

# Chronic cannula implantation 및 microdialysis가 periaqueductal gray내 신경세포 활성화에 미치는 영향

이장현 · 한호재\* · 양일석

서울대학교 수의과대학 생리학교실  
전남대학교 수의과대학 생리학교실\*  
(1998년 7월 20일 접수)

## Neuronal activity in the periaqueductal gray associated with chronic cannula implantation and microdialysis

Jang-hern Lee, Ho-jae Han\* , Il-suk Yang

*Department of Physiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University*  
*Department of Physiology, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University\**  
(Received Jul 20, 1998)

**Abstract** : Immunohistochemical technique of the c-fos primary gene protein, Fos, was used to analyze the effects of external factors on the neuronal activities in the periaqueductal gray (PAG) of the intact rats, sham-operated rats and post-operated stress control rats. In addition, the number of Fos positive neurons has been evaluated to verify the effects of cannula implantation and veratridine treatment on the neuronal activities in PAG area. The results were summarized as follow :

1. There was no significant difference in the number of Fos positive neurons observed in the caudal and middle portion of lateroventral PAG from cannula implanted rats and sham operated rats.
2. The number of Fos positive neurons in the PAG was not changed by the stress induced by connection of collecting tube to rats for 12 hours as compared to that of intact rats.
3. In the saline treated group, the Fos immunoreactivity in the PAG did not changed at 30 minutes and 1 hour after saline treatment as compared to that of intact rats. However, the number of Fos positive neurons was significantly increased at 2 hours after treatment compared to that of saline treated rats at 30 minutes after treatment.
4. The Fos immunoreactivity was dramatically increased at 30 minutes, 1 hour and 2 hours after veratridine treatment as compared to those of saline treated groups. The number of Fos immunoreactive neurons showed the maximal level at 2 hours after veratridine treatment.

---

이 논문은 1995년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Jang-hern Lee, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

5. The Fos positive neurons induced by saline and veratridine treatment were mainly distributed in front of the microdialysis window.

These results suggest that new microdialysis demonstrated in this study improves efficiency and accuracy to confine the neuronal activity in front of microdialysis window site. Moreover, this directional specificity allows us to locate probe tips adjacent to the brain area of the interest site rather than centering the probes within that brain area. Finally, This microdialysis method can be used to dialyse the neurotransmitters using conscious and freely moving rats.

**Key words :** microdialysis, Fos, Immunohistochemistry, Periaqueductal gray, veratridine.

## 서 론

*In vivo* microdialysis(미세투석)법은 마취를 하지 않은 상태의 실험동물이 케이지 내에서 자유롭게 움직이는 동안 중추신경계의 특정부위를 자극하거나 약물을 투여함으로써 신경세포로부터 분비되어 세포외액에 분포하는 amino acids나 신경전달물질들을 채취하여 분석할 수 있는 방법이다<sup>1,2</sup>. 그러나 이러한 미세투석법은 정확한 시료의 채취 및 분석을 위해 시료가 채취된 정확한 부위 및 미세투석에 의한 신경세포의 활성변화를 검정해야만 이 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다.

최근 간접적으로 신경세포의 활성을 측정하는 방법중 Fos 단백질에 대한 면역조직화학법이 많이 이용되고 있다<sup>3</sup>. 이 방법은 외부 및 내부의 자극에 의해 신경세포의 활성이 증가함으로써 발현이 증가되는 *c-fos* 유전자에 의해 Fos 단백질의 생산이 증가하게 되는데 이러한 Fos 단백질은 자극이 가해진 후 약 30분경부터 세포질 내에 생산되기 시작하며 자극이 있은 후 20~90분에는 종래에 상용되고 있는 면역조직화학법에 의해 Fos 단백질의 신경세포내 축적유무를 쉽게 감지할 수 있다<sup>4-6</sup>. 따라서 면역조직화학법을 통해 Fos 단백질을 측정함으로써 다양한 형태의 자극에 대한 신경세포들의 단기반응(short term response) 및 활성증가 여부를 간접적으로 측정, 분석하는데 이용되고 있다<sup>7-9</sup>.

따라서 본 연구에서는 정상적인 실험동물 및 stress와 같은 미세투석법 등 외적인 요인에 의해 periaqueductal

gray(PAG)내 신경세포의 활성이 어떻게 영향을 받는지를 검증하고, 나아가 미세투석법을 위한 cannula 삽입후 생리식염수 또는 신경세포의 탈분극을 유도하는 veratridine을 microdialysis probe를 통해 주입함으로써 microdialysis probe에 의해 야기되는 물리적인 요인 및 약물에 의해 시료가 채취되는 표적부위에서 일어나는 신경세포의 활성변화를 측정함으로써 미세투석법의 효율성 및 정확성을 검증하고자 한다.

