

Pentylenetetrazol Kindling에 의한 백서 해마부위의 c-myc mRNA 발현의 변화

계명대학교 의과대학 신경외과학교실, 신경과학교실*

이장철 · 손은익 · 김인홍 · 이상도*

= Abstract =

Expression of c-myc mRNA in the Hippocampus of Pentylenetetrazol Kindling Rat

Jang Chull Lee, M.D., Eun Ik Son, M.D.,
In Hong Kim, M.D., Sang Do Lee, M.D.*

Department of Neurosurgery and Neurology,* Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Kindling development is a good animal model of epilepsy and neural plasticity. It is induced by repeated subconvulsive electrical or chemical stimulations. This leads to progressive and permanent amplification of seizure activity resulting in permanent brain changes. Immediate early genes(IEGs) are proposed as the master switch for turning on molecular events in long term neural plasticity. The role of c-myc, an IEG, in the development of kindling is not known. This study was conducted to investigate the role of c-myc in the neural plastic changes underlying kindling.

Among 115 adult male Sprague-Dawley rats, 51 were kindled by repeated administrations of subconvulsive doses (15–25mg/kg) of pentylenetetrazol(PTZ). Twenty-eight rats experienced various degree of convulsions induced by a single injection of convulsive dose(30–60mg/kg) of PTZ. Eighteen rats experienced mild or severe convulsion by a single electroconvulsive shock(ECS). Eighteen rats received normal saline as a control group. Animals were sacrificed in 30 minutes, 1 hour and 48 hours after convulsion. C-myc mRNA levels in the hippocampus were quantified using slot-blot hybridization analysis.

In the experiment of PTZ kindling, c-myc mRNA expression 30 minutes after convulsion was elevated about 3–8 times compared with controls. C-myc mRNA expression 1 hour after convulsion was elevated about 4 times at stage I, II, and V, but was not elevated at stage III and IV. C-myc mRNA expression 48 hours after convulsion was elevated about 2–3 times compared with controls. In the experiment of PTZ-induced seizures, c-myc mRNA expression 30 minutes after convulsion was elevated 5–6 times compared with controls. C-myc mRNA expression 1 hour after convulsion was elevated 4–6 times. C-myc mRNA expression 48 hours after convulsion was elevated approximately 2 times. In the experiment of ECS-induced seizures, c-myc mRNA expression was elevated 4 times at 30 minutes and 1 hour after mild convulsion, but decreased at 30 minutes and 1 hour after severe convulsion compared with control. C-myc mRNA expression 48 hours after convulsion was elevated approximately 2 times.

These results suggest that the enhanced expression of c-myc mRNA is a non-specific consequence in the development of PTZ kindling. In addition, c-myc does not seem to play an important role in turning on a molecular program underlying kindling.

KEY WORDS : Kindling · Epileptogenesis · C-myc · Slot blot hybridization · Hippocampus.

서 론

간질은 발작을 주증상으로 하는 만성 뇌질환으로 인구

1000명 중 4~10명의 높은 유병률을 보이며 이중 약 10~20%는 약물치료에 반응하지 않는 난치성 간질이다^{1,2}. 최근 이를 난치성 간질에 대한 수술치료가 체계적으로 정립되어가

고 있으며 이와 함께 간질 발생기전에 관한 활발한 연구가 진행되고 있다. 간질에 관한 기초연구에 이용되는 동물모형은 급성 및 만성 모형으로 구분되어 있는데 급성 모형은 발작의 발달 및 유지에 관한 전기생리적 기전 등 발작 자체에 관한 연구에 이용되며 만성 모형은 발작을 만성적으로 일으킬 수 있는 구조적인 변화 등에 관한 연구에 사용되어 진다⁹. Kindling현상은 경련발작을 일으키는 역치보다 낮은 강도의 전기적 자극을 뇌의 일정부위에 일정한 시간 간격으로 반복 자극함으로써 점진적으로 간질양 후방전(afterdischarge)이 증가되어 결국에는 전신성 긴장성 간대성 발작이 일어나는 현상으로서 간질의 만성 모형을 만드는데 가장 널리 이용되는 방법이다¹³⁾⁽¹⁸⁾. 전기적 kindling은 편도핵(amygdala), 내비피질(entorhinal cortex) 등 변연 피질을 자극할 때 가장 잘 관찰되며, 전기적 kindling에 의한 동물모형은 여러 면에서 인간의 측두엽 간질과 유사한 점이 많음으로 측두엽 간질의 좋은 동물 모형으로 알려져 있다¹⁹⁾⁽²⁵⁾⁽³⁷⁾.

한편 전기적 kindling현상과 유사하게 콜린성 약물, γ -amino-butyric acid(GABA) 길항제, cocaine, lidocaine 및 흥분성 아미노산 등과 같은 화학경련제를 발작역치 이하의 농도로 국소적이나 전신적으로 반복 주사함으로써 경련 발작의 점진적 발달을 보게 되는데 이를 화학적 kindling 또는 약리적 kindling이라 칭한다¹⁷⁾⁽²²⁾⁽³⁶⁾. 화학적 kindling에 이용되는 약제 중 pentylenetetrazol(PTZ)은 작용기전이 명확하지는 않으나 GABA 수용체 복합체에 길항작용을 함으로써 GABA의 억제작용을 제거하여 신경세포의 활성화를 증가시킨 것으로 알려져 있다³². PTZ는 소발작, 대발작, 간대성 발작 및 간대성 근경련성 발작 등 각종 전신성 발작을 일으키므로 전신성 발작의 연구에 널리 이용되고 있다. 이러한 PTZ를 발작역치 이하로 일정한 시간 간격을 두고 반복 주사하면 kindling현상을 볼 수 있는데 이를 PTZ kindling이라고 하며 전신성 간질의 동물모형으로 이용된다²⁷⁾⁽¹¹⁾⁽²²⁾⁽³²⁾.

