

몽고리안 저빌에서 뇌허혈시 GR89696이 parvalbumin 발현 신경세포에 미치는 영향

권영배 · 양일석 · 이장헌

서울대학교 수의과대학 생리학교실
(1998년 10월 7일 접수)

Effects of GR89696 on parvalbumin positive neurons after cerebral ischemia in the Mongolian gerbil

Young-bae Kwon, Il-suk Yang, Jang-hern Lee

Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received Dec. 7, 1998)

Abstract : Ischemic damage in the selectively vulnerable populations of neurons is thought to be caused by an abnormal accumulation of intracellular calcium. It has been reported that the neurons, expressing specific calcium binding proteins, might effectively control intracellular calcium concentrations because of a high capacity to buffer intracellular calcium in the brain ischemic condition. It is uncertain that parvalbumin, one of the calcium binding proteins, can protect the neurons from the cerebral ischemic damage. Recently, treatment of kappa opioid agonists increased survival rate, improved neurological function, and decreased tissue damage under the cerebral ischemic condition. Many evidences indicate that these therapeutic effects might result from regulation of calcium concentration.

This study was designed to analyze the changes of number in parvalbumin-positive neurons after cerebral ischemic damage according to timepoints after cerebral ischemic induction. In addition, we evaluated the effect of GR89696 (kappa opioid agonist) or naltrexone(non selective opioid antagonist) on the changes of number in parvalbumin expressing neurons under ischemic condition.

Cerebral ischemia was induced by occluding the common carotid artery of experimental animals. The hippocampal areas were morphometrically analyzed at different time point after ischemic induction(1, 3, 5 days) by using immuno-histochemical technique and imaging analysis system.

The number of parvalbumin-positive neurons in hippocampus was significantly reduced at 1

본 연구는 '96년도 보건 의료기술 연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.

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

day after ischemia($p < 0.05$). Furthermore, the number of parvalbumin-immunoreactive neurons was dramatically reduced at 3 and 5 days after cerebral ischemic induction($p < 0.05$) as compared to 1 day group after ischemia, as well as sham control group. Significant reduction of parvalbumin positive neurons in CA1 region of hippocampus was observed at 1 day after cerebral ischemic induction. However, significant loss of MAP2 immunoreactivity was observed at 3 day after cerebral ischemia. The loss of parvalbumin-positive neurons and MAP2 immunoreactivity in CA1 region was prevented by pre-administration of GR89696 compared to that of saline-treated ischemic group. Furthermore, protective effect of GR89696 partially reversed by pre-treatment of naltrexone.

These data indicate that parvalbumin-positive neurons more sensitively responded to cerebral ischemic damage than MAP2 protein. Moreover, this loss of parvalbumin-positive neurons was effectively prevented by the pretreatment of kappa opioid agonist. It was also suggested that the changes of number in parvalbumin-positive neurons could be used as the specific marker to analyze the degree of ischemic neuronal damage.

Key words : cerebral ischemia, parvalbumin, kappa opioid, naltrexone, mongolian gerbil.

서 론

혈액공급 차단으로 인한 산소 및 에너지원의 부족이 유발되는 뇌허혈 상태에서 중추신경계를 구성하는 신경세포들은 다양한 병태생리화학적 반응을 보이며 특정영역에 존재하는 신경세포들은 허혈로 인해 쉽게 손상을 입는 것으로 알려져 있다. 이러한 현상을 허혈에 대한 '선택적 취약성(selective vulnerability)'이라고 하며¹, 이들 신경세포에서 관찰되는 손상은 허혈로 인해 유도되는 세포내 과도한 칼슘의 축적 때문인 것으로 알려져 있다^{2,3}. 따라서 뇌허혈시 세포내 칼슘농도를 조절할 수 있는 능력을 가진 신경세포들의 역할에 대해 관심이 집중되고 있다⁴.

Calcium binding protein의 하나인 parvalbumin은 해마부위에서 신경세포에서 관찰되며 이들 신경세포는 허혈 손상에 상대적 저항성을 보이는 것으로 알려져 있는 GABAergic 신경세포로 밝혀져 있어 허혈로 인한 신경세포의 손상에 저항성을 나타내는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁷. 한편 Tortosa와 Ferrer⁸는 대뇌 허혈을 유발시킨 mongolian gerbil의 parvalbumin 발현 신경세포들도 시간적인 차이는

있으나 허혈로 인해 손상을 입는 것으로 보고하였다. 이러한 상반된 결과로 미루어 볼 때 parvalbumin 발현 신경세포들이 허혈후 다른 신경세포에 비해 저항성을 갖는지의 여부 및 허혈로 인한 신경세포 손상기전에서의 parvalbumin 발현 신경세포의 역할규명이 필요하며 나아가 허혈유발후 시간경과에 따른 parvalbumin 발현 신경세포의 반응에 대한 연구가 필요한 실정이다.