## 재료 및 방법

Dialysis tube의 제작 및 설치 : 본 실험에서는 225~350g의 Sprague-Dawley종 랫트를 사용하여 ketamine과 xylazine을 혼합한 마취제로 심마취한 후 두부의 정중선을 따라 절개하였다. 20 gauge 직경인 stainless guide cannula를 stereotaxic instrument를 이용하여 bregma 후방 anterior/posterior axis가 7.9mm, 두개골의 표면에서 ventral/dorsal 이 6.8mm 및 정중선에서 medial/lateral이 0.073mm 되는 곳에 설치하였다<sup>10</sup>. Guide cannula는 screw와 dental cement를 사용하여 두개골에 단단히 고정시키고 피부를 surgical clip으로 다시 봉합하였다. 수술후 7~10일경이 경과하여 실험동물이 완전히 정상으로 회복된 실험동물만을 본 실험에 사용하였다.

Microdialysis tube는 직경 25 gauge인 stainless tube를 이용하여 제작하였으며, tube의 끝에서 부터 0.5mm 되는 부분에 크기가 1mm 되는 collection window를 만들어 microdialysis membrane이 외부에 노출되도록 하였다. 직경이 200 $\mu$ m 되는 dialysis fiber(5,000mol wt cutoff; Spectrum

Medical Industries)의 끝을 epoxy로 막고, microdialysis tube의 내로 삽입한 후 고정시켰다. 효과적인 미세투석을 위해 dialysis fiber의 반대쪽 끝을 약 1.75mm 남겨두고 다시 epoxy로 덮은 후 microdialysis probe의 반대쪽 끝을 microline tubing을 통해 fluid swivel에 연결시켰다. Silica capillary tube(145µm od, Cole Parmer, Chicago, IL)을 microline tube의 작은 구멍을 통해 dialysis tube 내로 주입하였다. 주입된 silica capillary tube를 microdialysis probe의 outflow의 통로로 이용되는 Polyethylene-10 tube에 고정하였다. Microdialysis tube의 제작이 끝나면 이 tube를 peristaltic pump(Rainin Rabbit-Plus, USA)에 연결하고 60µl 정도의 시료를 Gilson microfraction collector를 사용하여 채취하여 microdialysis tube들이 완전하게 연결되었는지를 검정하였다.

조직처리 : 미세투석에 사용한 실험동물을 17.5%의 chloral hydrate로 심파취시킨 후 복강을 열어 심장을 통해 고정액을 주입하기전 calcium free tyrode 용액 100ml을 주입하여 조직으로부터 혈액을 완전히 제거한 후 4% paraformaldehyde와 0.2% picric acid를 포함한 0.4M phosphate buffer(Lana's fixative)를 관류시켜 조직을 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 신속히 분리하여 동일한 고정액에서 4시간동안 후고정하였으며 10%, 20%, 30% sucrose 용액에 차례로 침전시켜 조직이 동결시 손상되지 않도록 하였다. 실온에서 24시간동안 sucrose 처리가 끝난 조직은 -20℃의 온도로 freezing stage에서 신속히 얼리고 sliding microtome을 사용하여 두께 40µm로 연속절편을 제작하여 면역조직화학법에 사용하였다.

Fos 단백질에 대한 면역조직화학적 검정 : 본 실험에서 사용한 면역조직화학법은 Avidin-Biotin peroxidase method를 사용하였으며, 항체의 비특이적 반응을 줄이고 항원 항체반응의 민감도를 높이기 위해 biotin amplification 방법을 사용하였다<sup>10,11</sup>. 면역조직화학법에 사용한 Fos 단백질에 대한 일차 항혈청은 anti-Fos rabbit IgG(Calbiochem) 및 anti-Fos sheep IgG(Cambridge)를 각각 1 : 100,000 및 1 : 1,000으로 희석하여 4℃에서 24시간동안 조직에 처리하여 반응시켰다. Anti-Fos rabbit IgG(Calbiochem)을 사용한 경우 일차 항혈청 처리가 끝난 조직은 산양에서 생산한 이차항체(goat anti rabbit IgG, vector 1 : 200)를 이용하여 실온에서 1시간 처리하였다. 항체반응이 끝난 조직은 avidin-biotin complex(Elite kit, Vector, 1 : 250)을 실온에서 30분간 반응시켰으며 반응이 끝난 조직은 Biotinylated

tyramine(BT : 1µl BT/ml PBS + 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)과 20분동안 실온에서 반응시킨 후 다시 avidin-biotin complex(Elite kit, Vector, 1 : 500)와 실온에서 1시간동안 반응시켰다. Avidin-biotin complex와 반응이 끝난 조직은 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride(DAB, Sigma)를 녹인 Tris-buffer에서 반응시켜 실온에서 발색시켰다. 각 단계마다 반응이 끝난 조직은 TPBS를 사용하여 잔류 항혈청을 완전히 제거한 후 다음 단계로 진행하였다. 발색이 끝난 조직은 slide glass 위에 올리고 완전히 건조시킨 후 alcohol의 농도를 높이면서 탈수시키고 cover glass를 씌워 봉입하였다.

대조군에서의 신경세포 활성변화 측정 : 정상적인 실험동물 및 미세투석 외적인 요인에 의해 periaqueductal gray(PAG)내 신경세포의 활성이 어떻게 영향을 받는지를 검증하기 위해 아래에 기술한 바와 같이 실험진행 도중 실험동물을 무작위로 선정하여 Fos 면역조직화학법을 이용하여 신경세포의 활성을 조사하였다.

