

# 리튬-필로카르핀에 의한 중첩경련 모델에서 MK-801이 해마의 신경병리 및 Fos 발현에 미치는 영향

## Effect of MK-801 on Neuronal Cell Loss and Fos Expression of Hippocampus in Lithium-Pilocarpine Induced Status Epilepticus

이광수<sup>1,2</sup> · 김영인<sup>1,2</sup> · 박정욱<sup>1</sup> · 정성우<sup>1</sup> · 이상봉<sup>1</sup>

Kwang-Soo Lee, M.D.<sup>1,2</sup>, Yeong-In Kim, M.D.<sup>1,2</sup>, Jeong-Wook Park, M.D.<sup>1</sup>,  
Sung-Woo Chung, M.D.<sup>1</sup> and Sang-Bong Lee, M.D.<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Background & Objectives** : Endogenous excitatory amino acid has been implicated in neuronal damages occurred in many neuropathological conditions such as ischemia and seizures. Glutamate, the principal excitatory neurotransmitter in the CNS, exerts its neurotoxic activity primarily by binding to the NMDA receptor, one of the three glutamate receptors. We evaluated the effect of MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist, on both Fos expression and neuronal damages in lithium-pilocarpine induced status epilepticus rat model. **Methods** : Seizures was induced in rats by lithium pretreatment followed by low dose of pilocarpine (30 mg/kg, ip). MK-801 (1 mg/kg) was treated 15 min before (MK-801 Pre group, N=5) or 20 min after the injection of pilocarpine (MK-801 Post group, N=5). Saline, instead of MK-801, was injected for the Control group (N=5). **Results** : Seizure-induced neuronal damages, which was evaluated by the counting of the number of viable pyramidal cells in the area of CA1 and CA3 of the hippocampus, were significantly inhibited by MK-801 in both MK-801 Pre and Post groups. This protective effect of MK-801 was observed only in the CA1 area and was not typical in the CA3 area in both groups, and there was no differences in MK-801 activity between Pre and Post groups. We also examined the expression of Fos, which has been known to be involved in long-term neuronal plasticity or delayed neuronal insults, by the immunohistochemical analysis in the hippocampus and thalamus. Pilocarpine induced Fos expression significantly in the Control group and moderately in the MK-801 Post groups, whereas, it was completely blocked by the pretreatment of MK-801 in hippocampus. **Conclusion** : Our results showed that MK-801 prevented the hippocampal cells from neuronal damages as well as inhibited Fos expression in the pilocarpine-induced rat seizure models. These results suggest the roles of NMDA receptor and Fos protein in seizure-related hippocampal damages. (J Korean Epilep Soc 3 : 155-163, 1999)

**KEY WORDS** : Lithium-pilocarpine · Status epilepticus · NMDA antagonist · c-fos · Hippocampus · Neuroprotection.

### 서론

쥐에서 무스카리닉 콜린성 제제인 필로카르핀의 고용량 단독 투여 또는 리튬과 필로카르핀의 복합 투여로 유도되는 중첩경련 모델은 사람에서의 간질중첩증에 대한 실험적 연구 모델로 널리 이용되어 왔다.<sup>1-4)</sup> 리튬-필로카르핀에 의한 중첩경련은 변연계를 포함하는 광범위한 영역에 걸쳐 뇌 신경<sup>1</sup>가톨릭대학교 의과대학 신경과학교실, <sup>2</sup>의과학연구원 겸임연구원 Department of Neurology<sup>1</sup>, The Catholic University of Korea<sup>2</sup>, Catholic Research Institutes of Medical Science, Seoul, Korea  
교신저자 : 김영인, 137-040 서울 서초구 반포동 505번지  
TEL : (02) 590-2093 · FAX : (02) 599-9686  
E-mail : nuyikim@cmc.cuk.ac.kr

경세포 손상을 일으키는 것으로 알려져 있으며<sup>5)</sup> 이는 임상적으로 소아의 열성 경련이 내측두엽 경화(mesial temporal sclerosis)와 관련된다는 보고<sup>6)</sup>와 함께 경련에 의한 신경 세포 손상의 증거를 제시하고 있다.

Glutamate와 aspartate 등 흥분성 아미노산의 과도한 생성은 신경 세포막에 위치한 특정 수용체를 활성화시킴으로써 연접후성 신경세포의 손상을 초래한다는 흥분독성(excitotoxic) 가설<sup>7)</sup>은 현재 세포손상 기전 및 그의 치료적인 측면에 대한 많은 연구들에 중요한 골격을 제시하고 있다. 중첩경련후에 나타나는 신경병리소견은 glutamate와 같은 흥분성 아미노산에 의한 신경세포 손상과 유사하며, 특히 glutamate가 주된 신경전달물질로서 작용하는 구심

성 신경들의 밀집 부위에서 신경세포 손상이 두드러지게 나타난다고 보고되고 있다.<sup>8)9)</sup> 또한 NMDA 수용체 길항제의 투여가 경련에 의한 신경세포 손상을 차단하였다는 결과<sup>10)</sup>는 지속적 경련으로 인한 뇌 신경세포 손상에 glutamate 수용체, 특히 NMDA 수용체를 통한 과도한 활성화가 중요한 원인이 될 수 있음을 시사해준다.

한편 즉각 초기 유전자(immediate early gene)의 하나인 c-fos는 세포에 대한 다양한 자극에 대한 반응으로 유전 계획을 전환시키는 master-switch의 역할을 한다.<sup>11-13)</sup> 중첩경련 시 c-fos는 해마 및 여러 대뇌피질에서 발현이 증가 또는 감소된다고 하나<sup>14)</sup> 아직까지 그 의미는 명확히 밝혀져 있지 않다. 최근에는 c-fos 발현이 세포 분열에 대한 직접적인 작용보다는 세포의 분화 및 활성화에 관련될 것이라는 견해들이 대두되고 있다.<sup>15)16)</sup> 한편 c-fos의 일시적인 발현이 영구적 의미를 갖는 kindling의 발달에 관련하며 지속적인 발현은 지연성 세포 손상과 관련 있다는 보고들은<sup>17)18)</sup> 경련 후 나타나는 c-fos 발현의 증가가 세포 가소성(neuronal plasticity) 또는 지연성 세포손상에 관여할 것이라는 점을 시사하고 있다.