전기적 kindling 동물모형을 통하여 밝혀진 해마의 신경세포의 소실 및 치상회(dentate gyrus) 태상섬유(mossy fiber)의 연접(synapse) 재구성이 PTZ kindling모형에서도 관찰되며 측두엽 절제술을 시행한 난치성 측두엽 간질환자의 측두엽에서도 관찰되므로 이러한 구조적 변화가 kindling발달 및 간질발생에 공통적으로 중요한 역할을 하는 것으로 보인다¹¹⁾⁽³⁴⁾. Kindling은 단기간의 반복자극으로써 이와 같은 영구적인 형태적 변화를 초래하지만 이러한 변화의 발생기전은 아직 분명히 밝혀져 있지 않다. 그러나 kindling 자극 후에 c-fos, c-myc, c-jun 등 즉각조기유전자(immediate early gene)와 이들의 단백이 전사인자(transcription factor)로써 역할하여 각종 후기반응유전자(late effector gene)의 전사를 지

속적으로 증가시켜 연접 재구성 등 신경계의 영구적 변화를 초래할 것으로 추정되고 있다⁸⁾⁽³³⁾. 또한 간질발작에 의한 신경 세포의 소실이 계획된 세포사(programmed cell death : apoptosis)에 의한 것일 수 있으며 이러한 세포사에 c-myc 등이 관여할 것으로 알려져 있다²⁷.

c-myc은 원형암유전자(protooncogene)의 일종으로 암유전자로써의 역할뿐만 아니라 세포내외의 여러 자극에 조기에 반응하여 후기 반응유전자의 전사를 조절하는 즉각조기유전자의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. kindling의 발달과 간질의 발생기전에 중요한 역할을 할 것으로 생각되어지는 해마에서의 신경세포의 소실과 태상섬유의 연접 재구성은 kindling이 진행됨에 따라서 점차 심화됨이 관찰된다¹¹⁾⁽⁴⁾⁽³³⁾. c-myc이 kindling의 발달과 함께 점차 진행되는 이와 같은 형태학적 변화를 일으키는데 중요한 역할을 한다면 PTZ kindling의 발달단계에 따른 c-myc의 발현이 일관성 있는 변화를 보일 것으로 가정할 수 있다. 저자는 kindling의 발달에 있어서 c-myc의 역할에 관한 이러한 가정을 검증하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 국립화학연구소에서 분양 받은 Spargue-Dawley종 백서로서 8주 이상 동일한 조건으로 사육한 체중 250~450gm의 수컷 115마리 중 실험군 97마리, 대조군 18마리를 사용하였다. 실험군 중 PTZ kindling실험에 51마리, PTZ 유발발작 실험에 28마리 및 전기경련충격(electroconvulsive shock : ECS) 실험에 18마리를 각각 사용하였다. 실험동물들은 한 마리씩 polyethylene-carbonyl 사육장에 분리 수용하였으며 실험 전후 동일한 조건으로 사육하였다.

2. 실험방법

1) PTZ kindling

실험군 51마리는 PTZ(Sigma Chemical Co., USA)를 0.9% 생리식염수에 녹여 10mg/ml의 농도로 만든 다음 발작역치이하의 용량인 15~25mg/kg을 2~3일 간격으로 복강 내 주사하였다. 주사 후 30분 이상 동안 행동양상을 관찰 기록하였고 이 등²⁷의 방법에 따라 운동발작의 발달 단계를 다음과 같이 분류하였다. 제 1단계 : 귀, 턱, 얼굴, 목 등에 경한 간대성 발작(clonic seizure)을 보이는 경우, 제 2단계 : 머리와 상체의 간대성 발작을 보이거나 또한 뚜렷한 근간대성 연축(myoclonic seizure)을 보이는 경우, 제 3단계 : 머리와 상체의 강한 간대성 발작 또는 강한 근간대성 연축으로 상지

가 바닥에 들리는 경우, 제 4단계 : 발작과 함께 넘어진 후 전신의 간대성 발작을 보이는 경우, 제 5단계 : 발작과 함께 넘어진 후 뒷다리의 긴장성 신전을 포함한 전신의 긴장성 (tonic) 및 간대성 발작을 보이는 경우이다. 실험동물이 PTZ kindling에 의한 운동발작의 일정단계에 도달하여 연속된 PTZ 주사 후 동일단계의 운동발작을 5~10회 보인 후 30분과 1시간, 48시간 후에 각각 19마리, 15마리, 17마리를 단두하여 해마를 적출한 후 즉시 RNA를 분리하였다. 대조군 18마리는 같은 양의 0.9% 생리식염수만을 복강내 주사 후 30분과 1시간, 48시간 후에 각각 6마리씩 단두하여 해마는 적출하여 같은 방법으로 RNA를 분리하였다.

2) PTZ 유발발작

실험군 중 28마리는 PTZ를 0.9% 생리식염수에 녹여 10 mg/ml의 농도로 만든 다음 경련성 용량인 30~60mg/kg을 일회 복강내 주사하였다. 주사 후 30분 이상동안 행동양상을 관찰 기록하였다. PTZ 주사에 의한 각 단계별 발작을 보인 다음 30분과 1시간, 48시간 경과 후에 각각 10마리, 9마리, 9마리를 단두하여 희생시켜 해마부위를 적출하여 즉시 RNA를 분리하였다.

3) 전기경련충격(ECS)

실험군 중 18마리는 양극 및 음극 전극을 백서의 양측 귀에 각각 연결하고 ECT UNIT-7801(UGO GASILE, Italy)기기를 사용하여 자극하였다. 전신성 긴장성 간대성 발작을 유도하기 위하여 85mA 전류를 0.5msec 맥폭, 100Hz 빈도로 1초 동안 자극하였으며 경한 운동발작을 유도하기 위하여 동일한 조건에서 40mA로 자극하였다. ECS에 의한 발작을 보인 다음 30분 및 1시간, 48시간 경과 후에 각각 6마리씩 단두하여 희생시켜 해마부위를 적출하여 즉시 RNA를 분리하였다.

