

신생 흰쥐 해마 절편 배양에서 산소-포도당 박탈에 의한 신경 세포 사멸에 대한 성장호르몬의 효과

단국대학교 의과대학 소아과학교실, 해부학교실*

홍경식 · 강지희 · 김명주* · 유지숙 · 장영표

= Abstract =

Effect of growth hormone on neuronal death in hippocampal slice cultures of neonatal rats exposed to oxygen-glucose deprivation

Kyung Sik Hong, M.D., Jihui Kang, M.D., Myeung Ju Kim, M.D.*, Jeeseuk Yu, M.D. and Young Pyo Chang, M.D.

Departments of Pediatrics and Anatomy*, College of Medicine, Dankook University, Cheonan, Korea

Purpose : To investigate whether growth hormone (GH) has a protective effect on neurons in hippocampal slice cultures of neonatal rats exposed to oxygen-glucose deprivation (OGD).

Methods : Cultured hippocampal slices of 7-day-old rats were exposed to OGD for 60 min. Then, the slices were immediately treated with three doses of GH (5, 50, or 500 μ M) in media. The relative fluorescent densities of propidium iodide (PI) uptake in the slices and relative lactate dehydrogenase (LDH) activities in the media were determined and compared between each GH-treated group of slices and untreated slices (control) at 12 and 24 h after OGD. Immunofluorescent staining for caspase-3 and TUNEL staining were performed to observe the effect of GH on apoptotic neuronal death.

Results : The relative fluorescent densities of PI uptake in CA1 and dentate gyrus (DG) of the hippocampal slices in each GH-treated group were not significantly different from those in the untreated slices at 12 and 24 h after OGD ($P > 0.05$). Treatment with GH could reduce the relative LDH activities in the media of the GH-treated groups only at 12 h after OGD ($P < 0.05$). Expression of caspase-3 and TUNEL positivity in CA1 and DG of the slices treated with 50- μ M GH were not different from those of the untreated slices at 12 and 24 h after OGD.

Conclusion : Treatment of hippocampal slice cultures with GH after OGD does not show a definitive protective effect on neuronal death but can reduce the LDH efflux of the slices in media at 12 h after OGD. (*Korean J Pediatr* 2009;52:588-593)

Key Words : Growth hormone, Cultured hippocampal slice, Oxygen glucose deprivation, Apoptosis, Neurons

서 론

성장호르몬은 뇌하수체 전엽에서 분비된 후 간세포에서 IGF-1의 생성과 분비를 촉진 시키며, IGF-1을 매개로 성장에 대한 효과를 나타낸다¹⁾. 또한, 성장호르몬은 뇌의 성장과 발달, 뇌세포의 수초화 등에 중요한 역할을 하고, 성장호르몬의 수용체는 인체의 맥락막, 해마, 시상 하부 및 뇌하수체 등에 광범위하게 분포하는 것으로 보고 되고 있다¹⁻⁴⁾.

성장호르몬과 뇌손상과의 관계는 외부에서 투여한 성장호르몬이 뇌혈류장막(blood brain barrier, BBB) 통과가 매우 어려워 저산소성-허혈성 뇌손상과 관련하여 그 역할에 대한 연구가 거의 없었으나, 최근에 신생 쥐에 주사한 일부 성장호르몬이 미성숙된 뇌의 뇌혈류장막을 통과하여 저산소성-허혈성 뇌손상 정도를 감소시킬 수 있음이 확인되었다⁵⁻⁸⁾. 그러나 성장호르몬의 뇌신경 세포 보호 효과는 in vivo 동물 실험과는 달리 아직 in vitro 실험에서는 증명된바가 없다.

신생아 저산소성-허혈성 뇌손상의 병태 생리를 연구하기 위한 in vitro 모델로는 미성숙 흰쥐 뇌의 절편 배양이 이용되고 있는데, 해마 절편이나 대뇌 전두엽 절편 배양에 산소-포도당 박탈(oxygen-glucose deprivation, OGD)을 가하여 저산소성-허혈성 손상과 비슷한 손상을 유발할 수 있다⁹⁻¹⁵⁾.

