

항경련제에 의한 *C-FOS*, *KROX-24* 및 *BDNF*의 발현

체명대학교 의과대학 신경과학교실·약리학교실*

서순천·박영춘·김수경*

The Expression of the Immediate Early Genes, *c-fos*,
krox-24 and the Late Response Gene, *BDNF*
Induced by Antiepileptic Drugs

Soon-chun Suh, M.D., Young-choon Park, M.D.,
Soo-kyung Kim, M.D.*

Department of Neurology and Pharmacology*, College of Medicine, Keimyung University

—Abstract—

The expression of the *c-fos* and *krox-24* (immediate early genes: IEGs) and the *BDNF* (late response gene) were investigated by convulsants such as kainate (KA, 200 μ M), N-methyl-D-aspartate (NMDA, 10 mM), glutamate (GLU, 2 mM), and picrotoxin (PTX, 20 μ M) in the rat C6 glioma cells. In addition, the changes of their expression patterns were investigated by the anticonvulsants such as a NMDA antagonist MK-801, phenytoin, phenobarbital, diazepam, and newer antiepileptic drugs like felbamate and gabapentin. NMDA-induced *c-fos* and *krox-24* expressions were decreased specially by the anticonvulsants. KA, NMDA, GLU, and PTX-induced *BDNF* expression were increased by the anticonvulsants.

These results imply the molecular basis of the anticonvulsant action mechanism lies in differential and coordinated transcriptional regulation of IEGs.

서 론

*Fos, jun, krox family*에 속하는 즉각조기유전자들 (immediate early genes : IEGs)은 조기 단백질 전사인자로 작용하며 여러 가지 신경원 유전자의 표현

을 조절한다 (Draunow 등, 1989; Sheng과 Greenberg, 1990). IEGs는 경련 (Dragunow과 Robertson 1987; Saffen 등, 1988; Sonnenberg 등, 1989; Woodburn 등, 1993), 신경원 방출 (Douglas 등, 1988), long-term potentiation (Jeffery 등, 1990), 뇌손상 (Dragunow 등, 1990b) 및 뇌여혈상

데(Gunn 등, 1990) 등에 의해서 발현되는 것으로 알려져 있으며 *fos*와 *jun*은 leucine-zipper DNA binding motif를 갖고 있으며 (Morgan 등, 1987; Ryder 등, 1988; Hirai 등, 1989) 동종 또는 이종이중체(heterodimer)를 이루어 그 기능을 나타낸다 (Chiu 등, 1989). *Krox-24* (Lemaire 등, 1988)는 NGFI-A (Changlian 등, 1989), *zif/268* (Christy 등, 1988) 또는 *Erg-1* (Sukhatme 등, 1988)이라고 하며, long-term potentiation과 경련 등의 경우에 유도되는 zinc-finger DNA binding motif를 가진 전사 인자이다 (Lemaire 등, 1988; Schlingensiepen 등, 1991). 그러나 이를 분자의 정확한 세포내 역할에 대해서는 명확하게 규명되어 있지 않으나, 아마도 어떤 특수 DNA에 결합하여 특이한 단백질을 생산하므로써 신경계의 기능을 나타내게 되는 것으로 추측하고 있다. 경련에 의해 유도된 IEGs들의 작용으로 신경세포에서는 축삭반야 (Sutula 등, 1989), enkephalins, dynorphin, neuropeptide Y, cholecystokinin 등의 neuropeptides를 (Gall, 1988; Wanscher 등, 1990; Bellman 등, 1991)과 신경성장인자들 (Gall과 Isackson, 1989)의 표현이 유도된다.

현재 간질은 뇌신경의 특정 부위에서 동시에 발생한 일종의 신경원의 과활성현상이라는 (Dichter와 Ayala, 1987) 일반적인 견해가 있지만 간질 발작의 발생에 대한 정확한 세포기전은 아직 불확실하다. 그러나 γ -aminobutyric acid (GABA) 수용체의 억제기전과 glutamate 수용체에 의한 신경 흥분이 가장 밀접하게 간질발생에 관련된 인자로 여기고 있음을 주지의 사실이다 (McNamara, 1992). GABA 효应체는 경련을 억제하며, GABA 친형체는 경련을 유발시킨다는 결과는 여러 가지 간질 모형에서 실험적으로 검증되었으며 (Lothman 등, 1990), 해부학적으로도 간질병소에서 GABA성 신경관단이 손실되었음을 보고된 바 있다 (Ribak 등, 1986). 한번 간질 활동이 있은 후에 GABA의 기능이 오히려 증가 (Feldblum 등, 1990) 또는 별 변화가 없었다 (Lerner-Natoli 등, 1985)는 상반된 보고도 있다. Glutamate 수용체는 G protein을 결합하는 metabotropic receptor와 ligand-gated ion channel을 활성화 시키는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 및 AMPA/kainate 유형의 특이한 수용체로 대별된다. 이 중 NMDA 수용체는 long term potentiation 및 여러

형태의 시냅스가소성 유지에 중요한 역할을 하는 수용체이다 (Collingridge와 Bliss 1987; Komuro와 Rackic, 1993). 그 외에 NMDA 수용체는 치매, 허혈성 신경원 괴사, 간질 및 만성 폐행성 신경질환 등의 병태생리에 관여하는 수용체로도 알려져 있다 (Rothman과 Olney, 1987; Choi, 1988 a & b; Meldrum과 Garthwaite, 1990; Lipton, 1992).

현재 사용되고 있는 항경련제 종류에는 GABA성 전달을 증가시키는 작용이 있는 phenobarbital, benzodiazepine제 약물들과 valproic acid 등이 있으며, 최근 약제로는 GABA aminotransferase를 억제시키는 vigabatrin, GABA의 analog인 gabapentin, GABA 채흡수 억제제인 tiagabine을 포함하여 수십 종류가 개발되었으나 현재 시판되는 것은 그 중 몇몇 종류 밖에 안된다. 그 외에 lamotrigine은 voltage-dependent 나트륨이온 통로를 차단하므로써 흥분성 신경 전달 물질, 특히 glutamate 유리를 억제하는 작용이 있다. 신약인 felbamate는 GABA와 NMDA 수용체 두 부위에서 신경전달 물질의 기능을 조절한다는 보고가 있다 (Rho 등, 1994).