4) RNA 분리

적출한 백서의 해마조직은 Chomczynski 및 Sacchi방법⁶⁾을 다소 수정하여 다음과 같이 RNA를 분리하였다. 해마조직을 Guanidium-thiocyanate 완충액(4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate, 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol, 0.033% antifoam A emulsion(Sigma Chemical Co., USA : pH 7.0)으로 용해시킨 후 homogenizer를 이용하여 분쇄한 다음 water-saturated phenol-chloroform-isoamylalcohol mixture와 2M sodium acetate(pH 5.2)를 넣고 4°C에서 20분간 10,000rpm으로 원심분리한 후 상층액을 채취하였다. 여기에 ice-cold isopropanol을 같은 양 넣고 다시 30분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다.

침전된 RNA를 guanidium-thiocyanate 완충액에 녹인 다음 2.5배의 ice-cold ethanol을 넣어 RNA를 재원심분리 한 후 70% ethanol로 세척하고 SpeedVac(Savant Instrument Inc., USA)을 이용하여 말린 다음 DEPC(diethylpyrocarbonate)로 처리된 물에 녹여 spectrophotometer로 260nm에서 RNA농도를 측정하고 영하 20°C에 보관하면서 2주일 이내 사용하였다.

5) Slot blotting, 유전자 재결합 반응 및 자기방사기 록법(autoradiography)

Slot-blot 분석은 RNA표본을 formaldehyde로 변성시킨 후 8.0μg, 4.0μg, 2.0μg의 3단계로 희석한 후 slot blot vacuum minifold(Minifold II, Schleicher & Schuell, Germany)를 사용하여 nitrocellulose 여과지 위에 점적하여 공기 건조시킨 후 80°C 전공오븐에서 90분 가온하여 고정시키고 비닐봉지에 넣고 밀봉시킨 후 테시케이터에 보관하다가 0.45 M NaCl, 45mM sodium citrate(pH 6.8), 50% formamide, 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), 5% Denhardt's solution(0.1% polyvinylpyrrolidine, 0.1% bovine serum albumin, 0.1% Ficoll), 그리고 5% salmon sperm DNA를 함유한 용액으로 42°C에서 12시간 prehybridization하였다. RNA-probe 재결합반응(hybridization)은 $\gamma^{32}P$ -ATP(Amersham Inc., USA)로 5'-end labelling하여 특이 활성도가 1×10^6 cpm/μg 이상 되는 경우에 위의 용액에 소식자(probe)를 첨가하여 실시하였다. 그런 후 2X SSC(0.3M NaCl 및 0.03M sodium citrate, pH 6.8) 및 0.1% SDS용액으로 실온에서 20분간 세척하고, 또 0.2X SSC 및 0.1% SDS가 들어있는 용액으로 65°C에서 10분간, 그리고 0.1X SSC 및 0.1% SDS가 들어있는 용액으로 65°C에서 10분간 세척한 다음 영하 70°C에서 70~76시간 x-ray film에 노출시킨 후 현상하였다. mRNA 정량은 IBM 컴퓨터에 연결된 음영농도계측기(Hoefer GS300 scanning densitometer, Hoefer Scientific Co., USA)를 사용하여 측정되는 각 음영의 면적을 Gaussian integration방법으로 측정하였다.

6) 소식자

본 실험에 사용한 소식자는 미국 Oncogene Science 회사로부터 구입한 c-myc 및 GAPDH antisense oligoclonal nucleotides에 $\gamma^{32}P$ -ATP를 5'-end labelling하여 사용하였다.

3. 통계적 분석

대조군 및 실험군 각 단계에서 c-myc mRNA의 발현정도 사이에 차이가 있는지를 알아보기 위하여 Kruskal-Wallis

test를 이용하였으며, 여기에서 통계학적으로 유의하게 나왔을 경우에 대조군과 각 실험군의 비교에서는 Bonferroni correction을 하여 검정하였다.

성 적

1. PTZ kindling 단계별 c-myc mRNA의 발현

대조군으로 18마리를 이용하여 30분 후 6마리에서 측정한 c-myc mRNA의 음영농도계측치(densitometric absorbent units)는 0.366이었으며 1시간 후 6마리에서 측정한 계측치는 0.44이었으며 48시간 후 6마리에서 측정한 계측치는 0.628이었다. PTZ kindling의 각 단계별 발작 양상을 보인 백서는 I 단계가 9마리, II 단계가 11마리, III 단계가 12마리, IV 단계가 9마리, V 단계가 10마리였다. PTZ kindling에 의한 운동발작이 I 단계를 나타낸 백서 9마리 중 발작 후 30분에 적출한 3마리의 해마에서 측정한 c-myc mRNA의 계측치는 대조군보다 3.4배 증가하였으며, 1시간 후 3마리에서 측정한 계측치는 4.3배 증가하였으며 48시간 후 3마리에서 측정한 계측치는 2.1배 증가하였다. II 단계 발작을 나타낸 11마리 중 발작 30분 후 5마리에서 측정한 c-myc mRNA의 계측치는 대조군보다 6.1배 증가하였으며, 1시간 후 3마리에서 측정한 계측치는 4.6배 증가하였으며, 48시간 후 3마리에서 측정한 계측치는 2.0배 증가하였다. III 단계 발작을 나타낸 30분 후 4마리에서 측정한 c-myc mRNA의 계측치는 대조군보다 2.9배 증가하였으며, 1시간 후 측정한 계측치는 1.4배 증가하였으며, 48시간 후 측정한 계측치는 2.7배 증가하였다. IV 단계 발작 30분 후 3마리에서 측정한 c-myc mRNA의 계측치는 대조군보다 7.9배 증가하였으며, 1시간 후 2마리에서 측정한 계측치는 대조군과 비슷하였으며, 48시간 후 4마리에서 측정한 계측치는 3.1배 증가하였다. V 단계 발작 30분 후 4마리에서 측정한 c-myc mRNA의 계측치는 대조군보다 4.1배 증가하였으며, 1시간 후 2마리에서 측정한 계측치는 3.8배 증가하였으며 4마리에서 측정한 계측치는 2.4배 증가하였다. 이들 단계별간의 c-myc mRNA의 발현은 Kruskal-Wallis test상 30분에서 현저한 유의성이 있었으며($p < 0.01$) 1시간에서도 유의성이 있었으나($p < 0.05$), 48시간에서는 유의성은 없었다. 대조군과 각 단계별 c-myc mRNA의 발현의 차이에 대한 검정의 결과 30분에서 II 단계에서만 유의성이 있었지만($p < 0.01$) 다른 단계에서도 가능성은 보여주고 있었다. 1시간과 48시간에서는 각 단계별 c-myc mRNA의 발현과 대조군간에 유의성은 없었다(Table 1, Fig. 1).

