

Kainic Acid에 의한 흰쥐 해마의 손상과정에서 RPIA가 미치는 영향에 관한 형태학적 연구

A Morphological Study on the Effects of RPIA on Kainic Acid-induced Neurotoxicity in the Hippocampus in Rats

신동진¹ · 황세진² · 정호삼²

Dong-Jin Shin, M.D.¹, Se-Jin Hwang, M.D.² and Ho-Sam Chung, Ph.D.²

ABSTRACT

Systemic injection of kainic acid (KA) in experimental animals induces the limbic seizure and structural damages in hippocampus and amygdala which resemble the changes in human temporal lobe epilepsy. In recent reports, some adenosine analogues exert neuroprotective actions against excitatory or ischemic neurotoxicity by several mechanisms. The author performed this study to investigate the neuroprotective effects of an adenosine agonist, R-phenylisopropyl adenosine (RPIA), on the neurotoxicity induced by KA in the hippocampus in rats. Kainic acid (10 mg/kg) was administered intraperitoneally, and coadministration of KA with RPIA (100 µg/kg, i.p. 10 min prior to injection of KA), was also performed. The experimental animals were sacrificed at 1 day and 1 week after drug administration. Luxol fast blue-cresyl violet stain and GFAP immunohistochemistry in hippocampus were performed. Loss of pyramidal cells in CA1 and CA3 of hippocampus and increase of GFAP immunoreactivity in the dentate gyrus and all hippocampal area were observed 1 day and 1 week after KA injection. Neuronal atrophy and nuclear pyknosis were observed but substantial cell loss was not found after coadministration of KA with RPIA. GFAP immunoreactivity in the hippocampus was not increased after coadministration of KA and RPIA. It is consequently suggested that RPIA may attenuate the KA-induced neuronal loss and increase of GFAP immunoreactivity in hippocampus in rats. (J Korean Epilep Soc 1 : 71-79, 1997)

KEY WORDS : Kainic acid · R-phenylisopropyladenosine · Hippocampus · GFAP · Epilepsy · Neuroprotection.

서론

Kainic acid는 흥분성 신경독성물질의 일종으로서¹⁾ 실험 동물에서 선조체 (corpus striatum)와 해마 (hippocampus)에서 특징적인 손상을 유발하므로 이와 관련된 중추신경계 질환의 실험동물모델 개발에 유용하게 사용되고 있다.^{2,3)} 또한 국소간질 (focal seizure)의 일종인 측두엽 간질 (temporal lobe epilepsy)의 경우 해마의 특정지역의 신

경세포의 소실 및 신경교세포의 증가가 유발되는 해마경화 (hippocampal sclerosis)의 소견이 특징적으로 관찰되며⁴⁾ 실험동물에서 이러한 형태학적 손상 등의 병변은 kainic acid의 국소적 및 전신적 투여에 의하여 유발시킬수있다.

Kainic acid에 의한 해마의 세포손상은 glutamate 및 aspartate 신경말단을 자극 하여 이들 신경전달물질의 calcium 의존적인 방출증가 및 kainate 수용체에 대한 직접 자극이 주원인이며,⁵⁾ 이는 연접후 신경세포의 과도하고 지속적인 탈분극을 유발하고 이에 따라 수상돌기와 세포체의 변성 및 에너지 고갈을 유발시키는 한편 뇌 혈관장벽 (blood brain barrier, BBB)을 파괴하여 독성물질 및 거식세포등이 뇌내로 유입시킨다고 알려져 있다.⁶⁾ Schwarcz 등⁷⁾은 10 nM의 kainic acid를 흰쥐의 해마에 투여한 결과 해마 전체의 신경세포의 괴사와 조직의 위축이 관찰되었으며 GABA 신경세포의 지표인 glutamate decarboxylase, 내

¹인천 중앙길병원 신경과

Department of Neurology, Choongang Gil Hospital, Inchun, Korea

²한양대학교 의과대학 해부학교실

Department of anatomy, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

교신저자 : 황세진, 133-170 서울시 성동구 행당동

TEL : (02) 290-8201 · FAX : (02) 281-7841

E-mail : neuana@elim.net

인성 GABA 및 [³H] GABA의 연접부로의 재흡수가 모두 감소되었고, choline acetyl transferase 및 tyrosine hydroxylase 등의 acetylcholine, dopamine 관련 효소의 변화도 유발되었다고 하였으며 Ulney등⁸⁾은 스트레스단백의 일종인 heat shock protein 70 (hsp 70)의 mRNA 발현이 kainic acid 투여 후 2시간 부터 증가되어 24시간 경에 최고조에 달한다고 하였다.

경련에 의한 신경계의 손상에서 흥분성 아미노산의 증가는 가장 중요한 기전으로 인식되고 있으며 이는 경련 뿐 아니라 뇌의 허혈 및 외상성 뇌손상에서도 중요한 기전으로 작용하므로⁹⁾ 항경련제의 개발연구는 허혈 및 외상성손상의 억제 연구와도 직접적 관련을 지닌다고 할수있다. Benveniste등¹⁰⁾은 흰쥐의 일과성 허혈성 발작 (transient ischemic attack, TIA)에 의한 해마의 손상과정에서 glutamate와 aspartate의 세포의 농도가 증가한다고 하였으며 Bullock 및 Fujisawa¹¹⁾는 뇌혈종이 유발되는 외상성 뇌손상에서 지연성세포사망 (delayed cell death)이 나타나며 이 역시 glutamate의 농도와 밀접히 관련된다고 주장하였다.

