

생쥐에서 Pilocarpine에 의한 경련이 해마의 신경세포사멸, 이끼섬유발아 및 신경발생에 미치는 영향

이상현, 국지현, 황신애¹, 김종근¹, 배춘상

전남대학교 의과대학 해부학교실, ¹약리학교실

(2011년 10월 28일 접수, 2011년 11월 28일 수정접수, 2011년 12월 2일 게재승인)

간추림 : 해마 치아이랑은 지속적인 경련 후 이끼섬유발아(mossy fiber sprouting)가 일어나는 부위일 뿐만 아니라 성체 뇌의 신경발생(neurogenesis)이 일어나는 부위로 많은 연구의 대상이 되고 있다. 본 논문은 pilocarpine에 의한 발작을 이용한 해마 및 치아이랑에서 신경세포사멸, 이끼섬유발아 및 신경발생의 변동을 조사하여 이들 3자간의 상관관계를 규명하고자 하였다.

수컷 ICR 생쥐와 C57BL/6 생쥐에 pilocarpine을 처리하여 발작을 유발하였으며 처음 4시간 동안 발작양상을 관찰하여 Racine의 5등급 scale에 중 적어도 3등급 이상인 동물을 실험에 사용하였다. 신경세포사멸은 Fluoro-Jade C (FJC) 염색으로, 이끼섬유발아는 NeoTimm 염색으로, 신경발생은 bromodeoxyuridine (BrdU) 주사 후 이에 대한 면역조직염색으로 평가하였다.

본 실험에서 사용한 모든 동물에서 pilocarpine (300 mg/kg, ip) 투여에 의해 3등급 이상의 발작을 일으켰으며 발작 반응은 ICR 생쥐에서 C57BL/6 생쥐에서 보다 더 강하게 나타났다. 즉 ICR 생쥐의 평균 발작 등급이 4.37로 C57BL/6 생쥐의 3.22보다 유의하게 강하였다. 그러나 3등급 이상의 발작이 시작하는데 걸린 시간은 15~20분 사이로 차이가 없었다. 약물주입 4시간 후 ICR 생쥐에서는 FJC염색 상 해마 문(hilus)에서 사멸세포가 관찰되었으나, C57BL/6 생쥐에서는 관찰되지 않았다. 24시간 이후부터는 두 strain 모두에서 CA1 및 CA3 피라미트세포의 사멸도 관찰되었다. 이 세포사멸은 약물투여 후 3일에 가장 강하였으며 1주일 후에는 거의 관찰할 수 없었다. 신경발생을 나타내는 해마의 BrdU 양성세포수는 대조동물의 경우 C57BL/6 생쥐가 ICR 생쥐보다 유의하게 많았다. BrdU 양성세포수는 약물투여 2일 후에 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 8일 후에는 더 큰 증가를 보인 후 15일 후에는 대조군 수준으로 돌아왔다. 두 strain 모두에서 약물투여 후 해마 신경발생의 증가를 보였으나 대조동물과의 비로 비교하면 ICR 생쥐가 C57BL/6 생쥐에 비해 더 큰 증가를 보였다. 이끼섬유발아는 약물투여 2주 후에 약하게 나타나서 4주 후에는 더 강해졌으며 두 strain 간에 차이는 관찰 할 수 없었다.

이상의 성적은 pilocarpine에 의한 발작의 정도와 신경세포사멸 및 신경발생 간에는 서로 상관관계가 있지만 이들과 이끼섬유발아 간에는 직접적인 상관관계가 없음을 시사한다.

찾아보기 낱말 : 필로카핀, 이끼섬유발아, 신경발생, 해마, 신경세포사멸

서 론

뇌 신경세포는 서로간의 연결이 끊임 없이 없어졌다

*이 논문은 2009년도 전남대학교 임상의학연구소 학술연구비(CR109030-1)에 의하여 연구되었음.

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

교신저자: 배춘상(전남대학교 의과대학 해부학교실)

전자우편: csbae@jnu.ac.kr

가 다시 자라나거나 재구성되는 능력, 즉 연결 가소성(synaptic plasticity)의 특성을 갖고 있다. 사람 환자엽 간질은 연결가소성에 의해 관련 뇌 부위 신경망 구조가 영구히 변화되어 경련 유발이 쉽게 일어나는 특성을 갖는 질환이다(Babb 등 1991, Dubek과 Spitz 1997). 사람 환자엽 간질의 실험적 동물 모형에서 발작 후 나타나는 해마 치아이랑의 이끼섬유발아(mossy fiber sprouting, MFS)는 성숙 개체의 뇌에서 일어나는 대표적 연결가소성의 예로서 많은 연구의 대상이 되었다

(Ben-Ari와 Represa 1990, Babb 등 1991, Dubek과 Spitz 1997). 이 경우 해마에는 MFS와 함께 광범위한 신경세포사멸과 이에 따른 신경아교증(gliosis)이 동반됨이 알려져 있다(Nadler 등 1980, Cavazos와 Sutula 1990, Cavazos와 Sutula 1994). 그러나 이 신경세포사멸과 MFS와의 상관관계에 대해서는 아직 확실하지 않다.

최근에는 신경세포의 연결가소성에, 성숙 개체의 중추 신경세포계에서도 끊임없이 새로운 신경세포가 만들어지는 신경발생(neurogenesis) 현상이 일어남이 알려져 있다. 이러한 신경발생은 전뇌(forebrain)의 뇌실 밀구역(subventricular zone)과 해마 치아이랑의 과립밀층(subgranular layer)의 두 곳에서 가장 현저하게 일어난다. MFS가 치아이랑의 과립세포의 신경돌기가 발아한 것임을 감안하면 MFS와 치아이랑의 신경발생 간에도 깊은 관계가 있음을 짐작할 수 있다. 실제로 경련성 발작 후에 해마의 신경세포사멸과 함께 치아이랑에서 신경발생이 증가하며 이것이 MFS의 생성과 관계가 있음이 보고되어 있다(Parent 등 1997, Madsen 등 2000, Nakagawa 등 2000, Scott 등 2000). 또한 지속적인 경련성 발작 후에 신경발생이 치아이랑 뿐만 아니라 뇌실 밀구역에서도 증가함이 보고되어 있다(Parent 등 1997, Parent 2002). 그러나 흰쥐에서 kainate나 pilocarpine에 의해 유발된 간질 지속상태시 MFS와 신경발생 간에 상관관계가 없다는 보고(Covolán 등 2000), 흰쥐를 이용한 지속적인 열성 경련 모형에서 해마 신경세포의 사멸이나 신경발생의 변동없이 MFS가 증가한다는 보고(Bender 등 2003) 및 흰쥐에서 pilocarpine에 의한 경련성 발작 후에 치아이랑의 신경발생이 증가하지만 이것이 MFS발생에는 영향이 없다는 보고(Radley와 Jacobs 2003) 등은 경련성 발작과 신경세포손상 및 신경발생 간에 연관관계가 없음을 시사한다.