이 연구에서는 경련이 IEGs를 발현시킨다는 많은 보고에 근거하여 항경련제에 의한 세포내 분자생물 학적 변화, 즉 세포자극의 초기에 일어나는 IEGs의 발현의 변화와 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 유전자 발현을 약리작용 기전과 연관지어 조사해 보고자 하였다. 그리하여 수령신경세포주 rat C6 glioma 세포주를 이용하여 IEGs인 *c-fos*, *krox-24* 및 후기에 반응하는 유전자 중 하나인 BDNF를 태여 그들의 유전자 표현계를 reverse transcriptase-coupled polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법으로 조사하였다.

실험재료 및 방법

1. 세포배양

한국 세포주 은행에서 분주방은 rat C6 glioma cell을 실험에 이용하였다. 세포배양은 penicillin 100 unit/ml 및 streptomycin 100 μ g/ml, 10% fetal bovine serum (Gibco BRL)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 이용하여 5% CO₂와 95% O₂ 및 37 °C 환경을 유지하면서 3일 또는 4일 동안 배양하였다. 세포생존

율은 trypan blue dye exclusion 방법으로 산정하여 생존 세포 수가 5×10^3 이 되도록 배양하였다.

2. 약물 및 재료

경련을 유도하기 위하여 사용된 kainic acid (KA), NMDA, glutamate (GLU) 및 picrotoxin (PTX)은 Sigma chemical company 제품이었고, RT-PCR kit는 Perkin Elmer company 제품이었다. 항경련제로는 MK-801 (RBI, U.S.A.), phenytoin (PHT: Samjin Co., Korea), phenobarbital (PHB: Roche Korea Co.), diazepam (DZ: Daewon Co., Korea) 등이 사용되었으며, gabapentine은 미국의 Parke-Davis 회사로부터 기증받았으며, felbamate는 미국의 Carter-Wallace 회사로부터 기증받았다.

3. 실험군

단층으로 배양된 세포에 경련을 유도하기 위하여 KA는 200 μM 농도에서 6시간, NMDA는 10 mM 농도에서 24시간, glutamate는 2 mM농도에서 1 시간, PTX는 20 μM 농도에서 6시간 처리하였다. 각 실험군에 대하여 여러 가지 항경련제의 효과를 관찰하였으며 사용된 항경련제는 저농도와 고농도의 두 가지 농도로 실험하였다. MK-801은 300과 900 μM , PHT는 0.4와 1.2 mM, PHB는 2와 6 mM, DZ는 100과 300 μM , GP는 50과 150 μM , FM은 100과 300 μM 의 농도로 사용되었으며, 이들은 각각의 경련 유도 약물과 병합 투여하였다. 일정 시간 동안 약물이 처리된 후 D-PBS로 3회 씻어내고 mRNA를 추출하였다.

4. Total RNA의 분리

Chomczynski와 Sacchi (1987)의 방법을 다소 수정한 방법으로 mRNA를 분리하였다. 배양 세포는 D-PBS로 씻고 100 mm petri dish당 RNAsolTMB (Bioteex Laboratories 사) 1 ml을 넣었다. 세포용해액 1 ml 당 0.1 ml의 chloroform을 넣고 15초간 잘 혼합하고 4 °C에 5분간 두었다가 4 °C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심한 후 상층액을 취하여 차가운 isopropanol을 넣고 -70 °C에 4시간 이상 방치하였다. 그 후 4 °C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심 침전하여 얻은 RNA pellet을 75%의 차가운 알코올로

세척하고 SpeedVac (Savant Instrument사, U.S.A.)를 이용하여 건조시켰다. 그 다음 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수를 넣어 녹인 후 분광광도계로 농도 및 순도를 측정하고 -20 °C에 보관하여 사용하였다. 추출된 total RNA를 agarose /formaldehyde gel에 염동하고 ethidium bromide로 염색하여 그 integrity를 확인하였다(Fig. 1).

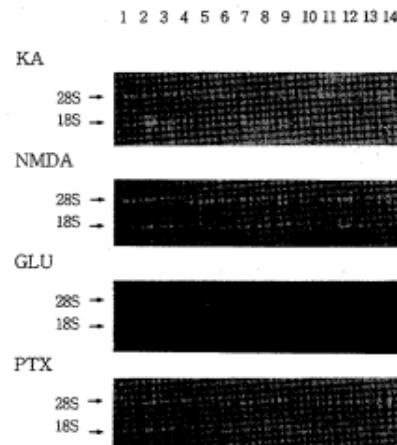


Fig. 1. Total RNA(10 μg) preparations of rat C6 glioma cell electrophoresed on agarose/formaldehyde gel. KA:kainic acid, NMDA:*N*-methyl-D-aspartate, GLU:glutamate, PTX:picrotoxin.

5. cDNA 합성

분리된 total RNA 2 μg 을 DEPC 처리한 초순수 물로 전체가 3 μg 되게 한 다음 oligo dT (16mer)를 포함한 반응액을 총량 20 μl 로 하여 이용하여 역전사 반응시켰다. 반응 혼합액의 조성은 다음과 같다. 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1 mM dATP, 1 mM dITTP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1U/ μl RNase inhibitor (Perkin-Elmer Co.) 및 2.5 U/ μl MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer Co.), 2.5 μM oligo d(T)₁₆ 등이었으며 이 혼합액과 RNA 2 μg 을 37 °C에서 60분 동안 역전사 반응시켰다.