현재까지 kainic acid를 이용한 경련모델 및 허혈성 뇌손상에서 경련억제 혹은 신경세포 보호가능성이 제시된 물질로는 AMPA/kainate등의 glutamate 수용체 길항제,¹²⁾ phenobarbital,¹³⁾ calcium channel blocker,¹⁴⁾ NMDA 수용체 길항제¹⁵⁾ 및 purine 유도체¹⁶⁾를 들수 있다. Purine의 일종인 adenosine은 신경계에서 매우 광범위하게 분포된 신경전달물질로서 다양한 신경전달물질의 유리를 억제하는 기능을 지니며,¹⁷⁾ 뇌의 다양한 지역에서 자발적 혹은 외부 자극에 의한 전기적 흥분을 억제한다고 알려져 있다.¹⁸⁾ 중추 및 말초신경계에서 adenosine의 작용을 매개하는 수용체는 A₁, A₂ 및 최근에 밝혀진 A₃ 수용체로 분류되며 신경세포의 억제기능은 주로 A₁ 수용체의 작용으로서 cyclic AMP의 감소에 의하여 매개되는 것으로 알려져 있다.¹⁹⁾ Adenosine A₁ 수용체 자극약물의 허혈 및 흥분성 아미노산에 의한 뇌손상에 대한 신경세포보호작용에 관한 연구에서 Arvin등¹⁶⁾은 kainic acid의 선조체내 투여에 의한 손상과정에서 2-chloroadenosine이 calcium이온의 유입을 억제하여 glutamate의 유리를 감소시킬수 있다고 주장하였으며 Fastbom 및 Fredholm²⁰⁾은 L-phenylisopropyl adenosine이 해마절편에서 전기자극으로 유발된 glutamate의 유리를

억제한다고 하였다. 또한 McGregor 및 Stone²¹⁾은 안정적인 adenosine A₁ 수용체 자극제인 R-phenylisopropyladenosine (RPIA)가 kainic acid의 투여에 의한 말초 benzodiazepine 수용체 결합의 증가를 억제시킬수 있다고 주장한 바 있다.

한편 GFAP는 정상교세포의 세포질과 돌기에 존재하는 신경교특이단백 (gliotypic protein)의 일종으로 신경계의 손상에 의한 반응성 정상교세포종의 진행과정에서 매우 민감하게 증가하므로 신경독성의 평가에 있어 매우 유용한 지표로 알려져 있다.²²⁾

이상과 같이 kainic acid의 전신적 투여는 사람의 측두엽 간질과 유사한 경련 및 해마의 형태학적 손상을 유발하며 adenosine 수용체 자극약물은 이러한 손상 및 경련을 억제할 것이라고 예상할 수 있다. 이에 본 연구자는 adenosine A₁ 수용체 자극약물인 RPIA를 kainic acid와 병용 투여하고 해마 각부위의 조직형태학적 변화 및 GFAP의 면역활성 변화를 통하여 RPIA에 의한 kainic acid 유발경련 및 신경세포손상의 억제효과를 연구하고자 본실험을 시행하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군

본실험에 사용된 실험동물은 체중 300~350 gm의 건강한 SPF (specific pathogen free, 대한 실험동물 주식회사) Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였으며 실험기간 중 식수와 사료 (신촌사료 주식회사)는 무제한 공급하였다. 본 실험의 실험동물은 대조군, kainic acid 투여군, kainic acid 및 RPIA 병용투여군으로 분류하였으며 각각의 실험군에는 10마리씩의 흰쥐를 배당하였다.

2. Kainic acid 및 RPIA 투여

Kainic acid 투여군의 흰쥐에는 체중 kg당 10 mg의 kainic acid를 주사용증류수에 용해하여 (10 mg/10 ml) 복강내에 투여하였다. 또한 RPIA 및 kainic acid 병용투여군의 흰쥐에는 kainic acid 투여 10분 전에 체중 kg당 100 µg의 RPIA를 주사용 증류수에 용해하며 (5 mg/ 50 ml) 복강내에 투여하였다. 대조군의 실험동물에는 주사용 증류수 만을 투여하였다 모든 실험동물은 약제 투여후 정상적으로 실험동물 cage에서 사육하였으며 1일 및 1주 경과

시에 각각 회생하였다.

3. Luxol fast blue-cresyl violet 이중염색

Kainic acid 및 RPIA 투여에 의한 해마의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 luxol fast blue-cresyl violet 이중염색을 시행하였다. 실험동물은 약제 투여 후 1일 및 1주 경과시에 각각 50 mg/kg의 pentobarbital을 복강투여하여 마취시킨 후 좌심실을 통하여 상행대동맥에 삽관술을 시행하고 50 ml의 생리식염수 및 300 ml의 neutral buffered formalin을 사용하여 관류고정한 후 뇌를 제거하였으며 간뇌부위에서 5 mm두께로 관상절단을 한후 동일한 고정액에서 3~4일간 고정하고 수세, 탈수 및 포매과정을 거쳐 두께 8 μ m의 관상절편을 제작하고 luxol fast blue-cresyl violet 이중염색을 시행하였다.

Luxol fast blue-cresyl violet 이중염색은 조직절편을 탈파라핀 시킨후 36 °C의 incubator에서 luxol fast blue 수용액에서 4시간동안 반응시키고 lithium carbonate 용액으로 탈색시킨 후 cresyl violet 염색 및 탈수 청명과정을 거쳐 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

4. GFAP 면역조직화학염색

Kainic acid 및 RPIA 투여후 해마에서 GFAP의 면역활성변화를 관찰하기 위하여 GFAP 면역염색을 시행하였다. 실험동물을 약제투여후 1일 및 1주 경과시에 각각 50 mg/kg의 pentobarbital을 복강투여하여 마취시킨후 좌심실을 통하여 상행대동맥에 삽관술을 시행하고 60 ml의 0.1 Mol phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 및 300 ml의 4% paraformaldehyde-0.5% glutaraldehyde (in PBS)를 사용하여 관류고정한 후 뇌를 제거하였으며 간뇌 및 중뇌 부위에서 5 mm두께의 관상절단을 하여 동일한 고정액에서 1일간 후고정한후 30% sucrose-PBS 용액에서 1일 이상 침적시켰고 cryostat를 이용하여 -14 °C에서 두께 40 μ m의 관상절편을 제작하였으며 24 well tissue culture plate를 이용하여 PBS내에서 free floating 방법으로 면역조직화학염색을 시행하였다.

