

쥐 시각 피질절편에서 저농도 마그네슘으로 유도된 간질모양 활동파의 특성

최 병 준

가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실

Properties of Low Magnesium Induced Epileptiform Activity in Rat Visual Cortex Slices

Byung Joon Choi, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose : The goal of the present study was to investigate the effect of low magnesium on the excitability of visual cortex, observe the induction of epileptiform activity, and define the characteristics of spontaneous activity.

Methods : We divided 19-23 days-old Sprague-Dawley rats into three groups ; they were divided by the concentration of Mg, 1 (n=10), 0.5 (n=13), and 0 (n=14) mM. The visual cortex slices from brain were incubated in artificial CSF for one hour, and then extracellular recordings were performed.

Results : The latency of interictal epileptiform activity in 0.5 and 0 mM Mg was 26.9 ± 11.7 and 13.3 ± 2.7 min, the frequency was 1.1 ± 0.7 and $5.7 \pm 0.7 \text{ min}^{-1}$, the amplitude was 1.0 ± 0.3 and $1.4 \pm$

0.4 mV , the duration was 15.1 ± 15.4 and $587.4 \pm 398.0 \text{ ms}$. The latency of ictal epileptiform activity in 0 mM Mg was 15.5 ± 8.0 min, the frequency was $53.8 \pm 16.3 / \text{event}$, the amplitude was $2.9 \pm 0.7 \text{ mV}$, the duration was $25.2 \pm 6.0 \text{ s}$.

Conclusions : Low Mg showed the increased excitability in the visual cortex and induced the interictal and ictal spontaneous epileptiform activity. This induction was abolished by D-AP5 and decreased by CNQX. This result may provide insights into the events underlying the epileptogenesis. (J Korean Epilep Soc 2005; 9(1):17-20)

KEY WORDS : Magnesium · Experimental epilepsy.

서 론

대부분의 후천적 부분 발작은 처음에는 국소 병리적 손상(외상 혹은 허혈)을 받은 후 일정한 유도 기간이 요구된다.¹ 이러한 유도 기간을 넘어 계속 손상이 진행되면 재발성 발작 전위로 특징지어지는 완전한 형태의 간질 발생이 생긴다. 따라서, 간질 연구에 가장 유용한 모델은 이러한 두 가지 위상이 쉽게 인지되어야 하며, 이에 따라 각각의 시기에 맞는 다른 치료법을 적용할 수 있어야 한다.

시험관내(*in vitro*)에서 연구된 대부분의 경련 모델은 약

물 노출 후²⁻⁴ 나타나는 활동을 검사하거나 혹은 특정한 실험 절차(알루미늄 겔 노출⁵ 혹은 뇌 피질 아래부분 잘라냄⁶)를 통해 발생하는 활동을 연구하는 것이다. 이중 경련 모양 활동 모델에서 가장 대표적인 것은 GABA성 억제 차단, 고농도 칼륨 폭로 혹은 마그네슘 저하 등이다. 실제 마그네슘 저하는 중추신경계의 많은 부분에서 간질 모양 활동을 나타나게 할 수 있으며,⁷ 특히 간질 간기 활동도 잘 관찰할 수 있게 한다.

한편, 글루탐산염 전달 역할을 조사 함으로서 간질 발생과 경련 발현을 이해하는데 많은 진전이 이루어졌다. 여러 연구에 따르면 마그네슘에 의한 전압의존성 방식에 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 활성 통로가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.⁸ 마그네슘을 없애면, NMDA 수용체가 활성화되어 안정막 전위(resting membrane potentials)에 다다르게 되고 돌발파를 일으켜 자발적인 간질 모양 활동파가 뇌의 여러 부분에서 관

Received 15 April 2005
Accepted 21 May 2005

Corresponding author: Byung Joon Choi, M.D., Department of Pediatrics, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea
E-Mail: choibj@catholic.ac.kr

찰된다.^{9,10} 또한, NMDA 대항제가 여러 가지 치료로 유도된 경련을 억제하는 것으로 보아,^{11,12} NMDA 수용체는 간질 모양 활동과의 시작과 전파에 기본적인 역할을 하는 것으로 보인다. 한편, NMDA 수용체 저항성 구성 요소도 관여하고 있는 것으로 생각된다.¹³

본 연구 목적은 시각 피질에서 저 마그네슘 노출 후 자발성 간질 모양파가 유도되는지 알아보는 것이다.