6. 측합효소연쇄반응

측합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction : PCR)은 5 μ l의 10×reaction buffer(100 mM Tris-HCl pH 8.3, 및 500 mM KCl)와 2 mM MgCl₂, 1 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP와 20 pmol sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 2 μ l의 반응시킨 cDNA reaction액과 2.5 unit의 taq polymerase (Perkin-Elmer Co.)를 넣은 후 중류수로 총량을 50 μ l로 맞추고 동량의 mineral oil을 넣고 DNA thermal cycler (Perkin Elmer 2400)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 본 실험에 사용한 *c-fos*의 염기서열은 sense 5'-CACCGAGGCCAGAC-CTGCAGTGGCT-3', antisense 5'-GAG-GCAGGGTGAAAGGCCTC-CTCCTCA-3' (크기 523 bp), *krox-24*의 염기서열은 sense 5'-CTG-GAGGAGATGATGCTG-3', antisense 5'-GAAGCGGCCAGTATAGGT-3' (크기 309 bp)이고 BDNF의 염기서열은 sense 5'-ATGACCATC-CTTTCT-3', antisense 5'-TCCTCCCTTT-TAATGG-3' (크기 750 bp) 이었다.

7. 전기영동 및 분석

증폭된 PCR 산물 10 μ l를 1% 또는 1.5% agarose gel에 전기영동하여 Gel documentation

system (Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 밀도를 측정 비교하였다.

결 과

1. 경련제에 의한 *c-fos*, *krox-24*, BDNF의 표현

KA, NMDA 및 glutamate 등의 glutamate성 경련제에 의한 *c-fos*의 표현계는 NMDA 농도 5 mM과 10 mM 그리고 glutamate 농도 2 mM에서 현저하였다. *krox-24*의 표현은 NMDA의 농도 5 mM과 10 mM, glutamate의 농도 1 mM, 2 mM 및 3 mM에서 현저하였으며, BDNF는 KA의 농도 100 μ M, 200 μ M 및 300 μ M NMDA의 농도 5 mM 및 10 mM과 glutamate의 농도 1 mM, 2 mM 및 3 mM에서 현저하였다. GABA 침 향제인 PTX에 의한 *c-fos*의 표현은 20 μ M 농도에서 현저하였으며, *krox-24*와 BDNF mRNA 표현은 10 μ M, 20 μ M 및 30 μ M 농도에서 현저하였다. 그리하여 본 실험에서는 IEGs와 BDNF 표현계 검사를 위해서 경련 유도 약물의 농도를 KA는 200 μ M, NMDA는 10 mM, glutamate는 2 mM, PTX는 20 μ M을 사용하였다(Fig. 2).

2. 항경련제에 의한 *c-fos*의 표현

KA, NMDA 및 glutamate 단독 투여에 의한

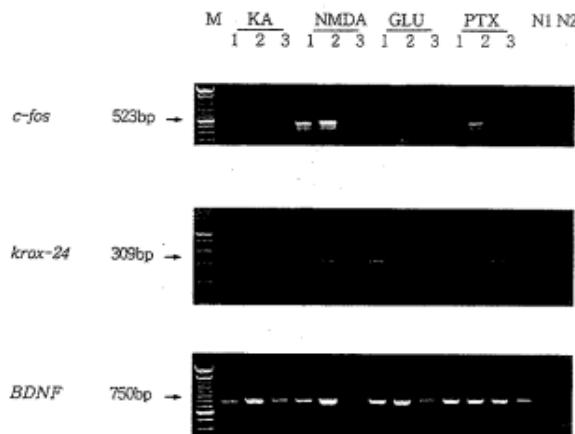


Fig. 2. Expressions of *c-fos*, *krox-24*, and BDNF gene by dose-dependent excitotoxin condition. KA: kainic acid (1: 100 μ M, 2: 200 μ M, 3: 300 μ M), NMDA: *N*-methyl-D-aspartate (1: 5 mM, 2: 20 mM, 3: 15 mM), GLU: glutamate (1: 1 mM, 2: 2 mM, 3: 3 mM), PTX: picrotoxin (1: 10 μ M, 2: 20 μ M, 3: 30 μ M), M: size marker, N1: no reverse transcriptase, N2: no RNA.

표현은 NMDA 길항제인 MK-801 병합 투여에 의해서 억제의 경향을 보였으나, GP 또는 FM 병합 투여에 의해서는 증가되었다. GABA 효현작용과 나트륨 이온 통로에 작용하는 PHT, PHB 및 DZ 병합 투여에 의한 억제는 NMDA로 인한 경련 유도시 현저하였다. GABA 길항작용이 있는 PTX에 의한 *c-fos*의 표현은 GP 또는 FM 병합 투여에 의해서 다소 증가되는 경향을 보였으며, PHT, PHB 및 DZ 병합 투여에 의해서는 모두 억제를 나타내었다 (Fig. 3과 4).

3. 항경련제에 의한 *krox-24*의 표현

NMDA에 의한 *krox-24*의 표현은 항경련제 MK-801, GP, FM, PHT, PHB 및 DZ 병합 투여에 의해서 억제되었으나, KA 또는 glutamate에 의한 *krox-24*의 표현은 사용된 항경련제에 의하여 별 변화를 보이지 않았다. PTX에 의한 *krox-24*의 표현은 GP 병합 투여에 의해서만 현저한 증가를 나타내었다 (Fig. 5과 6).

4. 항경련제에 의한 BDNF의 표현

KA, NMDA 및 glutamate 등의 glutamate성 경련제에 의한 BDNF의 표현은 항경련제 MK-801, GP, FM, PHT, PHB 및 DZ 병합 투여에 의해서 증가하였다. PTX 치료군에 GP 또는 FM을 병합 투여해 보았을 때 BDNF 표현이 증가하는 경향을 보였으며, PHB 또는 DZ 병합 투여군에서는 대조군 및 PTX 단독 투여군에 비하여 BDNF의 표현이 증가하였다 (Fig. 7과 8).

