

## Harmaline 처치에 따른 소뇌 조롱박세포의 변성

김진호<sup>1</sup>, 전제열<sup>1</sup>, 유호진<sup>2</sup>, 기근홍<sup>3</sup>, 오재욱<sup>4</sup>, 김영택<sup>4</sup>, 장인엽<sup>4</sup>

조선대학교 의과대학 신경과학교실,

<sup>1</sup>생리학교실, <sup>2</sup>약리학교실, <sup>3</sup>병리학교실, <sup>4</sup>해부학교실

**간추림** : 인돌알칼로이드 계열의 일종인 harmaline이 소뇌의 변성을 초래하는 기전은 아래올리브핵의 흥분에 의한 이차적인 손상으로 추측되고 있다. 따라서 본 연구에서는 실험동물로 체중 220~300g의 성숙한 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 사용하여 harmaline에 의해 유도된 오름섬유의 흥분이 소뇌 조롱박세포의 손상을 초래하는가를 알아보고자 하였다. 또 3-acetylpyridine을 이용하여 아래올리브를 선택적으로 제거한 후, 다시 harmaline을 처치하여 나타난 변화를 harmaline만을 처치하여 나타난 결과와 비교하여 관찰하였다. 이러한 형태학적 변화를 알아보기 위하여 조롱박세포 및 아래올리브핵세포(calbindin D-28k, CGRP), 신경아교세포(GFAP)에 대한 각각의 항체를 사용하여 면역조직화학염색을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Harmaline을 투여한 실험군에서는 소뇌별레와 소뇌별레옆구역에 있는 조롱박세포들의 변성과 신경아교세포가 활성화되는 것을 관찰할 수 있었다. 반면, 3-acetyl pyridine을 전처치하여 아래올리브핵을 선택적으로 파괴시킨 실험군에서는 조롱박세포들이 거의 손상되지 않았으며, 신경아교세포가 활성화되는 조건도 관찰할 수 없었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 harmaline의 투여로 유도된 아래올리브핵의 흥분은 조롱박세포와 연결되는 오름섬유의 신경연접종말에서 흥분성 신경전달물질의 방출을 증가시킴으로써 조롱박세포의 변성을 초래하는 것으로 사료된다. 이러한 조건은 신경독성물질이 하나의 신경연접을 지나 간접적으로 다른 신경세포에 영향을 줄 수 있다는 가능성을 제시하여 주고 있다.

**찾아보기 낱말** : Harmaline, 3-acetyl pyridine, 오름섬유, 소뇌, 조롱박세포, 신경변성

### 서 론

Harmaline은 5개의 고리로 구성된 인돌알칼로이드(indole alkaloid)로서 생체에 투여시 떨림(tremor)과 조화운동불능(ataxia) 등을 포함한 운동장애를 초래하는 것으로 알려지고 있다(Llinas와 Volkind 1973, Zetler 등 1972, 1974). 이러한 현상은 harmaline이 아래올리브핵(inferior olivary nucleus: ION) 신경원의 흥분성을 증가시켜, 오름섬유종말(climbing fiber terminal)에서 글루탐산(glutamate)의 과도한 분비를 유도함으로써 이루어진다. 반복적이

고 과도한 글루탐산의 분비는 조롱박세포에 비가역적인 흥분성 손상을 초래하여 결국에는 조롱박세포의 변성을 초래한다고 알려지고 있다(De Montigny와 Lamarre 1973, Olney 1978, Choi 1988).

소뇌의 들신경섬유들은 아래올리브핵에서 기원하여 소뇌로 오는 오름섬유(climbing fiber)와 뇌줄기 또는 척수의 여러 신경핵에서 기원하여 소뇌로 오는 이끼섬유(mossy fiber) 등이 대표적으로 알려져 있다(Granit와 Phillips 1956, Ghelarducci 등 1975, Maex와 Schutter 1998). 오름섬유와 이끼섬유는 glutamate수용체의 활성화를 통해서 조롱박세포와 과립세포(granular cell)에 각각 흥분성 신경전도를 제공한다. 이러한 소뇌 들신경섬유들의 흥분에 따라 여러 아미노산, monoamine, neuropeptide들이

\*이 논문은 1999년도 조선대학교 학술연구비의 지원으로 연구되었음.

교신저자: 장인엽(조선대학교 의과대학 해부학교실)

방출되는데, 이들은 들신경섬유내에서 상호 공존하는 등 복잡한 관계를 형성하는 것으로 알려지고 있다(Lundberg와 Hokfelt 1983, Ito 1984, Hokfelt 등 1986, King 등 1992). 또한 최근 보고에 따르면 harmaline이 NMDA channel blocker인 MK-801과 경쟁적으로 작용한다는 사실이 밝혀짐으로써 기존의 글루탐산을 통한 작용기전 이외에 칼슘통로를 통해 작용한다는 새로운 가설이 제기 되고 있는 실정이다(Du 등 1997).