대상과 방법

생후 19~23일 사이의 Sprague-Dawley 쥐를 대상으로 하였다. 흰쥐를 마취시키기 위하여 chloral hydrate 400 mg/kg을 복강 내로 투여하였으며, 마취 후에는 되도록 빨리 뇌를 적출하여 얼음으로 차갑게 한 인공 뇌척수액(NaCl 125 mM ; KCl 2.5 mM ; NaH₂PO₄ 2 mM ; MgSO₄ 1.25 mM ; NaHCO₃ 25 mM ; CaCl₂ 2 mM ; Glucose 10 mM, pH 7.3~7.4)에 담가두었다. 그런 다음 29~32°C의 온도에 95%의 산소와 5%의 이산화탄소를 포함하고 있는 인공 뇌척수액에서 30~45초간 담가 회복시킨 후 실험에 사용하였다.

뇌조직을 꺼내어 cyanoacrylate 성분의 순간 접착제로 vibratome (HA752-084 ; Campde-Inst, King ST, UK) 구조의 teflon 블록에 붙인 후 여기에 인공 뇌척수액을 채워 넣고 vibratome을 이용하여 400 μm 두께로 시각 피질이 포함되게 절단하였다. 그리고 절단된 조직 박편을 나일론 그물 위에 놓고, minipuls 3 peristaltic pump (Gilson Co, Middleton, WI, USA)를 이용하여 95% 산소와 5% CO₂의 혼합 가스가 공급되는 인공 뇌척수액을 3.5~4 ml/분의 속도로 관류시켰다. 이후 조직 절편은 1시간 이상 조용한 곳에 두어 평형을 이루게 한 후 전기장 전위를 측정하였다.

조직 절편은 인공 뇌척수액에 1시간 동안 담가 놓은 후 각각 0 (n=14), 0.5 (n=13), 1 mM (n=10) 농도의 Mg (Sigma chemical, St. Louis, MO, USA)을 첨가한 관류 뇌척수액(NaCl 125 mM ; KCl 6 mM ; NaH₂PO₄ 2 mM ; MgSO₄ 1.25 mM ; NaHCO₃ 25 mM ; CaCl₂ 2 mM ; Glucose 10 mM, pH 7.3~7.4)으로 옮겨 다시 1 시간동안 전기장 전위를 측정하였다. 전기장 전위는 Flaming/Brown micropipette puller (Model P-97, Sutter Instrument Co, Novato, CA, U.S.A.)로 뽑은 glass capillary microelectrode (저항 : 3~5 MΩ, 1B150F-4, World Precision Instruments, Inc, Sarasota, Florida, U.S.A)를 시각 피질 II 층에 놓고 bridge amplifier (IX2-

700, Dagan Corp, Minneapolis, MN, U.S.A)를 통해 측정하였다. 영향 유무를 관찰 후, 각각 D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5 ; 50 μM) 와 6-cyano-7-nitroquinoxaline-dione disodium (CN-QX ; 20 μM)을 첨가하여 효과를 알아보았다.

통계는 저농도 마그네슘 투여 후 첫 번째 간질 간기 전기장 전위와 간질기 전기장 전위가 나타나는 잠복시간, 빈도, 진폭과 전기장 전위가 지속되는 시간을 평균값을 내어 비교하였는데, 각각의 실험군 간의 차이는 t-test를 이용하였고, p 값은 0.05미만을 통계학적으로 의미 있는 것으로 간주하였다.