본 연구는 C57BL/6 생쥐와 ICR 생쥐에서 pilocarpine 투여로 발작을 유발한 후 해마에서 신경세포사멸, MFS 및 신경발생의 변동을 조사하여 이들 3자간의 상관관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 동물실험

동물실험은 전남대학교 의과대학연구소 동물위원회로부터 실험계획에 대한 승인을 얻은 후 규정에 따라 진행하였다. 실험동물은 수컷 ICR 생쥐(5 주령, 무게 25~30 g, 대한바이오링크, 충북), C57BL/6 생쥐(5 주령, 무게 15~20 g, 대한바이오링크, 충북)를 사용하였으며, 하루

light/dark cycle이 12시간/12시간으로 유지되며, 물과 음식물을 자유롭게 섭취할 수 있는 항온항습 동물사에 사육하였고, 적어도 실험 일주일 전에 동물장에 도착한 것을 사용하였다.

2. 약물주입 및 용량

Pilocarpine은 300 mg/kg를 복강 내로 주입하였다. Pilocarpine의 말초작용(침 흘림)을 억제하기 위해 atropine methylnitrate 1 mg/kg를 pilocarpine 주입 약 15~30 분전에 주입하였으며 약물의 양은 0.05~0.1 mL/10 g이 되게 하여 투여하였다.

3. 발작정도의 정량화

약물을 주입하고 나서 각각의 동물을 투명한 아크릴로 만들어진 사각 상자(30×20×20 cm)에 넣고 다음과 같은 Racine 등급(Racine 1972)을 약간 변형한 방법에 따라 관찰하였다. 즉, 제1 및 2등급은 얼굴근육 쉴룩거림, 꼬리 세우기, wet-dog shake이며, 제3등급은 일 측 앞발의 근간대경련(myoclonus)을 동반한 발작, 제4등급은 양측 앞발의 근간대경련과 함께 뒷발로 서기(rearing), 그리고 제5등급은 앞, 뒷발 모두가 근간대경련을 일으키며 뒷발서기를 하면서 넘어지는 단계로 나누어 평가하였다. 약물 주입 후 2~4시간 동안 관찰하며 최초로 3등급 이상의 발작을 시작하는 시간도 기록하였다. 발작이 3등급에 이르지 못하는 동물은 실험에서 제외하였다.

4. 실험군의 분류

신경세포사멸을 분석하기 위해서는 pilocarpine 투여 후 4시간, 1일, 3일, 7일군으로 나누었고, 신경발생을 분석하기 위해서는 pilocarpine 투여 24시간 후에 BrdU를 투여해야 하기에 pilocarpine 투여 후 2일, 8일, 15일군으로 나누었다. MFS분석을 위한 NeoTimm 염색은 pilocarpine 투여 후 7일, 14일, 28일군으로 나누었으며, 7일군의 조직절편은 신경세포사멸을 위한 실험군의 것을 사용하였다. Pilocarpine을 투여한 모든 군은 3마리로 구성하였다. 신경세포사멸 및 MFS는 대조군 동물에서는 일어나는 현상이 아니므로 단일 대조군으로 실험하였으나 신경발생은 대조군 동물에서도 일어나는 현상이므로 각각의 시기에 따라 대조군을 설정하였다.

5. 조직의 고정 및 절편의 제작

Pilocarpine 처리 후 각각의 실험군에 따라 생쥐를 chl-

oral hydrate (500 mg/kg, 복강 내)로 마취하고 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4)에 녹인 4% paraformaldehyde 고정액으로 심장 관류 고정을 시행하였다. 이 후 뇌 조직을 적출하여 동일한 고정액에 4°C에서 4시간 후 고정된 다음 30% sucrose (0.1 M PB에 녹임) 용액에 옮겨 조직이 가라앉을 때까지 냉장고에 보관한 후 액체질소를 이용 조직을 freezing media (O.C.T compound, Sakura, Japan)에 넣어 얼리고 -70°C에서 보관하였다. 해마부위 관찰을 위해 뇌 bregma 후방 2 mm부터 150~300 µm 간격으로 25~40 µm 두께의 관상절편을 얻어 fluoro-jade 염색, BrdU 면역조직화학염색, 혹은 변형된 Timm 염색에 사용하였다.

6. Fluoro-Jade C 염색

변성신경세포를 선택적으로 염색하는 형광염색물인 Fluoro-Jade C (FJC; Schumed 등 2005)를 이용하여 사멸신경세포 염색을 하였다. 두께 25 µm 내외인 절편을 젤라틴 피막 슬라이드에 올려, 실온에서 하루 동안 말렸다. 80% ethanol에 1% NaOH를 첨가하여 5분간 반응시킨 후, 70% ethanol로 5분간 2번씩 세척하고, 증류수로 3번 헹구었다. 0.06% potassium permanganate에 10분간 반응시킨 다음, 증류수로 3번 세척하였다. FJC는 증류수에 녹여 0.01% stock solution을 만들어 염색 시에 400배 희석하여 사용하였다. 즉 염색은 0.0004% FJC에 실온에서 20분간 발색 반응을 일으켰다. 그 후 증류수로 3번 세척하여, 조직을 ethanol에 탈수하고, xylene에 청명한 후 Canada balsam으로 봉입하여 형광현미경으로 관찰하였다. FJC 양성세포수는 고배율(×200) 현미경하에서 해마를 hilus, CA1, CA3 부위로 나누어 수동계수하였으며 세포수 20개 미만, 20개 이상 40개 미만, 40개 이상으로 나누어 각각 +, ++, +++로 표시하였다.

