

Kindled된 흰쥐에서의 Glutamate Receptor의 변화 : Metabotropic Glutamate Receptor*

The Changes of Glutamate Receptor in Kindled Rats : Metabotropic Glutamate Receptor

정대수¹ · 김해규² · 손우성³

Dae-Soo Jung, M.D.¹, Hae-Kyu Kim, M.D.² and Woo-Seong Sohn, D.D.S.³

ABSTRACT

Purpose : Kindling refers to a process whereby repeated applications of an initially subconvulsive electrical or chemical stimulus to animals lead to persistent epileptogenic in generalized seizures. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) have been shown to be involved in many brain functions. Widespread distribution of the mGluRs suggests glutamate may be the primary modulator of G-protein coupled signal transduction in the central nervous system. To investigate the role of mGluRs in kindling, we studied the changes of mRNA gene expressions of mGluR1 and 5 on the hippocampus, amygdala, and basal ganglia in PTZ-induced kindled rats. **Methods** : Male Wistar rats (n=6-4) were kindled by repeated administration, 5 times a week, by a subconvulsant dose of PTZ (35 mg/kg). After completion of kindling, the brains were analysed for mRNA gene expression of mGluR1 and 5 using reverse transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** : The kindling score was significantly increased after 8 injections and the definitive kindling score (more than 4 point) was obtained after 10 injections. mRNA gene expressions of mGluR1 in hippocampus, amygdala, and basal ganglia were increased by $180.1 \pm 4.4\%$, $130.2 \pm 6.1\%$, $148.6 \pm 1.4\%$ compared to controls ($p < 0.05$), but those of mGluR5 were not significantly increased. **Conclusions** : Although the mRNA gene expression of mGluR5 did not show any marked changes in kindled rat brain, that of mGluR1 showed significant increase in hippocampus and amygdala. From these results, high density of mGluR1 may suggest glutamatergic systems plays a role in PTZ-induced kindling. But our results would not exclude the possibility that changes of mRNA gene expressions of mGluR1 and 5 are due to repeated seizure activity alone. (**J Korean Epilep Soc 5 : 124-130, 2001**)

KEY WORDS : Chemical kindling · Metabotropic glutamate receptor · Gene expression.

서론

그리스어로 “에피람바라인(epilamblain)”은 손을 쥐다라는 뜻으로 경련을 의미하는 seizure를 말하며, 인구 2백명 당 한 명이 차지하는 간질 환자는 뇌의 기능 이상 항진증이라 할 수 있겠다. 현대에 와서 교통사고가 증가함에 따라서 간질 환자

는 점점 증가하는 추세에 있어 간질의 발생 기전을 알고 이를 치료하는 약제의 효능과 올바른 치료 방법을 연구하는 것이 우선적으로 필요하다.

발작을 일으키는 간질환자에 있어서 흥분성 신경전달물질은 경련유발에 있어 큰 요인을 차지하고 있다. 특히 glutamate의 역할에 많은 이론이 있다. 이를 연구하기 위하여 만들어진 kindling모델이다.¹⁾²⁾ kindling으로 강화시킨 경련에 대한 감수성은 오랫동안 지속되는 변화된 뇌신경세포의 흥분성을 나타내므로³⁾ 저자들은 kindling과 glutamate수용체의 활동과의 관계를 알기 위해 연구하였다. 또 이 수용체는 중추 신경계에서 빠른 시냅스의 신호전달에 결정적인 역할을 하고 LTP(long-term potentiation)에 추정되는 학습과 기억과 같은 신경세포의 유연성(plasticity)의 과정에서의 허혈이나 경련과 연관된 뇌손상과 신경퇴행성 질환에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있어⁴⁻⁶⁾ 간질의 epileptogenesis의 규명을

*이 연구는 1999년 부산대학교병원 지정진료연구비로 이루어졌습니다.

¹부산대학교 의과대학 신경과학교실, ²마취과학교실

Department of Neurology¹ and Anesthesiology,² Pusan National University Hospital, Pusan, Korea

³부산대학교 치과대학 교정과학교실

Department of Orthodontics, Pusan National University Hospital, Pusan, Korea

교신저자 : 정대수, 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10번지

TEL : (051) 240-7314, 240-7517

FAX : (051) 245-2783

E-mail : jungds@pusan.ac.kr

위해 저자들은 분자생물학적인 방법으로 노력하였다.