본 연구에서는 harmaline에 의해 과흥분된 오름섬유의 영향에 따라 나타나는 조롱박세포의 변화를 calbindin D-28k와 CGRP의 염색정도를 통해 밝혀내고자 한다. 이를 위하여 아래올리브핵을 화학적처리(3-acetyl pyridine)로 선택적으로 제거한 후, harmaline의 효과를 관찰함으로써 harmaline이 오름섬유의 과흥분에 의해 조롱박세포들에 영향을 준다는 주장들을 증명하고자 한다. 아울러 신경세포의 변성에 따른 신경아교세포의 활성여부를 알아보기 위하여 신경아교세포표지자인 glial fibrillary acidic protein (GFAP)에 대한 염색도 시행하여 신경원의 변화와 함께 신경아교세포의 변화도 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물로는 체중 220~300 g의 성숙한 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였다. 물은 자유로이 마실수 있게 하였지만, 사료는 약물투여 15시간 전에 중단하였다. 모든 약물이 들어있는 용액들은 복강내 주사를 통해 주입하였다. 용액내 약물들의 농도는 3-acetyl pyridine (70 mg/kg), harmaline (20 mg/kg)이 되게 투여하였다. 마취는 sodium pentobarbital (60 mg/kg)을 사용하였다.

### 2. 실험군

실험동물들은 모두 3무리로 분류하여 사용되었다.

#### 1) 3-acetyl pyridine 처치군

마취 후 3-acetyl pyridine을 (70 mg/kg)을 주입하고 1~6일 후 3-acetyl pyridine 투여하고 1~6일이 지난 후에 아래올리브핵이 제거된다는 보고들(Llinas 등 1975, Sotelo 등 1975)에 따라 harmaline (20 mg/kg)을 주입하였다.

#### 2) harmaline 처치군

마취 후 harmaline (20 mg/kg)을 주입하였으며, 3일, 7일, 2주일군으로 다시 세분하여 구분하였다.

#### 3) 대조군

대조군으로는 saline을 주입하거나, 아무것도 주입하지 않은 동물을 이용하였다.

### 3. 표본제작 및 면역조직화학염색

실험동물들은 sodium pentobarbital로 마취시킨 후 가슴벽을 제거하고 심장을 통하여 heparin (5 IU/ml)이 함유된 생리식염수를 관류시켜 혈액을 제거한 다음, 4% paraformaldehyde 또는 Zamboni 고정액을 관류고정시켰다. 이후 머리덜개뼈를 제거하여 뇌를 채취, 약 3 mm 두께로 절편을 만든 다음, 4°C에서 12시간 정도 재차 고정하였다. 냉동조직절편을 만들기 위해 30% sucrose (Sigma)가 함유된 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 담겨 4°C에서 1~2일간 보관하여 냉동손상을 방지하였다. 냉동절편기(Reichert-Jung)를 사용하여 30~40 μm 두께로 자른 절편들을 glycerol, ethylene glycol, 증류수, PBS들이 들어 있는 보관용액(용적비율 3:3:3:1)에 일단 저장하였다가 필요한 부위 절편들을 염색에 이용하였다. Cresyl violet 염색을 실시하여 중추신경계의 위치를 파악한 후 면역조직화학염색을 실시하였다. 면역조직화학염색과정은 아래와 같이 실시하였다. 절편을 0.05 M PBS에 30분간 처리한 후 내인성산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 20분동안 반응시킨 다음, 재차 PBS로 3회 이상 세척하였다. 비특이성반응을 억제하기 위해 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma)과 1.5% 정상염소혈청(normal goat serum)이 각각 희석되어 있는 PBS를 1시간 동안 진동시키며 반응

시켰다. 제1차 항체는 토끼에서 추출한 anti-calbindin D-28k (Sigma)를 1 : 1,000, anti-calcitonin gene related peptide (CGRP, Sigma)를 1 : 600, anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP, Sigma)를 1 : 200으로 각각 희석하여 4°C에서 48시간 진동시키며 반응시킨 다음, PBS로 수차례 세척하여 잔여 항체를 제거하고, biotin이 붙어있는 2차 항체 (Vector)를 1 : 200으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 세척한 후 avidin-biotin complex를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 발색은 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 10 mg/40 ml PBS)를 사용하였으며, 광학현미경하에서 발색정도를 확인한 후, 탈수, 투명 과정을 거친 후 Polymount (Polyscience)에 봉입하였다. 항체의 특이성 정도를 파악하기 위해 제1차 항체 대신에 PBS를 사용하여 같은 방식으로 실험하였다.

## 결 과

### 1. 약물 투여에 따른 운동성 변화

Harmaline 단독 투여시, 흰쥐의 반응은 5분 이내에 몸통, 머리, 팔다리 등에 경련이 유발되고, 보행장애, 근육긴장도 저하 등을 보였다. 경련과 운동장애는 harmaline 주입 24시간 이후에는 거의 소실되어 정상 대조군과 구분할 수 없었다. 3-acetyl pyridine를 주입한 실험군에서는 harmaline에 비해 경련은 거의 나타나지 않는 대신, 심한 운동조화불능과 닭걸음 (steppage gate)과 유사한 소견을 보인 후, 24시간 경과 후에는 머리 또는 몸통을 움직일 때 가벼운 경련만을 보였다.

### 2. 아래올리브핵

정상적으로 아래올리브핵 신경세포들은 calbindin D-28k에 강하게 염색되는 층상구조를 나타낸다 (Fig. 1A). 반면 CGRP에 대해서는 거의 염색이 되지 않는 소견을 보였다. GFAP에 대한 면역염색 반응을 나타내는 별아교세포들은 거의 관찰할 수 없었는데, 이 소견은 harmaline을 투여한 실험군의

소견과 차이가 없었다 (Fig. 3G).