7. 신경발생 분석을 위한 BrdU 면역조직화학염색

Pilocarpine 투여 24시간 후 BrdU (50 mg/kg)를, 4시간 간격으로 1일 3회 복강 내 주사 한 후 조사하고자 하는 날에 뇌를 심장관류를 통해 고정하여 냉동절편을 만들었다. 이 냉동절편을 24 well culture plate를 이용하여 2×SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate)로 5분간씩 흔들면서 2회 씻은 후 50% formamide와 2×SSC에 넣어 65°C에서 2시간 배양하였다. 이 후 다시 2 N HCl로 37°C에서 1시간 작용시킨 후 실온에서 0.1 M boric acid로 10분간 처리하였다. 그 후 0.01 M PBS로 10분간

씩 3번 흔들면서 씻어 준 후 정상 말 혈청으로 1시간 동안 실온에서 처리한 후 anti-BrdU 일차항체 (1 : 100 dilution, DAKO company, CA, USA)로 냉장고에서 하룻밤 처리하고 다음 날 0.01 M PBS로 10분간 3번 씻어 주고, biotinylated 2차 항체로 90분간 처리하고 (ABC kit, Vector) kit의 설명대로 작용시킨 후 0.1% diaminobenzidine와 0.05% hydrogen peroxide로 발색하였다.

각 동물의 뇌에서 bregma 후방 2 mm부터 150 µm 간격으로 25 µm 두께 3장의 절편을 얻어 염색하여 Olympus 현미경의 고배율(×200)에서 이미지를 잡아 Image-Pro Plus Version 4.0 (Media Cybernetics Inc., USA) 소프트웨어를 이용하여 치아이랑과 hilus 내에 있는 BrdU 양성수를 정량하였다.

8. NeoTimm 염색

MFS를 정량하기 위해 해마 절편을 변형된 Timm 염색 (Babb 등 1991)의 방법에 따라 시행하여 치아이랑의 과립신경세포말단에 있는 아연이온을 염색하였다. 이때 모든 유리 기구는 모두 산(1% HCl과 10% HNO₃)으로 씻은 것을 사용하였다. 절편을 실온 암실에서 Timm 현상액에 넣어 60~70분간 현상하였다. 흐르는 물로 약 15분간 가볍게 씻고 나서 다시 탈이온수로 씻어주고 cresyl violet으로 약하게 대조염색을 시행한 후 Permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. Timm 현상액의 구성은 증류수에 녹인 50% gum arabic 170 mL, 2.25 M citrate buffer (7.65 g anhydrous citric acid+7.05 g sodium citrate) 30 mL, 0.73% Ag-lactate 50 mL, 0.5 M hydroquinone 45 mL이었다. Timm's 염색에 의한 MFS의 정량은 실험에 참여하지 않은 두 사람에게 Tauck와 Nadler (1985)의 방법에 따라 점수를 매기게 해서 하나의 절편에 대한 두 사람 값의 평균을 그 절편의 값으로 사용하였다. Tauck와 Nadler (1985)의 점수매기기는 다음과 같다. 0: 과립세포층 (granule cell layer)에 염색이 거의 혹은 전혀 안됨, 1: 과립세포층에 군데군데 약한 염색을 보임, 2: 과립세포층에 중등도 정도의 연결되는 염색소견을 보이면서 속분자층 (inner molecular layer)에 연결되지 않는 점상 염색을 보임, 3: 전체 속분자층에 강한 염색 띠를 형성함.

9. 통계처리

신경세포손상, 신경발생 및 MFS의 정량은 ANOVA를 이용하여 각 군간의 차이를 조사한 후 post-hoc test (Tukey's protected t-test)로 각 군간의 유의성을 검정하

였으며, $p < 0.05$ 인 경우 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. Pilocarpine에 의한 발작

수컷 생쥐 (ICR, C57BL/6)에 복강 내로 pilocarpine (300 mg/kg) 처리하면 대부분 20분 내에 Racine scale (R-scale) 3등급 이상의 발작을 유발하였으며 본 실험에서 pilocarpine이 주입된 모든 동물에서 R-scale 3등급 이상의 발작이 일어났다. 본 실험에서 사용한 ICR 생쥐

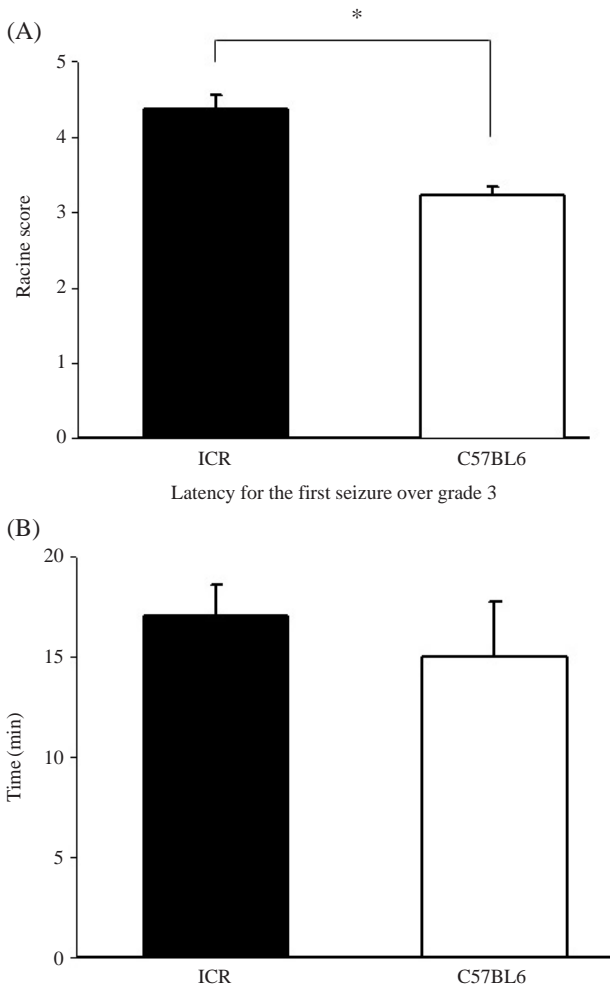


Fig. 1. ICR shows higher seizure severity (Racine scale) than C57BL/6 does (A), while the latency times for the first seizure over Racine scale grade 3 are not different between the 2 strains (B) by intraperitoneal administration of 300 mg/kg pilocarpine. Each column and bar represent the mean \pm SEM from 27 animals. Asterisk indicates the significant difference between 2 columns ($p < 0.05$).