이에 연구자들은 신생 흰쥐의 해마 절편을 in vitro에서 10일간 배양 후 OGD를 가하여 저산소성-허혈성 뇌손상과 유사한 손상을 유발하고 배양액에 성장호르몬을 투여하여 in vitro에서 성장

Received : 10 October 2008, Revised : 21 November 2008

Accepted : 4 December 2008

Address for correspondence : Young Pyo Chang, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Dankook University,

Anseo-dong 16-5, Choeran, Choongnam, 330-715, Korea

Tel : +82.41-550-3937, Fax : +82.41-550-3905

E-mail : ychang@dankook.ac.kr

The content of this paper was presented in 57th Annual Autumn Meetings of the Korean Pediatric Society in Seoul, Korea, October 19-20, 2007.

This study was supported by a grant from Ildong in 2006.

호르몬이 신경 세포 보호 효과가 있는지를 연구하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 신생 흰쥐의 해마 절편 배양

생 후 7일된 Sprague-Dawley 흰쥐의 뇌를 마취 후 제거하였다. 실험동물의 뇌 제거는 단국대학교 실험동물 처리 윤리 규정에 의거하여 시행하였다. 멸균 상태에서 주의 깊게 제거한 뇌를 양쪽 대뇌 반구로 분리 후 얼음위에 놓인 Petri dish에서 해마를 분리하였다. 분리한 해마의 중앙 부위를 McIlwain tissue chopper (Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd, Goose Green, UK)로 350 μ m 두께로 해마 중앙 부위를 장축에 수직되게 자르고, 잘라진 해마 절편은 12-14°C buffer 용액(modified Krebs-Heseleit solution; cutting solution)에 넣은 후 불필요한 조직을 정리하였다. Modified Krebs-Heseleit solution은 NaCl (120 mM), KCl (2 mM), CaCl₂ (2.0 mM), NaHCO₃ (26 mM), MgSO₄ (10 mM), KH₂PO₄ (1.18 mM), glucose (11 mM)와 sucrose (200 mM)를 포함했으며 pH는 7.4였다. 해마 절편을 Stoppini 등¹⁶⁾의 방법에 따라 조직이 공기와 배양액에 모두 접촉 가능한 membrane-interface technique으로 배양하였다. 간략하게 설명하면 잘 정리된 해마 절편을 semiporous membrane 위의 insert (Millicell, Bedford, MA, USA)로 옮긴 후 insert를 1 mL/well의 배양액이 들어 있는 6-well plate에 집어넣었다. 하나의 insert에 4개의 해마 절편을 넣어 배양하였다. 10일 동안 배양을 유지하면서 배양 중에 2-3일에 한번 씩 배양액을 교환해 주었다. 배양액은 pH 7.2, 50% MEM (minimal essential medium), 25% HBSS (Hank's balance solution), 25% horse serum, 6.5 mg/mL glucose, 2 mM L-glutamine과 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 포함하였다.

2. 산소-포도당 박탈(oxygen-glucose deprivation, OGD)과 성장호르몬 투여

10일간 배양한 해마 절편에 저산성-허혈성 뇌손상과 유사한 손상을 주기 위해 Frantseva 등¹⁷⁾이 고안한 submersion 방법으로 OGD를 유발하였다. OGD 유발 용액은 혈장과 배양액, 포도당이 없는 buffer 용액에서 산소를 제거한 용액(deoxygenated, glucose-free OGD solution)을 사용하였다. OGD 용액은 NaCl (120 mM), KCl (2 mM), CaCl₂ (2.0 mM), NaHCO₃ (26 mM), MgSO₄ (1.19 mM), KH₂PO₄ (1.18 mM), sucrose (10 mM)를 포함하며 glucose는 포함되지 않았고 pH는 7.4를 유지하였다. OGD 용액에 95% 질소와 5% 이산화탄소의 혼합 가스를 30분 이상 통과 시켜서(bubbling) 용액 내에 산소를 완전히 제거하였다(deoxygenated, glucose-free OGD solution). 조직과 well을 OGD 유발 용액으로 1회 세척 후 OGD 유발 용액을 semiporous membrane 아래와 위에 각각 1 mL를 넣어 membrane에 부착된 해마 절편을 OGD 용액이 완전히