2. PTZ 1회 주사에 의한 c-myc mRNA의 발현

경련성 용량의 PTZ를 복강내 1회 주사 후 각 단계별 발작을 보인 백서는 제 I - II 단계가 11마리, III - IV 단계가 6마리 및 V 단계가 11마리였다. I - II 단계의 발작양상을 보인 11마리 백서에서 발작 후 30분에 5마리에서 측정한 해마부위의 c-myc mRNA의 계측치는 대조군보다 5.6배 증가하였으며 발작 후 1시간에 3마리에서 측정한 계측치는 대조군보다 4.8배 증가하였으며 48시간 후 3마리에서 측정한 계측치는 1.6배 증가하였다. III - IV 단계의 발작양상을 보인 6마리의 백서에서 발작 후 30분에 1마리에서 측정한 c-myc mRNA 계측치는 대조군보다 6.3배 증가하였으며 발작 후 1시간에 2마리에서 측정한 계측치는 5.9배 증가하였으며 48시간 후 측정한 계측치는 1.9배 증가하였다. V 단계의 발작양상을 보인

Table 1. Optical density of c-myc mRNA expression in the hippocampus according to seizure stage 30 minutes, 1 hour and 48 hours after PTZ kindling

Stage	Optical density		
	30 minutes*	1 hour*	48 hours
Control	0.366±0.273 (n=6)	0.446±0.273 (n=6)	0.628±0.208 (n=6)
PTZ kindling			
I	1.240±0.710 (n=3)	1.901±0.264 (n=3)	1.325±0.446 (n=3)
II	2.231±0.389** (n=5)	2.058±0.286 (n=3)	1.283±0.748 (n=3)
III	1.055±0.513 (n=4)	0.609±0.385 (n=5)	1.720±0.728 (n=3)
IV	2.890±0.948 (n=3)	0.440±0.074 (n=2)	1.972±1.063 (n=4)
V	1.492±0.799 (n=4)	1.686±1.539 (n=2)	1.495±0.775 (n=4)

Values are given as mean±SD

*Significant difference($p < 0.05$) among stages according to Kruskal-Wallis test.

**Significant difference($p < 0.01$) between control and each stage according to Bonferroni correction.

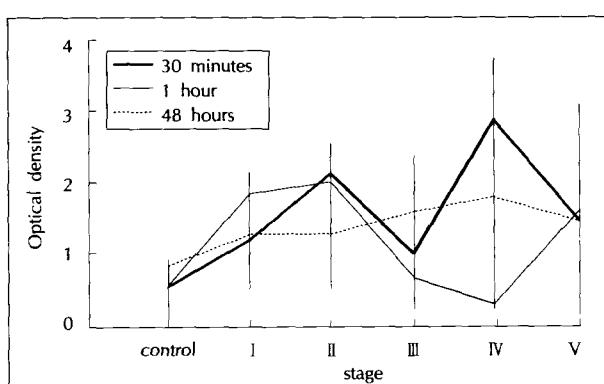


Fig. 1. Change of c-myc mRNA expression in the hippocampus in 30 minutes, 1 hour and 48 hours after PTZ kindling.

11마리의 백서에서 발작 후 30분에 4마리에서 측정한 c-myc mRNA 계측치는 대조군보다 5.1배 증가하였으며, 발작 후 1시간에 4마리에서 측정한 계측치는 3.8배 증가하였으며, 48시간 후 3마리에서 측정한 계측치는 2.7배 증가하였다. 이들 단계간의 관계를 보기 위한 Kruskal-Wallis test상 30분에 측정한 수치는 통계적 의의가 있었으나($p < 0.05$) 1시간과 48시간 후에 측정한 수치는 통계적 의의가 없었다. 대조군과의 차이에 대한 유의성을 검정한 결과 30분에서 대조군과 비교하여 I - II 단계와 V단계는 c-myc mRNA의 유의한 발현증가가 있었다($p < 0.017$)(Table 2, Fig. 2).

3. ECS 유발발작에 의한 c-myc mRNA의 발현

ECS 유발발작이 I 단계의 발작양상을 보인 경우와 V단계의 발작양상을 보인 경우는 각각 9마리였다. I 단계의 발

Table 2. Optical density of c-myc mRNA expression in the hippocampus according to seizure stage 30 minutes, 1 hour and 48 hours after PTZ induced seizure

Stage	Optical density		
	30 minutes*	1 hour	48 hours
Control	0.366±0.273 (n=6)	0.446±0.273 (n=6)	0.628±0.208 (n=6)
PTZ-induced seizure			
I - II	2.052±0.419** (n=5)	2.161±1.015 (n=3)	0.990±0.248 (n=3)
III - IV	2.325 (n=1)	2.624±2.638 (n=2)	1.205±0.236 (n=3)
V	1.875±0.502** (n=4)	1.713±1.052 (n=4)	1.667±1.073 (n=3)

Values are given as mean±SD

*Significant difference($p < 0.05$) among stages according Kruskal-Wallis test.