이에 저자들은 쥐의 리튬-필로카르핀 중첩경련 모델에서 비경쟁적 NMDA 수용체 길항제인 MK-801을 투여한 후 뇌파, 신경세포손상 여부, Fos단백(이하 Fos)의 발현 양상을 관찰하여 첫째, MK-801이 신경세포손상에 미치는 영향 둘째, MK-801이 Fos 발현에 미치는 영향 셋째, 신경세포손상의 정도와 Fos 발현과의 연관성 등을 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 실험 동물

실험동물로는 Sprague-Dawley계의 흰쥐로서 6주 이상 동일한 조건으로 사육한 250~300 gm의 건강한 수컷을 사용하였으며 실험기간 중 사료는 시판 고정 사료(제일 사료 주식회사)를 먹여 사육하였다.

#### 2) 약 제

리튬(lithium chloride)과 필로카르핀(pilocarpine hydrochloride) methylscopolamine 및 MK-801은 Sigma(U.S.A)에서, ketamine(유한양행, Korea), diazepam(명

인제약, Korea)과 xylazine(한국 바이엘 화학 주식회사, Korea)등은 국내 제약회사로부터 각각 구입하였다. 리튬은 주사하기 전 증류수에 녹여 3 mEq/ml로 만들고, 필로카르핀과 methylscopolamine은 0.9% 생리식염수에 녹여 각각 30 mg/ml과 1 mg/ml로 희석하여 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 중첩경련 모델

20마리의 흰쥐에 ketamine(87 mg/kg)과 xylazine(13 mg/kg)을 복강 내 주사하여 마취시킨 후 정위고정기(stereotaxic frame)위에 올려놓고 두개골을 노출시킨 후 양쪽 전두엽과 두정엽에 저자들이 고안한 경막의 전극을 각각 심은 뒤 골 시멘트(bone cement)와 치과용 아크릴(dental acrylic)을 사용하여 고정시키고 피부를 봉합하였다. 일주일 후에 리튬을 3 mEq/kg의 용량으로 복강 내 주사하였고 24시간이 지난 후 약 20분간 기준 뇌파를 기록한 다음 필로카르핀(30 mg/kg)을 복강 내 주사하여 중첩경련을 유도하였다. 이때 전신 무스카리닉 콜린성 부작용을 줄이기 위한 목적으로 methylscopolamine(1 mg/kg)을 함께 주사하였다. 경련의 시작 및 중첩경련의 발생은 지속적인 경련성 행동양상 및 뇌파의 변화에 의해 규정하였다. 중첩경련이 시작된 후 매 10분 간격으로 행동양상 변화 및 뇌파의 변화를 관찰하였으며 3시간이 지난 다음 항경련제로 다이아제팜(10 mg/kg)을 투여하여 경련을 중단시켰고, 그 후 2시간 동안 매 10분 간격으로 뇌파를 측정하였다. 1 Hz의 저주파 필터, 70 Hz의 고주파 필터 및 60 Hz의 notch filter를 사용하여 뇌파기(Nihon Koden, Japan)로 측정하였으며 뇌파용지의 속도는 15 mm/sec로 하였다.

### 2) 실험군

실험군은 중첩경련군, MK-801 전처치군과 후처치군의 세 군으로 나누었다. 중첩 경련군은 리튬-필로카르핀으로 중첩경련 유도 20분 후에 생리식염수를 투여하였다(N=10). MK-801 전처치군에서는 필로카르핀을 주사하기 15분 전에 MK-801을 1 mg/kg의 용량으로 투여하였고(N=5), 후처치군에서는 필로카르핀으로 중첩경련이 유도된 20분 후에 MK-801을 같은 용량으로 주사하였다(N=5).

### 3) 조직학적 관찰

필로카르핀 주사 24시간 후 각 실험군의 해마에서 신경세포의 손상정도와 Fos 발현을 관찰하기 위해 Hematoxylin-

Eosin(이하 H-E) 염색법과 면역세포화학법을 각각 실시하였다. 실험동물을 urethane으로 마취한 다음 가슴을 열고 심장을 통하여 생리식염수 300 ml와 paraformaldehyde를 300 ml를 차례로 관류하여 뇌를 고정한 후 적출하여 4°C의 paraformaldehyde에서 하룻밤 동안 더 고정하였다. 해마부위의 관찰을 위하여 intraaural 5.0 mm 부위를 절단한 후 마주보는 면의 한쪽은 Vibratome(Technical Product International, U.S.A.)을 사용하여 30 µm 두께의 관상절편(coronal section)을 만들어 Fos 발현을 보기 위한 면역염색을 시행하였고, 다른 한쪽은 파라핀 고정 후 10 µm 두께의 관상절편을 만들어 H-E 염색을 시행하여 신경세포 손상을 관찰하였다. 면역염색은 DAKO LSAB Kit (DAKO Corporation, U.S.A.)를 사용하여 실시하였으며 조직내 특이 면역반응을 제거하기 위하여 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 blocking reagent와 반응시킨 후 일차항체(rabbit polyclonal anti-Fos antibody, Oncogene Science, U.S.A.)를 1 : 20으로 희석하여 4°C에서 24시간동안 incubation하였다. 이차 항체인 biotinylated anti-rabbit IgG와 peroxidase-labelled streptavidin을 2시간동안 실온에서 반응시킨 다음 3% 3-amino-9-ethylcarbazole과 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 혼합액으로 발색하여 관찰하였다(DAKO LSAB Kit, DAKO Corporation, U.S.A.).