결 과

37개의 뇌 조직 절편에서 결과를 얻었다. 1 mM 마그네슘에서는 간질 간기와 간질기에 경련 모양 활동이 나타나지 않았다.

0.5 mM과 0 mM 마그네슘에서는 간질 간기에 경련 모양 전위가 나타났다(Figure 1). 간질 간기 경련 모양 전위는 자발성으로 나타나는 여러 개의 극파로 구성된 돌발파다. 잠복기, 빈도, 진폭과 지속시간은 각각의 농도에 따라 달랐다. 마그네슘 0.5 mM을 처리한 13개 조직 절편의 잠복기, 지속시간, 빈도와 진폭은 26.9±11.7분, 15.1±15.4 ms, 1.1±0.7/분과 1.0±0.3 mV이었고, 0 mM을 처리한 14개 조직 절편의 잠복기, 지속시간, 빈도와 진폭은 13.3±2.7분, 587.4±398.0 ms, 5.7±0.7/분과 1.4±0.4 mV이었다. 잠복기, 지속시간, 빈도와 진폭은 0.5 mM과 0 mM 사이에 통계적 의미가 있었다(Table 1).

간질기 경련 모양 전위는 마그네슘 0.5 mM을 처리한 13개 조직 절편에서는 나타나지 않고, 0 mM 마그네슘에서 나타났다(Figure 2). 간질기 경련 모양 전위를 살펴 보면, 마그네슘 0 mM을 처리한 14개 조직 절편의 잠복기, 지속시간, 빈도와 진폭은 15.5±8.0분, 25.2±6.0 s,

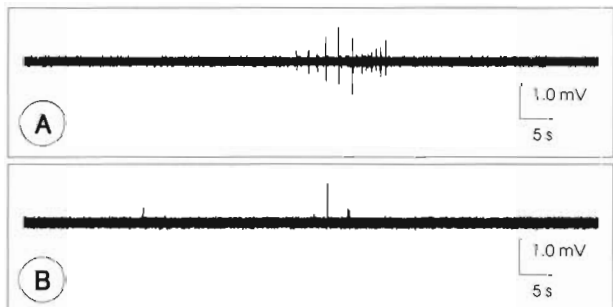


Figure 1. Representative examples of interictal discharges seen in artificial cerebrospinal fluid with 0 mM (A) and 0.5 mM Mg (B).

Table 1. Characteristics of Mg-free induced epileptiform activity

	0.5 mM (n=13)	0 mM (n=14)
Interictal		
Latency (min)	26.9±11.7	13.3± 2.7*
Duration (ms)	15.1±15.4	587.4±398.0*
Frequency (/min)	1.1± 0.7	5.7± 0.7*
Amplitude (mV)	1.0± 0.3	1.4± 0.4*
Ictal		
Latency (min)	No	15.5± 8.0
Duration (s)	No	25.2± 6.0
Frequency (/event)	No	53.8± 16.3
Amplitude (mV)	No	2.9± 0.7

*p<.05

Values are mean±SD

No, no ictal activity.

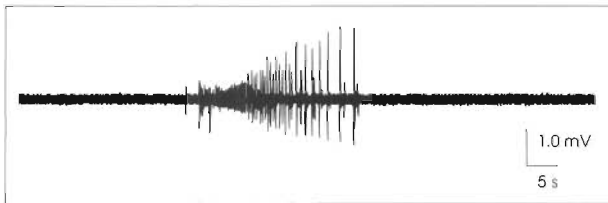


Figure 2. Representative examples of ictal discharges seen in artificial cerebrospinal fluid with 0 mM Mg.

53.8±16.3/회와 2.9±0.7 mV로 통계적 의미가 있었다 (Table 1).