- 1) 수술에 사용될 실험동물의 PAG 내에 정상적으로 존재하는 신경세포의 활성을 조사하였다(intact rats).
- 2) cannula implantation을 위한 수술후 7일경에 실험동물의 PAG내 신경세포 활성변화를 조사함으로써 수술 및 그 밖의 실험동물 조작이 신경세포의 활성에 미치는 영향을 조사하였다(sham operated rats).
- 3) 미세투석법을 통해 시료를 직접 채취하기 전에 실험동물을 collecting tube만을 연결시켜 최소한 12시간 이상 케이지에 넣어 실험동물이 미세투석중에 받게 될 stress 등의 요인에 의한 PAG내 신경세포의 활성변화를 관찰하였다(stress control).

Cannula implantation 및 veratridine 투여에 의한 신경세포 활성변화 측정 : Microdialysis probe만을 실험동물의 PAG 내에 삽입한 후 18~20시간이 경과한 실험동물의 PAG 부위에 생리식염수를 관류한 후 microdialysis probe에 의해 야기되는 물리적인 요인에 대한 신경세포의 활성이 어떻게 변화하는지를 조사하기 위해 생리식염수를 관류한 후 30분, 1시간 및 2시간이 경과하였을 때 나타나는 신경세포의 활성을 조사하였다. 뿐만 아니라 신경세포의 탈분극을 효과적으로 유발시키는 약물로 알려진 veratridine을 이용하여 신경전달물질의 분비를 촉진시킨 후 나타나는 신경세포의 활성변화를 관찰하였다. 이를 위해 75µl의 veratridine을 포함한 Ringer's solution을 microdialysis probe를 삽입한 후 18~20시간이 경과

한 실험동물의 PAG 부위에 24분가량 microdialysis tube를 통해 관류시킨 후 30분, 1시간 및 2시간이 경과되었을 때 일어나는 신경세포의 활성변화를 Fos 면역조직화학법을 이용하여 측정하였다.

**결과분석 :** 실험에서 분석하고자 하는 신경핵(nucleus)의 명칭과 경계는 Paxinos 및 Watson<sup>12</sup>이 제작한 Rat Brain Atlas를 참조하여 결정하였다. 처치가 완전히 끝난 뇌의 조직은 면역반응이 완료된 조직은 Zeiss Axiophort 2 현미경을 이용하여 각각 100배 및 400배의 배율로 관찰하였다. 뿐만 아니라 핵내에 Fos 단백질을 축적하고 있는 신경세포의 숫적인 변화를 관찰하기 위해 digital image analysis system(Meta-Morph, Universal Imaging Co.)를 이용하여 평균 grey level이 130 unit 이하 되는 신경세포만을 선택적으로 선별하여 측정하였다. 신경세포의 숫적 변화는 연결된 computer에 자동적으로 저장되며 측정이 끝난 후 일괄적으로 통계처리하였으며, 실험에 사용한 조직은 실험동물별로 가장 선명한 면역성을 가진 조직 중 5개를 선별하여 뇌와 척수내의 신경핵별로 숫적인 변화를 관찰하였다.

실험결과는 1-way ANOVA(Statview512+ Software, Brainpower Inc., Abacus Concept Inc., 1986)을 이용하여 통계처리 하였다. 뿐만 아니라 유의성 측정하기 위해 Scheffe F test를 실시하였으며, 실험동물간의 variance도 고려하였다.

## 결 과

미세투석법 외적인 요인에 의한 신경세포의 활성변화 : 수술에 사용될 실험동물의 PAG 내에 정상적으로 존재하는 신경세포의 활성을 조사한 결과 Tabel 1에서 보는

Table 1. The mean and S.E.M. of the number of Fos expression in the periaqueductal gray of the control groups

	Intact rats	Sham operated rats	Stress control
PAG LV Caud	18.19±1.92	19.12±2.15	21.74±3.64
PAG LV Mid	6.04±1.21	6.95±3.02	8.47±2.65

Abbreviations : PAG LV = caudal portion of lateroventral periaqueductal gray; Caud = caudal portion; Mid = middle portion.

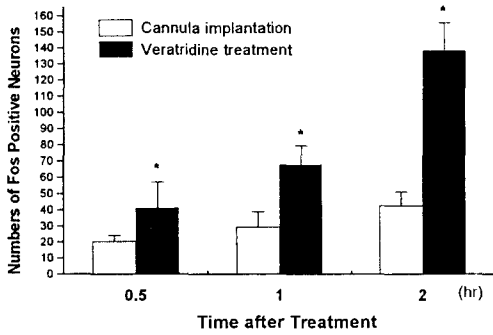
바와 같이 lateroventral portion의 caudal 및 middle PAG에서 section 평균 각각 18.19개 및 6.04개의 Fos 단백질에 대해 면역염색성을 나타내는 신경세포가 관찰되었다.