방법적으로 전기적이거나 화학적으로 유도된 kindling의 기전들이 비슷한지 동일한 지는 아직 알려져 있지 않지만 역사적으로 흰쥐에서 화학적으로 유도된 kindling은 Mason과 Cooper가²⁾ 경련유도제로 pentylenetetrazole (PTZ)을 사용하여 처음 보고하였다. 그리고 Schröder 등⁷⁾⁸⁾은 PTZ에 의해 kindling된 흰쥐의 해마와 대뇌피질부위에 L-glutamate가 증가된 것을 보여 주었고, Geula 등⁹⁾은 전기적 자극으로 kindling시킨 후 N-methyl-D-aspartate (NMDA)와 non-NMDA glutamate 수용체의 유전자발현이 증가됨을 나타내었다.

이 연구에서는 간질환자의 간질 발생의 원인의 규명과 그에 따른 치료법 개발을 위한 기초적 자료를 조사하기 위하여 PTZ를 사용하여 kindling 모델을 만들고 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 법을 이용하여 glutamate 수용체중 metabotropic glutamate receptor (mGluR) subtype 1 (mGluR1)과 subtype 5 (mGluR5)의 변화를 알기 위해 뇌의 각 부위, 특히 간질의 발생에 있어서 중요하다고 생각되는 hippocampus와 amygdala, basal ganglia의 mRNA 유전자발현의 정도를 측정하였다.

실험 대상 및 방법

실험동물은 몸무게 250~280 g의 웅성 Wistar계 흰쥐 10마리를 사용하였다. 실험 대상으로 사용된 흰쥐는 사용되기 전에 12시간 간격으로 명암이 조절되는 사육실에서 물과 사료를 자유롭게 먹을 수 있도록 하여 3~4일간의 적응기간을 거쳤다. 먼저 흰쥐를 각각 kindling군(n=6)과 대조군(n=4)으로 무작위 분류하고 kindling군은 PTZ를 주당 5회씩 매 회 35 mg/kg을 복강내 주사하였고 대조군은 동량의 생리적 식염수를 복강내 주사하였다. Kindling score는 Becker 등¹⁰⁾이 한 방법(Table 1)을 기준으로 하여 PTZ를 복강내 주사한 후에 20분 지나서 측정하였다. 22회차 PTZ주입후 실험동물을 isoflurane을 이용하여 깊이 마취한 후 단두하여 뇌를 재빨리 적출하여 basal ganglia, hippocampus, 및 amygdala를 분리하여 deep freezer에 보관하였다. mGluR의

mRNA 유전자발현을 대조군과 상호 비교하기 위하여 분리시킨 뇌조직은 다음과 같은 순서에 의하여 각각 RNA를 추출해 내고 이를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다.

먼저 조직을 homogenization시키고 RNA를 추출 분리하였으며 RNA의 양을 측정하기 위해서 260 nm, 280 nm로 범위를 정하고 optical density를 측정하였다. 이때 계산된 260 nm의 값을 280 nm의 값으로 나눈 값이 1.5이상 2.0 미만인 경우를 순수한 RNA라고 판정하여 실험에 이용하였다. mGluR의 mRNA 유전자발현을 측정하기 위하여 RT-PCR법을 사용하였다. First strand cDNA의 합성을 위하여 1 µg의 total RNA를 oligo-(dT)17 primer와 Moloney murine leukemia virus RT(Perkin Elmer Cetus, NJ, U.S.A.)를 이용하여 역전사를 하였고 합성한 cDNA에 발현을 조사하고자 하는 10 pmole의 sense와 antisense primer를 첨가하여 PCR을 실시하였다. 모든 PCR반응은 Perkin Elmer PCR kit, AmpliTaq DNA polymerase, 그리고 50 pmol oligonucleotide primers를 이용하여 100 µl로 만들어 시행하였다. PCR product를 2% agarose gel에 전기영동하여 기대되는 크기의 DNA가 존재하는 지를 확인하고 이를 pGEM-T vector(promega)에 cloning 한 후 T7이나 SP6 primer를 이용하여 염기서열을 결정하였다. DNA의 염기서열은 USB의 Sequenase v 2.0 효소를 이용하여 double-strand dideoxynucleotide termination으로 하였다. 역전사 PCR시 동일한 양의 RNA가 사용되었는지를 확인하기 위하여 β-actin의 primer를 이용하여 동일조건에서 PCR을 실시하였다. PCR product의 정량을 위하여 DNA를 2% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후 image analysis system(Biorad)을 이용하여 정량하여 비교하였다. mGluR를 증폭시키기 위하여 oligonucleotide primer와 cycling paradigm을 사용하였다. RT-PCR이 끝난 후 10×PCR buffer 4 µl MgCl₂ 2.4 µl, DEPC water 31.6 µl에 primer를 넣고(전체 40 µl) Taq polymerase 0.3 µl를 더한 후, 35 cycle로 amplification시키고(95°C 1분, 56°C 1분, 72°C 1분) 마지막 cycle은 72°C로 10분간 진행한 후 사진을 찍었다.

mGluR의 변화를 알기 위하여 사용한 oligonucleotide primer배열은 다음과 같다.