고 찰

신경원의 과활동에 의해서 여러 가지 전사 요인들, neuropeptide들, 신경 전달 물질 수용체 및 관련 효소들이 다양한 양상으로 표현되고 있음을 알려진 사실이다 (Gall, 1988; Gall과 Isackson, 1989; Sutula 등, 1989; Bellman 등, 1991). 또한 IEGs의 유도 양상은 조직의 부위, 유도시간 및 경련제의 종류에 따라 다르다고 한다 (Dragunow 등, 1990a). 실험동물이 간질 연구의 대상이 되겠지만 특히 이 연구에서 *in vitro*로 O6 glioma 세포주를 택하게 된 것은 아무리 적은 뇌조직이라 할지

라도 신경원, 뇌교세포 등 다양한 종류의 세포들로 구성되어 있기 때문에 동물 생체 실험에 앞서 어떤 특정 신경세포의 특징을 보존하고 있는 수립신경세포주에서 중추신경계 약물 효과를 연구하는 것이 타당하다고 생각되었기 때문이다. 또한 glial 세포의 세포막에도 신경세포에 존재하는 glutamate, acetylcholine, norepinephrine, GABA, histamine, serotonin 및 adenosine 등의 수용체가 분포하고 있다고 하며 (Repke와 Maderspach, 1982; Rougon 등, 1983), 최근에는 그 기능도 보고되고 있다 (Rudge 등, 1989). 이 실험의 목적은 경련제 투여에 의한 *c-fos*, *krox-24* 등의 IEGs 유전자 표현의 변화와 후기 반응 유전자로서 BDNF의 변화를 관찰하고, 이것이 glutamate성 또는 GABA성 경련 반응에 의해 특이하게 일어났는지를 조사하고, 항경련제 투여에 의하여 어떻게 영향을 받는지를 알아보기 하였다. 경련제 KA, NMDA, glutamate, PTX에 의한 *c-fos*와 *krox-24*의 두 IEGs의 표현은 시기적으로 일치하지는 않았으나 세포에 경련제로서 가해진 자극의 반응현상으로 나타났으며, lactic acid dehydrogenase를 측정하여 세포에 치명적인 손상을 일으키지 않는 용량을 경련 유도 용량으로 정하였다 (Fig. 1). 그리하여 KA는 200 μM, NMDA는 10 mM, glutamate는 2 mM, PTX는 20 μM 농도로 O6 glioma 세포주에 경련을 유도하였다. 항경련제로는 이미 널리 사용되고 있는 PHT, PHB 및 DZ를 사용하였으며, 최근에 개발된 항경련제로써 GP와 FM을 사용하였으며, NMDA 수용체 길항제인 MK-801을 사용하여 비교 관찰하였다.

Weller 등 (1994)은 *c-fos*, *c-jun* mRNA의 표현이 세포독성을 유발한 증거이거나 세포의 방어현상으로 나타난 증기라고 단정할 수 없다는 보고를 하였지만, NMDA 길항제인 MK-801이 KA, NMDA 및 glutamate 경련에 의한 *c-fos* mRNA의 표현을 길항하는 결과를 보이므로써 항경련효과가 있는 것으로 보아진다. KA 및 glutamate에 의한 *c-fos* 표현의 증가는 GP, FM, PHT, PHB 및 DZ 병합 투여에 의해서 억제되지 않았다. *Krox-24*의 표현은 KA, NMDA, glutamate 단독 투여에 의해서는 표현이 증가되었으나, 항경련제 MK-801, GP, FM, PHT, PHB 및 DZ 병합 투여에 의한

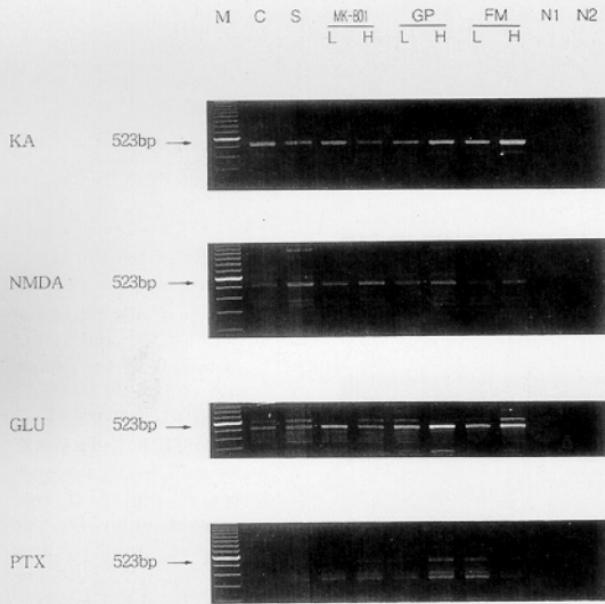


Fig. 3. Effects of MK-801, gabapentin(GP), and felbamate(FM) on the expression of *c-fos* by kainic acid(KA), NMDA, glutamate(GLU), and picrotoxin(PTX). M: size marker, C: control, S: convulsant only, N1: no reverse transcriptase, N2: no RNA, L: low dose, H: high dose.

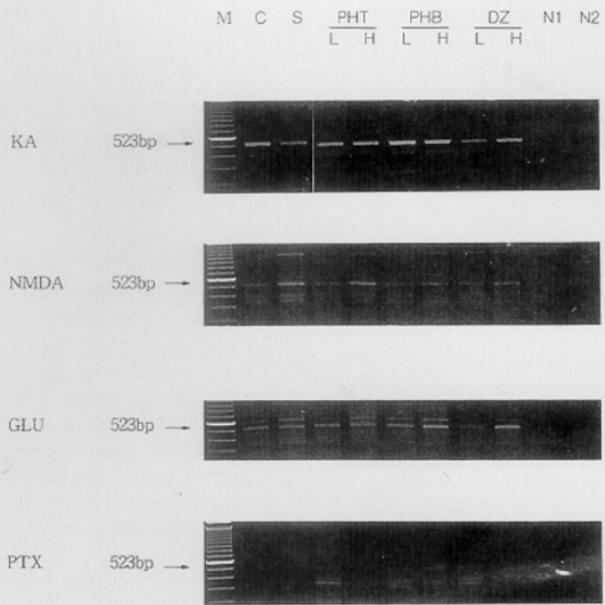


Fig. 4. Effects of phenytoin (PHT), phenobarbital (PHB), and diazepam (DZ) on the expression of *c-fos* by kainic acid(KA), NMDA, glutamate(GLU), and picrotoxin(PTX). M: size marker, C: control, S: convulsant only, N1: no reverse transcriptase, N2: no RNA, L: low dose, H: high dose.