Cannula implantation을 위한 수술후 7일경에 실험동물의 PAG내 신경세포 활성변화를 조사한 결과 lateroventral portion의 caudal 및 middle PAG에서 section 평균 각각 19.12개 및 6.95개의 활성이 증가하여 Fos 단백질을 함유한 신경세포가 관찰되었으며, 정상적인 실험동물의 동일한 부위에서 관찰되는 Fos 양성 신경세포의 수에 비해 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(Table 1,  $p < 0.05$ ).

미세투석법을 통해 시료를 직접 채취하기 전에 실험동물을 collecting tube 만을 연결시켜 최소한 12시간 이상 케이지에 넣어 실험동물이 미세투석중에 받게 될 stress 등의 요인에 의한 PAG내 신경세포의 활성변화를 관찰한 결과 정상적인 실험동물의 PAG에서 관찰되는 Fos 양성 신경세포의 수에 비해 유의성 있는 신경세포의 활성 변화는 관찰할 수 없었다(Table 1,  $p < 0.05$ ). 이들 대조군에서 관찰되는 Fos 단백질에 대한 면역반응성은 Fig 2에서와 같이 핵내에 축적된 Fos 단백질이 항체와 반응함으로써 원형 또는 타원형의 형태로 관찰되었다(A and B : arrows).

Cannula implantation 및 veratridine 투여에 의한 신경세포의 활성변화 : Microdialysis probe만을 실험동물의 PAG내에 삽입한 후 18~20시간이 경과한 실험동물의 PAG 부위에 생리식염수를 관류한 후 microdialysis probe에 의해 야기되는 물리적인 요인에 대한 신경세포의 활성이 어떻게 변화하는지를 조사하기 위해 생리식염수를 관류한 후 30분, 1시간 및 2시간이 경과하였을 때 나타나는 신경세포의 활성을 조사한 결과 생리식염수 관류 후 30분 및 1시간이 경과한 실험동물의 경우 대조군 (Table 1)에 비해 유의성 있는 신경세포의 활성변화를 관찰할 수 없었다(Fig 1, cannula control :  $p < 0.05$ ). 반면 생리식염수 관류후 2시간이 경과한 실험동물의 경우 대조군 및 30분 경과 처치군에서 관찰되는 Fos 양성 신경세포의 수가 유의성 있게 증가하였다(Fig 1,  $p < 0.05$ ). 생리식염수만을 관류시킨 처치군에서 관찰되는 Fos 양성 신경세포는 probe의 window가 위치한 lateroventral portion에서 주로 관찰되었다(Fig 2, B and C : arrows).

75µl의 veratridine을 포함한 Ringer's solution을 microdialysis probe를 삽입한 후 18~20시간이 경과한 실험동물의 PAG 부위에 24분가량 microdialysis tube를 통해 관류시킨 후



**Fig 1.** Total numbers of Fos positive neurons in the periaqueductal gray of the cannula implanted group and the veratridine treated group at different time points after treatments. An astrisk indicates significant difference between cannula implanted group and veratridine treated group ( $p < 0.05$ ).

30분, 1시간 및 2시간이 경과되었을 때 일어나는 신경세포의 활성변화를 관찰한 결과 Fig 1에서 보는 바와 같이 약물처치 30분, 1시간 및 2시간후 각각 41.24개, 67.88개 및 138.48개의 Fos 양성 신경세포가 PAG의 lateroventral portion에서 관찰되어 생리식염수만을 관류시킨 처치군에 비해 현저한 수적 증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ). 뿐만 아니라 veratridine을 처치한 후 30분과 1시간경에 관찰되는 Fos 양성 신경세포의 수에 비해 2시간 경과후 50% 이상의 수적인 증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ). Fos 양성 신경세포의 면역염색성은 대조군의 contrast에 비해 차이를 나타내지 않았으며, Fos 양성 신경세포의 대부분이 probe의 window가 위치한 lateroventral portion에서 관찰되었다 (Fig 2, E and F: arrows).

## 고찰

현재 가장 보편적으로 사용되고 있는 *in vivo* microdialysis 법은 Tossman과 Ungerstedt<sup>13</sup>에 의해 종래의 방법이 가지는 문제점을 보완수정하여 개발된 방법으로서 마취를 하지 않은 상태의 실험동물에 inner tube 와 outer tube로 구성된 microdialysis probe를 외과적인 방법으로 설치한 후 실험동물이 케이지 내에서 자유롭게 움직이는 동안 특정자극이나 약물의 투여에 의해 신경세포들이 세포외액으로 분비하는 신경전달물질들을 microdialysis membrane을 통해 채취하여 정량 및 정성분석을 할 수 있는 방법이다<sup>14,15</sup>. 뿐만 아니라 dialysis membrane의 pore

크기를 조절함으로써 특정 신경전달물질을 선택적으로 채취할수 있을 뿐만 아니라 실험에 필요한 약물을 투여하는데도 이용되고 있다<sup>16,17</sup>.

한편 microdialysis tube를 뇌조직에 설치할 경우 조직의 metabolism에 심각한 불균형을 초래하는 것으로 밝혀져 있으며<sup>18,19</sup> microdialysis에 의해 채취된 신경전달물질들이 실제로 자극에 의해 신경세포에서만 분비된 것인지 아니면 microdialysis시 발생할 수 있는 물리적인 자극에 의해 신경세포가 파괴되어 세포내의 components가 유출되었는지의 여부를 정확히 검증해야 하는 것으로 알려져 있다. 또한 시료를 채취하고자 목적했던 뇌의 특정 nucleus 내에서 시료가 채취된 실제 범위를 반드시 고려해야 한다.