#### 1) 아래올리브핵에 대한 harmaline의 효과

Harmaline 투여 후 아래올리브핵의 반응을 관찰한 결과, calbindin D-28k, GFAP의 염색반응은 정상대조군과 유사하게 나타났다 (Fig. 1B, C).

#### 2) 아래올리브핵에 대한 3-acetyl pyridine의 효과

3-acetyl pyridine 투여 후 아래올리브핵의 거의 모든 신경세포들이 소실되었다. 이를 calbindin D-28k에 대한 염색반응으로 확인한 결과 아래올리브핵의 신경세포체들은 거의 염색되지 않았다 (Fig. 1D). 3-acetyl pyridine를 투여한 실험군에서 적은 수의 calbindin D-28k 양성반응세포를 아래올리브핵에서 관찰할 수 있었는데, 이 양성반응세포들은 주로 안쪽덧올리브핵 (medial accessory olivary nucleus), 또는 등쪽덧올리브핵 (dorsal accessory olivary nucleus)에서 매우 드물게 관찰되었다. 3-acetyl pyridine 투여 후 아래올리브핵에서 별아교세포 표지물인 GFAP에 대한 염색을 실시한 결과, 정상군이나 단순히 harmaline 만을 투여한 실험동물과 비교하여 볼때 많은 활성화된 별아교세포들이 관찰되었다 (Fig. 3G, H).

### 3. 소뇌겉질

정상 소뇌조롱박세포는 calbindin D-28k와 calcitonin gene related peptide (CGRP)에 강한 양성을 보였는데, 세포체 뿐만 아니라 가지돌기와 축삭에서 면역반응이 나타났다. 정상대조군에서는 연속적인 1열의 조롱박세포들이 소뇌전반에 걸쳐 나타났는데, 가지돌기들이 분자층으로 뻗어 나가는 것을 관찰되었다 (Fig. 2A, H, J). Harmaline을 투여한 실험군에서는 조롱박세포의 세포체와 가지돌기들이 소실됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2D-G). Harmaline 투여 3일째에는 불규칙적으로 손상된 조롱박세포체가 관찰되었으며, 1주일 후에는 조롱박세포들이 calbindin D-28k나 CGRP에 염색이 되지 않아 띠를 형성하는 양상을 보이기 시작하였다 (Fig. 2B, K). 연속관상절편을 염색하여 분석한 결과, 특징적으로 정중선옆구역 (parasagittal area)에 염색되지

않은 조롱박세포 무리들이 관찰되었다. 이런 조롱박세포의 소실은 소뇌벌레(vermis)에서 가장 잘 나타났으며, 벌레옆구역(paravermis), 소뇌반구, 타래옆구역(paraflocculus)에서도 관찰할 수 있었다. 3-acetyl pyridine를 투여한 실험군에서의 소뇌겉질에 나타난 소견은 정상대조군에서의 결과와 유사하였다. 즉 조롱박세포가 1열로 소뇌겉질 전반에서 관찰되었다. 그러나 3-acetyl pyridine 투여 2주 후에 가쪽소뇌반구에서 일부 조롱박세포들이 소실되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 3-acetyl pyridine를 투여하고 6일 후에 harmaline을 투여한 실험군에서도 역시 소수의 조롱박세포들이 소실되는 양상을 보였다(Fig. 2C). 별아교세포에 대한 항체인 GFAP를 이용한 염색소견을 살펴보면, 정상대조군에서는 소뇌 백색질과 분자층에서 염색되는 반면, harmaline 투여군에서는 조롱박세포층과 과립층에서 진하게 염색되는 별아교세포들을 관찰되었다(Fig. 3A-F). 조롱박세포층에 나타나는 별아교세포들은 변성을 일으키는 조롱박세포들이 있는 위치와 일치하였다.

## 고 찰

Harmaline은 소뇌의 조롱박세포들 중 일부에 영향을 주어 그 세포들을 변성시키는 소뇌 신경독성을 일으키는 것으로 알려져 왔다(O'Hearn과 Molliver 1993). 조롱박세포의 변성은 별아교세포의 활성화가 일어나는 위치와 일치하였다. 이러한 소견은 주로 소뇌벌레에서 주로 나타나고, 분자층과 조롱박세포층에 세포띠 모양으로 관찰되었다. 드물게 벌레주위구역(paravermis)과 소뇌반구에서도 조롱박세포의 변성을 관찰할 수 있었는데, 이러한 본 실험결과는 기존의 보고(O'Hearn과 Molliver 1993, O'Hearn 등 1993, Molinari 등 1996)와 일치하였다. 또한 본 실험에서 알 수 있었던 것은 3-acetyl pyridine투여로 아래올리브핵을 제거함으로써 harmaline에 의한 조롱박세포의 변성을 방지할 수 있다는 것이다. 이러한 결과를 바탕으로 harmaline의 작용기전이 조롱박세포에 대한 직접적인 작용보다는 올리브소뇌신경로의 지속적인 흥분을 통하여

간접적으로 조롱박세포를 변성시킨다는 결론에 도달할 수 있다. Harmaline에 의해 조롱박세포가 변성된다는 사실은 올리브소뇌회로를 통해 흥분성 신경손상을 초래할 수 있는 실험기법이라고 사료된다.