**Significant difference($p < 0.017$) between control and each stage according to Bonferroni correction.

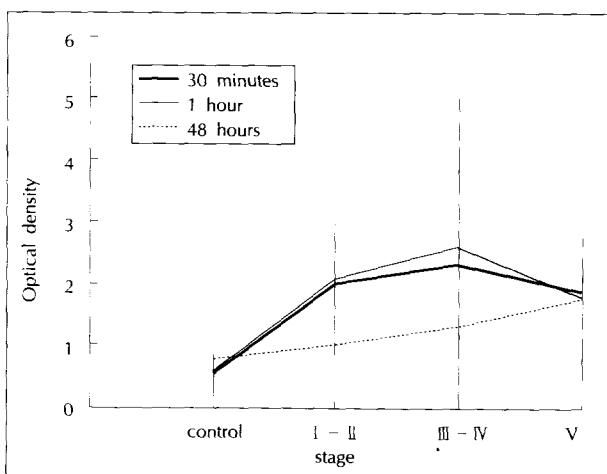


Fig. 2. Change of c-myc mRNA expression in the hippocampus in 30 minutes, 1 hour and 48 hours after PTZ-induced seizure.

작양상을 보인 9마리 중 30분 후의 c-myc mRNA의 계측치는 대조군보다 4.2배 증가되었으며, 1시간 후에 측정한 계측치는 4.5배 증가되었으며, 48시간 후에 측정한 계측치는 1.8배 증가하였다. V단계의 발작양상을 보인 9마리 중 발작 30분 후에 3마리에서 측정한 c-myc mRNA의 계측치와 1시간 후에 3마리에서 측정한 계측치는 오히려 대조군보다 감소된 양상을 보였으나 48시간 후에는 1.6배 증가되었다. 각 단계별 발현의 차이에서 30분에 측정한 경우엔 유의성이 없었으며 발작 단계 V에서는 오히려 대조군보다 감소된 양상을 보여 의미가 없었다(Table 3, Fig. 3).

고 칠

단백합성억제제의 투여로써 kindling의 발달이 저지되므로 kindling 발달에는 새로운 단백의 합성을 위한 유전자 발현이 요구됨을 알 수 있다. 또한 kindling의 상태가 반영구적으로 지속되기 때문에 이러한 유전자 발현의 변화도 장기적으로 지속할 것이다^{3,15)}. 예컨대 kindling된 해마에서 glu-

Table 3. Optical density of c-myc mRNA expression in the hippocampus according to seizure stage 30 minutes, 1 hour and 48 hours after electroconvulsive shock(ECS) induced seizure

Stage	Optical density		
	30 minutes	1 hour*	48 hours
Control	0.366±0.273 (n=6)	0.446±0.273 (n=6)	0.628±0.208 (n=6)
ECS-induced seizure			
I	1.525±1.116 (n=3)	2.005±0.534** (n=3)	1.142±0.651 (n=3)
V	0.250±0.223 (n=3)	0.123±0.728 (n=3)	1.006±0.765 (n=3)

Values are given as mean±SD

*Significant difference($p < 0.05$) among stages according Kruskal-Wallis test.

**Significant difference($p < 0.025$) between control and each stage according to Bonferroni correction.

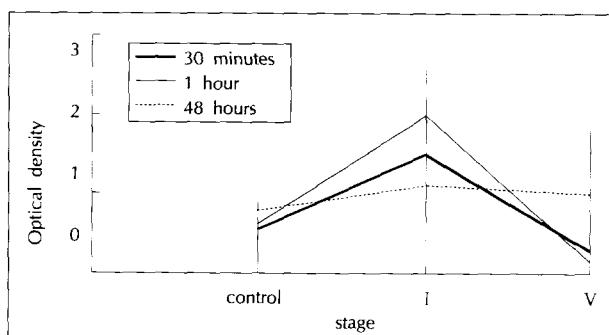


Fig. 3. Change of c-myc mRNA expression in the hippocampus in 30 minutes, 1 hour and 48 hours after ECS-induced seizure.