덮도록 하였다. 이후 air-tight chamber에 넣어 60분간 37°C 배양기에서 배양하였다. OGD가 끝난 후 조직과 well을 horse serum을 제거한 기초 배양액으로 1회 세척 한 후 유전자 재조합형 성장호르몬(유트로핀[□], LG Co. Korea)을 첨가한 기초 배양액에서 48시간 동안 배양을 유지하였다. OGD 직후에 유전자 재조합형 성장호르몬은 네 군으로 나누어 0 μ M (대조군), 5 μ M, 50 μ M, 500 μ M를 배양액에 투여하였다.

3. 세포 사망 지표의 측정

1) propidium iodide (PI) uptake

세포 사망 정도를 관찰하기 위해 사망 세포의 PI uptake를 정성적 또는 정량적으로 관찰하였다. OGD 주기 2시간 전에 조직과 well을 buffer 용액으로 2회 세척하고 기초 배양액에 PI 0.5 μ g/mL을 첨가하여 OGD 직전까지 2시간 정도 배양하였다. 이후 OGD를 주기 직 전에 형광 현미경으로 해마절편의 Cornu Ammonis1 (CA1)과 dentate gyrus (DG)에서 PI uptake 정도를 관찰하고 digital camera로 촬영하였다. OGD용액으로 절편을 세척 후 60분 동안 OGD를 주고 기초 배양액으로 세척하고 이후 PI와 성장호르몬이 첨가된 기초 배양액에서 배양하면서 OGD 후 12시간과 24시간에 PI uptake 정도를 해마 절편의 CA1과 DG에서 관찰하고 촬영하였다. 48시간 이후 조직을 4°C 냉장고에 넣어 glucose free OGD 용액에서 24시간 배양하여 해마 절편의 모든 세포를 죽인 후 PI uptake를 다시 관찰하고 촬영하였다. PI uptake의 관찰은 rhodamine filter가 있는 형광 현미경(Olympus)으로 관찰하였다. 촬영된 PI uptake는 image analyser (Image-J, NIH, USA)를 이용하여 fluorescence density를 측정하였다. 상대적 fluorescence density를 구하여 성장호르몬 투여군 들(5, 50, 500 μ M)과 투여하지 않은 대조군과 비교하였다. 상대적 fluorescence density는 다음 공식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{상대적 fluorescence density} = (F_t - F_0) / (F_{\max} - F_0) \times 100$$

(F_t: 정해진 시간에 측정된 fluorescence density, F₀: OGD 주기 전에 측정된 fluorescence density, F_{max}: 모든 세포를 죽인 후 측정된 최대 fluorescence density)

2) 배양액 LDH(lactate dehydrogenase) 활성도

세포 사망의 또 다른 지표로 손상 받은 세포 내에서 배양액으로 나오는 LDH 활성도를 배양액에서 측정하였다. OGD 후 12시간과 24시간에 배양액 1 mL를 수집하여 -70°C에 얼려서 보관하였다. 배양액 채취 시 배양 중인 해마 절편도 동시에 수집해 역시 -70°C에 냉동 보관하였다. LDH 측정은 spectrophotometer로 측정하였고 Cytotox 96 cytotoxicity assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였다. 배양액 내의 LDH 활성도는 냉동 저장된 조직을 완전히 용해하여 측정된 LDH 활성도의 퍼센티지로 표시한 상대적 LDH 활성도로 표시하였다. 측정된 LDH 상대적 활성도는 성장 호르몬 투여군 들(5, 50, 500 μ M)과 투여하지 않은 대조군 사이에 OGD 후 12시간과 24시간에 비교하였다.