와 C57BL/6는 300 mg/kg의 pilocarpine에 대한 발작 반응에서 차이를 보였다. 즉 ICR 생쥐의 평균 발작 등급이 4.37 ± 0.18 (27예 평균 \pm 표준오차)로 매우 강하였으나 C57BL/6의 경우에는 3.22 ± 0.12 (27예 평균 \pm 표준오차)로 ICR 생쥐에 비해 유의하게 약하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 1A). 그러나 발작을 시작하는데 걸린 시간은 ICR 생쥐와 C57BL/6에서 각각 17 ± 1.6 분과 15 ± 2.7 분(두 군 모두에서 27예 평균 \pm 표준오차)으로 두 군 간에 차이가 없었다 (Fig. 1B).

2. 발작에 의한 신경세포 사멸

Pilocarpine 주입과 이에 의한 발작 후 시간의 경과에 따라 각각 3마리의 동물에서 뇌 조직을 얻어 FJC염색을 시행한 결과 4시간 이후의 조직에서는 해마를 비롯한 거의 대부분의 뇌 부위에서 FJC양성세포를 관찰할 수 있었다. FJC양성세포는 세포체와 신경돌기에 밝은 녹색형광을 띄었다. 본 연구에서는 해마를 연구대상으로 삼았기에 해마부위를 hilus, CA1, CA3 및 치아이랑으로 구분하여 FJC양성세포를 정량화하였다. 일반적으로 hilus의 신경세포가 제일 먼저 죽기 시작하였고, 그 후 CA3 및 CA1 피라밋신경세포가 사멸하였으나 치아이랑에서는 FJC양성세포를 관찰할 수 없었다. 이 세포사멸은 발작 후 3일에 가장 강하였으며 1주일의 시간 경과 후에는 해마부위에서 사멸세포를 거의 관찰할 수 없었다 (Fig. 2, Table 1). 또한 신경세포사멸양상도 ICR 생쥐와 C57BL/6 생쥐 간에 약간의 차이를 나타냈다. 즉 pilocarpine 처리 4시간 후에 ICR 생쥐에서는 해마 hilus의 신경세포에 FJC양성세포가 나타났으나 C57BL/6 생쥐에서는 나타나지 않았다. Pilocarpine 처리 1일 후 CA1에서의 FJC양성세포를 C56BL/6 생쥐 조직에서는 관찰할 수 없었다. Pilocarpine 처리 3일 후에는 가장 많

Table 1. Comparison of Fluoro-jade C-positive neurons in hippocampal area of the ICR and C57BL/6 mouse after pilocarpine injection

	ICR			C57BL/6		
	CA1	CA3	hilus	CA1	CA3	hilus
Control	-	-	-	-	-	-
Pilocarpine-4hr	-	-	+	-	-	-
Pilocarpine-1D	+	+	++	-	+	++
Pilocarpine-3D	++	+++	+	++	+++	+
Pilocarpine-7D	-	-	-	-	-	-

Relative density of Fluoro-jade C-positive (FJC+) cells are evaluated in counting areas (200 \times magnification): -, no; +, <20 FJC+ cells; ++, 20~40 FJC+ cells; +++, >40 FJC+ cells