Pentylenetetrazol Kindling에 의한 백서 해마부위의 c-myc mRNA 발현의 변화

tamate의 방출과 NMDA에 대한 수용체의 감수성이 장기간 항진되어 있으므로^{[2][20]} 이들의 유전자 발현이 장기간 항진되어 있을 것으로 보이며, 이 밖에 이온통로, 신경전달물질, 효소 및 수용체단백 등의 합성에 관여하는 각종 유전자 발현의 장기적인 변화가 kindling된 동물의 조직에서 관찰되어질 것으로 기대된다. Kindling은 단시간의 반복된 자극에 의하여 이와 같이 다양한 유전자들의 장기적인 발현 변화와 함께 이로 인한 연접의 재구성 등 각종 형태학적인 변화를 가져온다. 단시간의 자극이 장기적인 변화를 가져오는 기전은 아직 잘 밝혀져 있지 않다. 그러나 단시간의 자극에 의하여 신속히 발현하여 각종 후기유전자 발현에 관여하는 것으로 알려진 c-fos, c-jun, c-myc 등 즉각조기유전자(immediate early gene)가 kindling 발달에 중요한 역할을 할 것으로 기대할 수 있다. 이들 즉각조기유전자는 다양한 세포의 자극에 의하여 세포가 어떤 유전계획으로부터 다른 유전계획으로 바뀔 수 있도록 하는 master switch로써 알려져 있으며 kindling과 같은 신경계의 가소적 변화(plastic change)에도 중요한 역할을 할 것이라는 견해가 있다^{[8][16]}. 그러나 즉각조기유전자는 다양한 실험적 또는 생리적 자극 후에도 발현증가를 보임으로 kindling의 발달에 중요한 역할을 하기보다는 kindling 자극에 대한 비특이적 반응 유전자의 하나로 보는 견해도 있다^[31]. Shin 등^[27]과 Simonato 등^[30]은 백서의 angular bundle에 kindling 자극을 준 후 해마에서 기록한 후방전과 후방전 후에 측정한 해마에서의 c-fos mRNA 발현간의 의미 있는 관계를 발견하고 c-fos가 kindling 발달에 중요한 역할을 할 것으로 추론하였다. 그러나 Teskey 등^[35]은 전기적 kindling에서의 c-fos 발현이 후방전과 유의한 상관관계가 없음을 관찰하고 전기적 kindling에서 c-fos 발현이 kindling 발달에 중요한 역할을 하지는 않을 것으로 생각하였다. 본 연구에서 PTZ kindling의 각 발달단계에 따른 백서 해마에서의 c-myc mRNA의 발현이 일관성 있는 변화를 보여주지 않았다. 이는 c-myc이 PTZ kindling의 발달에 중요한 역할을 하지 않음을 시사하는 소견이라고 하겠다. 이러한 소견은 Teskey 등^[35]의 kindling의 발달에 따른 c-fos의 발현에 관한 실험결과와 일치한다.

본 연구에서 PTZ kindling 각 단계별 c-myc mRNA의 발현정도는 같은 kindling 단계 내에서도 개체마다 큰 차이를 보였다. 또한 자극 후 시간 경과에 따른 발현정도의 변화에 있어서도 개체마다 차이가 많음을 보여 PTZ kindling 자극이 c-myc의 발현에 일관성 있는 영향을 끼치지 않음을 알 수 있다. 본 실험에서 kindling의 제 1, 2 단계에서는 c-myc의 발현이 점차 증가되다가 제 3 단계에서는 감소, 제 4 단계에서는 다시 증가, 제 5 단계에서는 다시 감소되는 양상을 보

여 kindling 발달단계에 따른 c-myc의 발현양상은 일관성이 없었다. 이는 kindling 자극이 반복됨에 따라 일관성 있는 발달단계를 보이는 kindling의 형성과정과는 다른 양상을 보임으로 c-myc이 kindling 형성과정에 중요한 역할을 하지는 않을 것으로 간주된다. 또한 kindling의 발달단계에 비례하여 일관성 있는 증가를 보이는 해마의 세포 소실과 태상섬유의 연접 재구성의 발생기전에도 c-myc의 역할은 중요하지 않는 것으로 판단된다. 반복자극에 의하여 c-myc의 발현이 계속 증가되다가 다시 감소되는 기전으로는 자극 후에 발현이 증가되는 다른 종류의 즉각조기유전자가 c-myc의 발현을 재조절하거나 c-myc의 작용에 대하여 조절되는 후기 반응 유전자에 의한 생성물이 c-myc의 발현을 되먹임(feedback)으로 억제하거나 혹은 반복자극이 c-myc의 발현을 조절하는 신호전달체계의 제 2 전령 및 이온통로로의 기능상태를 변화시킴으로써 c-myc의 발현을 억제할 것 등으로 추정할 수 있다. 한편 본 실험에서 kindling 자극과 같은 반복적인 자극이 아닌 1회의 PTZ 투여나 ECS 자극 후에 c-myc의 발현정도가 자극의 강도와 비례하여 증가되지 않는 점도 외부자극에 의한 해마에서의 c-myc의 발현이 매우 비특이한 반응임을 시사하는 소견이라 할 수 있겠다. 1회의 역치이상의 PTZ 또는 ECS 자극에 의한 전신성 긴장성간대성 발작후의 c-myc의 발현이 약한 발작 후 보다 낮은 발현을 보인 점은 c-myc의 발현이 발작의 강도와는 직접적인 관계가 없음을 보여준다고 하겠다. 1회의 강한 자극에 의한 c-myc의 발현이 약한 자극보다 낮은 이유는 강한 자극에 의하여 다양한 억제성 경로(inhibitory pathway)가 함께 자극되어 c-myc의 발현이 억제되는 것으로 추측된다.

신경계는 성숙해가면서 약 50%의 신경세포를 소실시킴으로써 구조적 및 기능적으로 올바른 성숙을 하게된다. 이러한 세포소실은 괴사에 의한 세포사와 달리 계획된 세포사에 의한다. 정상적인 성장과정에서 뿐만 아니라 Alzheimer병, Parkinson병 등 신경계의 각종 퇴행성질환이 계획된 세포사에 의하여 발생되며 뇌허혈에 의한 재관류 손상이나 간질도 계획된 세포사에 의할 것이라는 견해가 있다^{[5][23][24][26]}. c-myc을 비롯한 즉각조기유전자가 이러한 계획된 세포사에 관여할 것으로 알려져 있으며^{[5][10][28]} 특히 재관류 손상을 보인 해마의 신경세포에서 수 일 또는 수 주에 걸쳐 장기간동안 즉각조기유전자들의 발현이 항진되어있음이 관찰되었음으로 계획된 세포사와 지속적인 즉각조기유전자의 발현 항진과의 의미 있는 관계가 제시되고 있다^{[4][21][31]}.