4. Caspase-3의 면역 형광 염색과 TUNEL 염색

해마 절편의 신경 세포의 세포 사멸을 관찰하기 위해 caspase-3의 면역 형광 염색과 TUNEL 염색을 시행하였다. 배양된 해마 절편을 OGD 후 12, 24시간에 4% paraformaldehyde에 2시간 고정하였다. 이후 sucrose로 처리하고 -70°C에 동결 보관하였다. 얼려진 조직을 cryocut으로 10 μm 두께로 자르고 0.05 M PBS로 세척 후 0.03% H₂O₂로 점적하였다. 혈장으로 30-60분간 처리 후 다시 PBS로 세척하고 primary antibody와 하루 밤 동안 incubation을 시켰고 PBS 세척 후 caspase-3 antibody (Sigma)로 처리 후 세척 과정과 발광 과정을 거쳐 형광 현미경으로 관찰하였다. TUNEL 염색(TUNEL Apoptosis Detection Kit, DNA Fragmentation/Fluorescence)은 정해진 방법에 따라 시행하였고 형광 현미경으로 관찰하였다.

5. 통계분석

통계 분석은 SPSS(version 11.0, Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여, Student's t-test, Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test를 시행하였고, P값이 0.05 미만에서 통계적으로 유의하다 하였다.

결 과

1. PI uptake

해마 절편의 PI uptake의 상대적 형광 밀도는 성장 호르몬의 농도를 5 μM (n=8), 50 μM (n=12), 500 μM (n=8)로 투여한 각각의 군에서 OGD 노출 후 12시간과 24시간에 대조군에 비해 통계적으로 의미 있는 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 1A, $P > 0.05$). OGD에 노출된 해마 절편은 CA1과 DG에서 PI-uptake의 증가를 보였으나, 성장 호르몬(50 μM)으로 처리한 해마 절편의 PI uptake는 OGD 노출 후 12와 24시간에 처치하지 않은 절편과 특별한 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 1B).

2. 배양액 LDH 활성도

OGD 후 12시간에 배양액에서 측정된 상대적 LDH 활성도는 성장 호르몬 5 μM (n=12), 50 μM (n=12), 500 μM (n=12)로 투여한 각각의 군에서 대조군(n=12)에 비해 통계적으로 의미 있는 감소를 보였다($P < 0.05$). 그러나 성장 호르몬 투여군 사이에 의미 있는 차이는 없었고, OGD 노출 후 24시간에는 성장 호르몬 각각의 투여군과 대조군에서 LDH 상대적 활성도는 유의한 차이를 보