Curran과 Teich<sup>20</sup>에 의해 2 murineosteogenic sarcoma virus의 *v-fos* oncogene과 유사한 포유동물의 oncogene을 'fos'라고 명명한 이래, Doucet *et al*<sup>21</sup>에 의해 cellular fos(*c-fos*) proto-oncogene의 특성들이 알려지기 시작했다. 포유동물의 *c-fos* oncogene은 자극에 의해 빠르게 반응하는 early response gene 또는 primary response gene의 일종이며, 신경세포의 탈분극에 의해 빠르게 활성화 되는 것으로 알려져 있다<sup>21</sup>. 또한 *c-fos*는 nerve growth factor, cholinergic neurotransmitters 및 calcium이나 cAMP와 같은 second messenger에 의해 쉽게 발현될 뿐만 아니라<sup>22</sup> 최근에 와서는 NMDA receptor activation이나 L-type calcium channel의 activation 같은 세포막에서 일어나는 자극에 의해서도 쉽게 발현되어지는 것으로 밝혀져 있다<sup>4,23,24</sup>. *C-fos*의 transcriptional activation은 자극후 5분 이내에 일어나며, Fos mRNA는 자극후 30~40분경에 최고의 수치를 나타낸다<sup>25</sup>. mRNA의 활성화에 의해 생산되는 Fos 단백질은 최초 자극이 있은지 약 30분후부터 나타나기 시작하며, 생산된 후 빠르게 nucleus 내로 전이된다<sup>26</sup>. 세포핵 내로 유입된 Fos protein은 differentiation, plasticity, learning 및 regeneration과 같은 long-term response에 관계되는 transcriptional regulation에 관여한다<sup>27</sup>. 이러한 Fos의 transcriptional regulation을 일으키기 위해서는 jun proto-oncogene의 protein 산물인 Jun의 협력작용이 필요한 것으로 알려져 있다<sup>28</sup>.

이러한 Fos 단백질의 핵내 축적유무는 최초자극이 있은 후 20~90분에 면역조직화학법에 의해 쉽게 감지할 수 있으며 여러가지 자극에 대한 *in vivo* 상태에서 일어나는 신경세포들의 short term response를 측정, 분석하는

데 좋은 방법으로 알려져 있다<sup>3</sup>. 실제로 Fos 단백질에 대한 항체를 이용한 면역조직화학법은 pain sensation<sup>29</sup>, visual system<sup>7</sup>, auditory system<sup>8</sup>, locomotion의 manipulation 및 hypergravity<sup>9</sup> 등의 연구들에서 특정자극에 대한 신경의 활성을 측정하는데 이용되어왔다.

본 실험에서 정상적인 실험동물에서 발현되는 Fos 양성 신경세포의 양상과 수술후 발현되는 Fos 양성 신경세포 및 미세투석에 의한 stress에 의한 신경세포의 활성변화를 관찰한 결과 통계학적으로 유의성 있는 차이를 관찰할 수 없었다(Table 1,  $p < 0.05$ ). 이는 microdialysis probe를 삽입하기 위한 수술에서 실험동물이 약 7일 이후에는 완전히 정상적인 상태로 회복되며 미세투석법을 이용하여 신경세포의 활성 및 신경전달물질의 분석하고자 할 때 수술후 최소한 7일 이상의 회복기를 가진 실험동물을 사용해야 함을 의미하고 있다. 뿐만 아니라 본 실험에 사용된 *in vivo* microdialysis법이 실험동물의 정상적인 행동에 아무런 제약을 주지 않을 뿐만 아니라 실험방법으로 인한 stress 수준이 기존의 방법에 비해 낮음을 관찰할 수 있었다.

Cannula implantation에 의해 야기되는 물리적인 요인에 대한 신경세포의 활성이 어떻게 변화하는지를 조사하기 위해 microdialysis probe를 통해 생리식염수를 관류시킨 후 30분, 1시간 및 2시간이 경과하였을 때 나타나는 신경세포의 활성을 조사한 결과 생리식염수 관류후 30분 및 1시간이 경과한 실험동물의 경우 대조군(Table 1)에 비해 유의성 있는 신경세포의 활성변화를 관찰할 수 없었으나 2시간이 경과한 실험동물의 경우 대조군 및 30분 경과 처치군에서 관찰되는 Fos 양성 신경세포의 수가 유의성 있게 증가하였다(Fig 1,  $p < 0.05$ ). 이는 cannula implantation이 유발하는 물리적인 자극에 의해 신경세포의 활성이 증가하는 것을 의미한다. 한편 veratridine을 포함한 Ringer's solution을 microdialysis probe를 삽입한 후 18~20시간이 경과한 실험동물의 PAG 부위에 24분가량 관류시킨 후 30분, 1시간 및 2시간이 경과되었을 때 일어나는 신경세포의 활성변화는 약물처치 30분, 1시간 및 2시간후 생리식염수만을 관류시킨 처치군에 비해 현저한 수적증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ). 뿐만 아니라 veratridine을 처치한 후 30분과 1시간경에 관찰되는 Fos 양성 신경세포의 수에 비해 2시간 경과후 급격한 수적인 증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ). 이러한 결과로 미루어 미세투석법시 cannula implantation시 신경세포의 활성증가를 초래

하지만 약물에 의한 신경세포의 활성증가와 비교해볼 때 증가양상이 현저히 낮게 나타나 미세투석법에 의한 신경세포의 활성변화 및 신경전달물질의 분석에는 영향을 미치지 못할 것으로 추측된다.