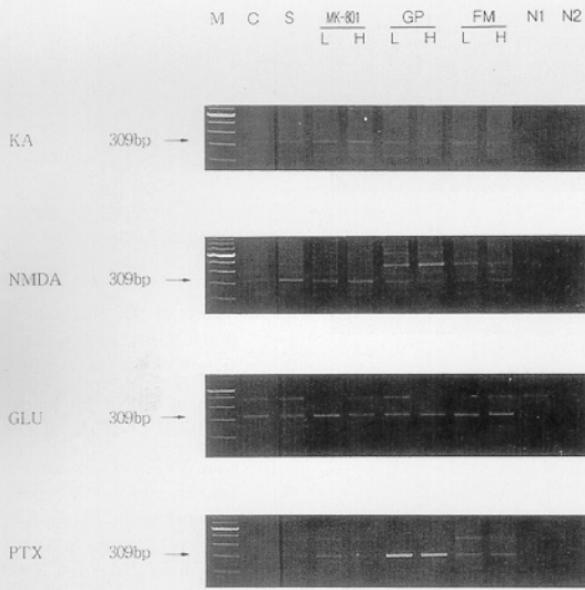


Fig. 5. Effects of MK-801, gabapentin(GP), and felbamate(FM) on the expression of *krox-24* by kainic acid(KA), NMDA, glutamate(GLU), and picrotoxin(PTX). M: size marker, C: control, S: convulsant only, N1: no reverse transcriptase, N2: no RNA, L: low dose, H: high dose.

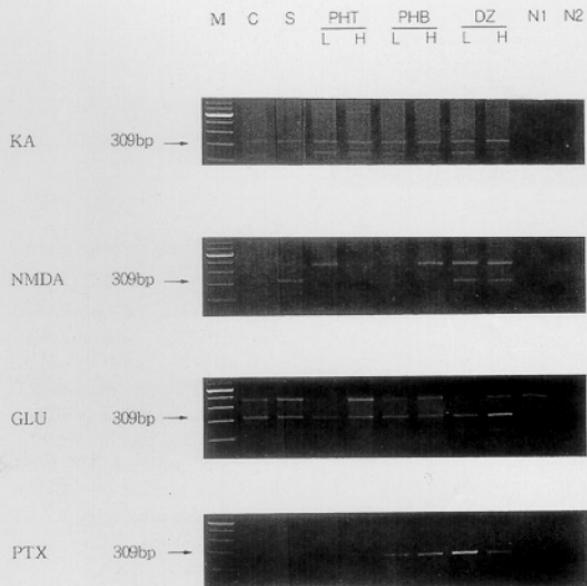


Fig. 6. Effects of phenytoin (PHT), phenobarbital (PHB), and diazepam (DZ) on the expression of *krox-24* by kainic acid (KA), NMDA, glutamate(GLU), and picrotoxin(PTX). M: size marker, C: control, S: convulsant only, N1: no reverse transcriptase, N2: no RNA, L: low dose, H: high dose.

	M	C	S	<u>MK-801</u>	<u>GP</u>	<u>FM</u>	N1	N2
	L	H		L	H	L	H	

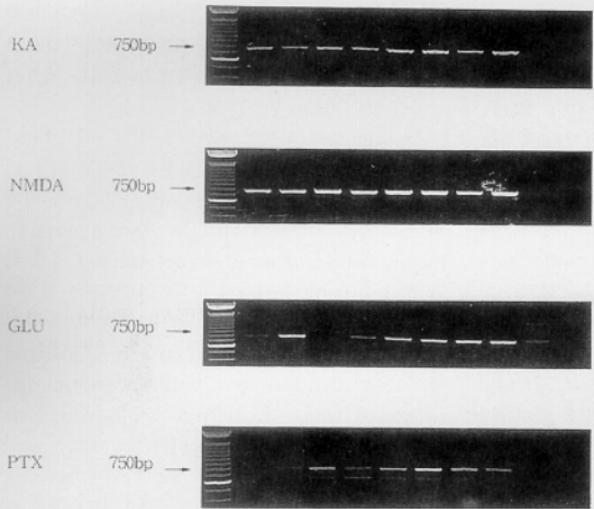


Fig. 7. Effects of MK-801, gabapentin(GP), and felbamate(FM) on the expression of BDNF by kainic acid(KA), NMDA, glutamate(GLU), and picrotoxin(PTX). M: size marker, C: control, S: convulsant only, N1: no reverse transcriptase, N2: no RNA, L: low dose, H: high dose.

	M	C	S	<u>PHT</u>	<u>PHB</u>	<u>DZ</u>	N1	N2
	L	H		L	H	L	H	

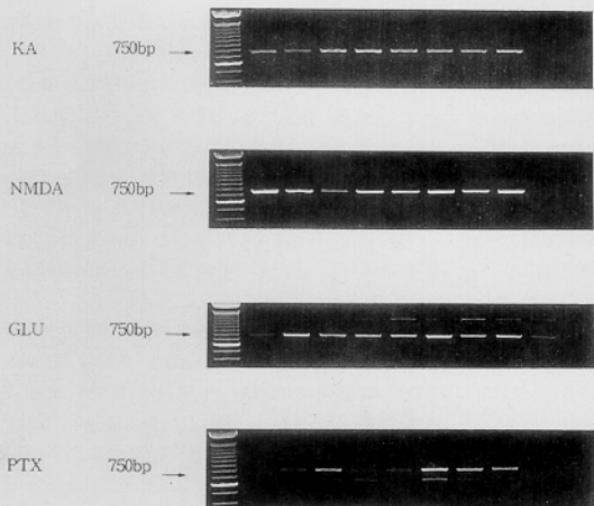


Fig. 8. Effects of MK-801, gabapentin(GP), and felbamate(FM) on the expression of BDNF by kainic acid(KA), NMDA, glutamate(GLU), and picrotoxin(PTX). M: size marker, C: control, S: convulsant only, N1: no reverse transcriptase, N2: no RNA, L: low dose, H: high dose.

