

단회 및 반복적인 Kainic Acid의 복강내 주사 후 백서 해마 Fos단백 발현의 비교

Comparison of Fos Protein Expressions in Rat Hippocampus Following Single and Repeated Intraperitoneal Administration of Kainic Acid

김광수¹ · 유경무¹ · 장희경²

Kwang Soo Kim, M.D.¹, Kyung Moo Yoo, M.D.¹ and Hee Kyung Chang, M.D.²

ABSTRACT

Background: Acute seizures that increase neuronal activity cause a rapid and transient induction of the immediate early gene c-fos in specific brain regions. C-fos gene may mediate long-term changes in cell function, such as growth, differentiation, and development, in response to acute extracellular stimulation. This study is designed to compare the expression of Fos protein in hippocampus after single and repeated injections of kainic acid (KA). **Methods:** In KA-single injection model, twelve adult male Sprague-Dawley rats were treated with single intraperitoneal injection of convulsive dose (20-30 mg/kg) of KA, and, in KA-multiple injections model, seven rats received KA by repeated daily intraperitoneal injections for 15 days. Eight control rats received normal saline. Expression of Fos protein was tested in hippocampus by immunohistochemical staining, and was scored by the degree of staining intensity and the ratio of stained cells to tested ones. **Results:** The scores tended to increase in CA3 and dentate gyrus after single and repeated intraperitoneal injections of KA. The scores of Fos protein expression in dentate gyrus were significantly higher in KA-single injection model than in control ($p < 0.05$). In comparison with scores in KA-single injection model, the scores in CA2, CA3 and dentate gyrus were lower in KA-multiple injections model. **Conclusions:** These results show that repeated seizure produces some blockade of c-fos induction in CA2, CA3 and dentate gyrus. This may be a long-term adaptive response by the nervous system to repeated neuronal activation. (J Korean Epilep Soc 3 : 33-38, 1999)

KEY WORDS: Fos protein · Rat hippocampus · Kainic acid-induced seizure.

서론

즉각조기유전자(immediate early gene)인 c-fos는 세포의 외부자극에 신속하게 반응하는 유전자이며, 이러한 즉각조기유전자로부터 만들어진 Fos단백은 전사인자로서 각종 후기반응유전자(late effector gene)의 전사를 증가시켜 신경계의 영구적인 변화를 초래한다.^{1,2)}

Kainic acid(이하 KA라 함)는 흥분성 아미노산인 glutamate 수용체의 촉진제로서 작용하며,³⁾ 신경독성 작용기전

은 신경세포의 수상돌기에 있는 KA수용체의 활성화 및 glutamate 등의 흥분성 수용체의 자극에 의한 탈분극이 신경세포내 칼슘이온의 농도를 증가시키고 이로 인한 칼슘 의존성 단백질분해효소의 자극 및 신경세포 에너지의 과소비가 일어나므로 인하여 결국에는 세포사를 일으키는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ KA는 동물실험에서 측두엽간질과 유사한 경련발작을 일으키며 측두엽간질에서 나타나는 근심측두엽 경화증(mesial temporal sclerosis)과 유사한 병변을 초래하므로^{5,6)} KA유발경련의 동물모형은 측두엽간질의 좋은 모형으로 이용되고 있다. KA를 전신적으로 투여함으로써 해마에서 Fos단백의 발현이 관찰된다.⁷⁻⁹⁾ Fos단백은 유전자발현의 조절에 관여하므로 KA에 의한 Fos단백의 발현은 간질에서 일어나는 변연계의 영구적인 변화를 야기하는 과정에 c-fos가 관여한다고 할 수 있다.