GFAP 면역조직화학염색에 사용된 일차 항체는 rabbit anti cow-GFAP (Dako Co.)를 0.2% triton X-100과 3% normal goat serum이 포함된 PBS에 1 : 500으로 희석하여 실온에서 24시간동안 반응시켰으며, PBS-triton X-100 용액으로 수세후 이차항체 (biotinylated goat anti rabbit)를 1 : 200으로 희석하여 30분간 반응시키고 avi-

din biotin peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector Co.)를 1시간 동안 반응시킨후 발색을 위한 기질로 0.05% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Co.)에 100 μ l의 3.0% H₂O₂를 첨가하여 5분동안 반응시켰다.

발색이 끝난 조직절편은 chrom-alum gelatin으로 coating된 slide glass에 옮긴 후 12시간 이상 건조시키고 탈수 및 청명과정을 거친 다음 permount로 봉입시킨 후 광학현미경으로 관찰하였다.

실험결과

1. 실험동물의 임상소견

1) Kainic acid 단독투여군

Kainic acid 단독투여군의 흰쥐는 kainic acid 투여후 30분 이내에 머리를 좌우로 흔드는 현상 (wet dog shaking) 및 안구돌출등의 증세를 나타내었으며 1~2시간 이내에 모든 실험동물에서 경련을 유발하였다. 경련은 강직성 간대성 발작의 형태를 나타내었으며 일부동물 (1/10)은 경련후 3시간 경과시에 사망하였다. Kainic acid 투여후 1일 부터는 대부분의 실험동물에서 운동성이 현저하게 감소되고 외부의 자극에 대하여 민감하게 반응하였으나 경련은 유발되지 않았다.

2) Kainic acid 및 RPIA 병용투여군

Kainic acid의 투여전에 RPIA가 투여된 흰쥐는 RPIA 투여 직후 부터 현저한 활동성의 감소를 나타내었다. RPIA가 투여된 흰쥐는 kainic acid가 투여된 후에도 대부분의 흰쥐는 활동성의 증가가 나타났으며 일부 실험동물 (2/10)은 경련을 유발하였고 모두 혈액이 포함된 구강 및 비강 분비물을 배출하며 사망하였다. 경련을 유발하지 않은 흰쥐는 모두 약물 투여후 1일 경과시 부터는 정상적인 활동성을 나타내었다.

2. Luxol fast blue -cresyl violet 염색소견

1) Kainic acid 단독 투여군

Kainic acid 단독투여후 1일 경과군의 흰쥐 해마의 모든 영역 및 치상회에서 형태학적 손상이 나타났으며 CA1, CA3 영역에서는 현저한 손상이 유발되었다. 치상회의 과립 세포 및 CA2영역의 추체세포층에서는 전층에서 세포의 위축 및 핵의 응축 (pyknosis)이 관찰되었으나 세포의 피사

소견은 관찰되지 않았다. 그러나 CA3 영역에서는 다수의 추체세포가 소실되어 공포 (vacuole)가 관찰되었으며 잔존하는 세포에서도 핵응축, 색소용해 (chromatolysis) 소견이 현저하였고 성상교세포가 상대적으로 증가되어 있었다. 또한 CA1 영역의 추체세포는 대부분이 소실되어 공포가 관찰되었고 잔존한 세포에서도 색소용해가 관찰되었다. Kainic acid 단독투여후 1주 경과군 흰쥐 해마에서 치상회의 과립세포는 1일경과군과 유사한 소견을 나타내었으나 핵응축 및 세포의 위축소견이 감소되어 있었다. CA3 영역에서 loop를 이루는 부분은 공포가 관찰되지 않았으나 추체세포는 완전히 소실되어 있었고 신경교세포가 증가되어 있었다. 또한 CA2 영역에서는 대부분의 추체세포가 정상적인 형태를 지니고 있었으나 CA1 영역에서는 추체세포의 수가 현저히 감소된 소견을 나타내었다 (Fig. 1).

2) Kainic acid 및 RPIA 병용투여군

Kainic acid와 RPIA 병용투여후 1일 경과군 흰쥐의 치상회 및 해마각 영역에서는 과립세포 및 추체세포의 위축과 핵응축소견이 관찰되었으나 CA3, CA1 영역에서도 세포의

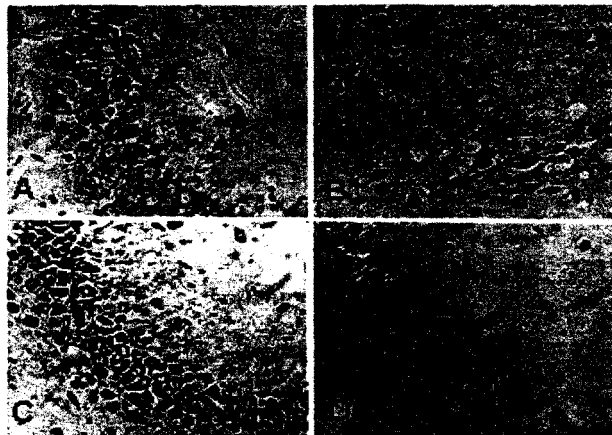


Fig. 1. Morphological changes of CA3 area of hippocampus induced by systemic injection of kainic acid (KA) and RPIA. Neuronal loss and gliosis induced by KA were attenuated by coadministration of RPIA A : control group, B : 1 day after KA treatment, C : 1 day after KA and RPIA treatment, D : 1 week after KA and RPIA treatment.

