistically significant as compared with sham group (§ : P < 0.05, §§ : P < 0.01)

9. Taurine 함량 변화

Sample 군의 base line taurine 함량은 19.4±9.4(100)μM이었고, MCAO 施術後 F1, F2, F3, F4, F5, F6의 taurine 함량은 각각 67.2±11.7(821.6±360.0), 69.9±11.6(949.4±472.8), 74.5±11.2(1040.1±537.9), 67.0±12.1(934.3±524.8), 68.6±11.1(908.4±397.9) 및 69.0±12.8(498.4±146.6)μM로 F6은 control 군에 비하여 有意性(P<0.05) 있게 감소하였다(Fig. 9).

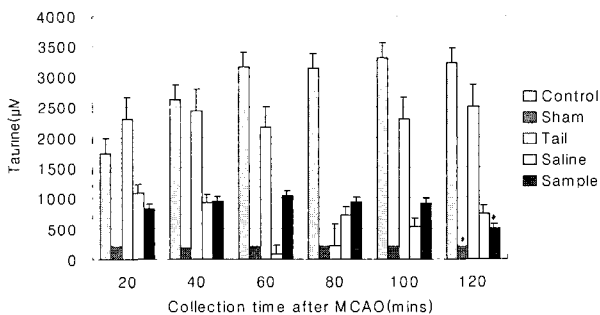


Fig. 9. Effect of Phospholipase A₂ on extracellular levels of taurine in MCAO rats. The concentration(μM) of extracellular taurine at the right striatum of rats subjected to MCAO, which was collected three times before MCAO(baseline) and six times after MCAO at 20-mins intervals in rat and analyzed by HPLC. a) : Mean ± Standard Error Numbers in parenthesis are relative values to baseline. # : Statistically significant as compared with control group (# : P < 0.05)

10. Tyrosine 함량 변화

Sample 군의 base line tyrosine 함량은 0.8±0.2(100)μM이었고, MCAO 施術後 F1, F2, F3, F4, F5, F6의 tyrosine 함량은 각각 1.6±0.4(183.3±19.6), 1.6±0.5(207.8±71.9), 1.5±0.4(203.7±67.7), 4.9±2.3(252.3±94.2), 5.3±2.4(327.2±78.9) 및 4.0±1.1(294.5±103.2)μM로 F1, F2, F5는 control 군에 비하여 有意性(P<0.05)있게, F3은

control 군에 비하여 현저하게 有意性(P<0.01)있는 감소를 보였다(Fig. 10).

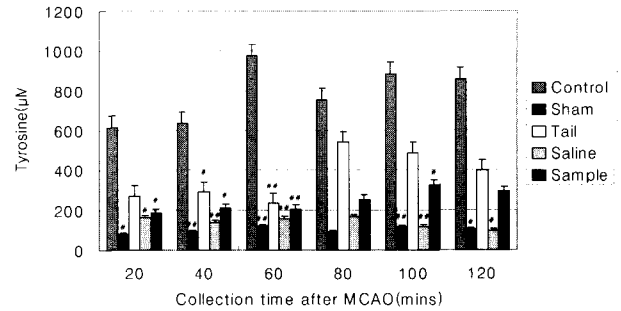


Fig. 10. Effect of Phospholipase A₂ on extracellular levels of tyrosine in MCAO rats. The concentration(μM) of extracellular tyrosine at the right striatum of rats subjected to MCAO, which was collected three times before MCAO(baseline) and six times after MCAO at 20-mins intervals in rat and analyzed by HPLC. a) : Mean ± Standard Error Numbers in parenthesis are relative values to baseline. # : Statistically significant as compared with control group (# : P < 0.05, ## : P < 0.01)

11. Alanine 함량 변화

Sample 군의 base line alanine 함량은 0.4±0.1(100)μM이었고, MCAO 施術後 F1, F2, F3, F4, F5, F6의 alanine 함량은 각각 6.2±3.1(378.0±105.3), 4.3±2.7(232.1±42.7), 8.1±5.3(295.6±87.3), 9.9±5.9(491.0±186.8), 15.0±8.4(737.7±306.4) 및 14.9±7.2(410.8±237.5)μM로 F2, F4는 control 군에 비하여 有意性(P<0.05)있게 감소하였다(Fig. 11).