#### 4) 신경 손상 및 Fos 발현의 평가

신경 손상의 평가를 위해 H-E로 염색한 해마절편중 CA1과 CA3 부위의 피라미드 신경원체(pyramidal neuron)를 현미경으로 관찰하여 세포손상이 없는 정상적인 세포의 수를 세었다. CA1은 치랑(dentate gyrus) 윗가지의 측단부위를 기준으로 하고, CA3은 치랑의 윗가지 측단부위와 신경띠 궁융부 외측 사이 부분으로 각각 정하였다.<sup>19)20)</sup> 손상 받은 세포는 변성되어 핵의 모양이 위축되고 핵농축(pyknosis)을 보인다고 알려져 있으나<sup>21)</sup> 이것만으로 많은 수의 세포들간의 명확한 구분이 어려울 때가 있어, Stummer 등<sup>20)</sup>의 방법을 따랐다(Table 1). 정량적인 신경손상의 비교를 위하여 현미경 400배율의 시야에 보이는 세포를 센 다음 400배 시야의 길이를 재어 항상 일정한 길이 내에 정상세포를 세도록 하였으며, 두 개의 연속절단표본으로부터 같은 부위에서 좌, 우 양측의 수를 세어 평균값을 구하여 표시하였다.

실험군에서 관찰한 Fos 발현의 정도는 grade 0, 1, 2의

**Table 1.** Inclusion criteria for the identification of viable nerve cells. Only cells with a complete presentation of all listed criteria can be classified as viable

- |   |
|---|
| 1. Sharply delineated nucleus with elipsoid or round shape                |
| 2. Clearly distinguishable nucleolus located centrally within the nucleus |
| 3. Nucleus slightly darker than surrounding neutrophils                   |
| 4. Neuronal cytoplasm clearly demarcated from surrounding neutrophils     |
| 5. Less than one third of the surrounded by confluent vacuolization       |

3단계로 주관적으로 나누어 표시하였다. 그리고 시간 경과에 따른 Fos 발현의 영향을 알아보기 위하여 시상의 Fos 발현을 관찰하여 비교하였다.

#### 5) 통계적 처리

각 실험군에서 얻은 해마의 CA1과 CA3 영역에서 측정된 피라미드 신경원체부위의 세포수를 각각 평균±표준편차로 표시하였다. MK-801 전처치군과 후처치군의 신경세포손상 정도는 각각 중첩경련군과 비교하여 Student's *t* test로 검정하였으며 유의수준은 5% 미만에 두었다.

## 결 과

#### 1. 행동양상

중첩경련군의 경우 대부분에서 상동적 행동(stereotyped movement), 고개 끄덕임, 간대성 경련 및 발로 서는 모양을 하다 넘어지는 양상(Rearing & Falling)과 같은 전형적인 중첩경련단계를 나타내었다. 한편 MK-801을 kg 당 1 mg의 용량으로 전처치 및 후처치한 실험에서는 다소 불안정한 듯한 움직임이 증가되고 5~10분이 경과한 후부터는 사지의 힘이 없어 서있는 상태를 유지하지 못하고 복와(prone) 상태로 유지하기는 하였으나 고개 끄덕임과 간대성 경련이 복와자세가 유지된 상태에서 적은 진폭으로 지속적으로 나타나는 중첩성 경련상태를 유지하였다. 본 실험에 사용한 용량의 MK-801이 필로카르핀에 의한 경련을 억제하지 않았음을 보여주어 계속된 실험을 위해 같은 용량을 사용하였다.

#### 2. 뇌 파

MK-801 전처치와 후처치가 전신성 중첩경련의 경과중에 나타나는 뇌파소견에 미치는 영향을 보기 위해 필로카르핀 투여후 30, 60, 120, 180 및 360분에 뇌파를 측정하여 동일시간의 중첩경련군과 비교하였다(Fig. 1).

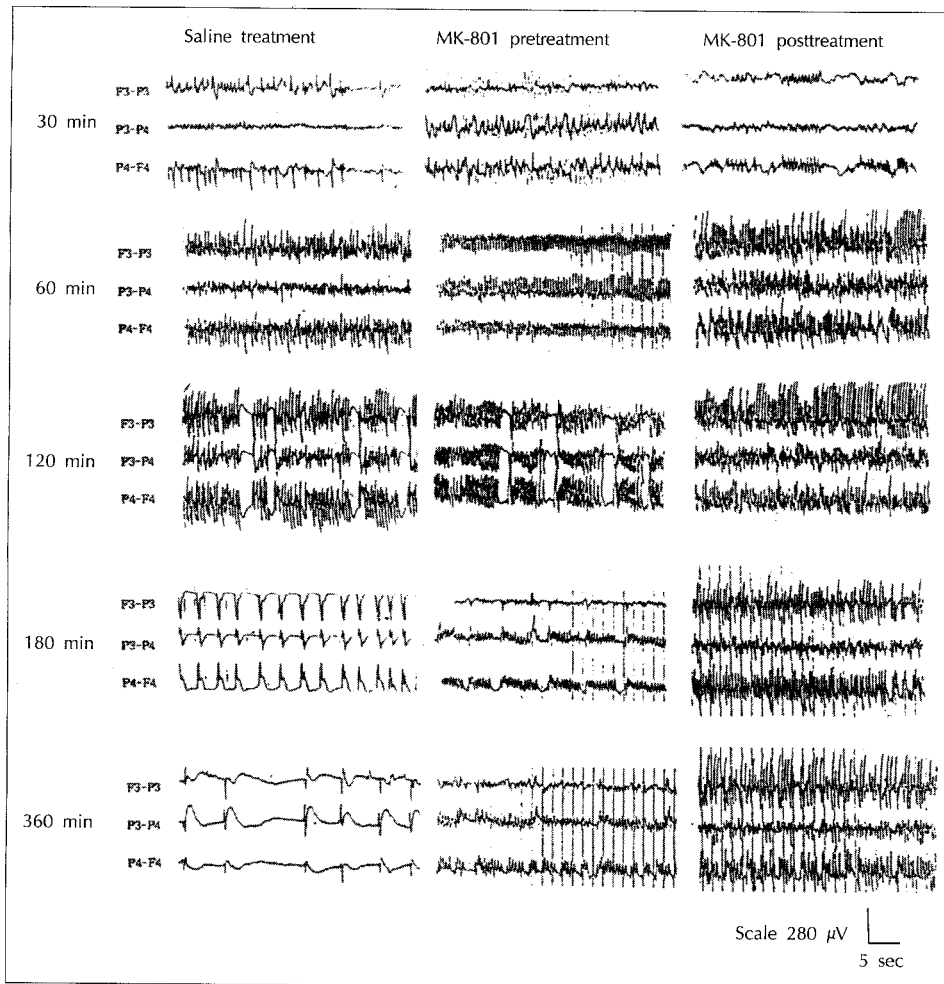


Fig. 1. EEG recorded at 30, 60, 120, 180 and 360 minutes after pilocarpine injection in control, MK-801 pre- and posttreatment rat.