mGluR1
 5' -Tgg-Tgg-TTC-TTC-ACC-CTg-ATC-AT-3'
 5' -TAT-ggC-TTC-ATT-gAT-ggA-TTg-C-3'
 mGluR5
 5' -TCC-AAT-CTg-CTC-CTC-CTA-CC-3'

Table 1. Kindling Score

Stage 0	No response
Stage 1	Ear and facial twitching
Stage 2	Convulsive waves through the body
Stage 3	Myoclonic jerks and rearing
Stage 4	Turning over into the lateral position
Stage 5	Turning over into the back and generalized clonic-tonic seizures

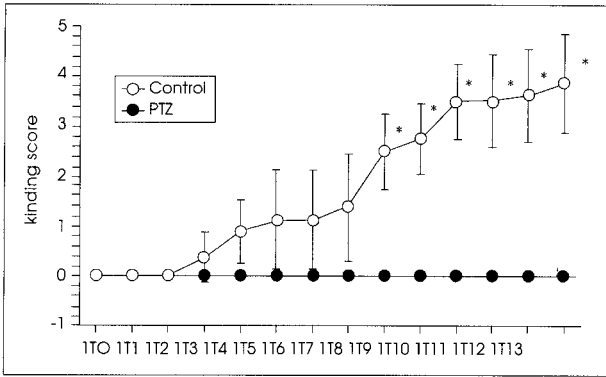


Fig. 1. The changes of kindling score according to the PTZ injection IT; injection times. * : p<0.05 vs. control group.

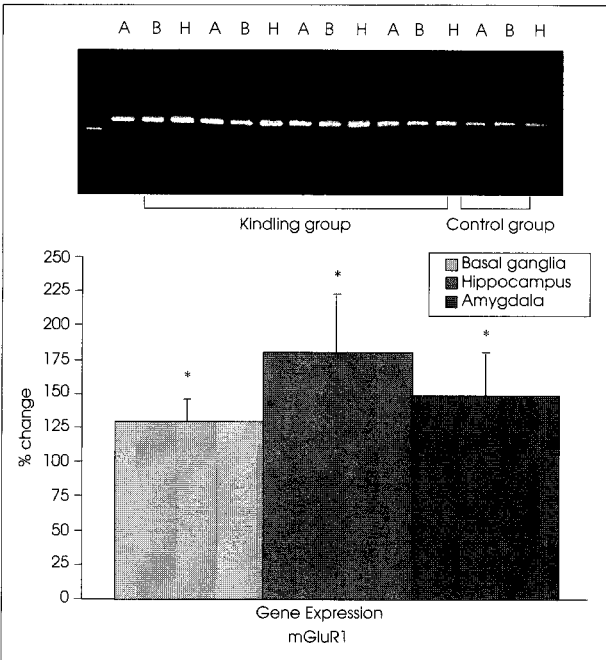


Fig. 2. The relative changes of mRNA gene expression of mGluR1 in kindled rat brain compare to normal control.

5'-CAA-CgA-TgA-AgA-ACT-CTg-Cg-3'

3. 통계

모든 측정치는 평균±표준편차로 표시하였고, 통계분석은 ANOVA 후 Fisher's test를 이용하였다. p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 의의가 있는 것으로 판정하였다.

실험결과

Kindling score는 PTZ를 복강내 주입한지 8일째부터 대조군에 비하여 유의있게 증가하였다(p<0.05, Fig. 1). 일반적으로 kindling이 완성되었다고 하는 4단계 이상의 상태는 복강내 주입 10회째부터 이루어 졌다.

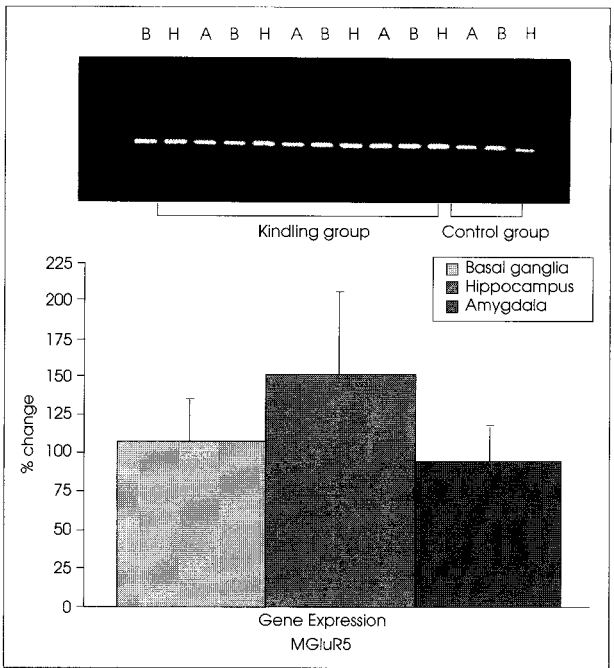


Fig. 3. The relative changes of mRNA gene expression of mGluR5 in kindled rat brain compare to normal control.