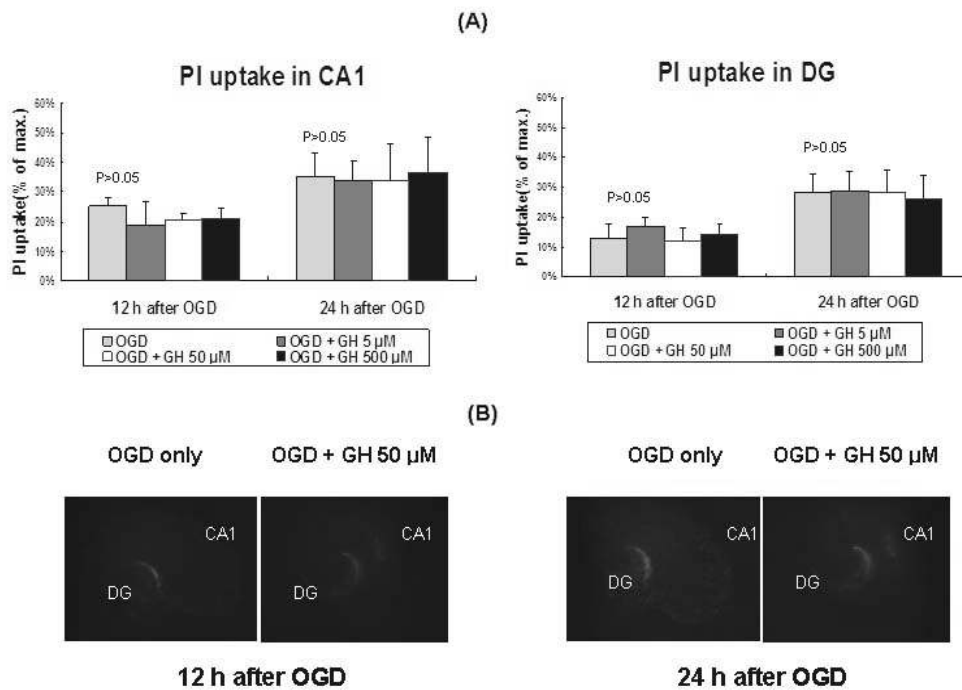


Fig. 1. (A) The relative fluorescent densities of propidium iodide (PI) uptake in CA1 and dentate gyrus (DG) of hippocampal slices treated with the three doses of growth hormone (GH) were not significantly different from those of the untreated slices (control) at 12 and 24 h after oxygenglucose deprivation (OGD; $P > 0.05$). (B) OGD increased the fluorescence of PI uptake in CA1 and DG of the hippocampal slices. However, significant differences were not detected between the slices treated with 50 μM GH and untreated slices at 12 and 24 h after OGD.

이지 않았다(Fig. 2, $P > 0.05$).

3. Caspase-3 면역형광염색 과 TUNEL 염색

성장 호르몬(50 μM)으로 처리한 해마 절편의 CA1과 DG에서 OGD 노출 후 12와 24시간에 caspase-3의 발현과 TUNEL 양성 발현은 대조군과 특별한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

고 찰

성장호르몬의 성장에 대한 작용은 주로 IGF-1을 매개로 하여 이루어진다¹⁾. 최근에 개발된 유전자 재조합형 성장호르몬은 임상에서 광범위하게 사용되고 있으나, 아직 신경 세포의 성장, 과사 및 사멸과의 관계에 관한 연구는 매우 제한적이다²⁻⁸⁾. 최근에는

성장호르몬이 뇌의 성장, 발달, 뇌세포의 수초화 등에 중요한 역할을 할 것이라는 증거들이 축적되고 있으며, 보고된 예에 의하면 쥐의 뉴런, 교세포, 그리고 내피 세포를 포함하는 중추 신경계에서 성장호르몬 수용체와 성장호르몬 결합 단백질 mRNA가 발현되고 있고, 성장호르몬의 수용체가 인체의 맥락막, 해마, 시상하부 및 뇌하수체 등에 광범위하게 분포하는 것으로 보고 되어 있다²⁻³⁾. 최근에는 신경 세포 배양을 이용한 연구에서 성장호르몬이 신경 세포의 증식을 증가 시키는 것이 관찰되었다⁴⁾.

외부에서 투여한 성장호르몬과 뇌손상과의 관계는 성장호르몬의 뇌혈류장막 통과가 어려워 저산소성-허혈성 뇌손상과 관련하여 그 역할에 대한 연구가 부족하다. 그러나 최근에 신생 쥐에서 피하로 주사한 일부 성장호르몬이 미성숙 뇌의 뇌혈류장막을 통과하여 저산소성-허혈성 뇌손상 정도를 감소시킬 수 있음이 확인되었으며, 이는 아마도 IGF-1을 매개로 그 생물학적 효과를 나타냈을 것으로 추측하였다⁵⁾. Scheepens 등⁶⁾은 21일된 쥐의 한쪽 대뇌 반구에 저산소성-허혈성 손상을 주면 손상 받은 신경 세포와 교세포에서 성장호르몬 또는 성장호르몬 유사 물질의 면역형광 발현이 증가하고, 뇌실 내로 유전자 재조합형 성장호르몬을 투여했을 때 저산소성-허혈성 뇌세포 손상을 줄여 줄 수 있다는 것을 보고하였다. 이러한 성장호르몬의 뇌 보호 효과는 신경 세포의 성장호르몬 수용체 면역형광 발현 양상과 일치함으로써 IGF-1의 뇌 보호 효과와는 관계가 없이 성장호르몬이 직접 신경 세포 보호 효과를 보여 주는 것으로 추측 하였다⁶⁾. Shin 등⁷⁾은 외부에서 투여한 유전자 재조합형 성장호르몬이 저산소성-허혈성 뇌손상을 준 생후 7일된 신생 흰쥐의 대뇌 반구에서 신경 세포의 사멸과 관련된 bcl-2 family와 caspase에 속하는 단백질들의 발현과 nitric oxide synthase 들의 발현에 변화를 주고 세포사멸을 감소시켜 신경 세포를 보호하는 것을 보고하였다.