Harmaline에 의해 조롱박세포의 변성이 세포띠 모양으로 나타나는 소견은 아래올리브-조롱박세포 사이의 연결양상과 일치한다. 즉 아래올리브의 신경세포들에서 기원한 신경 축삭들이 소뇌겉질의 세로방향으로 따라 투사되고, 올리브신경 세포들의 작은 무리들이 소뇌겉질 수백  $\mu\text{m}$  너비에 해당하는 parasagittal row로 배열된 조롱박세포들을 지배한다는 보고들(Oscarsson 1976, Brodal과 Kawamura 1980, Azizi와 Woodward 1987), 그리고 아래올리브 신경세포들이 교통신점(gap junction)에 의해 연결되고, 세포층에 있는 조롱박세포들을 동시에 조화롭게 흥분시킨다는 보고들과 밀접한 연관성이 있는 것으로 사료된다(Sotelo 등 1974, Llinas와 Yarom 1986, Llinas와 Sasaki 1989, Sasaki 등 1989). 본 연구에서 3-acetyl pyridine라는 약물로 아래올리브핵을 제거하였을 때 harmaline에 의해 유도되는 경련을 예방할 수 있었는데 이는 harmaline이 아래올리브핵에 작용한다는 사실을 뒷받침한다. 이렇게 3-acetyl pyridine투여로 harmaline에 의한 경련은 억제할 수 있었지만, 근육긴장도 저하는 계속 나타났는데, 이러한 소견으로 보아 harmaline은 아래올리브핵 뿐만 아니라 아직 알려지지 않은 중추신경계에 영향력을 가지는 것으로 추측된다. 일반적으로 신경세포의 흥분성 손상은 지속적인 글루탐산의 흥분, 연속적이고 과도한 세포내 칼슘농도상승, 이에 따른 여러가지 칼슘의존성 효소들에 의한 세포성분의 파괴를 초래하게 된다(Olney 1978, Garthwaite 등 1986, Choi 1988, Siman과 Noszek 1988). 오름섬유에 의한 조롱박세포의 활성화는 여러 가지 기전에 의해 세포질 칼슘수준을 상승시키게 된다. 아래올리브신경세포의 신경전달물질인 글루탐산이 조롱박세포에 존재하는 글루탐산 수용체의 활성화를 유도하게 된다(Llinas와 Sugimori 1980, Zhang 등 1990). 결과적으로 harmaline이 아래올리브핵 신경세포의 흥분빈도를 지속적으로 증가시킨다는 보고

들(O'Hearn과 Molliver 1993, Zhang 등 1990)과, 오름섬유와 조롱박세포 사이에 신경연접이 존재한다는 사실들(Llinas와 Yarom 1986, Sasaki 등 1989)로 미루어, harmaline에 의한 조롱박세포의 손상은 세포 흥분성 전달에 의해 발생된다고 사료된다.

3-acetyl pyridine 처치후 손상받지 않고 계속 생존하는 아래올리브핵 신경세포들은 꼬리쪽올리브핵, 특히 안쪽덧올리브에서 발견되었는데, 이는 기존의 보고들(Anderson과 Flumerfelt 1984, Rossi 등 1991)과 일치하였다. 안쪽덧올리브는 소뇌벌레로 투사된다고 알려져 있는데(Brodal, 1954), 3-acetyl pyridine 처치후 이곳에 살아남은 신경세포에서 기원한 오름섬유에 의해, 매우 드물게 소뇌벌레부위에서 조롱박세포의 변성이 관찰되었다. 3-acetyl pyridine와 harmaline에 의해 나타나는 소뇌 조롱박세포의 변성을 살펴보면, 3-acetyl pyridine를 투여한 후 재차 harmaline을 투여 한 결과와, 3-acetyl pyridine만을 투여하여 나타난 결과를 비교해 볼 때 바깥쪽 소뇌반구에서는 조롱박세포들의 변성이 증가되지 않았지만, 소뇌벌레에서는 미약하게 증가된 변성 양상을 보였다. 이러한 결과들을 종합하여 볼 때 3-acetyl pyridine와 harmaline을 병행하여 투여했을 때 나타나는 조롱박세포들의 변성은 3-acetyl pyridine의 독성에 의해 발생되고, 소뇌벌레에서 보이는 추가적인 조롱박세포들의 변성은 harmaline에 의한 독성으로 사료된다. 본 연구결과 harmaline은 올리브소뇌 투사경로를 통해서 간접적으로 조롱박세포의 변성을 초래한다는 것을 알 수 있었다. Harmaline은 신경독성물질로 작용하여 신경연접을 지나서도 신경세포 변성을 일으킨다는 것도 알 수 있었다. 이는 소뇌의 사이신경세포(interneuron)에 의한 다신경연접(poly-synaptic activation)에 의한 신경세포의 흥분을 초래할 수 있을 것으로 사료된다. Harmaline의 자극에 의해 아래올리브핵이 흥분되고, 이에 따라 오름섬유에서 흥분성 신경전달물질들이 과도하게 분비됨으로써, 신경연접이후 조롱박세포에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