### 1) 필로카르핀 투여후 30 및 60분

모든 실험군에서 동일한 뇌파소견을 보여 필로카르핀 투여후 30분에는 점차 진폭이 커지거나 발작뇌파(ictal discharge)의 진폭과 빈도가 점차 증가 또는 감소하는 양상(waxing and waning)을 보였고, 60분에는 규칙적이고 지속적인 높은 전위의 극파(spike) 또는 극-서파(spike-wave)의 지속적 발작뇌파(continuous ictal discharge)가 나타났다.

### 2) 필로카르핀 투여후 120분

전처치군과 중첩경련군에서는 60분에서 나타났던 지속적 발작뇌파기에 전반적인 뇌파의 편평화가 삽입되어지는 편평기를 동반하는 지속적 발작뇌파(continuous ictal discharge with flat periods)가 관찰되었으나 후처치군에서는 필로카르핀 투여후 60분에 보였던 지속적 발작뇌파가 계속 유지되고 있었다.

### 3) 필로카르핀 투여후 180분 및 360분

중첩경련군에서는 높은 전압의 단상성(monophasic)인 반복적 sharp wave가 편평한 배경에 양측성으로 나타나(periodic epileptiform discharge on a flat background) 시간이 경과할수록 편평한 배경의 기간이 증가되는 경향을 보였으나, MK-801 전처치군에서는 편평기를 동반하는 지속적 발작뇌파형이 극파의 전압이 다소 감소한 상태로 나타났으며 후처치군에서는 필로카르핀 투여후 60분에 보였던 지속적 발작 뇌파가 그대로 유지되었다.

### 3. 신경병리

MK-801은 중첩경련에 의한 CA1 및 CA3 영역의 신경세포손상에 대하여 보호효과를 나타내었다. CA1 영역에서는 중첩경련군에서 피라미드 신경원체 세포들이 대부분 손상되어 세포수가  $29.0 \pm 12.75$ 로 감소되어 있었으나 MK-801 전처치군 및 후처치군에서는 각각  $64.1 \pm 8.19$ 과  $68.0 \pm$

12.94로 대조군에 비하여 세포의 손상정도가 유의하게 감소하였다. CA3영역에서도 중첩경련군의 경우 세포수가 25.8±4.38로 CA1과 유사하게 감소되어 있었으나, 전처치군 및 후처치군에서는 37.0±12.10과 39.8±11.71로 중첩경련군에 비하여 신경세포 손상정도가 덜하였으나 통계적 유의성은 없었다(Table 2, Fig. 2).

**4. Fos 발현 양상**

중첩경련군에서는 해마의 CA1, CA3 영역 및 시상에서 Fos 발현이 증가되었으며 발현정도는 모두 grade 2로 나타났다. MK-801 전처치군에서는 해마의 CA1, CA3 영역과 시상에서 Fos 발현이 나타나지 않거나 매우 경미하였다. 후처치군에서의 Fos 발현정도는 CA1 및 CA3영역에서 모두 grade 1으로 중첩경련군에 비하여 감소되는 경향을 보였으나 시상에서는 중첩경련군과 마찬가지로 발현이 grade

2로 증가되었다(Fig. 3).