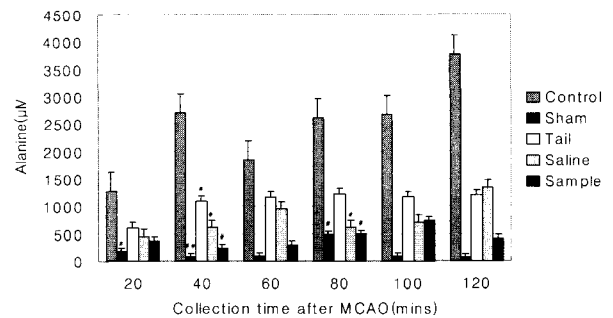


Fig. 11. Effect of Phospholipase A₂ on Extracellular Levels of alanine in MCAO Rats. The concentration(μM) of extracellular alanine at the right striatum of rats subjected to MCAO, which was collected three times before MCAO(baseline) and six times after MCAO at 20-mins intervals in rat and analyzed by HPLC. a) : Mean ± Standard Error Numbers in parenthesis are relative values to baseline. # : Statistically significant as compared with control group (# : P < 0.05, ## : P < 0.01)

고찰

봉독의 여러 성분 중 PLA₂는 봉독 enzymes의 主要成分으로 세포막 구성물질인 phospholipid의 2nd B부위에 결합하는 지방산을 가수분해하는 촉매효소로서 間接的 分解酵素로 作用하여 Phospholipid의 細胞膜을 分解하고, 다른 細胞膜 融解酵素의 作用을 誘導함으로 脂肪酸의 分解에 最初의 連鎖反應을 誘導하는 物質이 된다. PLA₂의 반응에 의해 형성된 산물은 강력한 세포막

활성물질로서 모든 세포를 둘러싸고 있는 지질의 이중구조에 영향을 미치고 또한 세포상호간의 작용을 가능케 한다. 이러한 생화학적 세포막구조의 파괴는 PLA₂와 같은 효소에 의해 광범위하게 이루어지며 PLA₂에 의해 형성된 phosphoglycerides는 계속 파괴되어 새로운 합성분자로 대체되어진다. PLA₂는 세포막의 투과성을 증가시키고, 혈소판의 응집을 억제하고 백혈구 및 내피세포의 작용을 변화시킨다¹⁸⁾. 또한 PLA₂는 용혈작용에서 Melittin과 상승적으로 작용하여 서로의 활성성을 증가시켜 준다¹⁹⁾. 그 외에 Nethery D²⁰⁾에 의하면 횡격막의 mitochondria의 ROS(reactive oxygen species)의 형성은 PLA₂에 의지한다고 하였고, Wu YL²¹⁾에 의하면 TNF(중양괴사인자)에 의한 세포술의 PLA₂의 활성화는 세포를 사망에 이르게하는 경로에 신호를 보내는 중요한 요소라고 하였다.

현재까지 알려진 神經傳達物質은 약 60가지 정도이며, 一般적으로 神經傳達物質은 3가지로 分類할 수 있다. Amino acid系 傳達物質은 I型, amine系는 II型, peptide系는 III型으로 分類한다. 特히 amino acid系는 Glutamate, Aspartate, GABA, Glycine, Taurine 등으로 빠른 作用을 나타내는 ion向性 傳達物質이고, 腦虛血時 神經末端에서 分泌된 後 腦組織液에 吸收되어 인접 뉴런에 興奮性 또는 抑制性으로 作用한다. Amine系는 比較的 느린 作用을 하는 代謝向性 傳達物質이며, peptide系는 아직 자세한 機能은 밝혀지지 않았으나, 神經傳達物質의 役割을 하기도 하고, 다른 神經傳達物質의 效果를 調節해 주는 調節者 役割을 하기도 한다.

病理的으로 腦虛血時 神經傳達物質은 神經細胞에 障害을 일으키는데, 虛血 後 아직 energy 代謝가 恢復되지 않은 時期의 神經細胞 障害에 對한 경우와 血流再開 後 一定時間이 經過한 狀態에서 認定되는 遲發性 神經細胞 現狀에 對한 것으로 區分할 수 있다²²⁾.