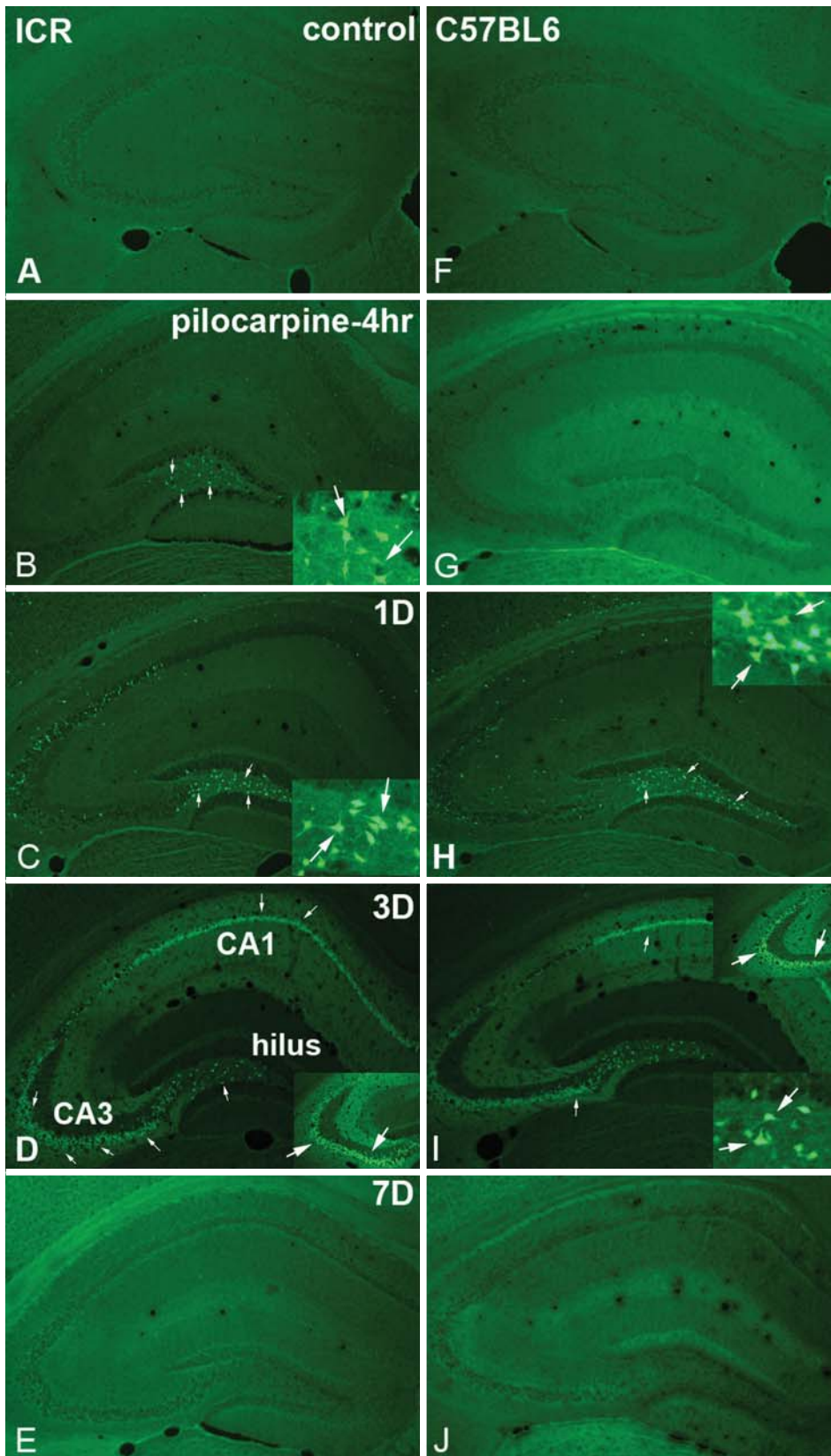


Fig. 2. Distribution of Fluoro-Jade C (FJC)-positive cells at 0, 4 hr, 1 d, 3 d and 7 d after 300 mg/kg pilocarpine injection in the hippocampal formation of ICR (A-E) and C57BL /6 (F-J) mouse. FJC-positive cells are indicated with arrows in high magnification insets.

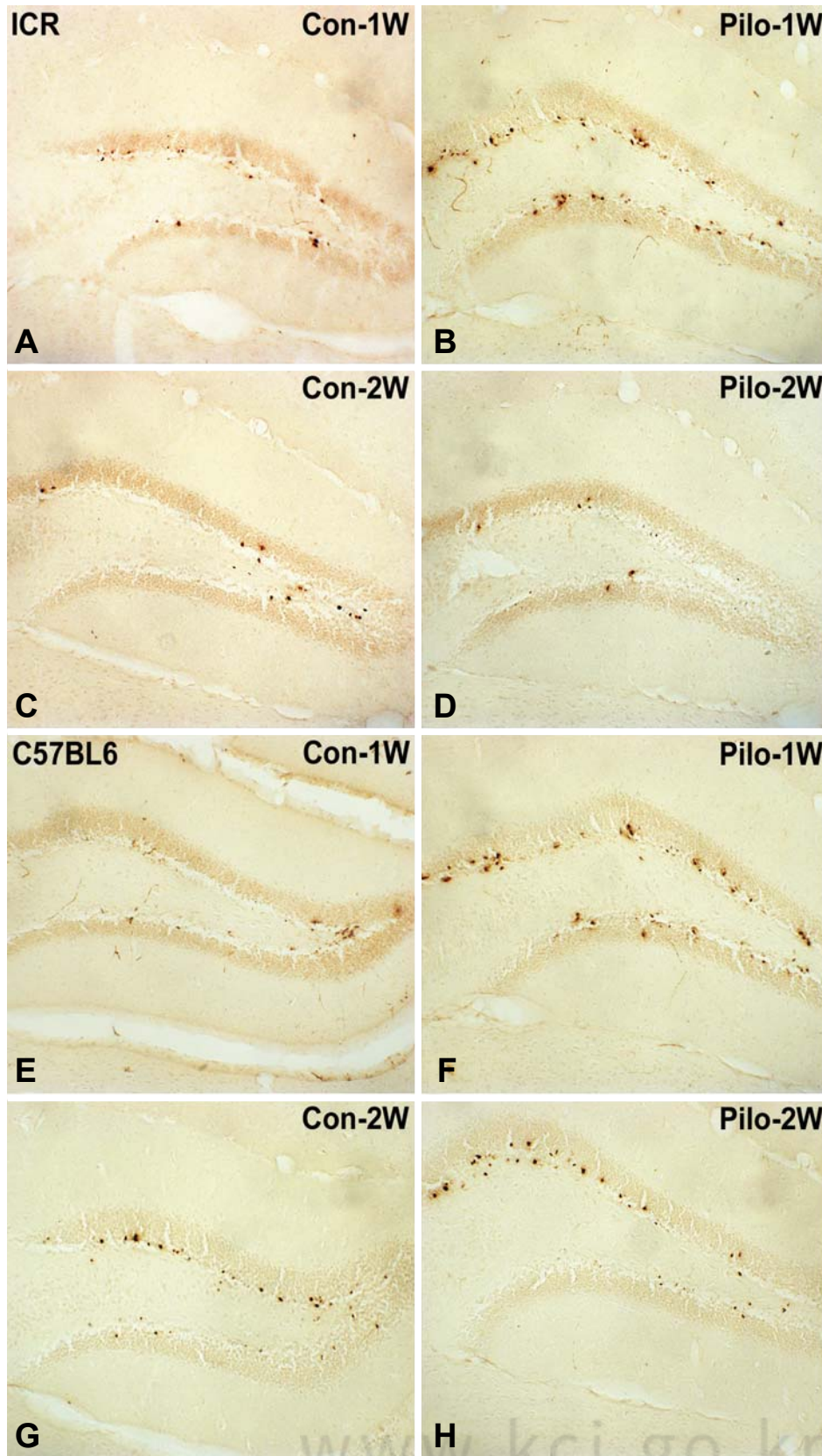


Fig. 3. BrdU immunohistochemistry at 8 d and 15 d after saline (A, C, E, G) or 300 mg/kg pilocarpine (B, D, F, H) injection in the dentate gyrus of ICR (A-D) and C57BL/6 (E-H) mouse.

은 FJC양성세포를 관찰할 수 있었으며 두 계통 생쥐 모두에서 CA1, CA3 및 hilus에 같은 정도의 FJC양성세포를 관찰할 수 있었다.

3. 발작에 의한 신경발생의 변동

신경발생 (neurogenesis)을 나타내는 해마의 BrdU 면역조직화학염색 양성세포수는 ICR 생쥐와 C57BL/6 생쥐 간에 차이를 보였다. 즉 약물을 처리하지 않은 대조동물에서 BrdU 주사 완료 24시간 후에 실시한 염색에서 ICR 생쥐에 비해 C57BL/6 생쥐가 유의하게 많은 BrdU양성세포수를 나타냈다 ($p < 0.05$). 즉 $200\times$ 배율 하에서 BrdU양성세포수가 ICR 생쥐와 C57BL/6 생쥐에서 각각 11 ± 1.7 개 (9예 평균 \pm 표준오차)와 25 ± 2.0 개 (9예)였다. 그러나 두 strain 모두에서 pilocarpine 처리 후 해마 신경발생의 증가를 보였다 (Fig. 3, Table 2). 즉 ICR 생쥐에서 pilocarpine 처리 2일 (BrdU 처리 1일 후), 8일 (BrdU 처리 7일 후) 후에 해마 BrdU양성세포수