과사소견이 관찰되지 않았다. 세포의 위축은 특히 CA3 영역에서 현저하였으며 과립세포층에서는 핵응축소견이 현저하였다. Kainic acid와 RPIA 병용투여후 1주 경과군 흰쥐의 해마에서 치상회의 과립세포는 대조군과 유사한 소견을 나타내었다. 또한 해마의 CA3, CA2, 및 CA1 영역에서도 대부분의 추체세포가 정상적인 형태를 나타내었으나 CA3영역에서는 추체세포의 수가 대조군에 비하여 감소되어 있었다 (Fig. 1).

3. GFAP 면역염색소견

1) 대조군

대조군 흰쥐 뇌의 해마 및 치상회에서 GFAP의 면역활성은 과립세포층 및 추체세포층에서는 미약한 양성반응 (±)을 나타내었으나 분자층 (molecular layer) 및 다형층 (polymorphic layer) 에서는 약한 양성반응 (+)을 나타내었으며 해마의 모든 영역에서 유사한 소견을 나타내었다 (Table 1, Fig. 2).

2) Kainic acid 단독투여군

Kainic acid 단독투여후 1일 경과군 흰쥐의 뇌에서 해마 및 치상회의 GFAP 면역활성은 대조군에 비하여 현저한 증가를 나타내었다. 치상회의 GFAP 면역활성은 과립세포층에서는 미약한 양성반응 (±)을 나타내었으나 분자층 및 다형층에서는 약한 양성반응 (+) 혹은 중등도의 양성반응 (++)을 나타내었다. 또한 해마의 각 영역에서는 추체세포층에서도 약한 혹은 중등도의 양성 양성반응 (+~++)을 나타내었으며 분자층과 다형층에서는 중등도 혹은 강한 양성반응 (++~+++)을 나타내었다. 특히 CA3 영역에서는 GFAP 면역활성의 증가에 의하여 추체세포층의 구분이 되지 않았다 (Table 1, Fig. 2, 3). Kainic acid 단독투여후 1주 경과군 흰쥐의 뇌에서 해마 및 치상회의 GFAP 면역활성은 1일 경과군과 유사한 소견을 나타내었으나 추체세포층 및 과립세포층이 심하게 위축되어 있었다. 치상회에서 과립층 및 분자층은 약한 양성반응 (+)을 나타내었고

Table 1. GFAP immunoreactivity of dentate gyrus and hippocampal CA3 and CA1 area at 1 day and 1 week after KA and RPIA injection

Group	Regions	Dentate gyrus				CA3			CA1		
		Gr.	Mol.	Pol.	Py.	Mol.	Pol.	Py.	Mol.	Pol.	
Control		±	+	+	±	+	+	±	+	+	
KA	1 day	±	+	++	++	++	++	+	++	++	
	1 week	+	++	++	++	++	++	+	++	++	
KA+RPIA	1 day	±	+	+	++	+	+	+	+	+	
	1 week	±	+	+	+	+	+	+	+	+	

다형층은 중등도의 양성반응(++)을 나타내었다. 또한 해마의 CA1, CA3 영역에서는 추체세포층에서는 중등도의 양성반응(++)을 나타내었으며 분자층 및 다형층에서는 중등도에서 강한 양성반응(++~+++))을 나타내었다 (Table 1, Fig. 3).

3) Kainic acid 및 RPIA 병용투여군

Kainic acid와 RPIA 병용투여후 1일 경과군 흰쥐의 해마 및 치상회에서 GFAP의 면역활성은 kainic acid 단독투여군에 비하여 감소된 소견을 나타내었다 면역활성은 치상회의 과립세포층에서는 미약한 양성반응(±)을 나타내었고 치상회의 분자층 및 다형층에서는 약한 양성반응(+)을 나타내었다. 또한 CA3 영역의 추체세포층에서는 중등도의 양성반응(++)을 나타내었으나, CA3 영역의 분자층과

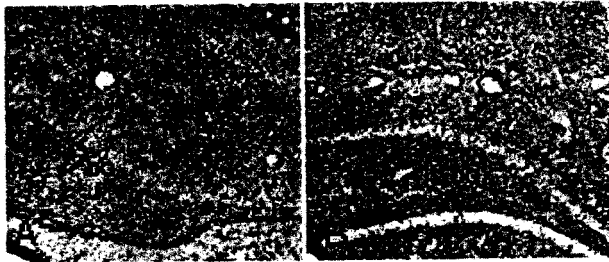


Fig. 2. Increase of GFAP immunoreactivity in hippocampus induced by systemic injection of kainic acid (KA), 1day after KA treatment. A : Control group, B : 1 day after KA treatment. DG : dentate gyrus.

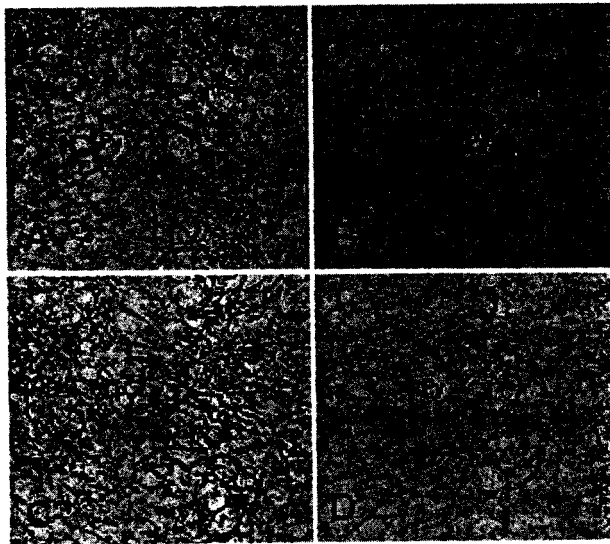


Fig. 3. Alteration of GFAP immunoreactivity in AC3 area of hippocampus induced by kainic acid (KA) tretment and coadministration of KA and RPIA. Immunoreactivity of GFAP was significantly attenuated by coadministration of RPIA. A : 1 day after KA treatment, B : 1 week after KA and RPIA treatment. Mol. : molecular layer, Py. : pyramidal layer, Pol. : polymorphic layer.