非可逆的인 腦神經細胞의 損傷機轉을 살펴보면, 腦血管의 閉鎖로 虛血狀態가 되면 細胞膜의 安全性이 消失되어 細胞內에 Na⁺, Ca²⁺이 流入되고, 細胞外에 K⁺이 增加되는 脫分極(depolarization)現狀이 일어난다. 大腦血流가 6-8mL/100g/min으로 되면 ATP가 현저히 消盡되고, 細胞가 酸化되어 수 시간 후에는 組織學的 壞死로 빠진다. 特히 Krebs cycle의 해당산인 Glutamate, Aspartate와 같은 興奮性 神經傳達物質은 腦虛血時 神經細胞를 興奮시켜 Na⁺과 Ca²⁺을 細胞內로 流入하게 하여 非可逆的인 細胞損傷을 일으킨다. 細胞內로 Ca²⁺이 增加되면 細胞膜의 磷脂質(phospholipids)을 破壞하는 phospholipase가 活性化된다. 膜의 磷脂質의 減少로 膜의 Ca²⁺ 透過性이 充進되어 미토콘드리아는 非可逆的인 損傷을 받는다. 이 代謝過程에서 毒性인 free radical이 活性化 되어 細胞膜 損傷, 酵素活動 抑制, prostacyclin合成 阻害 등을 일으킨다. 現在 腦梗塞의 範圍를 줄여 보려는 試圖는 大部分이 NMDA(N-methyl-D-aspartate) channel과 關聯된 glutamate 受容體 遮斷劑를 利用하는데 아직까지 完전하게 細胞內로 Ca²⁺ 流入을 遮斷하는 藥이 나오지 않고 있으며, 심각한 腦虛血로 細胞膜이 갑자기 破壞되는 경우와 오랜 시간동안 腦虛血狀態가 계속 되어진 경우 모두 神經細胞를 救할 수 없게 된다¹⁾.

腦虛血은 두 가지 病態生理學的 過程으로 發生하는데, 첫째는 血管閉鎖로 인하여 酸素와 血糖 供給이 消失된다는 점이고, 둘째는 細胞膜 崩壞와 에너지 生産過程의 왜해로 細胞代謝의 變化를 招來한다는 것이다. 最近 觀察에 따르면 神經細胞에 죽음을 招來하는 細胞內 過程은 治療할 수 없는 것이 아니고, 血流를 恢復시키거나 細胞內로의 Ca²⁺ 流入을 遮斷하거나 아니면 興奮性 神經傳達物質을 妨害함으로써 神經細胞를 죽음으로부터 피하게 할 수 있고, 治療的 可能性¹⁾도 있다는 報告가 많아 本 實驗을 하게 되었다. 虛血性 腦損傷을 誘發하는 動物實驗 model은 두 種類가 있는데, global ischemic model과 focal ischemic model 方法이 있다. 全體的인 腦虛血 誘發은 兩側 總頸動脈을 結紮하는 方法과 兩側 總頸動脈 및 椎骨基底動脈 모두를 結紮하는 方法이 있는데, 이 方法은 腦幹의 虛血로 因한 急性 死亡 등으로 實驗 成功率이 낮다는 報告²³⁾가 있어, 本 實驗은 局所的인 虛血을 誘發시키는 方法을 施行하였다. 可逆性 腦虛血模型의 實驗보다는 實際 臨牀的인 治療方面에 接近하기 爲해 非可逆性 腦虛血模型으로 하였다.

本 實驗은 中大腦動脈 閉塞 手術로 rat의 右側 腦虛血 誘發과 striatum과 關聯된 神經傳達物質 중 mono amine인 dopamine, DOPAC, HVA, HIAA와 amino acid인 Glutamate, Aspartate, GABA, Glycine, Taurine, Alanine, Tyrosine의 濃도를 microdialysis 및 HPLC를 利用하여 定量 分析하였고, 各各 8마리씩 1個群을 實驗 對象으로 하여 MCAO 前 1時間동안 20分 간격으로 3차례 microdialysis를 通해 sample을 取하였으며, MCAO 後 2時間동안 20分 간격으로 6차례 sample을 取하여 MCAO 前後를 比較 分析하였다.