가 각각 22 ± 2.0 개, 52 ± 4.3 개로 대조군 (각각 9예에서 11 ± 1.7 개, 18 ± 2.2 개)에 비해 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 그러나 15일 (BrdU 처리 14일 후) 후에는 14 ± 2.0 개로 대조군 (9예, 10 ± 2.2 개) 수준으로 감소하였다. C57BL/6 생쥐에서도 비슷한 양상을 보였다. 즉 pilocarpine 처리 2, 8, 15일 후 42 ± 1.8 개, 45 ± 3.0 개, 34

Table 2. Comparison of number of BrdU (+) cells at 2 d, 8 d and 15 d after saline or 300 mg/kg pilocarpine injection in the dentate gyrus of ICR and C57BL/6 mouse

	ICR	C57BL/6
Control 2D	11 ± 1.7	25 ± 2.0
Pilocarpine 2D	$22 \pm 2.6^{**}$	$42 \pm 1.8^{**}$
Control 8D	18 ± 2.2	21 ± 2.9
Pilocarpine 8D	$52 \pm 4.3^{**}$	$45 \pm 3.0^{**}$
Control 15D	10 ± 0.6	28 ± 4.5
Pilocarpine 15D	14 ± 2.0	34 ± 4.9

Numerals are mean \pm SEM of 9 sections from 3 animals (3 sections per each animal). Asterisks indicate significant difference from corresponding control group (**; $p < 0.01$).

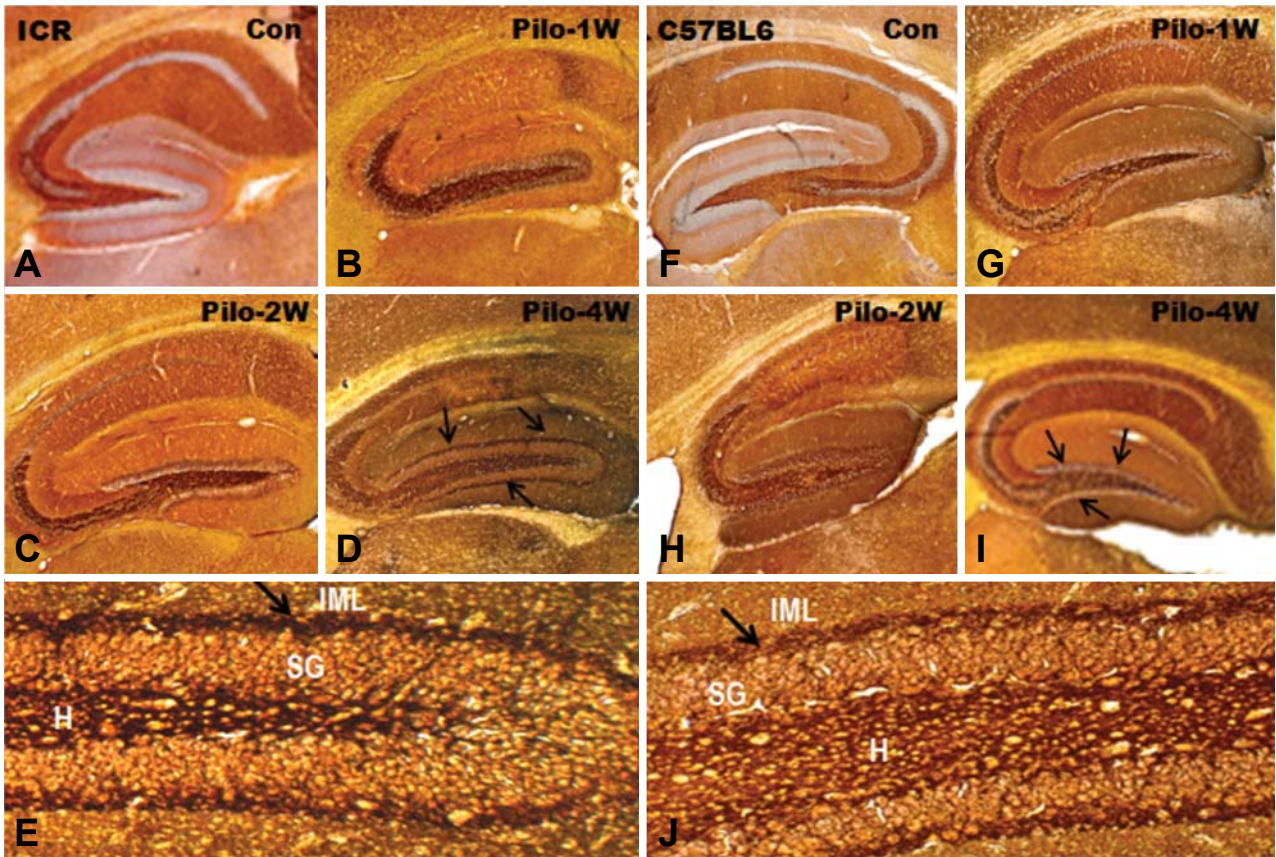


Fig. 4. Neo-Timm staining of control animal (A, F) and at 1 week (B, G), 2 weeks (C, H), 4 weeks (D & E, I & J) after 300 mg/kg pilocarpine injection in the hippocampal formation of ICR (A-E) and C57BL/6 (F-J) mouse. E and J are high magnification pictures of arrowed area in D and I, respectively. Arrows in E and J indicate strong mossy fiber sprouting in inner molecular layer (IML).

Table 3. Grade of mossy fiber sprouting after 300 mg/kg pilocarpine injection in the dentate gyrus of ICR and C57BL/6 mouse.

	ICR	C57BL/6
Control	0	0
Pilocarpine 7D	0	0
Pilocarpine 14D	0.9±0.1	0.8±0.1
Pilocarpine 28D	2.1±0.3	2.0±0.4

Numerals are mean±SEM of 6 sections from 3 animals (2 sections per each animal).

±4.9개로 대조군 25±2.0개, 21±2.9개 28±4.9개로 2일과 8일 군에서는 유의하게 증가하였으나($p < 0.05$), 15일에는 대조군과 차이가 없었다. 이를 2일, 8일, 15일 후 대조동물에서의 신경조직발생 생성과에 대한 비로 비교하면 ICR 생쥐가 각각 2.0, 2.88, 1.4로 C57BL/6 생쥐의 1.68, 2.14 및 1.21에 비해 더 큰 증가를 보였다.