의제는 NMDA에 의해서 경련이 유도된 경우에만 감소되는 경향을 나타내었다. 이 연구의 결과에서 *c-fos*, *krox-24* 두 종류의 IEGs의 전사가 각 항경련제에 의하여 NMDA 투여시에 비하여 모두 감소를 보이므로써 NMDA 수용체에 대하여 질환의 효과가 있는 것으로 생각되었다.

PTX에 의한 *c-fos*의 증가는 MK-801, PHT, PHB 및 DZ 병합 투여에 의해서는 억제의 양상을 보였으나, GP 병합 투여에 의해서 다소 증가하는 경향을 나타내었다. PTX에 의한 *krox-24*의 표현도 PHB 또는 DZ 병합 투여에 의해서 다소 증가되는 경향을 보였으나, GP 병합 투여에 의해서는 현저한 증가를 나타내었다. *C-fos* 및 *krox-24* 표현에 대하여 GP 및 DZ를 제외하고는 사용된 모든 항경련제 병합 투여에 의해 억제를 보이므로써 GABA 효험의 효과를 갖고 있는 것으로 생각되었다. PTX에 의한 경련에 대하여 GP 병합 투여군에서 *krox-24* 유전자 표현이 현저하게 증가되었는데 (Fig. 5), 이는 GP가 GABA 수용체에 대하여 직접작용을 갖고 있지 않기 때문인 것으로 생각되었다. 즉 GP는 cyclic GABA analog로서 지질유용성이 매우 높기 때문에 뇌척수 장벽을 잘 통과하여 중추신경계에서 GABA 효험으로 작용하므로 동물실험 모형 (Bartoszyk 등, 1986)이나 사람에서 부분 또는 전신성 경련에 효과가 있다고는 (Macdonald와 Kelly, 1995) 하지만 그 기전은 확실하지 않다. GP는 최근에 GABA_A 또는 GABA_B 수용체에 직접작용이 없으며 (Reimann, 1983; Schlicker 등, 1985) GABA의 대사 (Bartoszyk 등, 1986) 및 GABA의 재흡수에도 영향이 없으며, 오히려 GABA turnover를 증가 시킨다고 하는 보고가 있다 (Loscher 등, 1991). 또한 GP에 친화력이 있는 새로운 분자구조가 중추신경계에 있다고 하는 보고도 있다 (Oles 등, 1990). 현재는 GP가 신경세포막을 능동적으로 통과할 수 있는 특수한 결합부위가 있으리라는 가설이 있으며, 아직까지는 수용체에 대하여 직접적으로 작용하지는 않는다고 믿고 있다. 이 실험의 결과에서도 PTX에 의한 경련시 GP만의 현저한 증기는 이러한 약리기전에 의한 것으로 생각되었다. FM은 Lennox-Gastaut 증후군이 있는 부분 또는 전신 소아 경련 환자에 효과가 있는 것으로 알려져 있는데, 그 기전에 대해서는 확

실하지 못하다. 현재 추측하고 있는 FM의 기전으로는 낫트륨이온 통로의 전도를 억제하거나 NMDA 수용체의 strychnine-insensitive glycine receptor를 차단하거나 (Kemp와 Leeson, 1993) 또한 GABA에 의한 염소 이온 전류를 증가시키므로 GABA와 NMDA 수용체 모두에 작용하는 것으로 알려져 있다 (Rho 등, 1994).

Glutamate형 약물인 KA, NMDA 및 glutamate에 의한 BDNF 유전자 표현은 경련제 약물 단독 투여에 비하여 병합 투여된 모든 항경련제에 의해서 증가되는 양상을 나타내었다. Nerve growth factor, neurotrophin-3, neurotrophin-4 등과 같은 neurotrophic factor에 속하는 BDNF는 신경세포의 생존을 돋는 물질로써 중추신경계에서 특히 septal cholinergic neuron growth (Alderson 등, 1990; Knusel 등, 1991), dopaminergic neuron (Hyman 등, 1991 & 1994), cerebellar granule cell (Lindholm 등, 1993), motor neuron (Wong 등, 1993) 등의 생존에 관여하는 필수 인자라고 한다. 뿐만 아니라, 최근에는 BDNF가 세포의 생존과는 관계없이 striatal neuron 배양 세포상에서 GABA를 양적으로 증가시키고 (Mizuno 등, 1994), calbindin 또는 acetylcholinesterase를 표현하는 신경세포의 숫자를 증가시킨다고 하는 보고도 있다 (Ip 등, 1993). 이와같이 BDNF는 중추신경계에서 neuron의 성장과 분화 및 생존에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다.

IEGs과 후기 반응 유전자들의 표현정도가 세포의 활성 정도를 결정하는 기준이 될 수는 없으나, IEGs의 표현은 세포에 가해진 자극에 대한 반응 현상으로써 의미가 있으며, 후기 발현 유전자는 IEGs에 의한 target 유전자로써 발현되므로 이 연구에서 나타난 BDNF mRNA의 증가는 신경세포의 가소성에 관여하는 성장인자의 역할로서 신경보호작용을 나타내었다고 생각한다.