¹고신대학교 의과대학 신경과학교실, ²병리학교실
Department of Neurology¹ and Pathology², Kosin Medical College,
Pusan, Korea

교신저자: 김광수, 602-030 부산광역시 서구 암남동 34번지
TEL: (051) 240-6274 · FAX: (051) 245-9364

급성 발작에 의한 c-fos mRNA의 유도는 일시적인 Fos 단백질의 증가를 일으키며, Fos단백은 발작 후 4시간동안 증가되어 있으며 이후 정상범위로 감소한다. Morgan 등은 첫 번째 발작 4시간 후 두번째 발작에 의해서는 c-fos mRNA의 유도가 일어나지 않는데, 이는 Fos단백 증가의 시간경과로 볼 때 급성 발작 후 일어나는 c-fos 전사활동을 Fos단백이 억제조절하기 때문이라 하였으며,¹⁰⁾ Sassone-Corsi 등도 c-fos 유전자 전사가 Fos단백에 의하여 자동 조절된다¹¹⁾고 하였다. 이와 같이 급성 발작에 의한 c-fos 발현의 조절에 관한 연구는 많이 있으나 재발성 발작이 c-fos의 발현에 미치는 영향을 알아보려고 하는 연구로는 Winston 등이 실험쥐에 반복적으로 매일 전기경련충격을 가한 후 c-fos mRNA의 발현정도를 알아보려고 한 연구¹²⁾가 있으나 많지 않다. 본 연구는 KA를 일회 투여하여 유발된 발작에 의한 백서 해마의 Fos단백 발현정도와 KA를 매일 반복적으로 투여하여 발작 재발을 일으킨 후 Fos단백의 발현정도를 서로 비교함으로써 KA에 의해 유발된 재발성 발작이 Fos단백의 발현에 미치는 영향을 알아보려고 한다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

실험동물은 체중 200~350 gm의 Sprague-Dawley종 수컷 백서 27마리로서 이들 중 실험군에 19마리 및 대조군에 8마리를 사용하였다. 실험군 19마리 중 KA 일회 투여에 의한 발작실험에 12마리를 사용하였으며, 매일 반복적인 KA 투여에 의한 재발성 발작실험에 7마리를 각각 사용하였다. 실험군 및 대조군의 백서들은 polyethylene-carbonyl cage에 분리 수용하여 동일한 조건으로 사육되었다.

2. 실험 방법

1) 실험동물의 처치

KA 일회 투여에 의한 발작실험군 12마리는 KA(Sigma Chemical Co., USA)를 0.9% 생리식염수에 녹여 50 mg/ml의 농도로 만든 다음 20~30 mg/kg를 복강내에 일회 주사하여 발작을 유발시켰으며, 재발성 발작실험군 7마리는 KA를 생리식염수에 녹여 50 mg/ml 농도로 만든 다음 20 mg/kg를 15일간 매일 일회씩 복강내에 주사하였다. 대조군 8마리는 동일량의 0.9% 생리식염수를 일회 복강내에 주사하였다. KA 일회 투여에 의한 발작실험군 및 대조군 등

은 주사한 다음 3시간 후에 단두하여 희생시켜 뇌를 적출하였으며, 재발성 발작실험군은 실험 15일째인 마지막 KA주사한 다음 3시간 후에 같은 방법으로 희생시켜 뇌를 적출하였다.

2) 면역조직화학적 염색

적출된 뇌의 해마조직은 10% 중성 포르말린에 고정한다. 다음 파라핀 포매에 의해 4 μm 두께로 박절하였다. 박절된 조직절편을 probe-on plus slide에 부착시켜 70°C에서 10분간 건조시킨 후 xylene과 histoclear를 1:3의 비율로 섞은 용액에서 탈파라핀화한 후 alcohol로 흡수시켰다. 내인성 peroxidase의 활동을 억제하기 위하여 3% hydrogen peroxide를 처리한 후 유기 블롯팅 패드에 흡수시키고 70% ethyl alcohol로 세척하였다. 면역학적 염색을 위해 조직절편을 LSAB 세트내에 포함된 면역검정 완충액(immunoassay buffer)(Biomed Co., USA)에 5분간 담그었다. 결합항체의 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 3% bovine serum albumin(Sigma Co., USA)으로 20분간 처리하고 수성 패드에 흡수시켰다. 조직절편은 실온에서 90분간 1:50 polyclonal rabbit anti-Fos (Santa Cruz Biotechnology, USA)로 반응시키고 면역검정 완충액으로 수세하였다. 각 절편은 biotin으로 표지된 이차항체(Biomed Co., USA)로 37°C에서 30분간 처리하고 면역검정 완충액으로 수세하였다. 절편들을 avidin-biotin-peroxidase(Biomed Co., USA)로 37°C에서 30분간 반응시킨 후 증류수로 세척하였다. 색소원으로 3-amino-9-ethyl-carbazole (Biomed Co., USA)을 이용하여 실온에서 10분간 반응시키고 증류수로 수세하였다. 절편 슬라이드는 hematoxylin으로 대조염색을 시행한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