4. 발작에 의한 해마 치아이랑의 이끼섬유발아의 변동

Pilocarpine 투여 후 MFS의 발현은 두 strain 간에 차이를 관찰할 수 없었다. NeoTimm 염색 상 pilocarpine 투여 1주일 후에 이끼섬유의 일반적인 염색 강도는 증가하였으나 MFS는 관찰되지 않았다. MFS는 2주 후부터 약하게 나타나기 시작해서 점차 강해졌다 (Fig. 4, Table 3).

고 찰

Pilocarpine은 강력한 muscarine성 수용체 작용제로서 흰쥐나 생쥐에서 복강 내 주입 시 지속성 간질을 유발하고 만성적인 변연계 발작 (limbic seizure)을 유발하는 특성을 보여 전형적인 사람 환자엽 간질의 실험적 동물 모형으로 잘 알려져 있다 (Cavalherio 등 1996, Curia 등 2008). 본 실험에서 pilocarpine 주입으로 실험에 사용한 모든 동물에서 Racine scale 3등급 이상의 발작을 유발하였음은 지속적 경련이 발생하였음을 가리키고 있다. 그런데 본 실험에서 같은 용량 (300 mg/kg)을 사용하였음에도 ICR 생쥐와 C57BL/6 생쥐 간에 발작의 등급에 차이를 보인 점은 흥미로운 소견으로, kainate가 생쥐에서는 흰쥐에서와는 다르게 strain에 따라 약물에 대한 반응에 차이가 있다는 보고를 감안하면 (Schauwecker와 Steward 1997) ICR 생쥐가 C57BL/6 생쥐에 비해 pilocarpine에 더 예민한 반응을 보이는 것으로 판단된다.

본 실험에서 신경세포사멸의 지표로 FJC를 이용하여

염색을 시행하였다. Fluoro-Jade B (Histo-Chem Inc, Jefferson, AZ, USA)가 변성신경세포를 선택적으로 염색하는 형광염색약 (Schmued와 Hopkins 2000)으로 사용되기 시작 한 후 최근에는 염색능이 더 발달된 FJC (Schmued 등 2005, Wang 등 2008)가 개발되어 사용되고 있다.

Pilocarpine 주입 4시간부터 해마문 (hilus)의 신경세포가 먼저 죽기 시작하였고, 그 후 CA3 및 CA1 피라밋신경세포가 사멸하였으며 이 세포사멸은 약물주입 3일 후에 가장 강하였다. Wang 등 (2008)은 Kunming계 생쥐 pilocarpine 모형에서 FJC염색을 이용하여 해마에서의 신경세포사멸이 4시간부터 시작해서 3~5일에 최고에 달하고 7~14일에 걸쳐서 서서히 줄어든다고 보고하였다. 이 성적은 약물투여 3일 후에 신경세포사멸이 최고에 이른 본 실험 성적과 비슷하다. 그러나 본 실험에서는 1주일 후에는 해마부위에서 사멸세포를 거의 관찰할 수 없었다. 이러한 차이가 단지 strain에 따른 차이인지는 본 실험 성적만으로는 알 수 없다. 한편 본 실험에서 신경세포사멸양상이 ICR 생쥐에 비해 C57BL/6 생쥐가 더 약하였으며 발현 시기도 늦었다. 이는 두 strain 간의 발작 정도에 기인한다고 판단된다. 실제로 Mohajeri 등 (2003)은 pilocarpine에 의한 발작정도의 크기가 신경세포소실과 상관관계가 있다고 하였다.

경련성 발작 후에 해마의 신경세포사멸과 함께 치아이랑에서 신경발생의 증가가 보고된 (Parent 등 1997) 이후 이들의 상관관계에 대한 여러 보고가 있다 (Madsen 등 2000, Nakagawa 등 2000, Scott 등 2000, Parent 2002, Parent 등 2002). 본 연구에서도 두 strain 모두에서 BrdU 양성세포수는 약물투여 2일 후에 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 8일 후에는 더 큰 증가를 보인 후 15일 후에는 대조군 수준으로 돌아왔다. 이를 2일, 8일, 15일 후 대조동물에서의 신경발생과의 비로 비교하면 ICR 생쥐가 각각 2.0, 2.88, 1.4로 C57BL/6 생쥐의 1.68, 2.14 및 1.21에 비해 더 큰 증가를 보였다. 이러한 성적은 결국 ICR 생쥐에서 발작의 정도가 더 강하였고 이에 따른 신경세포사멸이 더 큰 점으로 미루어 신경발생의 생성도 더 큰 것으로 판단된다. 한편 정상상태에서 ICR 생쥐에 비해 C57BL/6 생쥐에서 기본적인 해마 신경발생생성이 높게 나타났다. 이는 생쥐의 strain 간의 차이로 판단된다.

본 연구에서 pilocarpine 투여 후 MFS는 2주 후에 약하게 나타나서 4주 후에는 더 강하게 나타났으며 두 strain 간에 차이를 관찰할 수 없었다. 본 성적은 C57BL/6 생쥐에 비해 ICR 생쥐에서 발작강도, 세포사멸 및 신

경발생이 더 큰 것에 비교하면 본 실험모형에서 MFS 생성이 신경세포사멸이나 신경발생생성과 직접적인 연관관계가 없음을 추측할 수 있다. 이 성적은 흰쥐와 생쥐 실험동물모형에서 발작과 hilus 부위의 신경세포사멸이 MFS에 필요 충분조건이라는 보고 (Cantalops와 Pouttenberg 1996, 2000)나 신경세포사멸이 꼭 MFS를 유발하는데 필요하지 않다는 보고(Qiao와 Noebels 1993, Stringer 등 1997) 및 흰쥐에서 pilocarpine에 의한 발작 후에 치아이랑의 신경발생생성이 증가하지만 이것이 MFS발생에는 영향이 없다는 보고(Radley와 Jacobs 2003) 등의 모순된 결과 중 어느 쪽에 더 부합하는지를 판단하기는 어려우며 향후 추가 실험을 필요로 한다고 판단된다.