IEGs의 표현 양상에 대하여 시간적 경향이나 여기서 조사되지 않은 기타 IEGs에 대하여 또 다른 결과가 있을 수 있겠으나 이 연구의 결과로 보아 경련제 또는 항경련제의 종류에 따라 IEGs의 표현계가 각각 다르게 표현되었다는 사실만으로도 약물의 작용기전을 분자적 수준에서 검토할 만한 충분한 근거가 되었다고 생각하며 실험에 사용된 모든 항경련

제에 의하여 BDNF 표현이 증가되므로써 항경련제가 경련시에 신경보호작용을 나타내었음을 알 수 있었다.

요 약

경련과 관련되어 표현되는 IEGs인 *c-fos*와 *krox-24*의 표현과 후기 반응 유전자 BDNF를 수립 신경세포주 rat C6 glioma 세포주에서 RT-PCR 방법으로 검색하였다. NMDA에 의한 *c-fos* 표현제의 증가는 항경련제 MK-801, GP, FM, PHT, PHB 및 DZ 병합 투여에 의해서 억제되었으며, glutamate 또는 KA에 의한 *c-fos*의 표현은 MK-801, GP, FM, PHB 및 DZ 병합 투여에 의해서 증가되었다. KA 또는 glutamate에 의한 *krox-24* 유전자의 표현은 실험에 사용된 항경련제 병합투여에 의해서 별 영향이 없었으나, NMDA에 의한 *krox-24* 유전자의 표현은 억제되었다. PTX에 의한 *c-fos* 유전자의 표현은 GP 병합 투여에 의해서만 증가의 경향을 보였으며, *krox-24* 유전자의 표현을 현저하게 증가시켰다. KA, NMDA, glutamate 및 PTX에 의한 BDNF 유전자의 표현은 항경련제 병합 투여에 의해서 증가를 보이므로써 항경련제에 의한 신경보호효과가 나타난 것을 알 수 있었으며, 항경련제들의 약리작용에 의해서 세포내 분자수준에서 서로 다르게 전사가 유도될 수 있다는 근거를 제공하였다고 하겠다.

REFERENCES

- Alderson RF, Altman AL, Barde Y-A, Lindsay RM (1990) : Brain-derived neurotrophic factor increase survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* 5(3):297-306.
- Bartoszyk GD, Meyerson N, Reimann W, Satzinger G, von Hodenberg A (1986) : Gabapentin. In : Meldrum BS, Porter RJ, eds. *Current problems in epilepsy: new anticonvulsant drugs*. London, John Libby & Company, pp 147-164.
- Bellman R, Widmann R, Olenik C, Meyer DK, Maas D, Marksteiner J, Sperk G (1991) : Enhanced rate of expression and biosynthesis of neuropeptide Y after kainic acid-induced seizures. *J Neurochem* 56(2):525-530.
- Changelian PS, Feng P, King TC, Milbrandt J (1989) : Structure of the NGFI-A gene and detection of upstream sequences responsible for its transcriptional induction by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 86(1):377-381.
- Chiu R, Angel P, Karin M (1989) : Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* 59(6):979-986.
- Choi DW (1988 a) : Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11(10):465-469.
- Choi DW (1988 b) : Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1(8):623-634.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annal Biochem* 162(1):156-159.
- Christy BA, Lau LF, Nathans D (1988) : A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with 'zinc finger' sequences. *Proc. Natl. Acad Sci U.S.A.* 85(2):7857-7861.
- Collingridge GL, Bliss TVP (1987) : NMDA receptors -their role in long-term potentiation. *Trends Neurosci* 10:288-293.
- Dichter J, Ayala GF (1987) : Cellular mechanism of epilepsy: a status report. *Science* 237(4811):157-164.
- Douglas RM, Dragunow M, Robertson H (1988) : High frequency discharge of dentate granule cells but not long-term potentiation, induces *c-fos* protein. *Mol Brain Res* 46(3):259-262.
- Dragunow M, Abraham WC, Goulding M,

- Mason SE, Robertson HA, Faull RLM (1989) : Long-term potentiation and the induction of c-fos mRNA and protein in the dentate gyrus of unanesthetized rats. *Neurosci Lett* 101(3):274-280.
- Dragunow M, de Castro D, Faull RLM (1990 a) : Induction of Fos in glia-like cells after focal brain injury but not during wallerian degeneration. *Brain Res* 527(1):41-54.
- Dragunow M, Robertson HA (1987) : Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* 329(6138):441-442.
- Dragunow M, Robertson GS, Faull RLM, Robertson HA, Jansen K (1990 b) : D2 dopamine receptor antagonists induce c-fos and related proteins in rat striatal neurons. *Neuroscience* 37(2):287-294.
- Feldblum S, Acherman RF, Tobin AJ (1990) : Long term increase of decarboxylase mRNA in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuron* 5(3):361-371.
- Gall C (1988) : Seizure induce dramatic and distinctly different changes in enkephalin, dynorphin, and CCK immunoreactivities in mouse hippocampal mossy fibers. *J Neurosci* 8(8):1852-1862.
- Gall CM, Isackson PJ (1989) : Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve-growth factor. *Science* 245(4919):758-761.
- Gunn AJ, Draunow M, Faull RLM, Gluckman PD (1990) : Effects of hypoxia ischemia and seizure on neuronal and glial-like c-fos protein levels in the infant rat. *Brain Res* 531(1):105-116.
- Hirai SI, Ryseck RP, Mechta F, Bravo R, Yaniv M (1989) : Characterization of junD: a new member of the jun protooncogene family. *EMBO J* 8(5):1433-1439.
- Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM (1991) : BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350(6315):350-352.
- Hyman C, Juhasz M, Jackson C, Wright O, Ip N, Lindsay RM (1994) : Overlapping and distinct action of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *J Neurosci* 14(1):335-347.
- Ip NY, Yanping L, Yancopoulos GD, Lindsay RM (1993) : Cultured hippocampal neurons show responses to BDNF, NT-3 and NT-4, but not NGF. *J Neurosci* 13(1):3394-3405.
- Jeffery KJ, Abraham WC, Dragunow M, Mason SE (1990) : Induction of Fos-like immunoreactivity and the maintenance of long-term potentiation in the dentate gyrus of unanesthetized rats. *Mol Brain Res* 8(4):267-274.
- Kemp JA, Leeson PD (1993) : The glycine site of the NMDA receptor. *Trend Pharm Sci* 14(1):20-25.
- Knusel B, Winslow JW, Rosenthal A, Burton LE, Seid DP, Nikolic K, Hefti F (1991) : Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88(3):961-965.
- Komuro H, Rackic P (1993) : Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260(5104):95-97.
- Lamaire P, Relevant O, Bravo R, Charnay P (1988) : Two mouse genes encoding potential transcriptional factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(13):4691-4695.
- Lerner-Natoli M, Heaulme M, Leyris R, Biziere K, Rondourin G (1985) : Absence of modifications in γ -aminobutyric acid metabolism after repeated generalized seizures in