저산소성-허혈성 뇌손상의 병태 생리 연구를 위한 in vitro 모델은 in vivo 모델에 비해 뇌혈류장막이 없으므로 세포내 환경에 직접 접근이 가능하고 연구자가 세포외 환경의 직접 조절이 가능하다는 장점을 가진다. 신경 세포의 손상 또는 생성에 관한 in vitro 모델은 Stoppini 등¹⁶⁾과 Grawiler 등¹⁸⁾이 해마 절편 배양

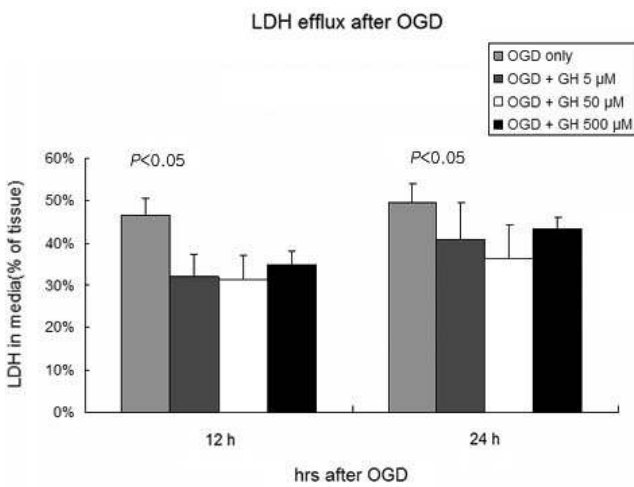


Fig. 2. The relative lactate dehydrogenase (LDH) activities in media significantly decreased in each group of slices treated with the three doses of growth hormone (GH) compared with those in the untreated slices (control) at 12 h after oxygenglucose deprivation (OGD; $P < 0.05$). However, the relative LDH activities in the media of the GH-treated slices at 24 h after OGD were not significantly different from those in the media of the untreated slices ($P > 0.05$).

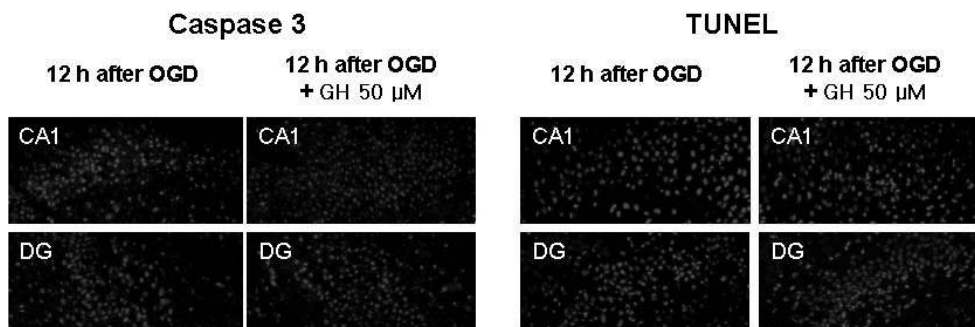


Fig. 3. Expression of caspase-3 and TUNEL positivity in CA1 and dentate gyrus (DG) of the hippocampal slices treated with 50 μM growth hormone (GH) were not different from those of the untreated slices (control) at 12 and 24 h after OGD ($\times 200$ magnification).

방법을 제시한 이래 뇌 조직 절편, 특히 해마 절편 조직 배양을 이용한 방법이 광범위하게 이용되고 있다^{9, 16-22)}. 즉, 해마 절편이나 대뇌 전두엽 절편을 일정 기간 배양 한 후에 산소-포도당 박탈을 가하여 저산소성-허혈성 손상과 비슷한 손상을 유발한 후에 세포-생화학적, 전기 생리적, 또는 형태학적 연구를 수행하였다¹⁸⁻²²⁾.