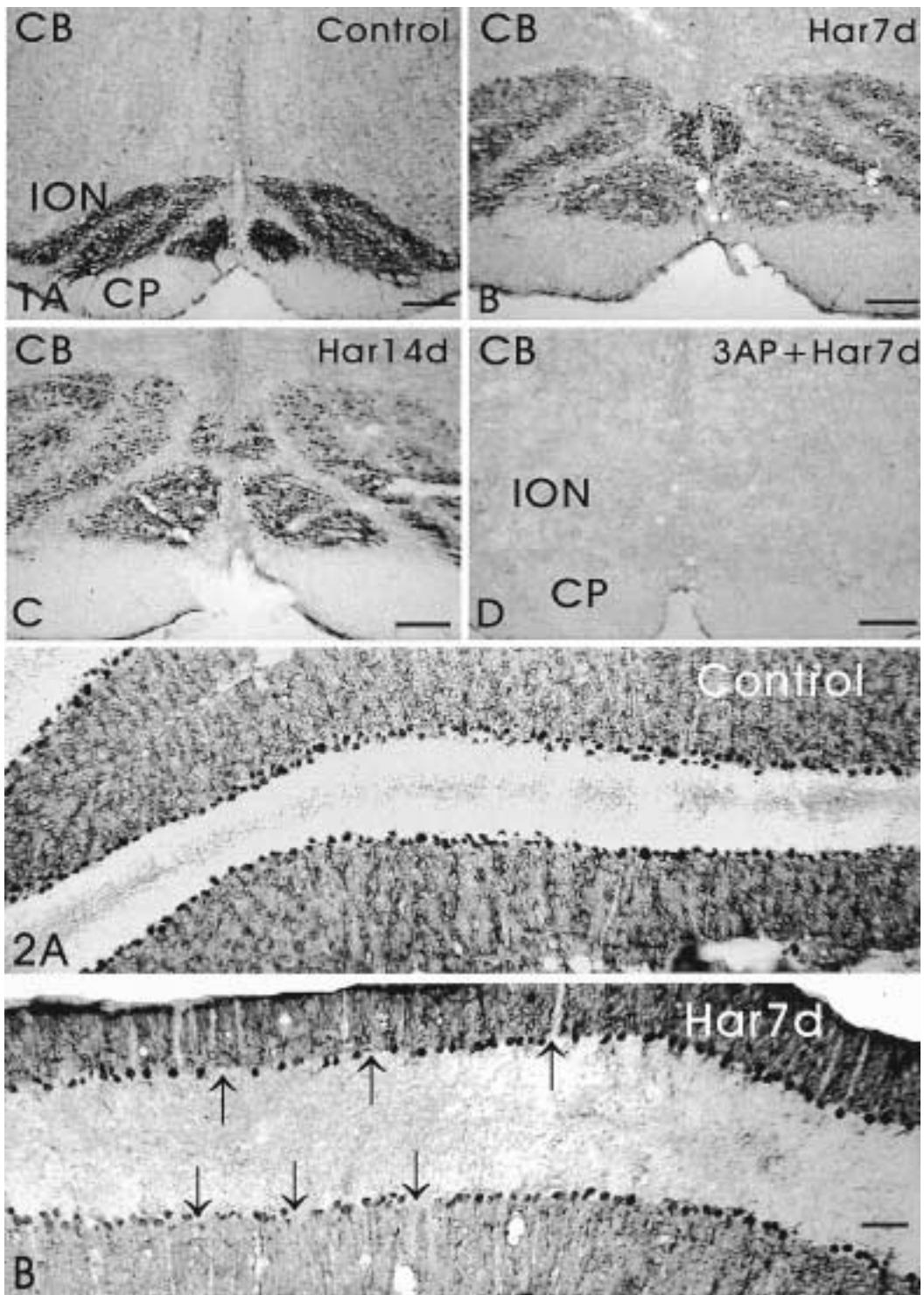
- Anderson WA, Flumerfelt BA : Sensitivity of rat inferior olivary neurons to 3-acetylpyridine. *Brain Res* 314(2) : 285-91, 1984.
- Azizi SA, Woodward DJ : Inferior olivary nuclear complex of the rat: morphology and comments on the principles of organization within the olivocerebellar system. *J Comp Neurol* 22; 263 : 467-84, 1987.
- Brodal A, Kawamura K : Olivocerebellar projection: a review. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 64 : 1-140, 1980.
- Choi DW : Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1 : 623-34, 1988.
- De Montigny C, Lamarre Y : Rhythmic activity induced by harmaline in the olivo-cerebello-bulbar system of the cat. *Brain Res* 53 : 81-95, 1973.
- Du W, Aloyo VJ, Harvey JA : Harmaline competitively inhibits (3H)MK-801 binding to the NMDA receptor in rabbit brain. *Brain Res* 770 : 26-29, 1997.
- Garthwaite G, Hajos F, Garthwaite J : Ionic requirements for neurotoxic effects of excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 18 : 437-47, 1986.
- Ghelarducci B, Ito M, Yagi N : Impulse discharges from flocculus Purkinje cells of alert rabbits during visual stimulation combined with horizontal head rotation. *Brain Res* 87 : 66-72, 1975.
- Granit R, Philips CG : Excitatory and inhibitory processes acting upon individual Purkinje cells of the cerebellum in cats. *J Physiol* 133 : 520-547, 1956.
- Hökfelt T, Everitt B, Holets VR, Meister B, Melander T, Schalling M, Staines W, Lundberg JM : Coexistence of peptides and other active molecules in neurons: diversity of chemical signalling potential. In: Iversen LL, Goodman E. *Fast and slow chemical signalling in the Nervous System*. Oxford University Press, Oxford, pp. 205-231, 1986.
- Ito M : *The cerebellum and Neural Control*. Raven Press, New York, 1984.
- King JS, Cummings SL, Bishop GA : Peptides in cerebellar circuits. *Prog Neurobiol* 39 : 423-42, 1992.
- Llinas R, Sasaki K : The Functional Organization of the Olivo-Cerebellar System as Examined by Multiple Purkinje Cell Recordings. *Eur J Neurosci* 1 : 587-602, 1989.
- Llinas R, Sugimori M : Electrophysiological properties of in