Dopamine은 amino acid인 L-tyrosine에서 만들어지며 이는 효소 tyrosine hydroxylase에 의해 가수분해되어 L-dopa (dopamine 합성의 전구물질)가 되고, L-dopa가 Dopa decarboxylase에 의해 Dopamine으로 decarboxylation된다. Dopamine은 Glutamate의 NMDA receptor에 대한 작용에 관계하여 Glutamate의 세포 독성작용을 조절한다고 알려져 있으며²⁴⁾, 이러한 증거로 microdialysis 방법을 이용한 global ischemic model과 focal ischemic model에서 세포외액의 Dopamine 함량이 크게 증가하였다. 이러한 증가는 exocytosis 증가, 재흡수 결핍 및 산화대사의 변화로 야기된다²⁵⁾. 뇌경색의 정도는 가역적 손상기간과 밀접한 상관관계가 있으며 세포외액의 Glutamate 함량도 뇌경색 정도에 비례하여 증가한다. Dopamine의 경우도 뇌경색 정도에 비례하여 증가하나 증가속도는 Glutamate에 비하여 빠르다²⁵⁾. 이러한 Dopamine의 급격한 증가는 MCAO 동물모델에서 조직학적인 손상정도와의 밀접한 관계가 있으며²⁶⁾, 특히 허혈성 뇌손상 시 Dopamine은 직·간접적으로 매우 큰 신경독성 작용을 가지고 있다. 또한 조직학적 독작용 뿐만 아니라 adenylate kinase나 creative kinase같은 대사효소에 독작용을 보인다²⁷⁾. 본 실험에서 腦虛血이 유발된 후 對照群에서는 Dopamine의 함량은 60분까지 증가하고 그 이후는 감소하였다. 本 實驗에서 腦虛血을 誘發시킨 後 Dopamine 含量을 觀察한 結果, 藥鉞處理群은 對照群에 비해 有意性있는 억제가 되었다.

DOPAC과 HVA는 Dopamine의 대사산물로서 세포내 Dopamine 함량의 지표로 사용되는데 腦虛血 후 basal level을 유지하거나 감소한다고 보고되었으²⁹⁾, 본 실험에서 腦虛血이 유발된 후 대조군에서의 HVA의 함량은 basal level의 수준에서 약간 감소하는 결과를 보였다. 이러한 감소는 mono amine의 산화에 관여하는 효소인 MAO(monoamine oxidase) 활성의 감소와 관련이 있을 것으로 생각된다. 본 실험에서 腦虛血을誘發시킨 後 DOPAC과 HVA 함량은 對照群에 비해 有意性있는 증가가 觀察되었다. 여기서 Dopamine 함량은 有意性있게 억제된 반면 Dopamine의 대사산물인 DOPAC과 HVA는 有意性있게 증가하는 결과가 나타나 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

HIAA는 수산화 인돌산으로서 serotonin의 대사산물이다. 腦虛血시 HIAA는 별 변화가 없거나 감소한다고³⁰⁾ 알려져 있는데, 본 실험에서는 뇌허혈이 유발된 후 대조군에서의 HIAA의 함량이 감소하였다. 본 실험에서 腦虛血을誘發시킨 後 HIAA 함량을 觀察한 結果, PLA₂ 藥鍼을 處置한 實驗群에서 對照群에 비해 有意性 있는 變化가 觀察되지 않았으나 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

대표적인 興奮性 神經傳達物質은 Glutamate와 Aspartate이며, 이들은 cortex, caudate nucleus, hippocampus 部位에 가장 높은 濃度로 存在하고 있다³¹⁾. Glutamate와 Aspartate는 hypoxia나 ischemia 상태에서 release가 增加하고, reuptake는 減少하는데³²⁾, 腦虛血시 Glutamate와 Aspartate가 增加하므로 因하여 急性期の 細胞 膨脹과 慢性期の 神經細胞 分解 등으로 神經細胞가 損傷을 입는데 특히 NMDA receptor는 Glutamate에 의한 activation의 增加로 Ca²⁺이 細胞內로 過度하게 流入되어 急性期 細胞壞死가 일어나고, 代謝過程으로 free radical의 生産이 增加되어 慢性期 神經細胞 分解를 나타낸다³³⁾. 이러한 遲延的인 反應에 依하여 壞死가 완전히 나타나기 전까지는 24-72時間 정도가 所要된다. NMDA receptor에 의한 Glutamate와 Aspartate의 作用은 NMDA antagonist에 依해 여러 實驗에서 神經細胞 壞死가 抑制된다는 報告³⁴⁾가 있었다. 본 實驗에서 腦虛血이 誘發된 後 Glutamate와 Aspartate 함량을 觀察한 結果, Glutamate 함량은 PLA₂ 藥鍼을 處置한 實驗群에서 매우 有意性있는 減少가 觀察되었으나 Aspartate 함량은 有意한 차이가 觀察되지 않았다. 이로써 PLA₂ 藥鍼이 Glutamate release를 抑制시키면서 NMDA receptor의 antagonist로서의 作用 可能性이 觀察되었으나 Aspartate의 경우 유의한 變化가 없는 것으로 觀察되어 추후 심도있는 연구가 필요하다고 사려된다.