본 연구에서는 kindling 발달의 모든 단계에서 발작 후 48시간 경과 후에도 c-myc의 발현이 항진되어 있으므로 kindling 자극에 의한 c-myc의 지속적인 발현항진으로 인한

계획된 세포사가 유도될 가능성도 있으리라 생각되어진다. 그러나 해마의 세포손실이 관찰되지 않는 제1, 2단계의 kindling에서도 c-myc의 지속적인 발현항진이 보이고 세포소실이 점차 심화되는 제3, 4, 5의 발달단계간에 지속적인 발현항진의 정도가 차이를 보이지 않으므로 c-myc의 지속적인 발현항진이 세포소실에 중요한 역할을 하지 않을 것으로 판단된다. 또한 세포소실이 관찰되지 않는 1회의 PTZ 자극과 ECS 자극 후에도 c-myc의 지속적인 발현항진을 보이므로 c-myc의 발현항진과 세포소실과는 무관할 것으로 보인다.

그러나 이와 같은 실험 결과의 해석은 연구방법의 관점에서 한계가 있다. 해마의 전 부위를 적출하고 균질하게 파쇄하여 c-myc mRNA를 분리하였기 때문에 해마내의 각 세부조직 즉 CA₁, CA₂, CA₃, CA₄, 치상회 등에서 부위마다 다르게 나타나거나 의미 있게 나타날 수 있는 유전자발현의 변화는 알기 어렵다. 그러므로 향후 동소보합결합(*in situ hybridization*)을 통한 실험이 뒷받침될 필요가 있다고 생각된다.

본 연구는 kindling 현상을 초래하는 해부학적 기질(anatomical substrate)을 형성하는데 기여하는 c-myc의 역할이 크지 않음을 보여주었다. 그러나 본 연구가 시사해주는 것은 어느 한가지 암유전자 또는 즉각조기유전자가 단독으로 어떤 역할을 수행하지는 않을 것이라는 점이다. 이것은 kindling 형성에 기여하는 c-fos의 역할에 관한 논란에서도 시사되어지는 바이다^{[16][27][35]}. 이와 같이 연구를 통하여 암유전자나 즉각조기유전자는 독자적으로 어떤 고유한 기능을 수행하지 않고 현재까지 밝혀지거나 앞으로 밝혀질 많은 종류의 암유전자 또는 즉각조기유전자들이 상호 긴밀한 관계와 조율하면서 어떤 중요기능을 함께 수행할 것으로 보인다. 그러므로 kindling의 발달에 기여하는 암유전자와 즉각조기유전자에 관한 향후의 연구는 현재까지 밝혀진 모든 암유전자나 즉각조기유전자의 상호작용에 관한 것으로 방향 지어짐이 바람직하다고 생각된다.

요약

전신성 간질의 모형인 pentylenetetrazol(PTZ) kindling 동물모형에서 PTZ kindling에 의한 신경계 가소성과 c-myc mRNA 발현사이의 상관관계를 알아보기 위하여 백서의 해마에서 PTZ kindling의 발달단계에 따른 c-myc mRNA의 발현양상을 관찰하였다. Sprague-Dawley종 백서를 대상으로 51마리는 15~25mg/kg의 PTZ를 2~3일 간격으로 복강내 주사하여 PTZ kindling을 형성하였고, 28마리는 30~60mg/kg의 PTZ를 일회 복강내 주사하여 PTZ 발

작을 유발하였으며, 18마리는 양측 귀에 연결된 전극을 통하여 electroconvulsive shock(ECS) 자극을 가하여 발작을 유발하였다. 발작 양상을 관찰하여 각 단계별 발작을 보인 후 30분, 1시간 및 48시간 경과 후에 단두하여 회생시킨 다음 뇌를 적출하였다. 대조군 18마리는 0.9% 생리식염수를 복강내에 주사하였으며 주사 후 30분, 1시간 및 48시간 경과 후에 실험군과 같은 방법으로 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌의 해마조직에서 RNA를 분리하여 slot-blot hybridization 방법으로 c-myc mRNA를 정량 하였다.

PTZ kindling에서 c-myc mRNA의 발현유도는 발작 후 30분 경과 후에 대조군에 비하여 I, III, V 단계에서 3~4배 증가되었으며 II, IV 단계에서는 6~8배 증가되었으며, 이를 각 군간의 차이는 통계적으로 유의성이 있었지만 kindling 단계의 발달정도에 따라 c-myc mRNA의 발현이 일관성 있게 증가되지는 않았다. 발작 후 1시간에 대조군에 비해 I, II, V 단계에서 4~5배 증가되었지만 통계적 유의성은 없었다. 발작 후 48시간에 대조군에 비해 2~3배 증가하였지만 통계적 유의성은 없었다. PTZ 1회 투여 후 유발발작에 의한 단계별 c-myc mRNA의 발현은 발작 후 30분에 5~6배 증가되었으며 각 군간의 차이는 통계적으로 유의하였으나 발작 강도에 따라서 c-myc mRNA의 발현이 일관성 있게 증가되지 않았다. 발작 후 1시간에는 4~6배 증가되었으나 이는 통계적 유의성은 없었다. 발작 후 48시간에는 약 2배 증가되었으나 역시 통계적 유의성은 없었다. ECS 유발발작에서 c-myc mRNA의 발현은 가벼운 발작 후 30분 및 1시간에 약 4배 증가되었으며 48시간 후에는 약 2배 증가하였으나 전신성긴장성간대성 발작 후 30분 및 1시간에는 모두 대조군보다 감소된 양상을 보였으며 48시간 후에 1.6배 증가된 양상을 보였다.

이러한 결과는 PTZ kindling, PTZ 혹은 ECS 유발발작과 c-myc mRNA의 발현사이에 의미 있는 상관관계가 없다는 것을 시사한다. 그러므로 PTZ kindling 후에 보이는 c-myc mRNA의 발현증가는 신경세포의 비특이적인 활성화일 뿐이며 kindling의 발달 기전에 반드시 필요한 master switch와 같은 중요한 역할을 하지는 않는다고 할 수 있다.