이상의 성적을 종합하면 생쥐 strain에 따라 pilocarpine에 의한 발작정도, 신경세포사멸 및 신경발생의 생성에 차이가 나타날 수 있음을 가리키고 있으며, pilocarpine에 의한 발작의 정도와 신경세포사멸 및 신경발생의 생성 간에는 서로 상관관계가 있지만 이들과 MFS 간에는 직접적인 상관관계가 없음을 시사한다.

참 고 문 헌

- Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF : Synaptic reorganization of mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 42: 351-363, 1991.
- Ben-Ari Y, Represa A : Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 13: 312-317, 1990.
- Bender RA, Dubé C, Gonzalez-Vega R, Mina EW, Baram TZ : Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures. *Hippocampus* 13: 399-412, 2003.
- Cantalops I, Routtenberg A : Rapid induction by kainic acid of both axonal growth and F1/GAP-43 protein in the adult rat hippocampal granule cells. *J. Comp. Neurol.* 366: 303-319, 1996.
- Cantalops I, Routtenberg A : Kainic acid induction of mossy fiber sprouting: dependence on mouse strain. *Hippocampus* 10: 260-273, 2000.
- Cavalheiro EA, Santos NF, Priel MR : The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia* 37: 1015-1019, 1996.
- Cavazos JE, Das I, Sutula TP : Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: Evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J. Neurosci.* 14: 3106-3121, 1994.
- Cavazos JE, Sutula TP : Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res.* 527: 1-6, 1990.
- Covolani L, Ribeiro LTC, Longo BM, Mello LEAM: Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. *Hippocampus* 10: 169-180, 2000.
- Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M : The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Methods* 172: 143-157, 2008.
- Dubek FE, Spitz M : Hypothetical mechanisms for the cellular and neurophysiologic basis of secondary epileptogenesis: proposed role of synaptic reorganization. *J. Clin. Neurophysiol.* 14: 90-101, 1997.
- Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingstrom A : Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol. Psychiatry* 47: 1043-1049, 2000.
- Mohajeri MH, Saini K, Li H, Cramer A, Lipp HP, Wolfer DP, Nitsch RM : Intact spatial memory in mice with seizure-induced partial loss of hippocampal pyramidal neurons. *Neurobiol. Dis.* 12: 174-181, 2003.
- Nadler JV, Perry BW, Cotman CW : Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. *Brain Res.* 182: 1-9, 1980.
- Nakagawa E, Aimi Y, Yasuhara O, Tooyama I, Shimada M, McGeer PL, Kimura H : Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 41: 10-18, 2000.
- Parent JM : The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Res.* 50: 179-189, 2002.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH : Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17: 3727-3738, 1997.
- Parent JM, Valentin VV, Lowenstein DH : Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. *J. Neurosci.* 22: 3174-3188, 2002.
- Qiao X, Noebels JL : Developmental analysis of hippocampal mossy fiber outgrowth in a mutant mouse with inherited spike wave seizures. *J. Neurosci.* 13: 4622-4635, 1993.
- Radley JJ, Jacobs BL : Pilocarpine-induced status epilepticus

- increases cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats via a 5-HT1A receptor-dependent mechanism. *Brain Res.* 966: 1-12, 2003.
- Schmued LC, Hopkins KJ : Fluoro-Jade novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration. *Toxicol. Pathol.* 28: 91-99, 2000.
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L : Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res.* 1035: 24-31, 2005.
- Schwauwecker PE, Steward O : Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: Implications for gene targeting approaches. *Proc. Natl. Acad. USA* 94: 4103-4108, 1997.
- Scott BW, Wojtowicz JM, Burnham WM : Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures. *Exp. Neurol.* 165: 231-236, 2000.
- Stringer JL, Agarwal KS, Dure LS : Is cell death necessary for hippocampal mossy fiber sprouting? *Epilepsy Res.* 27: 67-76, 1997.
- Tauck DL, Nadler JV : Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J. Neurosci.* 5: 1016-1022, 1985.
- Wang L, Liu YH, Huang YG, Chen LW : Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. *Brain Res.* 1241: 157-167, 2008.

Effects of Pilocarpine-induced Seizures on the Neuronal Cell Death, Mossy Fiber Sprouting and Neurogenesis in the Hippocampus of Mice

Sang-Hyeon Lee, Ji-Hyun Kook, Shinae Hwang¹, Jong-Keun Kim¹, Choon-Sang Bae

Departments of Anatomy, and ¹Pharmacology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Abstract : Present study was performed to delineate the inter-relationship among neuronal death, mossy fiber sprouting (MFS) and neurogenesis in hippocampal formation of pilocarpine-treated mice.

Status epilepticus was induced by intraperitoneal administration of 300 mg/kg pilocarpine in male ICR and C57BL/6 mouse. The severity of seizure was evaluated using 5 grades of Racine scales for first 4 hr after pilocarpine injection. Fluro-Jade C (FJC) staining, NeoTimm's staining and immunohistochemistry for BrdU were employed to evaluate neuronal cell death, MFS and neurogenesis, respectively.

All animals in the present study induced seizures over grade 3 of Racine scale by pilocarpine injection. ICR mice show higher seizure severity (mean Racine scale; 4.37) than C57BL/6 mice do (mean Racine scale; 3.22), while the latency times for the first seizure over Racine scale grade 3 are from 15 min to 20 min and showed no difference between the 2 strains. In ICR mouse, numerous FJC-positive cells in hilus of hippocampus were detected at 4 h after pilocarpine injection, while they were not detected at that time in C57BL/6 mouse. The number of FJC-positive neuronal cells, which were densely found in the pyramidal layer of CA1, CA3 and hilus polymorphic regions of hippocampus, reached peak at 3 days after injection and then few cells were found at 7 days after injection in both strains.

In control animals, BrdU positive cells in dentate subgranular layer which represent the hippocampal neurogenesis were more numerous in C57BL/6 than in ICR. The number of BrdU positive cells significantly increased at 2 days after pilocarpine injection and reached the peak at 8 days after injection and returned to control level at 15 day after injection in both strains. The percent increase of the BrdU positive cell was more prominent in ICR mouse. MFS was found at 2 weeks after the injection and the intensity of MFS was getting strong at 4 weeks after injection. There was no differences in MFS grading between 2 strains.

These results suggest that there are some inter-relationships among the seizure severity, hippocampal neuronal cell death and hippocampal neurogenesis, but they don't have any significant relationships with the mossy fiber sprouting from dentate granule cells.

Keywords : Pilocarpine, Mossy fiber sprouting, Neurogenesis, Hippocampal neuronal cell death