0 mM 마그네슘에 D-AP5 50 μM을 첨가하였을 때는 자발성 간질 모양 활동은 나타나지 않았다. 한편, 0 mM 마그네슘에 CNQX 20 μM을 첨가하였을 때는 빈도는 5.7±0.7/분에서 5.1±0.9/분으로 다소 감소하였고, 지속 기간은 587.4±398.0 ms에서 465.6±262.5 ms로 감소하였지만, 자발성 간질 모양 활동의 완전 억제는 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구에서 사용된 뇌조직 절편 방(chamber)은 구성과 유지가 쉬워 본 연구 기록에 적합한 것으로 나타났다. 특히, 안정적인 기록이 한 시간 이상 이루어졌으며 이는 다른 보고와 유사하다.¹⁴ 또한, 본 연구에서 사용한 온도는 비교적 실험 내내 잘 유지되어 오랜 기간동안에 보이는 간질 모양 활동을 보는데 적합했음을 보여주었는데, 이 온도에서는 신경 전달 물질 섭취가 크게 증가하지 않고¹⁵ 신경 전달 물질 분비가 증가¹⁶되기 때문이다. 아울러 조직 절편의 활력도를 오랜 기간동안 증가시켜 장시간의 기록을 얻을 수 있었던 것으로 보인다.

본 연구에서는 간질 모양 방전이 자발적으로 나타나는 것을 잘 나타냈는데, 이는 다른 보고 결과와 유사하다.¹⁷ 간질 모양 방전 자발성의 배경을 살펴보면, 몇 개의 극과와 함께 그보다 짧은 혹은 좀 더 긴 탈분극 과형을 가진 발작성 탈분극 변위가 발생하여 모든 신경 세포로 퍼져 동기화된 활동이 나타나는 것이다.¹⁸ 이 파의 기간과 진폭은 실제 세포막 특징과 신경망의 성질에 따라 달라진다. 활성화된 신경망을 구성하는 모든 신경 세포의 동기성 발작성 탈분극 변위 활동이 간질 모양 전위의 모양, 기간과 진폭을 결정하며, 이것이 세포외 전기장 전위로 포착된다.¹⁷ 또한, 동기화된 간질 모양은 회귀 흥분성 시냅스, 틈새 이음을 통한 전기 긴장성 결합, 전기장과 전기 연결 영향과 세포외 이온 농도 변화에도 영향을 받는다.¹⁷

본 연구에서는 저농도의 마그네슘을 제한된 기간 동안만 뇌조직 절편에 폭로 시켜 간질 모양 활동이 나타나는 것을 알 수 있었는데 이는 다른 보고와 유사하다.¹⁷ 이러한 상태의 특징은 자발적인 간질 모양 활동과가 세포외에서 일어나는 것으로 시험관내(*in vitro*) 모델의 장점을 잘 보여 주고 있으며 간질 발생연구에 도움이 된다.

본 논문에서 0 mM 마그네슘에 NMDA 수용체 대항제인 D-AP5 50 μM을 첨가하였을 때는 자발성 간질 모양 활동은 관찰할 수 없었는데 이는 다른 보고와 유사하다.¹⁷ 따라서, 저농도 마그네슘 효과는 NMDA 수용체 의존성 과정도 관련되는 것으로 생각 할 수 있다.⁹ 한편, 0 mM 마그네슘에 CNQX 20 μM을 첨가하였을 때는 빈도와 지속 기간이 감소하였지만, 자발성 간질 모양 활동의 완전 억제는 관찰되지 않았는데, 이는 다른 보고와 유사하다.¹⁷ 이를 약리학적 측면에서 보면, 저농도 마그네슘 노출은 먼저 NMDA 수용체 활성화를 증가시키고¹⁹ 마그네슘 민감도를 변화시키며,²⁰ NMDA 수용체 발현 과다를 보여²¹ 경련 감수성을 증가시켜 NMDA 수용체 의존성으로 경련 모양 활동과가 시작된다.¹⁷ 한편으로는, 저농도 마그네슘이 non-NMDA 수용체를 활성화하여 빠른 탈분극을 만들어 막 전위를 문턱값(threshold) 이상으로 만든다.¹³ 간질의 정의는 신경세포 전위가 자발적으로 동기화되어 반복되는 것을 특징으로 하는데 본 연구 결과가 이를 잘 나타내고 있다. 따라서, 저농도의 마그네슘은 생리학 및 약리학 측면에서 억제성 영향을 차단하기보다는 흥분성을 증가시켜 간질 모양 활동 전위를 유도하는 좋은 모델로 생각된다.