Morphine이나 opioid peptides를 전신투여하거나 뇌의 ventrocaudal periaqueductal gray(PAG)에 직접 주입하였을 경우 antinociception을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 antinociception은 PAG 내에 존재하는 inhibitory interneuron들의 활동이 외부에서 투여된 opioid agonist에 의해 억제(inhibition)됨으로서 일어난다고 추측하고 있다<sup>17,30,31</sup>. 세부적으로 밝혀진 antinociception의 기전은 뇌의 다른 부분에서 PAG 내의 opioid 분비 신경세포의 말단에서 분비되는 opioid에 의해 PAG 내의 interneuron의 활동이 억제되므로서 일어난다. 따라서 interneuron의 활성억제는 PAG에서 nucleus raphe magnus로 투사(projection)하는 신경들의 활성이 interneuron의 억제에서 벗어나게 되어 결과적으로 spinal cord에서 진통효과를 나타내게 된다<sup>32</sup>. 이들 interneuron들은 GABA를 분비하여 inhibitory effect를 나타내는 것으로 보고되어 있으며<sup>31</sup> quantitative electron microscope를 이용하여 PAG-NMR neuron이 직접적으로 GABAergic neuron의 지배를 받는다는 것이 재확인 되었다<sup>33</sup>.

본 실험실에서 제작한 microdialysis probe를 이용하여 probe만을 삽입한 처치군 및 신경세포의 탈분극을 유발시키는 것으로 알려진 veratridine을 probe를 통해 처치한 실험동물에서 대조군에 비해 PAG의 lateroventral portion에서 현저히 신경세포의 활성이 증가되는 것으로 관찰되었으며 특히 probe의 window가 위치한 쪽의 신경세포의 활성 window의 반대쪽에 비해 활성이 현저히 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다. 이는 시판되고 있는 microdialysis probe의 membrane이 probe 끝에 위치하고 있어 dialysis 되는 방향 및 부위를 조절하는 것이 불가능했던 것과 비교할 때 시료채취부위를 특정한 부위로 국한시킬 수 있어 실험의 정확도 및 재현성을 높일 수 있을 것으로 생각된다. 특히 PAG와 같이 부위에 따른 기능이 다른 부위를 미세투석할 경우 시료의 채취를 일부분에 국한시킬 수 있으므로 진통기전에서의 PAG 역할을 보다 정확하게 분석할 수 있으리라 기대된다.

## 결론

본 연구에서는 microdialysis 법의 효율성 및 정확성을 향상시키고자 시판되는 기존의 microdialysis probe의 단점을 보완한 새로운 microdialysis probe를 설계, 제작하여 실험동물의 PAG에 설치한 후 정상적인 실험동물 및 미세투석 외적인 요인에 의해 periaqueductal gray(PAG)내 신경세포의 활성이 어떻게 영향을 받는지를 검증하고, 나아가 미세투석법을 위한 cannula implantation 및 신경세포의 탈분극을 유도하는 veratridine을 microdialysis probe를 통해 주입함으로써 microdialysis probe에 의해 야기되는 물리적인 요인 및 약물에 의해 시료가 채취되는 실제 부위에서 일어나는 신경세포의 활성변화를 검증하고자 하였다. 실험결과는 다음과 같다.

1. 정상 실험동물 및 cannula implantation을 위한 수술 후 7일경에 실험동물의 PAG내 신경세포 활성변화를 조사한 결과 lateroventral portion의 caudal 및 middle PAG에서 관찰되는 Fos 양성 신경세포의 수는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

2. collecting tube만을 연결시켜 최소한 12시간 이상 케이지에 넣어 실험동물이 미세투석중에 받게 될 stress 등의 요인에 의한 PAG내 신경세포의 활성변화를 관찰한 결과 정상적인 실험동물의 PAG에서 관찰되는 Fos 양성 신경세포의 수에 비해 유의성 있는 신경세포의 활성변화는 관찰할 수 없었다.

3. Microdialysis probe만을 실험동물의 PAG 내에 삽입한 후 18~20시간이 경과한 실험동물의 PAG 부위에 생리식염수를 관류한 후 30분, 1시간 및 2시간이 경과하였을 때 나타나는 신경세포의 활성을 조사한 결과 생리식염수 관류후 30분 및 1시간이 경과한 실험동물의 경우 대조군에 비해 유의성 있는 신경세포의 활성변화를 관찰할 수 없었다. 반면 생리식염수 관류후 2시간이 경과한 실험동물의 경우 대조군 및 30분 경과 처치군에서 관찰

되는 Fos 양성 신경세포의 수가 유의성 있게 증가하였다.