본 연구는 일정 기간 동안 해마 절편을 배양한 후 OGD를 가해 저산소성-허혈성 손상과 유사한 신경 세포 손상을 유발한 후 유전자 재조합형 성장호르몬을 배양액에 투여 하고 계속 배양하면서 신경 세포 보호 효과를 관찰하고자 하였다. 본 연구에서는 OGD 노출 후 12 시간에 배양액에서 LDH 유출이 의미 있게 감소하는 것 외에는 특별한 보호 효과를 관찰할 수 없었다. 본 연구 결과는 Shin 등⁷⁾이 연구한 in vivo 연구 결과와 차이를 보였는데 이는 아마도 in vivo와 in vitro의 조건 차이 때문으로 생각된다. 즉 in vitro의 경우 배양액에 있는 성장 호르몬이 해마 절편 내 세포에 도달하는 것이 부족 했을 수 있으며, 또한 성장호르몬이 in vivo에서 뇌세포 보호 효과를 나타내기 위해서는 뇌 내의 생화학적, 생리적 다른 요소들의 도움이 필요할 것으로 생각되는데 in vitro에서는 이러한 도움이 부족했기 때문으로 생각되었다. 그러나 주요 세포 사망 지표인 LDH의 활성도가 OGD 노출 후 12시간에 성장호르몬을 처치한 배양액에서 의미 있게 감소했기 때문에 본 연구에서 성장호르몬의 신경 세포 보호 효과를 완전히 배제할 수는 없다고 생각되었다.

해마절편 배양 방법은 세포 배양 방법에 비해 형태학적으로 in vivo에 가깝게 유지 가능하고 자극에 대한 생화학적 또는 생리적 현상도 비교적 in vivo에 가깝게 유지가 가능하다. 따라서 저산소성 허혈성 뇌손상의 병태 생리 연구뿐만 아니라 성장호르몬 등의 뇌 보호 효과가 있는 약물에 대한 연구에도 좋은 방법 중에 하나가 될 것으로 여겨진다.

연구자들은 본 연구를 통해 신생 흰쥐의 해마 절편 배양을 OGD에 노출 시켜 저산소성-허혈성 손상과 유사한 손상을 가한 후 배양액에 성장호르몬을 처치하여 신경 세포 사망에 대한 성장호르몬의 보호 효과를 관찰하고자 하였다. OGD 노출 후 성장 호르몬의 처치는 확실한 신경 세포 보호 효과를 보여 주지는 못했으나 OGD 노출 후 12시간에 해마 절편에서 배양액으로 LDH 유출을 감소시켜 줄 수는 있었다.

요 약

목 적 : 산소-포도당 박탈(oxygen-glucose deprivation, OGD)에 노출된 신생 흰쥐 해마 절편에서 성장호르몬이 신경 세포 보호 효과가 있는지를 연구하고자 하였다.

방 법 : 배양된 생후 7일된 신생 흰쥐의 해마 절편을 OGD에 60분간 노출 시켰다. 이후 각기 다른 세 용량의 성장 호르몬(5, 50, 500 pM)을 배양액에 투여하고 OGD 노출 후 12 와 24시간에 해마 절편의 상대적 propidium iodide (PI) uptake와 배양액의 상대적 lactate dehydrogenase (LDH) 활성도를 측정하여 성장 호르

몬 처치군과 성장 호르몬 처치하지 않은 대조군 사이에 비교하였다. 신경 세포의 세포 사멸에 대한 성장호르몬의 효과를 관찰하고자 caspase-3의 면역 형광 염색과 TUNEL 염색을 시행하였다.

결 과 : 1) 각기 다른 세 용량의 성장호르몬을 처치한 해마 절편의 CA1과 DG에서 상대적 PI uptake는 처치하지 않은 대조군에 비해 OGD 노출 후 12시간과 24시간에 의미 있는 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 2) 상대적 LDH 활성도는 OGD 노출 후 12시간에만 성장 호르몬을 투여한 군의 배양액에서 대조군에 비해 통계적으로 의미 있게 감소하였다($P<0.05$). 3) 성장 호르몬(50 pM)으로 처치한 해마 절편의 CA1과 DG에서 caspase-3 발현과 TUNEL 양성의 발현은 OGD 노출 후 12와 24시간에 대조군과 차이를 보이지 않았다.