다형층, CA1 영역에서의 모든 층에서는 약한 양성반응(+)이 관찰되었다 Kainic acid 와 RPIA 병용투여후 1주 경과군 흰쥐의 해마 및 치상회에서 GFAP의 면역활성은 1일 경과시에 비하여 감소된 소견을 나타내었다. 면역활성은 치상회 과립세포층에서는 미약한 양성반응(±)을 나타내었고 분자층 및 다형층에서는 약한 양성반응(+)을 나타내었다. 또한 해마의 CA1, CA3 영역에서는 전층에서 약한 양성반응이 관찰되었다 (Table 1, Fig. 3).

고 찰

간질경련 (epileptic convulsion)은 다수의 신경세포에서의 동시적인 과도한 흥분에 의하여 신경학적 및 행동학적 이상이 발작적으로 유발되는 뇌기능의 이상으로 인구에서 약 0.5~2% 정도가 이환되며 다양한 원인에 의하여 나타날 수 있다.²⁰ 국소적간질의 일종인 측두엽간질은 특징적인 임상적 증상 및 뇌파소견과 함께 형태학적으로 측두엽내측의 해마, 구 (uncus) 및 편도핵 (amygdala) 등에 특징적인 손상을 동반하며 실험동물에서 변연계 구조물의 전기가극 및 kainic acid 국소및 전신적 투여 및 glutamate 혹은 aspartate 같은 흥분성독성물질의 뇌내 국소적 투여는 사람의 측두엽간질과 유사한 병변을 초래할수 있다.²⁰ 이중 kainic acid의 전신적 투여에 의한 방법은 실험동물에 대한 수술조작과 이에 따른 부가적인 감염 혹은 인접한 구조물의 물리적 손상이 해마등의 변연계 (limbic system)에서 특징적인 손상을 유발하는 장점을 지니고 있다.²⁰

Kainic acid가 중추신경계에서 신경세포의 흥분 및 독성을 나타내는 기전은 신경연접후막 (postsynaptic membrane)에서의 수용체 결합에 의한 직접적인 흥분작용과 glutamate 및 aspartate를 분비하는 축삭말단 (axon terminal), 즉 신경연접전부 (presynaptic element)에서의 작용으로 구분할 수 있으며 그외 뇌-혈관장벽(BBB)의 파괴에 의한 외부물질의 유입도 간접적으로 신경독성을 유발한다고 알려져 있다.⁹

중추신경계에서 glutamate의 수용체는 ligand 결합시 세포막의 이온투과성을 변화시키는 NMDA수용체와 비 NMDA수용체 및 이온 채널에 결합되지 않고 2차 정보전달자 (secondary messenger)의 활성화 작용을 유발하는 metabotropic glutamate 수용체의 3종류로 대별되며 이중 비NMDA 수용체는 α-amino-3-hydroxy-5-methyl-

isoxazole-4-propionate (AMPA)에 반응하는 AMPA 수용체 및 kainate에 반응하는 kainate 수용체로 세분된다.²⁶⁾ Kainate수용체는 해마의 CA3영역의 투명층 (stratum lucidum), 대뇌피질의 심층, 선조체, 시상의 망상핵 (reticular nucleus of thalamus), 편도핵 및 소뇌의 과립세포층에 고밀도로 존재하며,²⁷⁻²⁹⁾ 이는 ligand의 선택성이 적고 kainic acid 외에 domoic acid, quisqualate 및 L-glutamate등에 의하여 자극될 수 있으며,^{30,31)} 해마의 CA3, CA4영역에서 kainic acid의 수용체 결합은 NMDA의 길항제에 의하여 증가 된다고 알려져 있다.³²⁾

한편 kainic acid의 신경연접전부에서의 작용에 대하여 Ferkany등³³⁾은 kainic acid가 수용체 결합에 의한 작용과 함께 calcium 의존적으로 연접전부의 아미노산 수용체를 자극하여 glutamate와 aspartate의 유리를 증가시킨다고 주장하였으며 Sloviter등³⁴⁾은 perforant path의 전기 자극 및 흥분성 신경독성으로 유발된 경련은 신경전달물질의 과도한 분비를 유발하고 이에 따라 연접후부에서 수상돌기의 팽창과 세포괴사를 유발한다고 하였다.

Kainic acid에 의한 해마의 손상에 관련된 보고로서 Sperk등³⁵⁾은 흰쥐에 체중 kg당 10 mg의 kainic acid를 피하투여 후 wet dog shak 현상과 지속적인 강직성 간대성 경련이 유발되었고 해마, 이상피질, 편도핵 등에서 kainic acid 투여후 3시간에 신경세포의 위축과 핵응축등이 관찰되고 1일 이후에는 신경세포와 회색질교세포의 소실, 탈수초화, 성상교세포의 증식, 정맥주위의 출혈, 혈관의 증식등이 유발되었으며 이러한 손상은 해마의 CA1 지역에서 특히 현저하였다고 보고한바 있다.