- 논문접수일 : 1996년 6월 27일
- 심사완료일 : 1996년 12월 20일

References

- 1) 이상도 · 이태희 · 박영춘 : 백서에서 pentylenetetrazol kindling에 의한 치상회 태상섬유의 시냅스 재구성, 대한신경과학회지 13 : 239-248, 1995

Pentylenetetrazol Kindling에 의한 백서 해마부위의 c-myc mRNA 발현의 변화

- 2) 이승환 · 이상도 · 박영춘 : 백서에서 Pentylenetetrazol 주사 후 kindling의 발달 단계 및 지속성. 대한신경과학회지 12 : 375-381, 1994
- 3) Cain DP, Corcoran ME, Staines WA : Effects of protein synthesis inhibition on kindling in the mouse. *Exp Neurol* 68 : 409-419, 1980
- 4) 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
- 5) Charriaut-Marlangue C, Aggoun-Zouaoui D, Represa A, et al : Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp 120 toxicity. *TINS* 19 : 109-114, 1996
- 6) Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 : 156-159, 1987
- 7) Diehl RG, Smialowski A, Gotwo T : Development and persistence of kindled seizure after repeated injections of pentylenetetrazol in rats and guinea pigs. *Epilepsia* 25 : 506-510, 1984
- 8) Dragunow M, Currie RW, Faull RLM, et al : Immediate-early genes, kindling and long-term potentiation. *Neurosci Biobehav Rev* 13 : 301-313, 1989
- 9) Engel Jr J : *Seizures and epilepsy*, F.A. Davis Co., Philadelphia, 1989, pp71-111
- 10) Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, et al : Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69 : 119-128, 1992
- 11) Fabisak JP, Schward WS : Aspects of pentylenetetrazol kindling model of epileptogenesis in the rat. *Exp Neurol* 78 : 1-14, 1987
- 12) Geula C, Jarvie PA, Thomas C, et al : Long-term enhancement of K⁺-evoked release of L-glutamate in entorhinal kindled rats. *Brain Res* 442 : 368-372, 1988
- 13) Goddard G, McIntyre DC, Leech CK : A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 25 : 295-330, 1969
- 14) Ham J, Babij C, Whitfield J, et al : A c-jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 14 : 927-939, 1995
- 15) Jonec V, Wasterlain CG : Effect of inhibitors of protein synthesis on the development of kindled seizures in rats. *Exp Neurol* 66 : 324-332, 1979
- 16) Marx JL : The fos genes as "master switch". *Science* 237 : 854-856, 1987
- 17) Mason CR, Cooper RM : A permanent change in convulsive threshold in normal and brain damaged rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. *Epilepsia* 13 : 663-674, 1972
- 18) McNamara JO, Byrne MC, Dasheiff RM, et al : The kindling model of epilepsy : A review. *Prog Neurobiol* 15 : 139-159, 1980
- 19) McNamara JO, Bonhaus DW, Shin C, et al : The kindling model of epilepsy : A critical review. *Crit Rev Clin Neurobiol* 1 : 341-391, 1985
- 20) Morisset RA, Chow C, Nadler JV, et al : Biochemical evidence for enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate in the hippocampal formation of kindled rats. *Brain Res* 496 : 25-28, 1989
- 21) Pennypacker KR, Thai L, Hong JS, et al : Prolonged expression of AP-1 transcription factors in the rat hippocampus after systemic kainate treatment. *J Neurosci* 14 : 3998-4006, 1994
- 22) Pinel JPJ, van Oot PH : Generality of the kindling phenomenon : some clinical implication. *Can J Neurol Sci* 2 : 467-475, 1976
- 23) Pollard H, Cantagrel S, Charriaut-Marlangue C, et al : Apoptosis associated DNA fragmentation in epileptic brain damage. *Neuroreport* 5 : 1053-1055, 1994
- 24) Pollard H, Charriaut-Marlangue C, Cantagrel S, et al : Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience* 63 : 7-18, 1994
- 25) Racine RJ, Kindling : The first decade. *Neurosurgery* 3 : 234-252, 1978
- 26) Schreiber SS, Baudry M : Selective neuronal vulnerability in the hippocampus-a role for gene expression ? *TINS* 18 : 446-451, 1995
- 27) Shin C, McNamara JO, Morgan JL, et al : Induction of c-fos mRNA expression by afterdischarge in the hippocampus of naive and kindled rats. *J Neurochem* 55 : 1050-1055, 1990
- 28) Shi Y, Glynn JM, Guilbert LJ, et al : Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* 257 : 12-21, 1992
- 29) Shorvon SD : Epidemiology, classification, natural history, and genetics of epilepsy. *Lancet* 336 : 93-96, 1990
- 30) Simonato M, Hosford DA, Labiner DM, et al : Differential expression of immediate early genes in the hippocampus in the kindling model of epilepsy. *Mol Brain Res* 11 : 115-124, 1991
- 31) Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, et al : Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* 363 : 166-169, 1993
- 32) Squires RF, Laederup E, Cranbey JN, et al : Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain. *Life Sci* 35 : 1439-1445, 1984
- 33) Sutula T, He XX, Cavazos J, et al : Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 239 : 1147-1150, 1988
- 34) Sutula T : Experimental models of temporal lobe epilepsy : new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia* 31(suppl) : S45-S54, 1990
- 35) Teskey GC, Atkinson BG, Cain DP : Expression of the proto-oncogene c-fos following electrical kindling in the rat. *Mol Brain Res* 11 : 1-10, 1991
- 36) Vosu H, Wise RA : Cholinergic seizure kindling in the rat :

- Comparison of caudate, amygdala and hippocampus. Behav Biol 13 : 491-495, 1975*
- 37) Wada JA : *Kindling as a model of epilepsy. In Cobb WA,*
- Van Duijn H : Contemporary clinical neurophysiology(EEG suppl. No. 34), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1978, pp309-316*