GABA는 대표적인 抑制性 神經傳達物質으로서 striatum, globus pallidus, substantia nigra 등에 가장 많이 分布되어 있다³¹⁾. 腦虛血時 및 虛血後 GABA는 過分極과 脫分極을 모두 일으키지만, 細胞內로 Cl⁻의 膜透過性을 增加(過分極)시켜 시냅스 前과 後의 興奮性 Glutamate와 Aspartate 傳達物質 release를 抑制하고, NO(Nitric oxide)을 遮斷하여 神經細胞의 興奮性을 低下시켜 細胞障害를 抑制한다는 報告³¹⁾가 있었다. 본 實驗에서 腦虛血을 誘發시킨 後 GABA 함량을 觀察한 結果, PLA₂ 藥鍼을 處置한 實驗群에서 有意하게 減少하는 것으로 나타났다.

Glycine은 GABA와 함께 中樞神經系에서 神經興奮을 抑制하는 神經傳達物質로 알려져 있다³⁵⁾. 특히 Glycine은 NMDA를 抑制하는 antagonist의 役割로 腦組織을 保護하고³⁶⁾, 硬膜下 血腫인 狀態에서도 NMDA receptor의 antagonist 役割을 한다는 報告³⁶⁾가 있었다. 본 實驗에서 腦虛血을 誘發시킨 後 Glycine을 觀察한 結果, PLA₂ 藥鍼을 處置한 實驗群에서 有意하게 減少하는 것으로 나타났다.

Amino sulfonic acid인 Taurine은 牛膽의 抽出物로서 잘 알려져 있다. Taurine도 GABA와 함께 抑制性 傳達因子³⁷⁾로 役割을 하지만 精確한 機轉을 아직 잘 알려져 있지 않다. 다만 腦虛血時 細胞浮腫이나 삼투압의 均衡이 破壞되었을 때 Taurine이 腦血流量을 調節에 重要な 役割을 한다는 報告³⁸⁾와 虛血性 心不全時에 Taurine이 Ca²⁺ 流入을 減少시킨다는 報告그리고 腦虛血時 興奮性 amino acid로 因해 Ca²⁺이온이 細胞內로 많이 流入하여 細胞障害를 일으키는 病理機轉을 抑制한다는 報告³⁹⁾가 있었다. 본 實驗에서 腦虛血을 誘發시킨 後 Taurine 함량을 觀察한 結果, PLA₂ 藥鍼을 處置한 實驗群에서 有意하게 減少하였다. 이는 Taurine이 腦虛血時 腦血流量을 調節에 重要な 役割을 한다는 기존의 報告¹⁹⁾와 반대로 나타나 추후 더 많은 연구가 필요하다고 사려된다.

Alanine은 천연 amino acid로서, kynurenic acid 分解酵素인 kynurenine hydroxylase의 抑制劑로 作用한다⁴⁰⁾. Kynurenine은 tryptophan의 代謝產物로서 動物의 尿中에 나타나며, kynurenic acid의 前驅物質이다. 腦虛血時 dialysis probe를 통해 hippocampus와 parietal cortex部位에 Alanine을 處置하면 透析物質中에 kynurenic acid 함량이 增加되어 glutamate receptor의 拮抗劑로서 役割⁴⁰⁾을 하고, kynurenine hydroxylase의 抑制 藥物을 投與했을 때 腦神經組織 損傷이 抑制되었다는 報告⁴¹⁾를 통해 Alanine은 抑制性 神經傳達物質로 作用함을 알 수 있다. 본 實驗에서 腦虛血을 誘發시킨 後 Alanine 함량을 觀察한 結果, PLA₂ 藥鍼을 處置한 實驗群에서 有意하게 減少하였다. Tyrosine은 hippocampus部位에 Tyrosine Phosphorylation(磷酸化)으로 存在하고 있는데, 腦虛血時 Tyrosine Phosphorylation이 Phosphotyrosine으로 되는데 Tyrosine Phosphorylation의 活性化를 抑制하면 海馬의 CA4와 CA1의 神經組織 壞死를 막아주고, 특히 腦의 一定 部位에 血流를 一時的으로 遮斷하였다가 다시 再灌流시키면 初期에는 特別한 異常이 나타나지 않다가 NMDA receptor에 依해 一定期間이 지나면 海馬部位에 遲延性 神經細胞 壞死(delayed neuronal death)가 일어난다는 報告⁴²⁾를 통해 Tyrosine은 興奮性 神經傳達物質로 作用함을 알 수 있었다. 본 實驗에서 腦虛血을 誘發시킨 後 Tyrosine 함량을 觀察한 結果, PLA₂ 藥鍼을 處置한 實驗群에서 有意性있는 減少가 나타나, Tyrosine Phosphorylation의 inhibitor로서의 作用 可能性이 觀察되었다.