음성대조실험은 일차항체 대신에 희석액을 이용하였다.

3) 면역조직화학적 반응성의 판정기준 및 점수

면역조직화학적 반응성의 판정은 광학현미경하에 육안으로 핵이 갈색으로 염색된 경우를 양성으로 판정하였다. 양성 염색된 세포의 비율 및 염색강도의 정도를 다음과 같이 점수로써 계산하였다. 양성 염색된 세포의 비율이 25% 미만인 경우 1점, 25~50%인 경우 2점, 51~75%인 경우 3점, 및 76~100%인 경우 4점 등으로 평가하였으며, 염색의 강도는 핵이 갈색으로 염색된 정도에 따라서 연하게 염색된 약한 양성인 경우 1점, 중등도로 양성 염색된 경우 2점, 및 진하게 염색된 강한 양성인 경우 3점 등으로 하였다.

3. 통계적 분석

KA 일회 투여에 의한 발작군, 반복적 KA 투여에 의한 재발성 발작군, 및 대조군 등에서 양성 염색정도의 비교는 Kruskal-Wallis검사를 이용하였고 여기에서 통계학적으로 유의하게 나왔을 경우에 비교는 Mann-Whitney검사로 검정하였으며, 통계학적 유의성은 Bonferroni검정 후 해석하였다. 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

성 적

1. KA에 의한 발작반응

KA 복강내 투여후 1~2분 이내에 실험군의 모든 백서는 일련의 경련성 행동반응을 보였으며, 실험군 각 동물마다 다소간 차이는 있었으나 대부분에서 KA 투여후 1~2시간 동안 변연운동발작이 관찰되었다.

KA 일회 투여에 의한 발작실험군 12례 중 전신을 불규칙적으로 급격하게 떠는 wet dog shake는 전례에서 관찰되었으며, 머리와 상체의 짧은 근간대성 연축, 실조보행, 고개를 까닥이고, 코를 킁킁거리며, 얼굴을 실룩이고, 눈을 깜짝이고, 앞발을 떠는 행동 등은 10례(83.3%)에서 관찰되었고, 머리와 상체에 강한 간대성 발작 또는 근간대성 연축으로 곧추서기와 발작과 함께 넘어진 후 전신성 간대성 발작을 보이거나 전신성 긴장성 간대성 발작을 보이는 경우는 6례(50%)였으며, 간질중첩증은 4례(33.3%)에서 관찰되었다. 매일 반복적인 KA 투여에 의한 재발성 발작실험군 7례는 모든 례에서 매일 일련의 발작이 나타났으며, 이들 중

2례(28.6%)에서 간질중첩증이 관찰되었다. 간질중첩증이 나타난 2례 중 1례는 KA주사 10일째 멈추지 않는 간질중첩증으로 죽었다.

2. 대조군, 및 KA 일회 및 반복적 투여에 의한 발작실험군 해마에서 Fos단백의 발현

KA 일회 및 반복적인 투여에 의한 발작실험군 각각 1례에서 Fos단백의 발현은 Fig. 1과 같다.

대조군 8례의 해마에서 Fos단백은 CA1, CA3 및 CA4에서는 전례에서 검출되었으며, CA2에서는 7례(87.5%)에서, 그리고 치상회에서는 2례(25%)에서 각각 검출되었다. 양성 염색된 세포들의 염색강도는 약한 양성 염색에서 강한 양성 염색까지 다양하였으나 CA1, CA2 및 CA4에서는 강한 양성 염색을 보인 예가 많았으며, CA3에서는 중등도 양성 염색을 보인 예가 많았고, 치상회에서는 약한 양성 및 중등도 양성 염색을 보였다. 양성 염색을 보이는 세포들의 비율은 CA1 및 CA2에서는 75%이하였으며, CA3에서는 대부분에서 50%이하였고, CA4에서는 25%이하가 많았으며, 치상회에서는 모두 25%이하였다.