mGluR1의 mRNA 유전자발현은 hippocampus, amygdala, basal ganglia의 순으로 대조군에 비하여 각각 180.2±44.4%, 130.2±16.1%, 148.6±31.4%씩 증가되어 있었다 (p<0.05, Fig. 2).

mGluR5 mRNA 유전자발현은 hippocampus, amygdala, basal ganglia의 순으로 대조군에 비하여 각각 151.4±55.1%, 93.7±23.9%, 108.2±27.3%씩 증가되어 있었으나 통계학적으로 의의는 없었다(p>0.05, Fig. 3).

고찰

간질 발작에 대한 실험 동물 모델은 약 한 세기를 거슬러 올라가서 이미 그 때에 전기 쇼크에 의한 간질 발작을 유도했던 기록이 남아 있으며 화학적 방법으로는 strychnine을 대뇌 피질에 국소 도포함으로써 간질양 뇌파를 유도한 시도가 처음으로 간주된다.¹¹⁾ 1937년 Putnam과 Merritt 등은 고양이에서 전기 자극을 통해 간질 발작을 유도한 후 여러 가지 항경련 물질을 시험하였다. 그중 phenytoin이 이 동물실험 모델을 통하여 독성에 비해 가장 나은 항경련 효과를 보여서 그 후 임상에 적용되어 현재까지 쓰이고 있는 대표적인 항경련제이다. 그러므로 간질 모델은 간질의 발생기전과 약물 치료의 효과를 아는데 중요한 연구의 기초가 된다 하겠다.

간질 모델의 종류로는 정상 뇌에서의 급성 모델과 만성 모델로서의 kindling 모델 그리고 간질 중첩에 대한 모델 및

유전과 관련된 모델로 크게 나눌 수 있다. Kindling model은 60년대 말 Goddard 등¹¹⁾이 그 현상을 체계적으로 정리하였으며, 이 모델은 반복적인 자극을 통해 자발적 간질 발작(spontaneous seizure)을 유발할 수 있다는 점으로 해서 사람에서의 간질 발작을 대신할 수 있는 실험 동물 모델로서의 유용성이 더욱 높아지게 되었다. Kindling을 통해서 간질 발작이 또 다른 간질 발작을 유도할 수 있으며 그 과정에 대한 연구가 또한 간질 모델로서의 중요성을 더하여 준다. Kindling이란 뇌의 국소 부위에 afterdischarge(AD)를 유발할 수 있는, 그러나 한번에 경련을 일으키지 않을 정도의 적은 전기적 자극을 반복적으로 가함으로써 궁극적으로 단순 부분성 간질 발작이나 전신성 경련성 발작을 유발하는 것을 의미한다.¹²⁾ Kindling 모델을 통해 여러 가지 중요한 간질 발작의 기전에 대한 연구가 가능하게 무엇보다도 hyperexcitability가 형성되고 표현되는 기전과 이것이 어떻게 지속될 수 있는지 그리고 이러한 hyperexcitability가 다른 해부학적 구조와 어떻게 연관을 갖는지, 또한 이렇게 자극에 의해 유도된 간질이 어떻게 자발적 간질 발작으로 이행되는지 등 간질 발작에 대한 많은 기본적인 문제에 대한 해답을 얻는데 많은 도움이 되고 있다.

이러한 반복적인 자극은 kindling이 진행됨에 따라 점진적으로 강력한 경련 발작을 유발하는데, 이를 진행 정도에 따라 class 1 ; facial clonus, class 2 ; head nodding, class 3 ; contralateral forelimb clonus, class 4 ; rearing, class 5 ; rearing and falling 등으로 단계적으로 구분하였다.¹²⁾ 또한 뇌파 역시 이러한 임상 양상의 진행에 따라 AD가 점차 길어질 뿐 아니라 다른 부위까지 널리 퍼져나가는 것을 관찰할 수 있고 결국에는 처음보다도 적은 정도의 자극만으로도 이러한 AD나 경련발작을 유도할 수 있게 된다. 이렇게 단계적으로 임상 양상이 진행되어 결국 class 5 정도의 경련 발작이 적어도 3번 이상 반복될 경우 kindling이 확립된 것으로 간주되게 되며 이렇게 형성된 kindling은 1년 후에도 쉽게 class 5의 경련 발작을 유도할 수 있기 때문에¹¹⁾ 그 영향은 평생 지속되는 것으로 생각된다.¹³⁾¹⁴⁾ 반복적인 전기자극 이외에도 경련을 유발할 수 있는 물질, 예를 들면 muscarinic receptor agonist인 carbachol과 같은 약물을 반복적으로 국소 부위에 투여하거나 cocaine, PTZ 혹은 picrotoxin을 전신적으로 투여함으로써도 kindling 현상을 관찰할 수 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁵⁾ Kindling 모델은 앞에서 언급한 다른 실험 모델에 비해 모델을 만드는데 비교적 많은 노력이 들지만 무엇보다도 점진적 hyperexcitability를 형성하는 과정에서 연구자에게 어느 정도의 실험적 조절이나 중재를 허용하고 또한 매우 reproducibility가 높기 때문에 정량