본 연구에서도 kainic acid의 전신적 투여는 해마의 CA1, CA3 구역의 추체세포에서 심한 손상을 유발하였다. Kainic acid 투여후 1일 경과시에 CA1 구역에서는 추체세포가 대부분 소실되어 있었으며 CA3 구역의 경우에는 추체세포가 많이 소실되어 있었고 잔여세포의 경우는 대부분 세포의 위축 및 핵응축소견을 나타내었다 또한 1주 경과시에는 CA1구역의 경우 1일 경과시와 유사한 소견을 나타내었으나 CA3구역에서는 세포의 괴사가 더욱 진행되어 대부분의 세포가 소실되고 신경교증이 유발되었다. 반면 CA2구역의 추체세포 및 치상회의 과립세포는 1일 경과시에는 핵응축 및 세포질의 위축소견을 나타내었고 1주경과시에는 CA2구역은 정상적인 형태를 나타내었으며 치상회의 과립세포층

에서는 세포의 감소 및 세포질위축의 소견을 나타내었다 이상의 소견으로 보아 해마의 CA1 구역은 가장 초기에 심한 손상을 나타내며 CA3 구역도 심한손상을 유발하나 CA2 및 치상회에서는 심한 손상이 유발되지 않음을 알 수 있었다.

이상의 본실험등에서 나타난 바와 같이 해마의 각 구역 및 치상회의 각 지역에서 kainic acid에 대한 민감성의 차이를 나타내는 것은 각각의 신경세포에 존재하는 수용체 및 calcium 결합단백질 등의 차이에서 기인하는 것으로 생각할 수 있다. 중추신경계에서 NMDA 수용체는 CA1 영역에 많이 분포하고, kainate 수용체는 치상회문및 CA3 영역에 많이 분포하며,³³⁻³⁵⁾ 간질등의 손상에 대한 저항성을 지닌 신경세포에서는 calbindin이나 parvalbumin등의 calcium 결합단백질이 발현되는 것으로 알려져 있다.^{36,37)}

본 연구에서는 kainic acid의 신경독성과 RPIA에 의한 보호효과를 성상교세포의 지표물질인 GFAP의 면역염색을 통하여 관찰하였다. 측두엽간질등 해마의 신경세포 손상은 신경교세포의 활성화를 유발한다. Mitchell등³⁸⁾은 kainic acid를 흰쥐의 뇌실에 투여한 결과 CA3 영역에서 3개월 정도 지속되는 반응성 성상교세포증과 미교세포 (microglia)의 증식을 관찰할 수 있다고 하였으며, Griffin등³⁹⁾은 측두엽간질환자의 뇌에서 성상교세포에 분포한 calcium 결합단백질인 S-100 단백질이 증가한다고 주장한바 있다.

본 연구에서는 RPIA투여가 kainic acid에 의한 신경독성에 미치는 영향을 관찰하였다. 현재까지 뇌허혈, 간질 및 퇴행성 뇌질환 및 신경독성물질에 의한 뇌손상을 억제하기 위한 수단이 다각적으로 연구되어 왔으며 근래에 glutamate 등의 흥분성 신경독성물질이 많은 뇌손상의 주원인으로 작용한다는 이론⁴⁰⁾이 인정됨에 따라 뇌손상억제연구에서 흥분성독성물질의 작용기전 차단에 기초한 방법이 많은 부분을 차지하고 있다. 흥분성신경독성의 차단에는 다양한 glutamate 수용체의 길항제, 항경련제, calcium channel 억제제 등이 시도되고 있고 이중 adenosine 화합물도 다양한 기전으로 작용한다고 알려져 있다. Bullock등⁴¹⁾은 NMDA 수용체 길항제인 D-CPP-ene가 경막하뇌혈중에 의한 인접 대뇌피질부위의 허혈성 뇌손상을 억제할 수 있다고 하였으며 Sutula등⁴²⁾은 kainic acid를 뇌실내에 투여하고 5일간 60 mg/kg의 phenobarbital을 투여한 결과 간질경련 대한 민감성 및 치상회에서의 신경세포손상등을 억제할 수 있다고 하였다. 또한 Braun 및 Freed⁴³⁾은 kainic acid를 흰쥐

의 뇌실내에 주입하고 calcium 채널차단제인 nifedipine 을 동시에 투여할 때 경련의 지속시간의 현저히 감소하였으며 이는 nifedipine이 경련의 전파 혹은 지속을 차단하는 효과가 있음을 의미한다고 주장하였다.

본 연구에서는 adenosine A₁ 수용체의 자극제인 RPIA 를 kainic acid와 병용투여하여 kainic acid에 의한 손상의 억제 효과를 관찰하였다. 포유류의 뇌에 광범위하게 분포된 adenosine은 억제성 신경전달물질 및 신경조절물질 (neuromodulator)로 작용하여 중추신경계의 흥분조절에 관여하며 흥분성신경독성의 차단에도 효과를 지닐 것으로 예상되고 있다. Adenosine의 수용체는 기본적으로 adenosine과 결합후 adenylylase를 억제하는 A₁ 수용체와 adenylylase를 자극하는 A₂ 수용체로 구분되며,^{41,42} adenosine에 의한 중추 및 말초신경계에서의 억제 작용은 주로 A₁ 수용체에 의하여 매개된다고 알려져 있다.⁴³ Mahan등⁴⁴은 adenosine A₁ 수용체가 해마, 대뇌피질 및 소뇌에 많이 분포한다고 하였으며 Schubert 및 Mitzdorf⁴⁵는 해마의 CA1 영역에서 연결부에 작용하여 신경세포의 활성을 억제한다고 하였다. 또한 Deckert 및 Jorgensen⁴⁶은 A₁ 수용체는 CA3 영역에서는 연결전부인 추체세포의 축삭말단에, CA1영역에서는 연결후부인 추체세포의 수상돌기에 위치하여 kainic acid등에 의한 손상의 억제에 기여한다고 주장하였다.