KA 일회 투여에 의한 발작실험군 12례에서 Fos단백은 CA1, CA2 및 CA3에서는 전례에서 검출되었으며, CA4 및 치상회에서는 각각 11례(91.7%)에서 검출되었다. KA 일회 투여에 의한 발작실험군에서 Fos단백의 검출은 대조군에 비하여 치상회에서 현저히 증가하였다. 양성 염색을 보인 세포들의 염색강도는 해마 모든 영역에서 중등도 양성 및 강한 양성 염색을 보였다. 양성 염색을 보이는 세포들의 비율은 CA1 및 CA4에서는 50%이하가 많았으며, CA2 및 CA3에

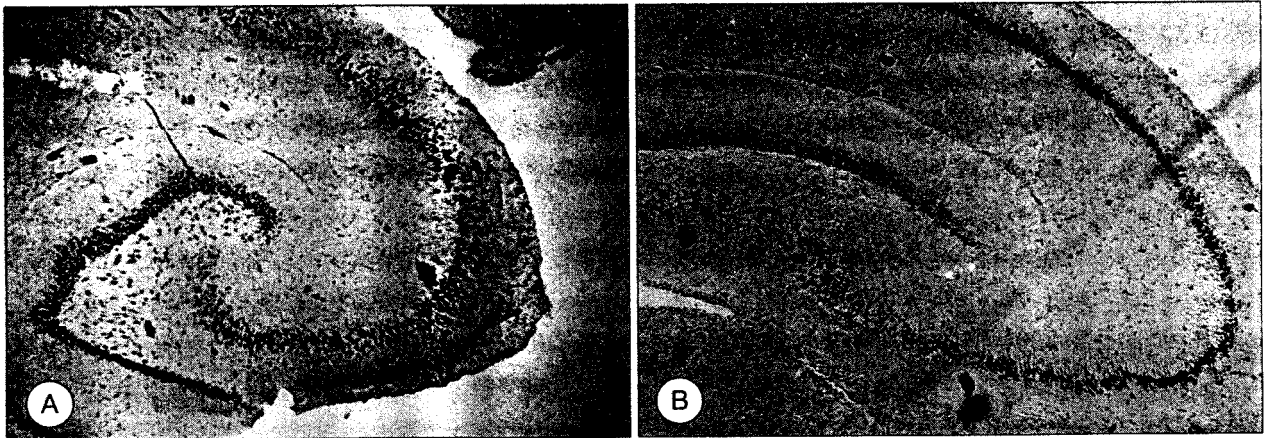


Fig. 1. Immunohistochemical demonstration of Fos protein expression in rat hippocampus following single and repeated injections of kainic acid (KA). Immunoperoxidase staining with polyclonal anti-Fos counterstained with hematoxylin, original magnification : $\times 40$ (A and B). In KA-single injection model, Fos protein immunoreactivity is intense in pyramidal cells of all hippocampal areas and dentate gyrus granule cells (A). In KA-multiple injections model, Fos protein immunoreactivity is moderate in pyramidal cells of CA3, and weak in CA4 pyramidal cells and dentate gyrus granule cells (B).

Table 1. Scores of Fos protein expression in hippocampus

Hippocampal area	Control (n=8)	KA-Single injection group (n=12)	KA-Multiple injections group (n=7)
CA1	4.75±3.28	5.08±3.70	5.14±4.49
CA2	5.00±3.34	6.75±3.60	3.00±1.41
CA3	3.88±2.36	6.17±2.41	4.71±2.81
CA4	3.63±2.62	2.50±1.09	3.14±1.46
Dentate gyrus	0.38±0.74	5.58±4.03*	2.57±2.51

*significant difference ($p < 0.05$) versus control, KA : kainic acid

서는 25~75%가 많았고, 치상회에서는 51~75%가 많았다. 대조군에 비하여 양성 염색된 세포들의 비율이 CA2, CA3 및 치상회 등에서 더 높았다.