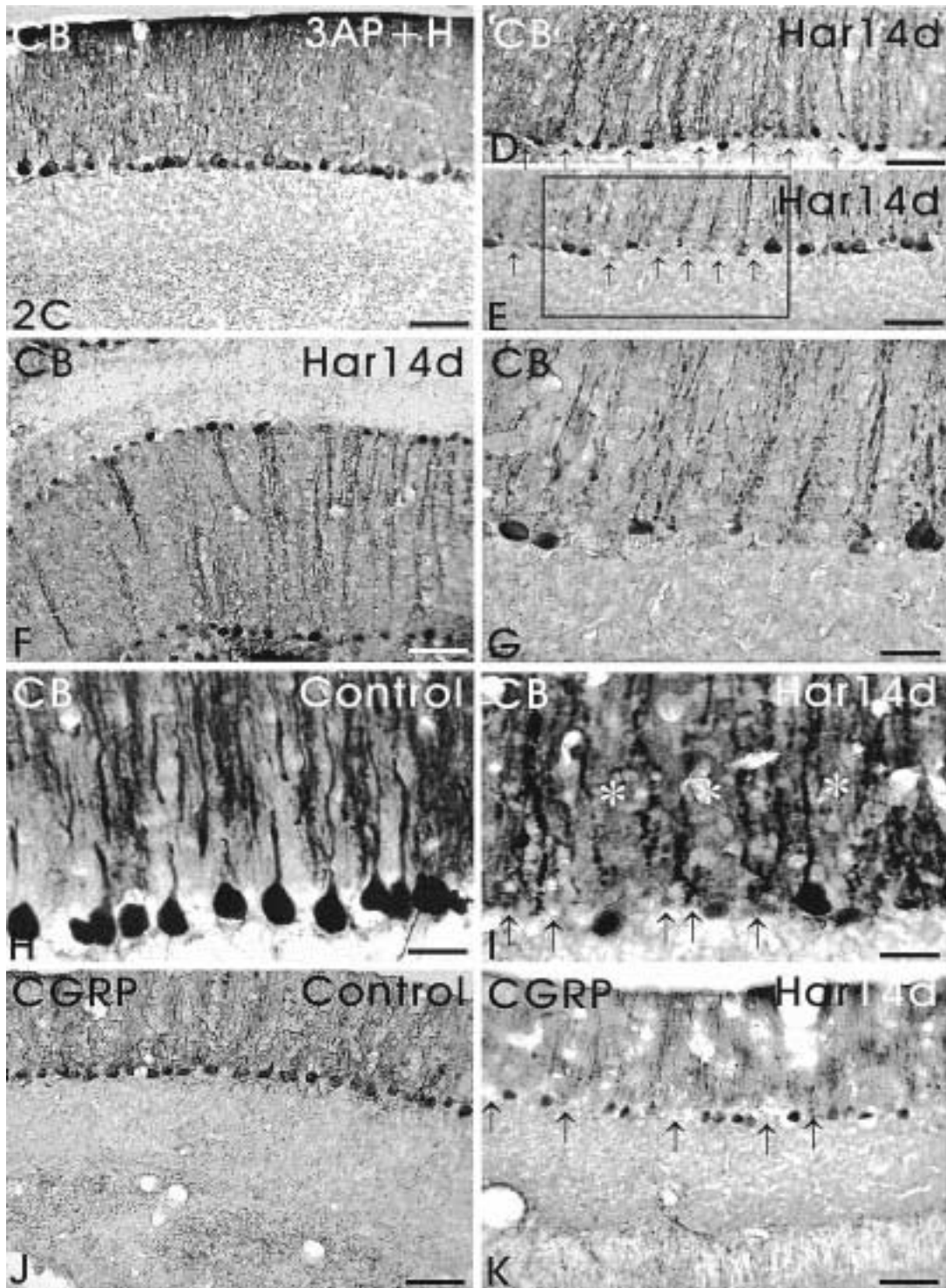
- vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J Physiol* 305 : 197-213, 1980.
- Llinas R, Volkind RA : The olivo-cerebellar system: functional properties as revealed by harmaline-induced tremor. *Exp Brain Res* 31; 18 : 69-87, 1973.
- Llinas R, Walton K, Hillman DE, Sotelo C : Inferior olive: its role in motor learning. *Science* 19 : 1230-1231, 1975.
- Llinas R, Yarom Y : Oscillatory properties of guinea-pig inferior olivary neurones and their pharmacological modulation: an in vitro study. *J Physiol* 376 : 163-82, 1986.
- Lundberg JM, Hokfelt T : Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *Trends Neurosci* 83 : 325-333, 1983.
- Maex R, Schutter ED : Synchronization of golgi and granule cell firing in a detailed network model of the cerebellar granule cell layer. *J Neurophysiol.* 80 : 2521-37, 1998.
- Molinari HH, Maisonneuve IM, Glick SD : Ibogaine neurotoxicity: a reevaluation. *Brain Res* 737 : 255-62, 1996.
- O'Hearn E, Long DB, Molliver ME : Ibogaine induces glial activation in parasagittal zones of the cerebellum. *Neuroreport* 4 : 299-302, 1993.
- O'Hearn E, Molliver ME : Degeneration of Purkinje cells in parasagittal zones of the cerebellar vermis after treatment with ibogaine or harmaline. *Neuroscience* 55 : 303-10, 1993.
- Olney JW : Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: Kainic acid as a tool in neurobiology (McGeer EG, Olney JW, McGeer PO, eds), New York: Raven, pp. 95-171, 1978.
- Oscarsson O : Spatial distribution of climbing and mossy fiber input into the cerebellar cortex. *Brain Res* 1 : 36-42, 1976.
- Rossi F, van der Want JJ, Wiklund L, Strata P : Reinnervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibres surviving a subtotal lesion of the inferior olive in the adult rat. II. Synaptic organization on reinnervated Purkinje cells. *J Comp Neurol* 22; 308 : 536-54, 1991.
- Sasaki K, Bower JM, Llinas R : Multiple Purkinje Cell Recording in Rodent Cerebellar Cortex. *Eur J Neurosci* 1 : 572-586, 1989.
- Siman R, Noszek JC : Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1 : 279-87, 1988.
- Sotelo C, Hillman DE, Zamora AJ, Llinas R : Climbing fiber deafferentation: its action on Purkinje cell dendritic spines. *Brain Res* 21; 98 : 574-8, 1975.
- Sotelo C, Llinas R, Baker R : Structural study of inferior olivary nucleus of the cat: morphological correlates of electrotonic coupling. *Neurophysiol* 37 : 541-59, 1974.
- Zetler G, Back G, Iven H : Pharmacokinetics in the rat of the hallucinogenic alkaloids harmine and harmaline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 285 : 273-92, 1974.
- Zetler G, Singbartl G, Schlosser L : Cerebral pharmacokinetics of tremor-producing harmala and iboga alkaloids. *Pharmacology* 7 : 237-48, 1972.
- Zhang N, Walberg F, Laake JH, Meldrum BS, Ottersen OP : Aspartate-like and glutamate-like immunoreactivities in the inferior olive and climbing fibre system: a light microscopic and semiquantitative electron microscopic study in rat and baboon (*Papio anubis*). *Neuroscience* 38 : 61-80, 1990.