적 분석을 가능하게 해서 연구에 많은 이점이 있다. 또한 이전의 electroshock나 PTZ에 의해 유도된 급성 간질의 동물 모델에서의 간질 발작이 정상적인 뇌에서 일어나는 간질 발작인 것임을 감안하면 kindling 모델에서의 간질 발작이 야말로 hyperexcitable한 뇌에서 일어나는 임상 양상으로 실제 인간에서의 간질 발작을 설명하는데 보다 적절한 연관성이 있을 것으로 생각된다. 항경련제는 antiepileptic보다는 antiepileptogenic한 약제에 대한 개발 및 효과 검증이 중요한데 이는 특히 뇌손상에 의한 간질의 예방적인 치료에는 antiepileptogenic한 약제가 중요하다 하겠다. 난치성 측두엽 간질 환자에서 심부 뇌전극으로부터 kindling 모델에서와 같은 국소 electrical seizure를 관찰할 수 있다. 특히 혈관성 병변이나 천천히 자라는 종양의 경우 국소적인 hyperexcitability를 형성해서 이것과 시냅스를 이루는 다른 국소 조직에 excitability를 증가시킴으로써 kindling에서와 같은 간질성 조건을 형성하는 것으로 설명이 가능하며 cavernous hemangioma 환자에서도 병변에서의 국소적 미세출혈로 인한 철분의 침착이 hyperexcitability를 형성해서 간질을 유발하는 것으로 kindling에서와 같은 기전이 관여한다고 할 수 있다.¹⁶⁾ Kindling 모델의 또 다른 장점은 이차성 간질발현(secondary epileptogenesis)에 대한 연구가 가능하다는 점인데 kindling이 형성된 후 반대편 mirror focus(second focus)를 자극함으로써 kindling을 유발하려 할 때 원래의 국소적 간질 발현 부위(primary)를 자극할 때 보다 적은 횟수의 자극으로 쉽게 kindling을 유발할 수 있는데 이와 같은 현상을 transfer effect라고 부른다. 이는 다른 원위부의 kindling을 용이하게 하는 어떤 기전이 kindling이 확립되어 있는 원래 부위로부터 작용하기 때문으로 생각되어지며 또한 일단 kindling이 형성되고 난 후 일부 동물에서는 stimulating 전극과는 해부학적으로 다른 부위에서 자발적 간질발작이 일어나는 것이 보고되어 이 역시 이차성 간질 발현에 대한 동물 모델이 될 수 있음을 보여주는 좋은 증거임을 알 수 있다. 더욱이 최근 세포 및 분자 생물학적 연구 기법을 kindling에 적용함으로써 사람에서의 epileptogenesis를 연구하는데 더 많은 도움이 될 것으로 생각된다. 우리가 예측할 수 있는 병리적 현상이나 손상의 기전이 규명될 수 있다면 그 진행을 미리 방지함으로써 소정의 목적을 달성할 수가 있을 것이므로 많은 연구들은 이 기전 탐구에 초점이 모이게 되는 것이다. 특히 glutamate의 역할은 흥분성 신경독성발현의 기전에서 중요한 자리를 차지하고 있다. Glutamate는 뇌에 있어서 주요한 신경독성 물질이며 허혈이나 저혈당 및 anoxia후에 관찰되는 손상을 일으키게 한다. 칼슘이온이 아주 잘 통과하기 때문에 NMDA수용체가 이들 독성효과를 나타내는 주요한

역할을 하고 있다.