반복적인 KA 투여에 의한 재발성 발작실험군 7례에서 Fos단백은 CA3 및 CA4에서는 전례에서 검출되었으며, CA2에서는 6례(85.7%)에서 검출되었고, CA1과 치상회에서는 각각 5례(71.4%)에서 검출되었다. 양성 염색된 세포들의 염색강도는 해마 모든 영역에서 중등도 및 강한 양성 염색이었다. 그러나 양성 염색된 세포들의 비율은 해마 모든 부위에서 50%이하가 많았다. KA 일회 투여에 의한 발작실험군과 비교하여 양성 염색을 보이는 세포들의 비율이 해마 모든 부위에서 낮았으며, 특히 CA2, CA3 및 치상회에서 현저하게 낮았다.

대조군, 및 KA 일회 및 반복적인 투여에 의한 발작군 등에서 해마 각 부위별 Fos단백 발현의 정도는 CA1, CA2, CA3 및 CA4 등에서는 3군간에 유의한 차이가 없었으나, KA 일회 투여에 의한 발작군은 CA2, CA3 및 치상회에서 반복적인 KA 투여에 의한 재발성 발작군은 CA3 및 치상회에서 대조군에 비하여 점수가 높은 경향을 보였다. 치상회에서는 KA 일회 및 반복적인 투여에 의한 발작군 모두에서 대조군에 비하여 점수가 높았으나, KA 일회 투여에 의한 발작군이 대조군에 비하여 점수가 유의하게($p < 0.05$) 높았다(Table 1).

고 찰

본 연구는 반복적인 KA 투여에 의한 재발성 발작시 백서 해마에서 Fos단백의 발현이 감소됨을 보여 주었다. 이러한 결과는 KA를 일회 투여 후 유발된 발작이 해마에서 Fos단백의 발현증가를 보였다는 여러 보고^{7,8,13,14}와 차이가 있었다.

전신적으로 KA를 투여시 후엽피질, 편도체, 해마, 시상 및 신피질 등에서 광범위한 신경세포의 소실이 일어난다.¹⁵

해마에서는 CA3, CA4 및 CA1 등의 추체신경세포가 손상을 잘 받으며, CA2 추체신경세포와 치상회 과립세포는 비교적 손상을 잘 받지 않는다.¹⁶ 이러한 전신적 KA 투여에 의한 해마신경세포의 소실은 항경련제인 diazepam을 투여시 변연계 손상이 감소 되었다는 실험결과,¹⁷ 경련을 악화시키는 약물인 morphine을 같이 투여하면 변연계 손상이 심해지고 아편수용체 길항제인 naloxone을 같이 투여하면 변연계 손상이 감소하였다고 하는 보고,¹⁸ 및 경련발작의 전파를 차단하는 병소가 있을 때 변연계 손상이 감소되었다는 실험결과¹⁹ 등에서 유추해 볼 때 KA의 직접적인 신경독성 작용에 의한 것이라기 보다는 지속적인 경련발작의 결과 초래된 것으로 생각된다.

간질발작 후에 실험동물의 뇌에서 즉각조기유전자인 c-fos 등의 발현증가가 관찰된다.^{10,20,21} 이러한 즉각조기유전자들은 신호전달도입체계의 제 3전령으로서 작용하여 세포의 자극에 의하여 유발된 단기간의 세포내 신호를 후기반응유전자 발현의 영구적인 변화로 연결시키는 역할을 한다.¹¹ c-fos 유전자로부터 만들어진 Fos단백은 Jun단백과 이종이합체를 형성하여 DNA에 위치하고 있는 AP-1에 결합함으로써 AP-1 핵단백복합체를 형성한다. 전사인자인 AP-1은 표적유전자의 전사활동에 영향을 주어 표적유전자의 발현에 변화를 일으킨다.²² 즉 Fos단백은 다양한 자극에 의하여 발현되어 자극과 유전자발현변화 사이를 연결하는 신호전달체계의 매개체로서 작용하여 신경계의 가소성 변화에 관여한다.