以上에서 살펴본 바와 같이 PLA₂ 藥鍼은 mono amine인 dopamine, DOPAC, HVA와 Glutamate, GABA, Glycine, Taurine, Alanine, Tyrosine 등에서 有意性이 認定되어 急性期 中風治療 및 遲延性 神經細胞壞死 防止에 利用할 수 있

을 것으로 思慮된다.

결 론

PLA₂ 藥鍼은 興奮性 神經傳達物質을 抑制하는 作用이 藥理 實驗에서 立證되어, 臨床에서 虛血性 腦血管疾患의 急性期 治療 및 遲延性 腦神經細胞壞死 防止에 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

참고문헌

1. Raymond D. Adams 外 이담산 신경과학 서울장담 715-28. 1998.
2. 金永錫. 臨床中風學. 서울:書苑堂. 303-4, 437. 1997.
3. 全國韓醫科大學 心系內科學教室. 서울:書苑堂. 502, 505-6. 1999.
4. Arai H, Passonneau JV, Lust WD. Energy metabolism in delayed neuronal death of CA1 neurons of hippocampal following transient ischemia in the gerbil. *Brain Dis.* 1:263-78. 1986.
5. Blomqvist P, Lindvall O, Wielloch T. Lesions of the local coeruleus system aggregate ischemic damage in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 58:353-8. 1985.
6. Iijima K, Kogure K. Prevention of delayed neuronal death in gerbil hippocampus by iron channel blockers. *Stroke.* 19:1003-7. 1988
7. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239:57-69. 1982.
8. 沈全魚 外. 中風證治. 北京:中醫古籍出版社. 1, 6, 8-10, 13-4. 1988.
9. 叢法滋. 腦病的中醫論治. 北京:人民衛生出版社. 78-86. 1993.
10. 陳輝. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 62-74. 1993.
11. 廓賀齡. 內科急症治療學. 5. 上海:上海科學技術出版社. 270-73. 1988.
12. 김지영 외. 봉독요법의 최신연구동향에 대한 고찰. *大韓鍼灸學會誌.* 14(2):47-71. 1997.
13. 全國韓醫科大學 鍼灸·經穴學教室. 鍼灸學(上). 서울:집문당. 323-5. 2000.
14. Warner DS, Martin H, Ludwig P, McAllister A, Keana JFW and Weber E. In vivo models of cerebral ischemia: Effects of parenterally administered NMDA receptor glycine site antagonists. *J. Cereb. Blood flow Metab.* 15:188-96. 1995.
15. Hillered L, Hallstrom A, Segersvard S, Persson L, Ungerstedt U. Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intercerebral microdialysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9:607-16. 1989.
16. Tossman U, Ungerstedt U. Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. *Acta. Phys. Scand.* 128:9-14. 1986.
17. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 20:1037-43. 1989.
18. Yuan Y et al. An essential role for lysophosphatidylcholine in the inhibition of platelet aggregation by secretory phospholipase A₂. *Blood.* 86(11):4166-74. 1995.
19. Assen E et al. A peptide from the venom of the Honey Bee. *Brit. Pharmacol.* 337-8. 1973.
20. Nethery D, Callahan LA, Stofan D, Mattera R, DiMarco A, Supinski G: PLA(2) dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygenspecies. *J. Appl Physiol.* 89(1):72-80. 2000.
21. Wu YL, Jiang XR, Newland AC, Kelsey SM. Failure to activate cytosolic phospholipase A₂ causes TNF resistance in human leukemic cells. *J. Immunol.* 160(12):5929-35. 1998.
22. 許仁會 外. 神經傳達物質 基礎와 臨床. 서울:신일상사. 288, 392. 1996.
23. Hickey RW, Akino M, Strausbaugh S, De Courtmn-Myers GM. Use of the Morris water maze and acoustic startle chamber to evaluate neurologic injury after asphyxial arrest in rats. *Pediatr. Res.* 39(1):77-84. 1996.
24. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4(9):2587-97. 1990.
25. Vulto AG, Sharp T, Ungerstedt U, Versteeg DH. Rapid postmortem increase in extracellular dopamine in the rat brain as assessed by brain microdialysis. *J. Neurochem.* 51(3):746-9. 1988.
26. Matsumoto K, Graf R, Rosner G, Taguchi J, Heiss WD. Elevation of neuroactive substances in the cortex of cats during prolonged focal ischemia. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 13(4):586-94. 1993.
27. Maker HS, Weiss C, Brannan TS. Amine-mediated toxicity. The effects of dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine, 6-hydroxydopamine, ascorbate, glutathione and peroxide on the in vitro activities of creatine and adenylate kinases in the brain of the rat. *Neuropharmacology.* 25(1):25-32. 1986.
28. Damsma G, Boisvert DP, Mudrick LA, Wenkstern D, Fibiger HC. Effects of transient forebrain ischemia and pargyline on extracellular concentrations of dopamine, serotonin, and their metabolites in the rat striatum as determined by in vivo microdialysis. *J. Neurochem.* 54(3):801-8. 1990.
29. Kawano T, Tsutsumi K, Miyake H, Mori K. Striatal dopamine in acute cerebral ischemia of stroke-resistant rats. *Stroke.* 19(12):1540-3 1988.
30. Weinberger J, Nieves-Rosa J. Metabolism of monoamine neurotransmitters in the evolution of infarction in ischemic striatum. *J. Neural Transm.* 69(3-4):265-75. 1987.
31. 서유현. 신경전달물질. 2. 서울:민음사. 22-3, 272, 302, 314. 1996.