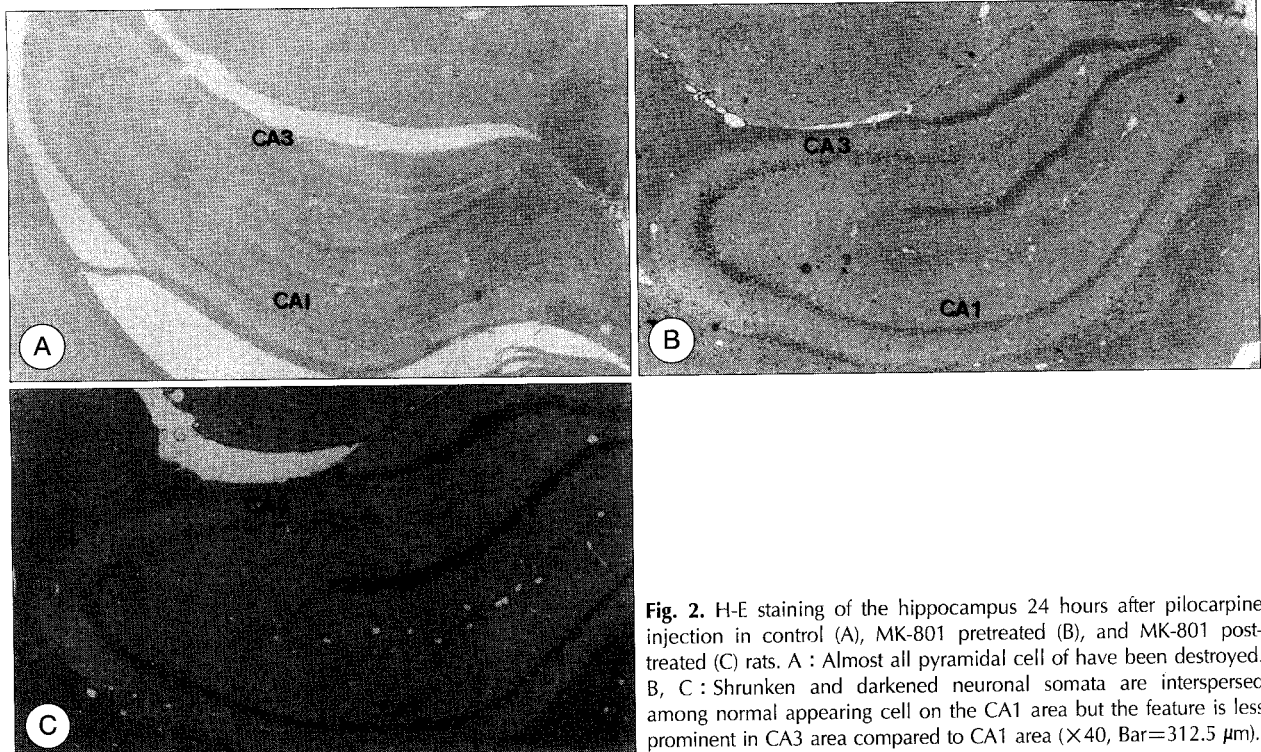
**고 찰**

리튬-필로카르핀이나 카이닉산 등에 의한 중첩경련 모델에서 흥분독성에 의한 신경세포 손상기전에 대한 실험들은 MK-801, ketamine 등의 비경쟁적 NMDA 수용체 길항제들을 이용하여 진행되어 왔다.<sup>22-25</sup> 이중 MK-801은 중첩경련기간동안 운동성을 약화시키거나 용량에 의존하는 형태로 항경련 효과를 보이는 것으로 보고되기도 하여<sup>26/27</sup> 중첩경련의 유도 및 유지에 있어 NMDA 수용체가 중요한 역할을 할 것이라 추측되고 있다. 본 실험에서는 MK-801의 신경 보호 효과에서 항경련 역할로 인한 신경세포 보호영향의 가능성을 배제하고자 하는 목적으로 예비 실험을 통하여 뇌파 기록상 대조군과 동일한 시간동안 전기적 경련이 유지될 수 있는 최소량의 MK-801 용량을 결정하였다. MK-801 투여에 따른 사지의 강직성마비로 인하여 뒷발서기 및 넘어짐은 나타나지 않았고 두부 및 앞발의 근간대성 경련의 진폭이 매우 감소되었으나 촉지 및 관찰을 통하여 중첩경련 상태의 지속성을 확인하였으며 뇌파소견에서도 지속적 발작극파가 3시간 이상 유지되었다는 점은 MK-801투여 실험군에서도 중첩경련이 대조군과 동일하게 지속되었음을

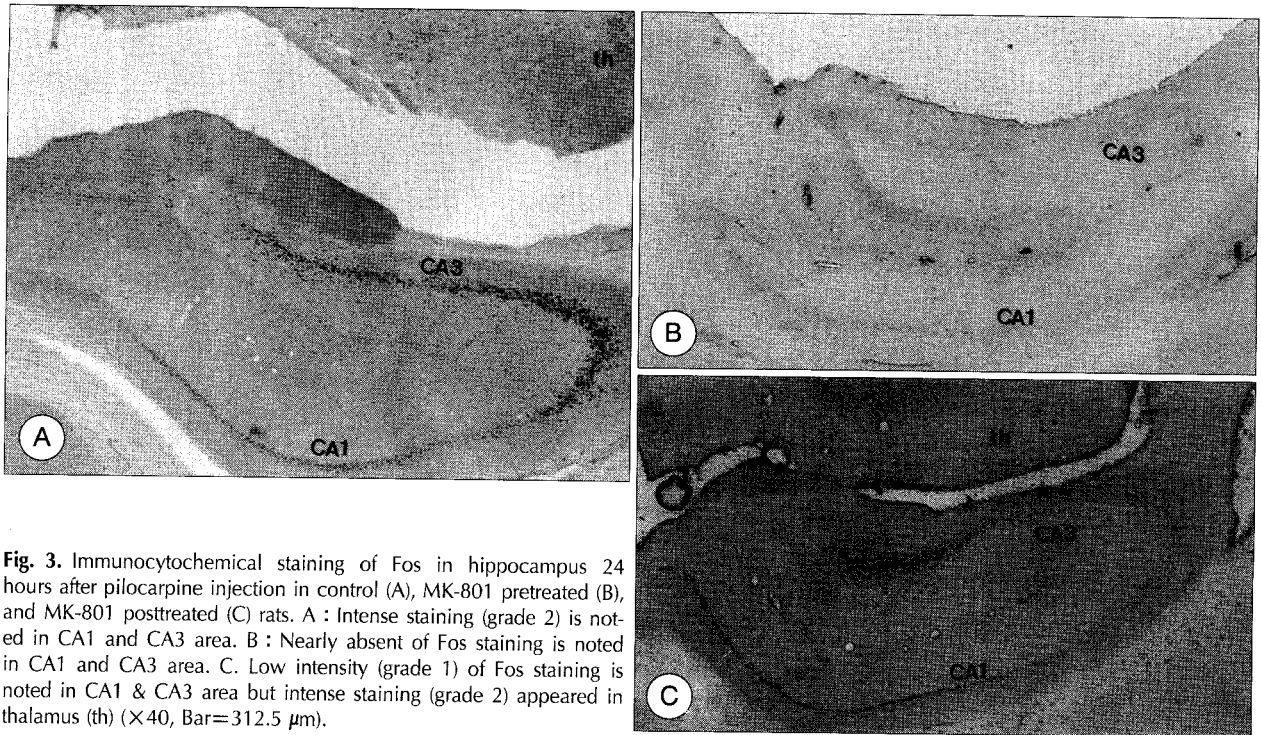
**Table 2.** Measurement of the neuronal damage in CA1 and CA3 area of the hippocampus by Stummer's method (20) (mean±SD) in the rats treated with saline, or MK-801 before and after pilocarpine injection. Viable cell number was counted

	CA1	CA3
	No of neuron	No of neuron
Saline treated	29.0±12.75	25.8±4.38
MK-801 pretreatment	64.1± 8.19*	37.0±12.10
MK-801 posttreatment	68.0±12.94*	39.8±11.71

\*p<0.05



**Fig. 2.** H-E staining of the hippocampus 24 hours after pilocarpine injection in control (A), MK-801 pretreated (B), and MK-801 post-treated (C) rats. A : Almost all pyramidal cell of have been destroyed. B, C : Shrunken and darkened neuronal somata are interspersed among normal appearing cell on the CA1 area but the feature is less prominent in CA3 area compared to CA1 area (×40, Bar=312.5 μm).