REFERENCES

1. Treiman LJ, Treiman DM. Genetic aspects of epilepsy. In: E. Wyllie

- (Ed.), *The Treatment of Epilepsies: Principles and Practice*, Lea and Febiger, Philadelphia, 1993:145-56.
2. Galvan M, Grafe P, Bruggencate G. Convulsant actions of 4-aminopyridine on the guinea-pig olfactory cortex slice. *Brain Res* 1982; 241:75-86.
 3. Gutnick MJ, Connors BW, Prince DA. Mechanisms of neocortical epileptogenesis *in vitro*. *J Neurophysiol* 1982;48:1321-35.
 4. Schwartzkroin PA, Prince DA. Penicillin-induced epileptiform activity in the hippocampal *in vitro* preparation. *Ann Neurol* 1977;1: 463-9.
 5. Schwartzkroin PA, Turner DA, Knowles WD, Wyler AR. Studies of human and monkey "epileptic" neocortex in the *in vitro* slice preparation. *Ann Neurol* 1983;13:249-57.
 6. Hoffman SN, Salin PA, Prince DA. Chronic neocortical epileptogenesis *in vitro*. *J Neurophysiol* 1994;71:1762-73.
 7. Anderson WW, Lewis DV, Swartzwelder HS, Wilson WA. Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 1986;398:215-9.
 8. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature* 1984;309: 261-3.
 9. Mody I, Lambert JDC, Heinemann U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 1987;57:869-88.
 10. Thompson AM, West DC. N-methylaspartate receptors mediate epileptiform activity evoked in some, but not all conditions in rat neocortical slices. *Neuroscience* 1986;19:1161-77.
 11. Rafiq A, DeLorenzo RJ, Coulter DA. Generation and propagation of epileptiform discharges in a combined entorhinal cortex/hippocampal slice. *J Neurophysiol* 1992;67:443-54.
 12. Traynelis SF, Dingledine R. Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* 1988;59:259-76.
 13. Gean P. NMDA receptor-independent epileptiform activity induced by magnesium-free solution in rat amygdala neurons is blocked by CNQX. *Neuroscience Letters* 1990;119:53-5.
 14. Aram JA, Lodge D. Validation of a neocortical slice preparation for the study of epileptiform activity. *Journal of Neuroscience Methods* 1988;23:211-24.
 15. Alger BE, Nicoll RA. Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied *in vitro*. *J Physiol* 1982;328: 105-23.
 16. Hubbard JL, Jones SF, Landau EM. The effect of temperature change upon transmitter release, facilitation and post-tetanic potentiation. *J Physiol* 1971;216:591-609.
 17. Gulyas-Kovacs A, Doczi J, Tarnawa I, Detari L, Banczerowski-Pelyhe I, Vilagi I. Comparison of spontaneous and evoked epileptiform activity in three *in vitro* epilepsy models. *Brain Res* 2002; 945:174-80.
 18. Prince DA. The depolarization shift in epileptic neurons. *Exp Neurol* 1968;21:467-85.
 19. Gloveli T, Albrecht D, Heinemann U. Properties of low Mg induced epileptiform activity in rat hippocampal and entorhinal cortex slices during adolescence. *Developmental Brain Research* 1995; 87:145-52.
 20. Kleckner NW, Dingledine R. Regulation of hippocampal NMDA receptors by magnesium and glycine during development. *Mol Brain Res* 1991;11:151-9.
 21. Hamon B, Heinemann U. Developmental changes in neuronal sensitivity to excitatory amino acids in area CA1 of the rat hippocampus. *Dev Brain Res* 1988;38:286-90.