이상과 같이 adenosine은 해마등에서 A₁ 수용체와 결합하여 신경세포의 억제를 유발하며 이러한 억제의 기전에는 흥분성 아미노산의 분비억제가 주요하며 이외에도 신경세포의 흥분감소로 인한 산소소모의 감소, 체온저하 및 말초 및 중추의 혈관확장등이 기여한다고 알려져있다.⁴⁷ Arvin등⁴⁸은 adenosine A₁ 수용체 자극제인 2-chloroadenosine이 kainic acid의 국소투여에 의한 선조체 신경세포의 손상을 억제한다고 하였으며 이는 2-chloroadenosine이 연결전부의 수용체에 결합하여 calcium이온의 유입을 억제함에 따라 glutamate의 유리가 억제되기 때문이라고 하였고 Barrie 및 Nicholls⁴⁹는 내재성 adenosine이 4-aminopyridine에 의하여 유발된 glutamate의 유리를 억제할 수 있다고 하였으며 여기에는 A₁ 수용체 및 protein kinase C가 매개한다고 주장하였다.

본 연구에서는 RPIA를 사용하여 kainic acid에 의한 손상의 억제유무를 관찰하였으며 RPIA의 전신적투여는 투여

후 1일과 1주 경과시에 kainic acid에 의한 해마의 추체세포손상을 현저하게 억제하였다. Luxol fast blue-cresyl violet 염색소견상 해마의 CA1, CA3 영역의 추체세포는 kainic acid 단독투여시에는 1일 및 1주경과후에 많은 세포가 괴사되고 소실되었으나 RPIA와 kainic acid 병용투여후 1일 경과시에는 핵응축 및 세포질 위축등의 소견은 현저하였으나 세포의 괴사는 관찰되지 않았고 1주 경과시에는 CA3 영역에서 세포의 수가 다소 감소되었으나 대부분의 지역에서 정상적인 소견을 나타내었다. 이러한 결과는 RPIA에 의한 kainic acid의 신경독성 차단효과에 의한 것이라고 사료된다.

RPIA는 안정적인 adenosine A₁ 수용체 자극제의 하나로 중추 및 말초에서 다양한 신경전달물질의 방출을 억제한다고 알려져 있다. Fastbom 및 Fredholm⁵⁰은 RPIA의 이성체인 LPIA (L-phenylisopropyladenosine)가 배양된 해마절편에서 glutamate의 유리를 감소시킨다고 하였으며 MacGregor 및 Stone⁵¹과 McGregor등⁵²은 RPIA와 kainic acid를 동시에 투여하고 말초 benzodiazepine 수용체인 PK-11195의 결합을 측정된 결과 kainic acid에 의한 [³H]-PK11195의 결합을 현저히 감소시켰으며 이는 kainic acid에 의한 신경교증이 RPIA에 의하여 억제되기 때문일 것이라고 주장하였으며 이러한 RPIA의 작용은 주로 중추신경계에 위치한 adenosine A₁ 수용체에 의하여 매개된다고 주장하였다.

본 연구에서 RPIA의 투여는 kainic acid의 투여에 의한 해마의 GFAP 면역활성증가를 현저히 감소시켰다. Kainic acid 투여후 해마 및 치상회에서 GFAP 면역활성은 대조군에 비하여 현저하게 증가하였으며 1일 경과시에 비하여 1주후에 더욱 증가된 소견을 나타내었으나 RPIA와 kainic acid 병용투여시에는 1일 및 1주 경과군에서 모두 대조군과 유사한 면역활성을 나타내었다. 이상과 같이 본실험의 결과를 종합할때 RPIA는 흰쥐의 해마에서 kainic acid에 의한 신경세포손상 및 GFAP 면역활성의 증가를 억제하는 것으로 사료된다.

중심 단어 : Kainic acid · RPIA · 해마.