**Fig. 3.** Immunocytochemical staining of Fos in hippocampus 24 hours after pilocarpine injection in control (A), MK-801 pretreated (B), and MK-801 posttreated (C) rats. A : Intense staining (grade 2) is noted in CA1 and CA3 area. B : Nearly absent of Fos staining is noted in CA1 and CA3 area. C. Low intensity (grade 1) of Fos staining is noted in CA1 & CA3 area but intense staining (grade 2) appeared in thalamus (th) ( $\times 40$ , Bar=312.5  $\mu\text{m}$ ).

의미한다고 할 수 있을 것이다. 더욱이 대조군에서 관찰되는 지속적 발작기 이후의 신경세포의 손상을 의미하는 편평파를 배경으로 하는 주기적 극파가 나타나지 않았다는 결과(Fig. 1)는 아직 신경세포가 손상되지 않은 상태에서 전기적 활동을 하고 있다는 것을 의미하며 본 실험의 조직소견과 연관지어 볼 때 MK-801의 신경세포 보호효과에 의한 결과로 생각해 볼 수 있다. 이는 NMDA 수용체 길항제의 전치치가 경련에 의한 신경세포 손상을 차단하였다는 보고들<sup>10)28)</sup>에 미루어 볼 때 경련에 의해 유도된 NMDA 수용체의 활성화가 신경세포손상에 중요한 역할을 할 것이라는 단서를 제안하는 것이라 생각된다. 1995년 Fujikawa 등<sup>29)</sup>은 간질중첩모델에서 ketamine의 투여 후 해마나 시상 및 심부 피질에서 전기적 경련상태의 유지에는 영향 없이 독립적으로 신경세포손상이 감소되었다고 보고하면서 NMDA 수용체 길항제의 역할이 세포내 전기적 경련 활동성 자체에 대한 항경련효과에 의한 것이라기보다 흥분성 시상-피질 투사를 포함하는 흥분 전도 체계에 대한 흥분 독성 차단을 통해 이루어지는 것이라고 제시하였다.

본 실험에서 MK-801 투여에 따른 신경병리 소견의 변화로는 해마에서의 신경세포 손상정도의 현저한 감소로 나타났다으며(Table 2, Fig. 2) 이는 이전의 여러 비경쟁적 NMDA 수용체 길항제들에 의한 연구들의 결과와 일치하였

다.<sup>30)31)</sup> Clifford 등<sup>10)</sup>과 Lason 등<sup>28)</sup>은 카이닉산으로 유도된 중첩경련모델에서 NMDA 수용체 길항제를 투여한 후 편도, 이상핵, 시상 및 해마의 CA1에서는 신경세포 손상의 감소가 현저하게 나타났으나 중격핵 및 해마의 CA3 영역에서는 손상의 정도가 대조군과 유사하게 나타나는 선택적 보호성을 보고하였는데 본 실험에서도 CA1 영역에 비해 CA3 영역에서의 신경세포손상이 두드러지게 나타나 이들의 결과와 유사하였다.

이와 같은 선택적 수용성의 발생기전은 필로카르핀으로 유도된 중첩경련이 흥분성 연결에 의해 해마로 전파되어지며 해마에서의 흥분성 아미노산 방출이 일어나 신경세포 손상을 초래하게 되는데, 해마의 CA3 영역에서는 NMDA 수용체보다 카이닉산 수용체가 풍부하게 존재하므로<sup>33)34)</sup> 리튬 필로카르핀 유도 중첩 경련에서는 MK-801의 신경세포 보호 효과가 나타난 반면, 카이닉산 유도 경우에는 NMDA 수용체 길항제의 투여에 의한 보호 효과가 적게 나타나는 것이라 추측 할 수 있다. 다른 가능성으로서는 중첩경련에 의해 흥분성 연결이 과도한 양으로 해마에 도달하는 경우, 민감성을 가진 치상문세포가(dentate hilar cell) 먼저 손상 받게 됨에 따라 본래의 치상문세포가 가진 mossy fiber를 통한 CA3 영역세포에의 억제능력이 저지됨으로써 CA3 영역의 세포들이 폭주하는 흥분성 연결상태에 노출되

어저 비경쟁적 NMDA 수용체 길항제에 의한 방어기능이 한계에 이르게 됨에 따라 신경세포손상이 시작된다는 것이다. 반면 CA1 영역의 세포들은 CA3영역의 세포들로부터 Schaffer collateral fiber에 의해 이차적 흥분성 연결을 받으므로 해마로 도달한 흥분연접의 일부가 CA3 영역에서 비경쟁적 NMDA 수용체 길항제에 의해 일정한 양이 차단된 후 CA1 영역의 세포로 도달하기 때문에, 보다 적은 양의 흥분성 연결에 노출될 수 있고 CA1 영역의 세포에 NMDA 수용체가 풍부하게 존재하므로 NMDA 수용체 길항제에 의한 세포손상의 방어가 보다 CA1 영역에서 효과적으로 이루어질 수 있다는 것이다.

1993년 Barone 등<sup>34)</sup>은 필로카르핀으로 유도된 경련모델에서의 c-fos 단백질의 발현을 관찰한 연구에서 국소성 경련만이 지속된 경우에는 이상핵, 편도, 후각결절의 제한된 영역에서만 발현되었으나 중첩성 경련을 포함하는 전신성 경련이 유도된 경우 위에서 언급한 부위의외에 해마, 띠릉(cingulate gyrus), 전두엽 피질, 선조체 및 시상 등에 걸쳐 발현되었다고 하여 변연계 경련의 유발위치 및 전체화(generalization)되는 경로를 나타내는 지표라고 하였으며, White와 Price<sup>35)</sup>는 단계별로 구분된 국소적 경련 및 중첩경련에서 c-fos 단백질의 발현부위가 <sup>14</sup>C-2-deoxyglucose 자기방사선 사진술을 이용한 대사 증가 부위와 일치하였다는 연구들을 통해 c-fos의 발현이 그 시점의 신경세포 활동을 나타내는 중요한 단서가 될 것이라 제안되기도 하였다.