최근에는 kindled된 동물에서 직접 뇌조직 절편(slice)을 얻음으로써 신경세포나 시냅스 고유의 hyperexcitability에 대한 연구에 많은 노력을 기울이고 있다. 그리하여 우리가 예측할 수 있는 병리적 현상이나 손상의 기전이 규명될 수 있다면 그 진행을 미리 방지함으로써 소정의 목적을 달성할 수가 있을 것이므로 많은 연구들은 이 기전 탐구에 초점이 모이게 되는 것이다. 특히 glutamate의 역할은 흥분성 신경독성발현의 기전에서 중요한 자리를 차지하고 있다. Glutamate와 관련된 수용체가 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionate (AMPA) 수용체, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체, 및 kainate (KA) 수용체 등의 이온통로에서 작용할 뿐만 아니라, GTP-binding proteins (G-proteins)와 연관된 mGluRs와도 작용하고 있다는 것이 최근 보고되고 있다. 흰쥐에서 화학적으로 유도된 kindling은 1972년 Mason과 Cooper가 경련유도제로 PTZ를 사용하여 처음 보고하였는데²⁾ 이 후 kindling 모델과 가장 흡사한 temporal lobe epilepsy의 발생기전 연구에 사용되었기에 이 연구에서 PTZ를 이용하였고 특히 mGluR에 초점을 맞추어 이들 수용체에 분자생물학적 접근법을 이용하여 실험을 시도하였다.

이 연구에서는 kindling이 완성되었는지를 객관적으로 판단하기 위하여 Schröder 등⁷⁾이 사용한 kindling score를 이용하는데 실험자에 따라 PTZ 주입횟수에는 차이가 난다. 이 연구에서는 Schröder 등⁷⁾¹⁷⁾¹⁸⁾의 결과보다 좀 더 많은 횟수의 주입 후 kindling점수가 상승하였고, kindling이 완성되었다고 하는 4점 이상의 점수는 Schröder의 6회보다 많은 10회에서 얻을 수 있었다. 이와 같은 차이는 비록 같은 Wistar 계 흰쥐를 사용하였으나 사육회사나 실험환경에 따른 차이가 있을 것으로 보인다.

Kindling모델에 의한 간질의 기전으로 아미노산계 뇌신경전달물질의 역할이 많은 이야기가 되었다. Halonen 등¹⁹⁾은 PTZ(45 mg/kg ip)에 의하여 야기된 clonic-tonic convulsion후에 쥐의 cisternal CSF에서 아미노산 치가 증가됨을 보고하였다. 그리고 Rocha 등²⁰⁾은 clonic-tonic seizure는 없으나 clonic jerks는 일으키는 용량인 PTZ 30 mg/kg을 복강내 주입하여 amygdala와 전뇌 피질(frontal cortex)에서 glutamate와 aspartate의 세포외 농도가 증가한다고 하였다. 또한 NMDA수용체에 대한 길항제를 사용한 연구로는 Giorgi 등²¹⁾이 비경쟁적 NMDA수용체 길항제인 MK-801을 투여하면 흰쥐에서 PTZ유도성 kindling의 발생을 차단한다고 보고하였다. 이와 같은 연구의 성과로 간질을 유도하는 기전으로 glutamate수용체의 역할이 중요함을 인식되

었다. 이와 같은 아미노산계 신경전달물질의 중요성은 kindling모델을 만들기 위한 방법에 따라 다른 것이 아닐까 생각되고 있다. 왜냐하면 PTZ 60 mg/kg을 급속 주입하여 kindling을 만들 때 glutamate의 증가가 나타나지 않았으며 이것이 전기적 자극의 경우와 차이가 난다고 하였다.¹⁸⁾²²⁾ 그 전기적 자극에 의하여 kindling된 흰쥐에서는 NMDA수용체가 관여하고 있다는 것이 Wu 등²³⁾과 Cain³⁾ 및 Kraus 등²⁴⁾에 의해서 알려졌다. 그러나 Schröder 등¹⁷⁾은 PTZ kindling 후 해마조직에서 NMDA에 민감한 [³H]-L-glutamate나 [³H]CGP39653과 [³H]MK-801의 접합부위에서 어떤 차이점을 발견하지 못하고 결국 전기적 자극과 화학적 자극에 의한 kindling발생의 기전에 있어서 glutamate수용체의 아형이 서로 다른 역할을 하고 있는 것을 추정하였다. 이와 같은 일련의 연구에서 Schröder 등⁸⁾은 [³H]-L-glutamate 부착에서 mGluR 부착부가 PTZ kindling에 따라서 증가하고 있음을 보여주었으며 1998년에는 PTZ kindling후 mGluR에 의해 매개되는 trans-ACPD에 자극되는 inositol phosphate형성이 증가되는 것을 보여주었다. 즉 kindling에 있어서의 mGluR의 역할에 초점이 모여지게 되었다. Cozzi 등²⁵⁾은 시냅스전에 있는 mGluR1이 활성화되면 뇌조직에서 glutamate유리가 증가되는 것을 보여주었다. Fotuhi 등²⁶⁾은 hippocampus에서 mGluRs의 발현형태를 보고 신경조직이 퇴행하는 것에 관련되는 것이 mGluRs가 관여한다고 하였다. Schröder 등²⁷⁾은 PTZ에 의하여 kindling되는 현상은 glutamate에 의한 전달 계통에서의 mGluRs의 활성상태에 따른 것이라고 하며 kindling에 따라 시냅스 연결성이 변화되는 것과 관련된다고 하였다. Thomsen과 Dalby²⁸⁾는 mGluR 아형에 대한 연구를 작동제와 길항제를 이용하여 실시하여 group 1 mGluR의 길항제인 1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid를 사용하면 용량 의존적으로 PTZ에 의해 유도된 경련을 길항할 수 있었으며 선택적으로 group 1 mGluR 작동제인 (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine을 사용하면 경련을 유도하고 PTZ에 의해 유도되는 경련시작을 빠르게 만든다고 하여 group 1 mGluRs가 중요한 역할을 하고 있다고 시사하였다. 이와 같은 예측을 뒷받침하여 이 연구에서는 mGluR1에서는 hippocampus, amygdala, basal ganglia의 순서로 약 180%에서 130%에 이르기까지의 증가 양상을 나타내고 있는 것을 보여주었다. 또한 mGluR5에서도 통계적인 유의성은 얻지 못하였으나 hippocampus에서 약 150%의 증가 양상을 보여주어 Thomsen과 Schröder 등의 결과와 부합하였다. 이와 같은 결과는 Neugebauer 등²⁹⁾이 연구한 억제성 시냅스전 mGluRs의 역할과 아울러 kindling을 만들게 되는 기전에 mGluRs의 제1군이 중요한 역할을 하고 있