32. Benveniste H, Drejer J, Schoonusboe A. Elevation of extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 43:1369-74. 1984.
33. MacDermott AB, Mayer ML, Wessbrook GL. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature.* 321:519-21. 1986.
34. Leach MJ, Swan JH, Eisenthal D, Dopson M, Nobbs M, A glutamate release inhibitor, protects against focal cerebral ischemic damage. *Stroke.* 24:1063-7. 1993.
35. Globus MY, Busto R, Martinez E, Valdes I, Dietrich WD, Ginsberg MD. Comparative effect of transient global ischemia on extracellular level of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat. *J. Neurochem.* 57(2):470-8. 1991.
36. Sternau LL, Lust WD, Ricci AJ, Role for GABA in selective vulnerability in gerbils, *Stroke*, 20:281-7. 1989.
37. Tsuchida E, Bullock R. The effect of the glycine site-specific NMDA antagonist ACEA1021 on ischemic brain damage caused by acute subdural hematoma in the rat. *J. Neurotrauma.* 12(3):279-88. 1995.
38. Hagberg H, Andersson P, Kjellmer I, Thiringer K, Thordstein M. Extracellular overflow of glutamate, aspartate, GABA and taurine in the cortex and basal ganglia of fetal lambs during hypoxia -ischemia. *Neurosci Lett.* 78(3):311-7. 1987.
39. Stummer W, Betz AL, Shakui P, Keep RF. Blood-brain barrier taurine transport during osmotic stress and in focal cerebral ischemia. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 15(5):852-9. 1995.
40. Paulsen RE, Fonnun F. Role of glial cells for the basal and Ca^{2+} -dependent K^{+} -evoked release of transmitter amino acids investigated by microdialysis. *J. Neurochem.* 52:1823-9. 1989.
41. Salvati P, Ukmar G, Dho L, Rosa B, Cini M, Marconi M, Molinari A, Post C. Brain concentrations of kynurenic acid after a systemic neuroprotective dose in the gerbil model of global ischemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 23(4):741-52. 1999.
42. Cozzi A, Carpenedo R, Moroni F. Kynurenine hydroxylase inhibitors reduce ischemic brain damage. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 19(7):771-7. 1999.
43. Yokota M, Sado TC, Miyaji K, Kawashima S, Suzuki K. Stimulation of protein-tyrosine phosphorylation in berbil hippocampus after global forebrain ischemia. *Neurosci Lett.* 168:62-72. 1994.