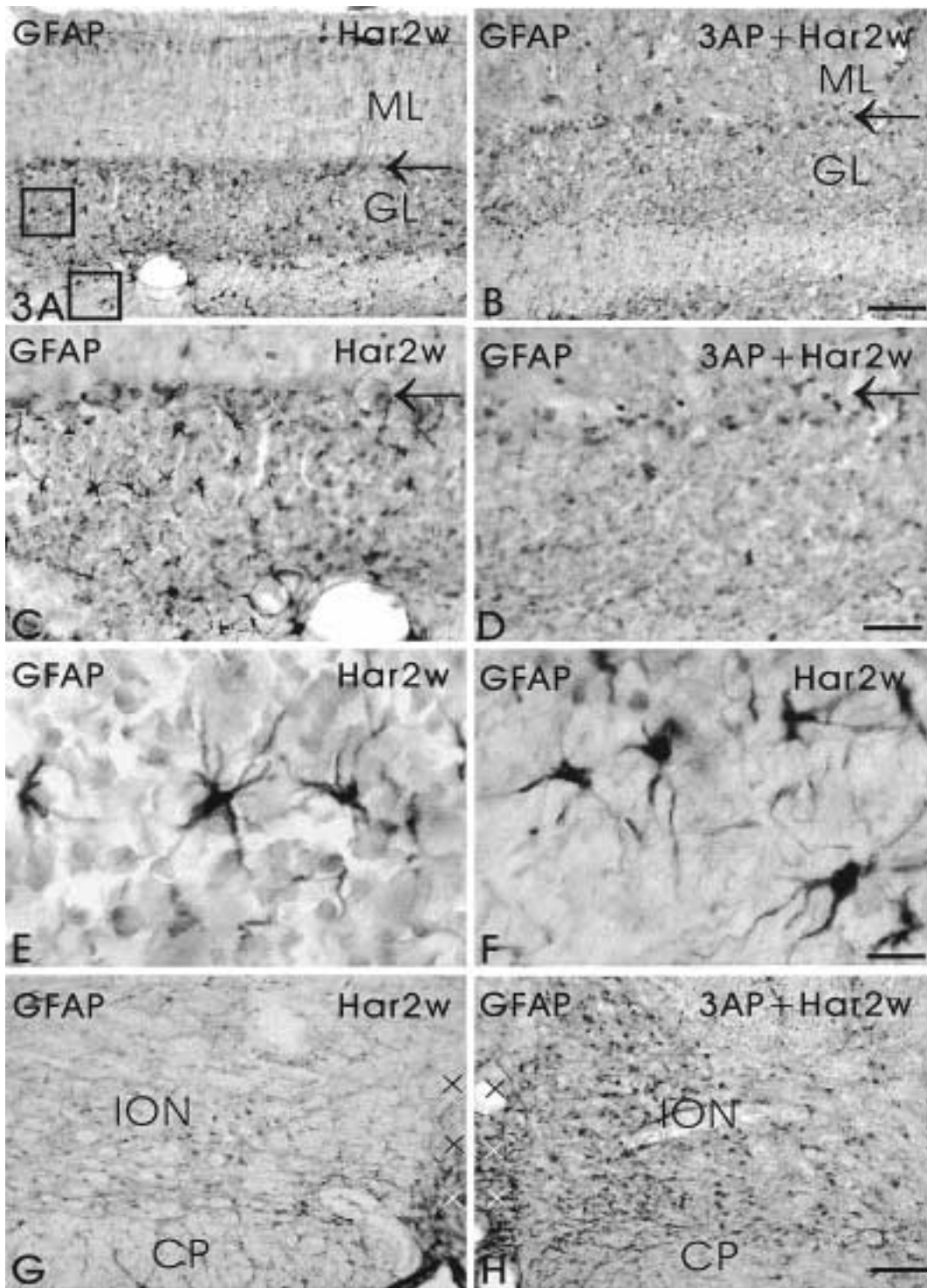
## Legends for Figures

- Fig. 1.** Inferior olivary neurons remain intact and exhibit normal morphology in the harmaline treated rat (B,C) similar to normal control (A). Pretreatment of 3-acetyl pyridine prior to harmaline degenerates the most neuron in inferior olivary nucleus (D). CB: calbindin D-28K, ION: inferior olivary nucleus CP: cerebral peduncle, Har: Harmaline. Scale bars = 240  $\mu\text{m}$  in A, 150  $\mu\text{m}$  in B-D
- Fig. 2.** Loss of calbindin D-28k and CGRP immunoreactivities in the cerebellum after harmaline treatment. (B, D, E, F, G, I) harmaline treated group, (A, H, J) control group. Loss of Purkinje cells (arrows) is most prominent in the vermis but is also present in the paravermis (B, F, R) of the harmaline treated rats. Animal that received 3AP followed by harmaline injection 6days later demonstrate marked neuroprotection against Purkinje cell degeneration (C). High magnification of cerebellar vermis (I), shows degenerated Purkinje cell bodies (arrows) and dendrites (astericks). CB: calbindin D-28K, 3AP: 3-acetyl pyridine, CGRP: calcitonin gene related peptide. Scale bars = 70  $\mu\text{m}$  in A, B; 80  $\mu\text{m}$  in C-F, J, K; 40  $\mu\text{m}$  in G; 30  $\mu\text{m}$  in H, I.
- Fig. 3.** GFAP-like immunoreactivity (GFAP-ILR) in cerebellar cortex and inferior olivary nucleus. After harmaline administration, activated astrocytes present primarily in Purkinje cell layer (arrow) and granule cell layer of the vermis. Higher magnification of upper rectangle (E) and lower rectangle (F) show activated astrocyte in granule cell layer. Compare to harmaline treatment, 3-acetyl pyridine-treated animals show less GFAP-LIR in cerebellum (B,D). Contrast to cerebellar cortex, inferior olivary nucleus expressed more enhanced GFAP-LIR in 3-acetylpyridine-treated group (H) than harmaline-treated group (G). GL: granule cell layer, ML: molecular layer, ION: inferior olivary nucleus, CP: cerebral peduncle. Scale bars = 70  $\mu\text{m}$  in A, B, G, H; 35  $\mu\text{m}$  in C,D; 12  $\mu\text{m}$  in E,F; 70  $\mu\text{m}$  in A,B