다는 것을 밝힐 수 있게 하였다. 그러나 변화가 발작(seizure) 자체로 인한 것인지, kindling 과정의 변화인지에 의문이 있었다. 그러나 고용량의 PTZ의 주입을 하였을 시에 발작이 있었어도 Glutamate의 증가가 나타나지 않았던 경우, 전기적 자극과 화학적 자극에 의한 kindling에서 서로 다른 glutamate 수용체의 아형이 서로 다른 점, group 1 mGluR의 길항제인 1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid를 사용하면 PTZ에 의해 유도된 경련을 길항할 수 있었으며 group 1 mGluR 작동제인 (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine을 사용하면 경련을 유도하고 PTZ에 의해 유도되는

경련시작을 빠르게 하여 group 1 mGluRs가 중요한 역할을 하고 발작 자체의 영향과 차이가 있다고 할 수 있겠다. 앞으로 이 연구에서 밝혀진 hippocampus, amygdala, basal ganglia부위에서의 mGluRs의 역할을 in situ hybridization을 통한 보다 자세한 기전 연구가 필요할 것이다.

중심 단어 Chemical kindling · Metabotropic glutamate receptor · 유전자 발현.

- 논문접수일 : 2001년 5월 10일
- 심사통과일 : 2001년 7월 10일

REFERENCES

- Goddard GK, McLintyre DC, Lech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969;25:295-330.
- Mason CR, Cooper RM. A permanent change in convulsive threshold in normal and brain-damaged rats with repeated small doses of pentylenetetrazole. *Epilepsia* 1972; 13:663-74.
- Berridge MJ, Irvine RF. Inositol triphosphate: A novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;325: 315-21.
- Cain DP. Long-term potentiation and kindling: how similar are the mechanisms? *Trends Neurosci* 1989;12:6-10.
- Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31-9.
- Green JG, Greenamyre JT. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol* 1996;48:613-34.
- Meldrum B. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology* 1994;44:14-23.
- Schröder H, Becker A, Lossner B. Glutamate binding to brain membrane is increased in pentylenetetrazole-kindled rats. *J Neurochem* 1993;60:1007-11.
- Schröder H, Schlichthaar R, Krug M. Changes of glutamatergic synaptic mechanisms after PTZ kindling and LTP. *Neuroscience* 1994;60:337-42.
- Geula C, Jarvie PA, Logan TC, Slevin JT. Long-term enhancement of K⁺-evoked release of L-glutamate in entorhinal kindled rats. *Brain Res* 1988;442:368-72.
- Becker A, Grecksch G, Ruthrich HL, Pohle W, Marx B, Matthies H. Kindling and its consequences on learning in rats. *Behav Neural Biol* 1992;57:37-43.
- Swinyard EA, Kemp JW, Tannhauser M. Effect of diphenylhydantoin on hexobarbital sleep time in mice and rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1971 Sep;193(1): 37-47.
- Johnson BG, Wright RA, Arnold MB, Wheeler WJ, Ornstein PL, Schoepp DD. [3H]-LY341495 as a novel antagonist radioligand for group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: characterization of binding to membranes of mGlu receptor subtype expressing cells. *Neuropharmacology* 1999 Oct;38(10):1519-29.
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972 Mar;32(3):269-79.
- Wada JA, Sato M, Corcoran ME. Persistent seizure susceptibility and recurrent spontaneous seizures in kindled cats. *Epilepsia* 1974 Dec;15(4):465-78.
- Lowry OH, Rosebrough RN, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265-75.
- Wada JA, Sato M, Wake A, Green JR, Troupin AS. Prophylactic effects of phenytoin, phenobarbital, and carbamazepine examined in kindling cat preparations. *Arch Neurol* 1976 Jun;33(6):426-34.
- Wasterlain CG, Jonec V. Chemical kindling by muscarinic amygdaloid stimulation in the rat. *Brain Res* 1983 Jul 25;271(2): 311-23.
- Reid SA, Sybert GW. Acute FeCl₃-induced epileptogenic foci in cats: electrophysiological analyses. *Brain Res* 1980 Apr 28;188(2):531-42.