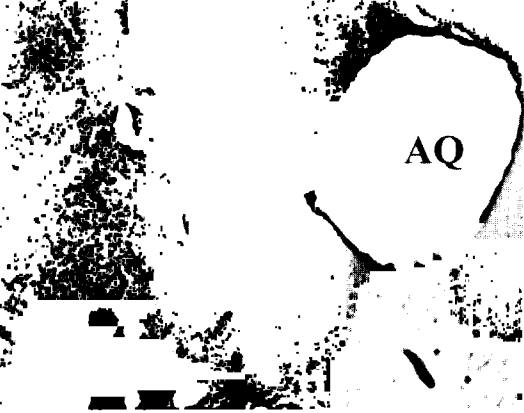
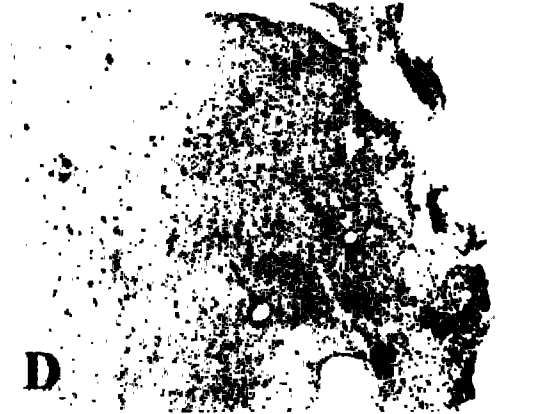
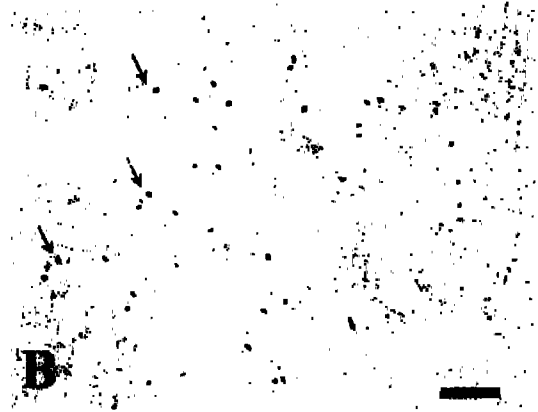
4. Veratridine을 포함한 Ringer's solution을 microdialysis probe를 삽입한 후 18~20시간이 경과한 실험동물의 PAG 부위에 24분가량 관류시킨 후 30분, 1시간 및 2시간이 경과되었을 때 일어나는 신경세포의 활성변화는 약물처리 30분, 1시간 및 2시간후 생리식염수만을 관류시킨 처치군에 비해 현저한 수적 증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ). 뿐만 아니라 veratridine을 처리한 후 30분과 1시간경에 관찰되는 Fos 양성 신경세포의 수에 비해 2시간 경과후 급격한 수적인 증가를 나타내었다.

5. Microdialysis probe만을 삽입한 처치군 및 신경세포의 탈분극을 유발시키는 것으로 알려진 veratridine을 probe를 통해 처리한 실험동물에서 대조군에 비해 PAG의 lateroventral portion에서 현저히 신경세포의 활성이 증가되는 것으로 관찰되었으며 특히 probe의 window가 위치한 쪽의 신경세포의 활성 window의 반대쪽에 비해 활성이 현저히 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 본 실험에 사용된 *in vivo* microdialysis 법이 실험동물의 정상적인 행동에 아무런 제약을 주지 않을 뿐만 아니라 실험방법으로 인한 stress 수준이 기존의 방법에 비해 현저히 감소함을 관찰할 수 있었다. 나아가 미세투석법시 cannula implantation이 신경세포의 활성증가를 초래하지만 약물에 의한 신경세포의 활성증가와 비교해볼 때 증가양상이 현저히 낮게 나타나 미세투석법에 의한 신경세포의 활성변화 및 신경전달물질의 분석에는 영향을 미치지 못할 것으로 추측된다. 뿐만 아니라 본 연구에 사용된 microdialysis probe는 신경세포의 활성이 증가되는 부위를 국한시킬 수는 장점이 있어 실험의 정확도 및 재현성을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

## Legends for figures

**Fig 2.** Photomicrographs of Fos immunolabeling in the periaqueductal gray (PAG) from the stress control rats (A and B), cannula implanted rats (C and D) and veratridine treated rats (E and F). Low magnification photographs of Fos positive neurons (arrows) in the PAG of stress induced groups (A), cannula implanted group(C) and veratridine treated group(E). Bar = 400 $\mu$ m. High magnification photographs(B, D and F) of Fos positive neurons (arrows) were represented at the right side of low magnification photographs. Bar = 200 $\mu$ m. AQ = aqueduct.