또한 c-fos 유전자는 광범위한 영역의 세포외적 자극에 대응하여 일시적으로 급속히 발현되는 즉각 초기 유전자들 중의 하나로써 세포분열에 대한 직접적인 작용보다는 세포의 분화 및 활성화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>36-38)</sup> Le Gal La Salle<sup>19)</sup>는 카이닉산에 의한 중첩경련모델에서 치랑(dentate gyrus)에서는 c-fos의 발현이 일시적으로 나타났으나 해마의 CA1 영역에서는 중첩경련 후 24시간 이후까지 유지되었으므로 c-fos의 발현이 중첩경련 후 지연성 가소성 및 분화에 관여한다고 보고하였다. 전기적으로 kindling 된 해마에서 after discharge(후발사) 후에 c-fos가 발현되었으며<sup>17)18)39)</sup> 펜틸렌테트라졸 경련모델에서 일차적으로 c-fos가 발현된 이후 일정 기간동안 이차적 c-fos는 발현되지 않았으나 경련은 재유발은 가능하였다는 보고와<sup>38)</sup> Schreiber 등<sup>40)</sup>이 생후 13일 이후의 백서에 카이닉산을 투여한 결과 경련은 일어났으나 c-fos의 발현 및 신경세포손

상이 나타나지 않았고 충분히 성숙한 백서에서는 경련과 함께 c-fos의 발현 및 신경세포손상이 있었다는 연구 결과들은 c-fos의 발현이 단순히 선행하는 경련이 존재하였다는 것을 의미한다기 보다는 자신의 전사체(transcription)인 Fos 단백을 통한 이차적 흐름(downward stream)을 통해 경련에 의한 신경세포가소성, 만성화, 및 지연성 세포 손상에 관여할 것이라는 점을 시사하고 있다.<sup>41)42)</sup>

본 실험에서 해마의 CA1 및 CA3 영역과 시상에서 중첩경련 후 Fos 발현이 증가되어 나타났으며, 신경 세포 손상이 적었던 MK-801 투여군에 비하여 경련에 의한 신경세포 손상이 많았던 중첩경련군의 Fos 발현이 오히려 증가되었다는 결과(Fig. 3)는 중첩경련으로 인한 Fos의 발현이 신경세포에서 이미 진행된 손상 정도나 대사상태를 반영할 뿐 아니라, 중첩경련의 자극을 통해 신경세포에서 향후 예정될 유전 계획에 대한 활동성이 증가되었음을 의미할 수도 있을 것이다.

본 실험에서 MK-801 투여에 따른 Fos 발현양상의 변화에서도 이와 관련지어 두가지 점을 생각해 볼 수 있다. 첫째 MK-801을 중첩경련 유도이전에 처치한 경우 Fos의 발현이 거의 나타나지 않았다는 것(Fig. 3-B)은 중첩경련으로 인한 흥분성 체계 활성화에 따른 Fos 발현이 비경쟁적 수용체 길항제에 의하여 억제되었다는 결과로서 이는 Fos의 발현이 NMDA 수용체를 통한 흥분성체계에 의해 이루어진다는 점을 의미한다. 이러한 결론은 전신적으로 흥분성 아미노산인 카이닉산을 투여한 경우 해마에서 c-fos의 발현이 증가되며<sup>43-45)</sup> 비경쟁적 NMDA 수용체 길항제인 MK-801의 투여가 뇌손상,<sup>46)</sup> 중뇌동맥결찰<sup>47)</sup> 및 약제 등<sup>48)49)</sup>에 의한 c-fos의 발현을 억제하였다는 보고들에 의해서도 뒷받침되고 있다. 둘째, 중첩경련이 유도된 후 MK-801을 투여한 경우 Fos 발현이 해마에서 감소되었으나 시상에서는 중첩경련군과 마찬가지로 Fos의 발현이 증가되었다는 결과(Fig. 3-C)는 중첩경련에 의해 Fos의 발현이 중첩경련군과 같은 정도로 유도되었으나 해마에서는 본 실험의 조직적출시간 이전에 시상보다 먼저 소멸되기 시작하였다는 가능성을 의미한다. 이러한 결과는 MK-801의 중첩경련 유도 후 투여가 중첩경련시 해마와 시상에서의 지속적 Fos발현으로 인한 지연성 신경세포 손상 및 가소성을 통한 기능 변화를 감소시킬 수 있다는 가능성을 시사하고 이에 대한 충분한 연구가 필요하리라 사료된다.

중심 단어 : 리튬-필로카르핀 · 중첩경련 · NMDA 길항제 · 논문접수일 : 1999년 10월 8일  
 · c-fos · 해마 · 신경보호 · 심사통과일 : 2000년 1월 15일

REFERENCES

1) Snead OC. On the sacred disease: The neurochemistry of epilepsy. *Int Rev Neurobiol* 1982;24:93-180.

2) Olney JW, DeGubareff T, Labruyere J. Seizure related brain damage induced by cholinergic agents. *Nature* 1983;301:520-2.

3) Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983;9:315-36.

4) Honchar MP, Olney JW, Sherman WR. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science* 1983;220:323-5.

5) Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high dose pilocarpine seizure. *Epilepsia* 1990;3:382-90.

6) Falconer MA. Mesial temporal (Ammon's horn) sclerosis as a common cause of epilepsy. Etiology, treatment, and prevention. *Lancet* 1974;2:767-70.

7) Olney JW, Collins RC, Sloviter RS. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv Neurol* 1986;44:857-77.

8) Holmes GL. Do seizure cause brain damage? *Epilepsia* 1991;32 suppl 5:S14-28.

9) Meldrum B. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res* 1991;10:55-61.

10) Clifford DB, Olney JW, Benz AM, Fuller TA, Zorumski CF. Ketamine, phencyclidine, and MK-801 protect against kainic acid induced seizure related brain damage. *Epilepsia* 1990;31:382-90.

11) Marx JL. The fos genes as "master switch". *Science* 1987;237:854-6.