- O'Leary DM, O'Connor JJ. Potentiation of synaptic transmission by (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine in the rat dentate gyrus in vitro: A role for voltage dependent calcium channels and protein kinase C. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1999;23(1):133-47.
- Palmer MJ, Irving AJ, Seabrook GR, Jane DE, Collingridge GL. The group I mGlu receptor agonist DHPG induces a novel form of LTD in the CA1 region of the hippocampus. *Neuropharmacology* 1997;36: 11-12, 1517-32.
- Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 1995;33:715-17.
- Becker T, Gombos G, de Barry J. Differential ontogenetic pattern of metabotropic [3H]-L-glutamate receptors in normal and granule cell-deficient mouse cerebellum. *Exp Brain Res* 1996;107:361-6.
- Schröder H, Becker A, Schröder U, Hoell V. 3H-L-glutamate binding and 3H-D-aspartate release from hippocampal tissue during the development of pentylenetetrazole kindling in rats. *Pharm Biochem Behavior* 1999;62:349-52.
- Halonen T, Pitkanen A, Partanen J, Hyttinen JM, Riekkinen PJ. Amino acid levels in cerebrospinal fluid of rats after administration of pentylenetetrazol. *Comp Biochem Physiol* 1992;101:21-5.
- Schröder H, Becker A. The role of glutamate receptors in pentylenetetrazole kindling of rats: A neurochemical study. *Neuropharmacology* 1996;35:A28.
- Rocha L, Briones M, Ackermann RF, Anton B, Maidment NT, Evans CJ, Engel J Jr. Pentylenetetrazol-induced kindling: early involvement of excitatory and inhibitory systems. *Epilepsy Res* 1996;26:105-13.
- Giorgi O, Orlandi M, Geic M, Corda MG. MK-801 prevents the decrease in ³⁵S-TBPS binding in the rat cerebral cortex induced by pentylenetetrazol kindling. *Brain Res Bull* 27:835-7.
- Kaura S, Bradford HF, Young AM, Croucher MJ, Hughes PD. Effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: In vivo and in vitro studies. *J Neurochem* 1995; 65:1240-9.
- Wu K, Wasterlain C, Sachs L, Siekewitz P. Effect of septal kindling on glutamate binding and calcium/calmodulin-dependent phosphorylation in a postsynaptic density fraction isolated from rat cerebral cortex.

- Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5298-302.
- 31) Kraus JE, Nadler JV, McNamara JO. Regulation of alternative splicing of NMDAR1 in the kindling model. *Mol Brain Res* 1996; 41:97-104.
- 32) Seren MS, Aldinio C, Zannoni A, Leon A, Nicoletti F. Stimulation of inositol phospholipid hydrolysis by excitatory amino acids is enhanced in brain slices from vulnerable regions after transient global ischemia. *J Neurochem* 1989; 53:1700-5.
- 33) Cozzi A, Lombardi G, Leonardi P, Carfi M, Moroni F. Modulation of transmitter output "in vivo" by mGluR agents. *Neuropharmacology* 1996;35:A10.
- 34) Fotuhi M, Standaert DG, Testa CM, Penney JB, Young AB. Differential expression of metabotropic receptors in the hippocampus and entorhinal cortex of the rat. *Mol Brain Res* 1994;21:283-92.
- 35) Schröer H, Becker A, Hoelll V. Sensitivity and density of glutamate receptor subtypes in the hippocampal formation are altered in pentylenetetrazole-kindled rats. *Exp Brain Res* 1998;120:527-30.
- 36) Thomsen C, Dalby NO. Roles of metabotropic glutamate receptor subtypes in modulation of pentylenetetrazole-induced seizure activity in mice. *Neuropharmacology* 1998;37(12):1465-73.
- 37) Neugebauer V, Keele NB, Shinnick-Gallagher P. Epileptogenesis in vivo enhances the sensitivity of inhibitory presynaptic metabotropic glutamate receptors in basolateral amygdala neurons in vitro. *J Neurosci* 1997;17(3):983-95.