결 론 : OGD에 노출된 해마 절편에서 성장호르몬 처치는 확실한 신경세포 보호 효과를 보이지 않았으나 OGD 노출 후 12시간에 배양액으로 LDH 유출을 감소시킬 수 있었다.

References

- 1) Lobie PE, Zhu T, Graichen R, Goh EL. Growth hormone, insulin-like growth factor I and the CNS: localization, function and mechanism of action. *Growth Horm IGF Res* 2000;10 Suppl B:S51-6.
- 2) Hojvat S, Baker G, Kirsteins L, Lawrence AM. Growth hormone (GH) immunoreactivity in the rodent and primate CNS: distribution, characterization and presence posthypophysectomy. *Brain Res* 1982;239:543-57.
- 3) Lobie PE, Garcia-Aragon J, Lincoln DT, Barnard R, Wilcox JN, Waters MJ. Localization and ontogeny of growth hormone receptors gene expression in the central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 1993;74:225-33.
- 4) Ajo R, Cacicedo L, Navarro C, Sanchez-Franco F. Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology* 2003;144:1086-97.
- 5) Gustafson K, Hagberg H, Bengtsson B, Brantsing C, Isgaard J. Possible protective role of growth hormone in hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatric Res* 1999;45:318-23.
- 6) Scheepens A, Sirimanne ES, Breier BH, Clark G, Gluckman PD, Williams CE. Growth hormones as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience* 2001;104:677-87.
- 7) Shin DH, Lee E, Kim JW, Kwon BS, Jung MK, Jee YH, et al. Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 2004;354:64-8.
- 8) Chang YP, Jung MK, Jee YH, Cho JJ, Lee SB, Park WS, et al. Possible neuroprotective role of exogenous growth hormone on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Korean J Pediatr* 2004;47:1210-5.
- 9) Pringle AK, Angunawela R, Wilde GJ, Mephem JA, Sundstrom LE, Iannotti F. Induction of 72 kDa heat-shock protein following sub-lethal oxygen deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuropathol Appl Neurobiol*

- 1997;23:289–98.
- 10) Pringle AK, Iannotti F, Wilde GJ, Chad JE, Seeley PJ, Sundstrom LE. Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in in vitro ischemia. *Brain Res* 1997;755:36–46.
 - 11) Cho S, Liu D, Fairman D, Jenkins L, McGonigle P, Wood A, et al. Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Int* 2004;45:117–27.
 - 12) Berger R, Jensen A, Paschen W. Metabolic disturbances in hippocampal slices of fetal guinea pigs during and after oxygen-glucose deprivation: is nitric oxide involved? *Neurosci Lett* 1998;245:163–6.
 - 13) Garnier Y, Middelani J, Jensen A, Berger RJ. Neuroprotective effects of magnesium on metabolic disturbances in fetal hippocampal slices after oxygen-glucose deprivation: mediation by nitric oxide system. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9:86–92.
 - 14) Noraberg J, Kristensen BW, Zimmer J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc* 1999;3:278–90.
 - 15) Macklis JD, Madison RD. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J Neurosci Methods* 1990;31:43–6.
 - 16) Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1991;37:173–82.
 - 17) Frantseva MV, Carlen PL, El-Beheiry H. A submersion method to induce hypoxic damage in organotypic hippocampal cultures. *J Neurosci Methods* 1999;89:25–31.
 - 18) Gähwiler BH. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1981;4:329–42.
 - 19) Gatherer M, Sundstrom LE. Mossy fibre innervation is not required for the development of kainic acid toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurosci Lett* 1998;253:119–22.
 - 20) Xiang Z, Yuan M, Hassen GW, Gampel M, Bergold PJ. Lactate induced excitotoxicity in hippocampal slice cultures. *Exp Neurol* 2004;186:70–7.
 - 21) Holopainen IE. Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochem Res* 2005;30:1521–8.
 - 22) Dailey ME, Buchanan J, Bergles DE, Smith SJ. Mossy fiber growth and synaptogenesis in rat hippocampal slices in vitro. *J Neurosci* 1994;14:1060–78.