발작에 의한 뇌의 c-fos mRNA 발현은 발작한 후 수분 이내에 유의하게 증가하여 45분 후에는 최고치로 증가하였다가 2시간 후에 정상수준으로 감소하며, Fos단백은 c-fos mRNA의 발현에 비해 약간 지연되어 나타나서 발작 2-4시간 후에 최고치까지 증가하였다가 6~8시간 사이에 정상수준으로 돌아온다.^{10,21} Fos단백이 증가되어 있을 것으로 생각되는 첫 번째 발작 후 4시간 지나서 두 번째 발작자극을 가하는 경우 c-fos mRNA가 유도되지 않았다고 하는 연구,¹⁰ 배양세포에 단백질합성억제제로 처리하면 c-fos mRNA의 발현이 연장되었다는 연구,²³ 및 Fos단백에 의하여 c-fos 유전자의 촉진활동이 억제되었다고 하는 연구¹¹ 등은 Fos단백이 c-fos유전자 발현을 억제하는 조절기능을 가지고 있다는 것을 알 수 있다. 급성 발작 후 4시간 지나서 두번째 발작자극에 대하여 c-fos의 유도가 일어나지 않는 현상은 18시간이 지나서는 없어지며, 이때에는 두번째 발작자극시

c-fos의 유도가 완전히 일어났다고 한다.¹²⁾ 그러나 이러한 일회 발작자극 후 18시간 지나서 다시 c-fos의 유도가 재개되는 현상은 매일 일회씩 반복적으로 발작자극을 가한 후에는 일어나지 않는데, 이는 c-fos의 발현을 더 장기간 억제하는 기전이 있다는 것을 시사한다.

본 연구에서 실험백서에 매일 일회씩 반복적으로 15일간 KA를 복강 내에 주사하여 재발성 발작을 일으킨 후 관찰한 해마조직의 Fos단백이 KA를 일회 투여하여 발작을 일으킨 후 관찰한 Fos단백과 비교하여 발현유도가 낮았으며, 발작자극을 주지 않았던 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다.

Winston 등이 실험쥐에 반복적으로 매일 전기경련충격을 가한 후 관찰한 c-fos mRNA의 발현이 5일째부터 현저히 감소하기 시작하여 전기경련충격처치 8~10일째 이후에는 c-fos mRNA 발현유도가 전혀 일어나지 않았다¹²⁾고 한 연구결과에서 유추해볼 때 Fos단백은 c-fos mRNA가 발현되고 수 시간 후에 이어서 나타나므로 본 연구에서 Fos단백의 발현 감소를 보인 것은 c-fos mRNA의 발현 감소를 보고한 Winston 등의 실험결과와 비교하여 실험방법상 차이가 있으나 c-fos의 발현억제가 나타났음을 시사하는 점에서 유사하다고 할 수 있다.

급성 발작시 c-fos 발현의 억제는 처음 자극으로 인하여 이미 증가되어 있는 Fos단백이 두번째 자극에 의한 c-fos의 발현을 억제하기 때문이며, 처음 자극후 6~8시간 지나서 Fos단백이 다시 정상수준으로 감소했을 때에는 다음 자극에서 c-fos의 발현이 다시 유도된다.¹⁰⁾ 그러나 장기간 반복적인 자극에 의한 c-fos의 발현은 자극을 가한 처음 수일간은 급성 발작시와 마찬가지로 자극에 의하여 c-fos 발현이 유도되지만 그 이후에는 자극후 24시간이 지나서 이전 자극에 의하여 증가되었던 Fos단백이 정상수준으로 감소되었을 것으로 추정되는 시기에 다음 자극을 주어도 c-fos의 발현이 유도되지 않는다.¹²⁾ 그러므로 반복적인 자극에 의한 c-fos 발현의 억제기전은 급성 발작시 나타나는 Fos단백에 의한 자동조절 기전과는 서로 다른 것으로 추정된다. 즉 반복적인 자극에 의한 재발성 발작시 추정되는 c-fos 발현억제 기전은 발작시 Fos단백과 동시에 유도되는 다른 Fos 유사단백이 c-fos의 장기조절에 관여할 가능성, Fos의 전사활동에 의해 조절되는 유전자산물이 c-fos 발현조절자로서 작용할 가능성, 및 재발성 발작자극이 뇌에서 c-fos 발현을 조절하는 제 2전령체계와 이온통로의 기능적 상태를 변화시킴으로써 c-fos의 유도를 억제할 가능성 등이 제시되고 있다.¹²⁾