12) Schilling K, Curran T, Morgan JI. The excitement of immediate-early genes. *Ann NY Acad Sci* 1991;627:115-23.

13) Curran T, Franz BR. Fos and Jun: The AP1 connection. *Cell* 1988;55:395-7.

14) Willams MB, Jope RS. Distinctive immediate early gene response to seizure induced by lithium plus pilocarpine. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;25:80-9.

15) 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.

16) Schreiber SS, Baudry M. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus-role for gene expression? *Trends Neurosci* 1995;18:446-51.

17) Shin C, McNamara JO, Morgan JI, Curran T, Cohen DR. Induction of c-fos mRNA expression by afterdischarge in the hippocampus of naive and kindled rats. *J Neurochem* 1990;55:1050-5.

18) Simonato M, Hosford DA, Labiner DM, Shin C, Mansbach HH, McNamara JO. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus in the kindling model of epilepsy. *Mol Brain Res* 1991;11:115-24.

19) Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 1989;31:571-91.

20) Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forbrain ischemia. *Stroke* 1994;25:1862-9.

21) Eke A, Conger KA, Anderson M, Garcia JH. Histologic assessment of neurons in rat model of cerebral ischemia. *Stroke* 1990;21:299-304.

22) Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injection of kainic acid: a historical study. *Neuroscience* 1980;5:991-1014.

23) Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonist. *J Neurosci* 1987;8:185-96.

24) Fariello RG, Golden GT, Smith GG, Reyes PF. Potentiation of kainic acid epileptogenicity and sparing from neuronal damage by an NMDA receptor antagonist. *Epilepsy Res* 1989;3:206-13.

25) Hanh JS, Aizeman E, Lipton SA. Central mammalian neurons normally resistant to glutamate toxicity are made sensitive by elevated extracellular Ca<sup>++</sup> toxicity is blocked by N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801. *Epilepsia* 1990;31:382-90.

26) Ormandy GC, Jope RS, Snead III OC. Anticonvulsant actions of MK-801 on the lithium-pilocarpine model of status epilepticus in rat. *Exp Neurol* 1989;106:172-80.

27) Walton NY, Treiman DM. Motor and electroencephalographic response of refractory experimental status epilepticus in rats to treatment with MK-801, diazepam, or MK-801 plus diazepam. *Brain Res* 1991;553:97-104.

28) Fujikawa DG, Daniels AH, Kim JS. The competitive NMDA receptor antagonist CGP 40116 protect against status epilepticus induced neuronal damage. *Epilepsy Res* 1994;17:207-19.

29) Fujikawa DG. Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. *Epilepsia* 1995;36:186-95.

30) Clifford DB, Benz A, Olney JW, Benz AM, Fuller TA, Zorumski CF. MK-801 prevents thalamic damage induced by focal cortical seizure. *Soc Neurosci Abstr* 1987;13:1077.

31) Olney J, Price M, Shahid Salles K, Labruyere J, Friedrich G. MK-801 powerfully protects against N-methyl aspartate neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 1987;141:357-61.

32) Lason W, Simpson JN, McGinty JF. Effect of D-aminophosphonovalerate on behavioral and histological change induced by systemic kainic acid. *Neurosci Lett* 1988;87:23-8.

33) Monaghan DT, Cotman CW. Distribution of N-methyl-D-aspartate sensitive L-glutamate binding sites in rat brain. *J Neurosci* 1985;5:2909-19.

34) Barone P, Morelli M, Cicarelli G, Cozzolino A, Dejoanna G, Campanella G, DiChiara G. Expression of c-fos protein in the experimental epilepsy induced by pilocarpine. *Synapse* 1993;14:1-9.

35) White LE, Price JL. The functional anatomy of limbic status epilepticus in the rat. Patterns of 14C-2-deoxyglucose uptake and Fos immunocytochemistry. *J Neurosci* 1993;13:4787-809.

36) Monaghan DT, Cotman CW. The distribution of kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res* 1982;252:91-100.

37) Dragnow M, Robertson HA. Kindling stimulation induced c-fos proteins in granule cell of the rat dentate gyrus. *Nature* 1987;329:441-2.

38) Morgan JI, Cohen DC, Hempstead JL, Curran HT. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizures. *Science* 1987;237:192-7.

39) Dragunow M, Robertson HA, Robertson GS. Amygdala kindling and c-fos protein (s). *Exp Neurol* 1988;2:261-3.

40) Schreiber SS, Tocco G, Najm I, Finch CE, John SA, Baudry M. Absence of c-fos induction in neonatal rat brain after seizures. *Neurosci Lett* 1992;136:31-5.

41) Chen ZI, Yoshida S, Kato K, Momota Y, Suzuki J, Tanaka T, Ito J, Nishino H, Aimoto S, Kiyama H, Shiosaka S. Expression and activity-dependent change of a novel limbic serine protease gene in the hippocampus. *J Neurosci* 1995;15:5088-97.

42) Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B. Somatodendritic expres-



- sion of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5734-8.
- 43) Morgan JI, Curran T. The role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* 1986;322:552-5.
- 44) 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.
- 45) Popovici TH, Barbin G, Ben-Ari Y. Kainic acid induced seizure increases c-fos like protein in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 1988;150:405-6.
- 46) Dragnow M, Faull RL, Jansen KL. MK-801, an antagonist of NMDA receptors, inhibits injury-induced c-fos protein accumulation in rat brain. *Neurosci Lett* 1990;109:128-33.
- 47) Kinouchi H, Sharp FR, Chan PH, Mikawa S, Kamii H, Arai S, Yoshimoto T. MK-801 inhibit the induction of immediate early gene in cerebral cortex, thalamus, and hippocampus, but not in substantia nigra following middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett* 1994;179:111-4.
- 48) Pavlakovic G, Rathinavelu A, Isom GE. MK-801 prevents cyanide induced changes of Fos level in rat brain. *Neurochem Res* 1994;19:1289-94.
- 49) Ziolkowska B, Holtt V. The NMDA receptor antagonist MK-801 markedly reduce c-fos gene by haloperidol in the mouse striatum. *Neurosci Lett* 1993;156:39-42.