## 참 고 문 헌

1. Benveniste H. Brain microdialysis. *J Neurochem*, 52: 1667-1674, 1989.
2. Di Chiara H. *In vivo* brain dialysis of neurotransmitters. *Trends Pharmacol Sci*, 11:116-121, 1990.
3. Bullitt E. Expression of *c-fos*-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol*, 296:517-530, 1990.
4. Kehl LJ, Gogas KR, Lichtblau L, *et al.* The NMDA antagonist MK 801 reduces noxious stimulus-evoked Fos expression in the spinal cord dorsal horn, In: Bond MR, Chariton JE and Woolf CJ, eds. *Proc. 6th World Congress on Pain*. Elsevier. Amsterdam:307-311, 1991.
5. Morgan JI, Curran T. Role of ion flux in the control of *c-fos* expression. *Nature*, 322:552-555, 1992.
6. Murphy T, De Long MJ, Coyle JT. Enhanced NAD(P)H : quinone reductase activity prevents glutamate toxicity produced by oxidative stress. *J Neurochem*, 27: 620-625, 1991.
7. Craner SL, Lund JS, Hoffman GE, *et al.* Moving visual stimuli induce *c-fos* expression in the visual cortices of the rat. *Soc Neurosci Abst*, 17:487, 1990.
8. Wu MF, Fahringer HM, Kilduff TS, *et al.* Neuronal mechanisms of acoustic startle reflex: anatomical analysis using *c-fos*. *Soc Neurosci Abst*, 17:187.14, 1992.
9. Kaufman GD, Anderson JH, Beitz AJ. Activation of a specific vestibulo-olivary pathway following centripetal acceleration in the rat. *Brain Res*, 562:311-317, 1991.
10. Adams JC. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem*, 40:1476-1463, 1992.
11. Berghorn KA, Bonnett JH, Hoffman GE. *c-Fos* immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *J Histochem Cytochem*, 42:1635-1642, 1994.
12. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd. ed. Academic Press, Australia, 1986.
13. Tossman U, Ungerstedt U. Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. *Acta physiol Scand*, 128:9-14, 1986.
14. Hagberg H, Andersson P, Lazarewicz J, *et al.* Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem*, 49:227-231, 1987.
15. Damsma G, Westerink BHC, De Vries JB, *et al.* Measurement of acetylcholine release in freely moving rats by means of automated intracerebral dialysis. *J Neurochem*, 48:1523-1528, 1987.
16. Benveniste H, Diemer MH. Early postischemic Ca accumulation in rat dentate hilus. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8:713-719, 1988.
17. Renno WM, Mullett MA, Beitz AJ. Systemic morphine reduces GABA release in the lateral but not the medial portion of the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Brain Res*, 594:221-232, 1992.
18. Young AMJ, Bradford HF. Excitatory amino acid neurotransmitters in the corticostriate pathway: studies using intracerebral microdialysis *in vivo*. *J Neurochem*, 47:1399-1404, 1986.
19. Church WH, Justice JB, Neill DB. Detecting behaviorally relevant changes in extracellular dopamine with microdialysis. *Brain Res*, 412:397-399, 1987.
20. Curran T, Teich NM. Identification of a 39,000 dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus. *Virology*, 116:221-235, 1982.
21. Doucet SP, Squinto SP, Bazan NG. Fos-Jun and the primary genomic response in the nervous system: Possible physiological role and pathophysiological significance. N.G. Bazan (Eds.), *Molecular Neurobiology*, The Humana Press Inc., Clifton, NJ, 27-55, 1990.
22. Greenberg M, Greene L, Ziff E. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*, 234:80-83, 1986.
23. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Rev Neurosci*, 14:421-451, 1991.
24. Murphy TH, Worley PF, Baraban JM. L-type voltage

- sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron*, 7:625-635, 1991.
25. Muller R, Bravo R, Buckland J, *et al.* Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature*, 312:716-720, 1984.
  26. Renz M, Verrier B, Kurz C, *et al.* Chromatin association and DNA-binding properties of the *fos* proto-oncogene product. *Nuc Acids Res*, 15:277-292, 1987.
  27. Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4:477-485, 1990.
  28. Naranjo JR, Bellstrom B, Achaval M, *et al.* Molecular pathways of pain: Fos/Jun-mediated activation of a non canonical AP-1 site in the prodynorphin gene. *Neuron*, 6:607-617, 1991.
  29. Lee JH, Beitz AJ. The distribution of brain-stem and spinal cord nuclei associated with different frequencies of electroacupuncture analgesia. *Pain*, 52:11-28, 1993.
  30. Yaksh TL. Central nervous system sites mediating opiate analgesia. In JJ Bonica (ed.) *Advances in pain research and therapy*, Raven, New York, 3:229-259, 1979.
  31. Depaulis A, Morgan MM, Liebeskind JC. GABAergic modulation of the analgesic effect of morphine microinjected in the ventral periaqueductal gray matter of the rat. *Brain Res*, 436:223-228, 1987.
  32. Beitz AJ. Anatomic and chemical organization of descending pain modulation systems. In C.E. Short and A.V. Poznak (ed.), *rat Pain*, Livingstone Press, New York, 31-62, 1991.
  33. Reichling DB, Basbaum AI. Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls, I. GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus. *J Comp Neurol*, 302:370-377, 1990.
-