해마에서 Fos단백 발현의 지속시간은 해마 각 부위에 따라 차이가 있다. 발작 후 2~4시간 경에 발현이 최고치에 이른 다음 치상회에서는 4~5시간 이내에 점차 기저치로 감소되고 해마 추체세포층에서는 24시간까지 증가되었다가 48시간 이후에 기저치로 감소한다.⁷⁾¹³⁾ 본 연구는 해마에서 Fos단백이 최고치로 발현되어 있을 것으로 추정되는 KA투여 3시간 후에 관찰하였다. 해마 각 부위별 Fos단백의 발현정도에 차이가 있는데, Popovici 등은 Fos단백의 발현이 변연운동발작이 나타나는 시기에 치상회에서 처음 증가하기 시작하여 지속적인 발작을 보이는 KA투여 3~6시간 후에는 변연계의 다른 부위에서도 증가하였다¹³⁾고 하며, Le Gal La Salle는 KA투여 후 2-4시간에 해마 CA1, CA3 및 CA4 등의 추체세포층과 변연계 다른 부위에서도 Fos단백의 발현이 증가하였다⁷⁾고 한다. 본 연구에서는 KA 일회 주사에 의한 발작 및 15일간 반복적으로 주사한 재발성 발작시 Fos단백의 해마 각 부위별 발현정도 비교에서 재발성 발작시 치상회에서 Fos단백의 발현감소가 있었으며, 해마 다른 부위에서는 KA 일회 투여에 의한 발작자극시 Fos단백의 발현과 반복적인 투여에 의한 재발성 발작자극에 의한 Fos단백의 발현 사이에 서로 통계학적인 차이가 없었다. 그러나 반복적인 KA 투여에 의한 재발성 발작자극시 치상회에서 뿐만 아니라 CA2 및 CA3 등에서도 Fos단백 발현이 감소되는 경향을 보였다. 이는 재발성 발작자극시 해마 치상회, CA2 및 CA3 등에서 c-fos의 발현이 억제되었음을 시사한다. 그러나 본 연구의 연구대상이 적으므로 결론 내리기는 어려우며, 향후 더 많은 연구대상으로 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

측두엽간질의 모형인 Kainic acid(KA) 유발발작 동물모형에서 KA 일회 투여에 의한 발작자극 및 반복적으로 매일 KA를 투여한 재발성 발작자극시 해마에서 Fos단백의 발현을 서로 비교함으로써 KA에 의한 반복성 재발성 발작자극이 Fos단백의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. Sprague-Dawley종 수컷 백서 19마리를 대상으로 KA 일회 투여에 의한 발작자극군은 20~30 mg/kg의 KA를 복강 내에 일회 주사하여 발작을 유발시켰으며, 재발성 발작자극은 20 mg/kg의 KA를 15일간 매일 일회씩 복강 내에 주사하여 발작을 유발시켰다. 대조군 8마리는 0.9% 생리식염수

를 일회 복강 내에 주사하였다. KA 일회 주사에 의한 발작 실험군 및 대조군은 주사 3시간동안 경련발작을 관찰한 후 단두하여 뇌를 적출하였으며, 반복적인 KA 투여에 의한 재발성 발작실험군은 마지막 KA를 주사한 다음 3시간 후에 같은 방법으로 희생시켜서 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌의 해마조직은 면역조직화학적 염색을 하여 Fos단백에 대한 면역반응성의 양상을 관찰하였다.