- amygdala-kindled rats. *Neurosci Lett* 62(2):271-276.
- Lindholm D, Decgant G, Heisenberg CP, Thoenen H (1993) : Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 5(11):1455-1464.
- Lipton SA (1992) : Models of neuronal injury in AIDS: another role for the NMDA receptor? *Trends Neurosci* 15(3):75-79.
- Loscher W, Honack D, Taylor CP : Gabapentin increases aminoxyacetic acid-induced GABA accumulation in several regions of rat brain. *Neurosci* 1991; 128(2):150-154.
- Lothman EW, Bertran EH, Kapur J, Stringer JL (1990) : Recurrent spontaneous hippocampal seizures in the rat as a chronic sequela to limbic status epilepticus. *Epilepsy Res* 6(2):110-118.
- Macdonald RL, Kelly KM (1993) : Antiepileptic drug mechanism of action. *Epilepsia* 34(suppl 5):S1-S8.
- McNamara JO (1992) : The neurological basis of epilepsy. *Trends Neurosci* 15(10):357-359.
- Meldrum B, Garthwaite J (1990) : Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol* 11(9):379-387.
- Mizuno K, Carnahan J, Nawa H (1994) : Brain derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons. *Dev Biol* 165(1):243-256.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T (1987) : Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237(4811):192-197.
- Oles RJ, Singh L, Hughes, Woodruff GN (1990) : The anticonvulsant action of gabapentin involves the glycine/NMDA receptor. *Soc Neurosci Abst* 16:783.
- Reimann W (1983) : Inhibition by GABA, baclofen, and gabapentin of dopamine release from rabbit caudate nucleus: are there common or different sites of action? *Eur J Pharmacol* 94(3):341-344.
- Repke H and Maderspach K (1982) : Muscarinic acetylcholine receptors on cultured glia cells. *Brain Research* 232(1):206-211.
- Rho JM, Doneva SD, Rogawski MA (1994) : Mechanism of action of the anticonvulsant felbamate: opposing effect on N-methyl-D-aspartate and γ -aminobutyric acid A receptors. *Annals of neurology*, 35(2):229-234.
- Ribak CE, Hunt CA, Bakay R, Oertel WH (1986) : A decrease in the number of GABAergic somata is associated with the preferential loss of GABAergic terminals at epileptic foci. *Brain Res* 363(1):78-90.
- Rothman SM, Olney JW (1987) : Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trend Neurosci* 10:299-302.
- Rougon G, Noble M, Mudge AW (1983) : Neuropeptides modulate the β -adrenergic response of purified astrocytes in vitro. *Nature* 305(5936):715-717.
- Rudge JS, Smith GM, Silver J (1989) : An in vitro model of wound healing in the Analysis of cell reaction and interaction at different ages. *Exp Neurol* 103(1):1-16.
- Ryder K, Lau LF, Nathans D (1988) : A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(5):1487-1491.
- Saffen DW, Cole AJ, Worley PF, Christy BA, Ryder K, Baraban JM (1988) : Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(20):7795-7799.
- Schlingensiepen KH, Luno K, Brysch W (1991) : The basal expression of the zif/268 immediate early gene in cortical layer IV and VI, in CA1 and in the corpus striatum-an in situ hybridization study. *Neurosci Lett* 122(1):67-70.

- Schlicker E, Reimann W, Gothert M (1985) : *Gabapentin decreases monoamine release without affecting acetylcholine release in the brain.* *Arzneimittelforschung* 35(9):1347-1349.
- Sheng M, Greenberg ME (1990) : *The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system.* *Neuron* 4(4):477-485.
- Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T, Morgan JI (1989) : *Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure.* *Neuron* 3(3):359-365.
- Sukhatme VP, Cao Z, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PCP, Cohen DR, Edwards SA, Show TB, Curran T, Le Beau MM, Adamson ED (1988) : *A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation and after cellular depolarization.* *Cell* 53(1):37-43.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L (1989) : *Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe.* *Ann Neurol* 26(3):321-385.
- Wanscher B, Krath J, Barry DE, Bolqig T, Zimmer J (1990) : *Increased somatostatin and enkephalin-like immunoreactivity in the rat hippocampus following hippocampal kindling.* *Neurosci Lett* 118(1):33-36.
- Weller M, Montpiet P, Paul SM (1994) : *NMDA receptor-mediated excitoprotection of cultured cerebellar granule neurons fails to alter glutamate-induced expression of c-fos and c-jun mRNAs.* *Mol Brain Res* 22(1):227-235.
- Wong V, Arriaga R, Ip NY, Lindsay RM (1993) : *The neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5, but not NGF, upregulate the cholinergic phenotype of developing motor neuron.* *Eur J Neurosci* 5(5):466-474.
- Woodburn VL, Oles R, Post J, Woodruff GN, Hughes J (1993) : *Anticonvulsant agents, dizocilpine maleate enadoline and HA 966 have different effects on N-methyl-DL-aspartate-induced immediate early gene induction in mice.* *Neuroscience* 56(3):703-709.