- 논문접수일 : 1997년 9월 19일
- 심사통과일 : 1997년 10월 27일

REFERENCES

- 1) Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969;164:719-21
- 2) Nadler JV, Perry BW and Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 1978;271:676-7
- 3) Sperk G, Lassman H, Baran H, Kish SJ, Seitelberger F and Hornykiewicz O. Kainic acid induced seizures: Neurochemical and histopathological changes. *Neurosciences* 1983;10:1301-15
- 4) Margerison JH, Corsellis J. Epilepsy and the temporal lobes. *Brain* 1966;89:499-529
- 5) Ferkany JW and Coyle JT. Kainic acid selectively stimulates the release of endogenous excitatory amino acids. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;225:399-406
- 6) Zucker DK, Wooten GF and Lothman EW. Blood-brain barrier changes with kainic acid-induced limbic seizures. *Exp Neurol* 1983;79:422-33
- 7) Schwarcz R, Zaczek R and Coyle JT. Microinjection of kainic acid into the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 1978;50:209-20
- 8) Ulney JB, Leigh PN, Marsden CD, Lee A and Anerton BH. Stereotaxic injection of kainic acid into the striatum of the rats induces synthesis of mRNA for heat shock protein 70. *FEBS Lett* 1988;235:215-23
- 9) Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci* 1990;13:171-82
- 10) Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984;43:1369-74
- 11) Bullock R and Fujisawa H. The role of glutamate antagonists for the treatment of CNS injury. *J Neurotrauma* 1992;9(Suppl. 2)
- 12) Borowicz KK, Gasior M, Kleinrok Z, Czuczwar SJ. The non-competitive AMPA/kainate receptor antagonist, GYMK 52466 potentiates the anticonvulsant activity of conventional antiepileptics. *European J Pharmacol* 1995;281:319-26
- 13) Sutula T, Cavazos J, Golarai G. Alteration of long-lasting structural and functional effects of kainic acid in the hippocampus by brief treatment with phenobarbital. *J Neurosci* 1992;12:4173-87
- 14) Braun DE, Freed WJ. Effect of nifedipine and anticonvulsants on kainic acid-induced seizures in mice. *Brain Res* 1990;533:157-60
- 15) Bullock R, McCulloch J, Graham DI, Lowe D, Chen MH, Teasdale GM. Focal ischemic damage is reduced by CPP-ene studies in two animal models. *Stroke*, 1990;21(suppl. III):32-6
- 16) Arvin B, Neville LF, Pan J, Roberts PJ. 2-Chloroadenosine attenuated kainic acid-induced toxicity within the rat striatum: relationship to release of glutamate and Ca²⁺ influx. *Br J Pharmacol* 1989;98:225-35
- 17) Fredholm BB, Hedqvist P. Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides. *Biochem Pharmacol* 1980;29:1635-43
- 18) Philis JW, Wu PH. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 1981;16:187-239
- 19) Hamprecht, B and van Calker D. Nomenclature of adenosine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1985;6:153-4
- 20) Fastbom J, Fredholm BB. Inhibition of [³H] glutamate release from rat hippocampal slices by L-phenylisopropyladenosine. *Acta Physiol Scand* 1985;125:121-3
- 21) MacGregor DG, Stone TW. Inhibition by the adenosine analogue, (R)-N⁶-phenylisopropyladenosine, of kainic acid neurotoxicity in rat hippocampus after systemic administration. *Br J Pharmacol* 1993;109:316-21
- 22) O'Callaghan JP. Assessment of Neuro-toxicity using assays of neuron and glia-localized proteins: Chronology and critique, in *Neurotoxicology*, Raven press, 1992:83-100
- 23) Avoli M and Gloor P, Epilepsy. In: Adelman G ed. *Encyclopedia of Neuroscience*, 1st ed. Birkhauser 1987:400-2
- 24) Sloviter RS and Dempester DW. "Epileptic" brain damage is replicated qualitatively in the rat hippocampus by central injection of glutamate or aspartate but not by GABA or acetylcholine. *Brain Res Bull* 1985;15:39-60
- 25) McCandless DW, Finesmith RB. Chemically induced models of seizures. In: Bouton AA, Baker GB, Butterworth RF ed. *Neurotoxicology*, vol. 22, Animal models of neurological disease, Humana Press, 1992:144
- 26) Watkins JC, Krogsgaard-Larsen P, Honore T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:25
- 27) Monaghan DT and Cotman CW. Distribution of ³H-kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res* 1982;252:91-100
- 28) Unnerstall JR and Wamsley JK. Autoradiographic localization of high affinity ³H-kainic acid binding sites in the rat forebrain. *Eur J Pharmacol* 1983;86:361-71
- 29) Berger ML, Charton G, Ben-Ari Y. Effect of seizures induced by intra-amygdaloid kainic acid on kainic acid binding sites in rat hippocampus and amygdala. *J Neurochem* 1986;47:720-7
- 30) Monaghan DT, Bridges RJ and Cotman CW. The excitatory amino acid and receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1989;29:365-402
- 31) Olney JW. Excitotoxicity: an overview. *Can Dis Wkly Rep* 1990;16:(suppl.1E) 47-57
- 32) Shiraishi K, Nakazawa S and Ito H. Zinc enhances kainate neurotoxicity in the rat brain. *Neurol Res* 1993;15:113-6
- 33) Ferkany JW, Zaczek R, Coyle JT. Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature* 1982;298:757-9
- 34) Tremblay E, Represa A, Ben-Ari Y. Autoradiographic localization of kainic acid binding sites in the human hippocampus. *Brain Res* 1985;343:378-82
- 35) Cotman CW, Monaghan DT. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their properties. In: Schwarcz R, Ben-Ari Y, ed. *Excitatory amino acids and epilepsy*. New York: Plenum Publ Corp. 1986:237-52
- 36) Geddes JW, Cotman CW. Plasticity in hippocampal excitatory amino acid receptors in Alzheimer's disease. *Neurosci Res* 1986;3:672-8
- 37) Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD. Calcium-binding protein (calbindin-D 28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol* 1991;308:381-96
- 38) Mitchell J, Sundstrom LE, Wheal HV. Microglial and astrocytic cell responses in the rat hippocampus after an intracerebroventricular kainic acid injection. *Exp Neurol* 1993;121:224-30
- 39) Griffin WST, Yeralan O, Sheng JG, et al. Overexpression of neurotropic cytokine 5 100 in human temporal lobe epilepsy. *J Neurochem* 1995;65:228-33
- 40) McGeer PL, Eccles J and McGeer E. *Molecular neurobiology of the mammalian brain*, Chap. 6. Putative excitatory neurons: Glutamate and aspartate. Plenum Press 1987:1751
- 41) van Calker D, Muller M and Hamprecht B. Adenosine regulators, via two different types of receptors, the accumulation of cAMP in cultured cells. *J Neurochem* 1979;33:999-1005
- 42) Londos C, Cooper DMF and Wolff J. Subclass of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:2551-4
- 43) Alzheimer C, Kargl L and Bruggencate GT.

- Adenosinergic inhibition in hippocampus is mediated by adenosine A1 receptors very similar to those of peripheral tissues. *European J Pharmacol* 1991;196:313-7
- 44) Mahan LC, McVittie LD, Smykrnadall EM, *et al.* Cloning and expression of an A1 adenosine receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 1991;40:1-7
- 45) Schubert R and Mitzdorf U. Analysis and quantitative evaluation of the depressive effect of adenosine on evoked potentials in hippocampal slices. *Brain Res* 1979;172:186-90
- 46) Deckert J, Jorgensen MB. Evidence for pre- and postsynaptic localization of adenosine A1 receptor in the CA1 region of rat hippocampus a quantitative autoradiographic study. *Brain Res* 1988;446:161-4
- 47) MacGregor DG, Miller WJ, Stone TW. Mediation of the neuroprotective action of R-phenylisopropyladenosin through a centrally located adenosine A1 receptor. *Br J Pharmacol* 1993;110:470-6
- 48) Barrie AP and Nicholls DG. Adenosine A₁ receptor inhibition of glutamate exocytosis and protein kinase C-mediated decoupling. *J Neurochem* 1993;60:1081-6