Fos단백의 발현은 KA 일회 및 반복적인 투여에 의한 발작자극시 대조군에 비하여 해마 CA3 및 치상회에서 증가되어 있었으며, KA 일회 투여에 의한 발작자극시 치상회의

Fos단백 발현이 유의하게 증가되었다. 반복적인 KA 투여에 의한 재발성 발작자극시 Fos단백의 발현정도는 KA 일회 투여에 의한 발작자극에 비하여 CA2, CA3 및 치상회 등에서 감소되었다.

이러한 결과는 KA에 의한 재발성 발작시 해마에서 c-fos의 발현이 억제되며, 이는 반복적인 신경세포 자극에 대한 신경계의 장기 적응반응으로 생각된다.

중심 단어 : Fos 단백질 · 백서해마 · Kainic acid 유발 발작.

- 논문접수일 : 1999년 3월 10일
- 심사통과일 : 1999년 7월 9일

REFERENCES

- 1) Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: Metabolic mapping at the cellular level. *Science* 1988;240:1328-31.
- 2) Dragunow M, Currie RW, Faull RLM, et al. Immediate-early genes, kindling and long-term potentiation. *Neurosci Biobehav Rev* 1989;13:301-13.
- 3) Olney JW, Rhee V, Ho OL. Kainic acid: A powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res* 1974;77:507-12.
- 4) Coyle JT. Neurotoxic action of kainic acid. *J Neurochem* 1983;41:1-11.
- 5) Nadler JV. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci* 1981;29:2031-42.
- 6) Ben-Ari Y. Limbic seizures and brain damage produced by kainic acid: Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985;14:375-403.
- 7) Le Gal La Salle G. Long-lasting and sequential increase of c-fos oncoprotein expression in kainic acid-induced status epilepticus. *Neurosci Lett* 1988;88:127-30.
- 8) Popovici Th, Barbin G, Ben-Ari Y. Kainic acid induced seizures increase c-fos-like protein in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 1988;150:405-6.
- 9) Jorgensen MB, Johansen FF, Diemer NH. Post-ischemic and kainic acid-induced c-fos protein expression in the rat hippocampus. *Acta Neurol Scand* 1991;84:352-6.
- 10) Morgan JL, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 1987;237:192-7.
- 11) Sassone-Corsi P, Sisson JC, Verma IM. Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* 1988;334:314-9.
- 12) Winston SM, Hayward MD, Nestler EJ, Duman RS. Chronic electroconvulsive seizures down-regulate expression of the immediate-early genes c-fos and c-jun in rat cerebral cortex. *J Neurochem* 1990;54:1920-5.
- 13) Popovici Th, Represa A, Crepel V, et al. Effects of kainic acid-induced seizures and ischemia on c-fos-like proteins in rat brain. *Brain Res* 1990;536:183-94.
- 14) 유경무 · 김광수 · 조무연 · 박병채. Kainic acid로 유발된 경련이 백서 해마에서 c-fos 단백질의 발현에 미치는 영향. *대한신경과학회지* 1996;14(1):102-13.
- 15) Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat. An electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 1980;5:515-28.
- 16) Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 1978;271:676-7.
- 17) Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP, et al. Evidence suggesting secondary epileptogenic lesions after kainic acid: Pretreatment with diazepam reduces distant but not local brain damage. *Brain Res* 1979;165:362-5.
- 18) Fuller TA, Olney JW. Effects of morphine and naloxone on kainic acid neurotoxicity. *Life Sci* 1979;24:1793-8.
- 19) Nadler JV, Cuthbertson GJ. Kainic acid neurotoxicity towards hippocampal formation: Dependence on specific excitatory pathways. *Brain Res* 1980;195:47-56.
- 20) Dragunow M, Robertson HA. Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature(Lond)* 1987;329:441-2.
- 21) Sonnenberg J, Macgregor-Leon P, Curran T, Morgan J. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron* 1989;3:359-65.
- 22) Curran T, Franza BR Jr. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 1988;55:395-7.
- 23) Greenberg ME, Hermanowski AL, Ziff EB. Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol Cell Biol* 1986;6:1050-7.