K C I







Abstract

## Degenerative Change of Cerebellar Purkinje Cells by Harmaline Treatment

Jin Ho Kim, Jae Yeoul Jun<sup>1</sup>, Ho Jin You<sup>2</sup>, Keun Hong Kee<sup>3</sup>,  
Jae Wook Oh<sup>4</sup>, Young Taek Kim<sup>4</sup>, In Youb Chang<sup>4</sup>

*Department of Neurology, <sup>1</sup>Physiology, <sup>2</sup>Pharmacology <sup>3</sup>Pathology and  
<sup>4</sup>Anatomy, College of Medicine, Chosun University, Kwangju, Korea*

The indole alkaloid harmaline has been to cause tremor and ataxia, and produce cerebellar neurotoxicity in rat. Degeneration of Purkinje cell aligned in narrow parasagittal bands result from excitation of inferior olivary nucleus in harmaline-treated rats. The objective of this study was to investigate the hypothesis that excitation of climbing fiber induced by harmaline mediates Purkinje cell injury or degeneration. For this purpose, the inferior olive of rats was chemically ablated by using 3-acetyl pyridine, a neurotoxic chemical, and cerebellar damage followed by administration of harmaline was analyzed using immunohistochemical markers for neurons, glial cells. The results demonstrated that a subset of Purkinje cell in the vermis and paravermis degenerated after harmaline treatment, but harmaline produced little or no Purkinje cell degeneration after inferior olivary ablation. These results suggested that harmaline-induced activation of inferior olivary neurons may lead to release of glutamate from climbing fiber synaptic terminal distributed over the Purkinje cells, and may lead to cytotoxic degeneration of Purkinje cells.

**Key words** : Harmaline, 3-acetyl pyridine, Climbing fiber, Cerebellum, Purkinje cell, Neural degeneration