최근에 들어 허혈시 일어나는 신경세포의 손상기전에 있어 내인성 opioid peptide들의 역할에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다⁹. 특히 kappa opioid agonist로 알려진 dynorphin-A, U50488H, U62066E, GR89696(GR) 및 CI-977 등은 허혈로 인한 신경세포의 손상을 감소시킨다고 보고되어 있다¹⁰⁻¹². 이러한 kappa opioid가 나타내는 신경세포의 손상에 대한 보호작용은 허혈로 인해 증가하는 glutamate의 유리역제¹³, 직접적인 NMDA receptor의 활성화¹⁴ 및 간접적인 voltage dependent Ca^{2+} current의 감소에 의해¹⁵ 뇌허혈시 일어나는 세포내 칼슘의 급격한 증가를 효과적으로 억제함으로써 일어날 것으로 추측된다. 따라서 본 실험에서는 허혈에 대한 치료효과가 보고된 바 있는 kappa agonist인 GR을 사용하여 이들 약물이 허혈시 일어나는 parvalbumin 발현 신경세포의 숫적인

변화에 미치는 영향을 검증하고자 하였다. 또한 이 약물이 신경세포의 구조적인 손상에 미치는 영향을 알아보기 위해 MPA2(microtubule-associated protein 2)의 염색을 실시하였다.

재료 및 방법

허혈의 유발 : 실험동물은 mongolian gerbil(체중 60g~90g)를 사용하였으며 경동맥 결찰법으로 대뇌허혈을 유발하였다. Mongolian gerbil을 3% isoflurane(70% N₂O와 30% O₂를 혼합)으로 흡입마취를 유도한 후 1.5%로 유지하면서 양측 경동맥을 microaneurysm clip을 사용하여 10분간 폐쇄하였다. 대뇌허혈 유발 전 과정에 걸쳐 rectal probe를 사용하여 체온을 측정하고, heating pad로 체온을 38℃ 이상 유지시켰다. Sham control은 허혈유발군과 동일한 방법으로 수술한 후 경동맥 폐쇄는 하지 않았다.

약물의 처치 : GR 처리군은 허혈유발 직전에 피하를 통해 GR(30µg/kg, RBI)을 투여하였으며 naltrexone 투여군의 경우 허혈유발 30분전에 피하로 naltrexone(10mg/kg, RBI)을 전처치하였다. GR 및 naltrexone을 동시에 투여군은 naltrexone을 허혈유발 30분전에 전처치한 후 GR을 피하투여하였으며, GR 투여 10분후에 허혈을 유발하였다. 대조군은 용매로 사용한 0.9% saline을 동일한 시간대에 피하주사하였다. 허혈을 유발한 4시간후에 동량의 약물을 2차 투여하였다. 약물처리가 끝나고 1일, 3일 및 5일이 경과한 실험동물에서 parvalbumin의 숫적인 변동을 관찰하였다.

조직의 처리 : 허혈유발후 각각 1일, 3일 및 5일이 경과한 실험동물을 5% isoflurane(70% N₂O와 30% O₂를 혼합)으로 심마취시킨 후 calcium free tyrode 용액 100ml를 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 동일한 고정액에서 4시간동안 처리하여 후고정하였으며 10%, 20%, 30% sucrose 용액에 차례로 침전시켜 조직이 동결시 손상되지 않도록 했다. 실온에서 24시간동안 sucrose 처리가 끝난 조직은 -20℃의 온도로 freezing stage에서 신속히 얼리고 sliding microtome을 사용하여 두께 40µm로 연속절편을 제작하여 면역조직화학법에 사용하였다.

면역조직화학 염색 : 본 실험에서 사용한 면역조직화

학법은 avidin-biotin peroxidase method를 사용하여 실시하였으며 항체의 비특이적 반응을 줄이고 단백질 검출의 민감도를 높이기 위해 biotin amplification 방법^{16,17}을 사용하였다.

Anti-mouse parvalbumin(Sigma)의 일차 항체는 1:40,000으로 anti-mouse MAP2(Sigma)의 일차 항체도 1:40,000으로 희석하여 각각 사용하였으며 4℃에서 24시간 반응시켰다. 일차 항체와 반응이 끝난 조직은 이차 항체인 rabbit anti-mouse IgG(vector, 1:200)를 실온에서 1시간 처리한 후 avidin-biotin complex(ABC: Vector, 1:250)을 실온에서 30분간 반응시켰다. 그후 biotinylated tyramine(BT: 1µl BT/ml PBS+0.005% H₂O₂)과 20분동안 실온에서 반응시켰으며 다시 ABC(1:500)와 실온에서 1시간동안 반응시켰다. ABC와 반응이 끝난 조직은 DAB반응으로 실온에서 발색시켰다. 각 단계마다 반응이 끝난 조직은 TPBS를 사용하여 잔류 항혈청을 씻어낸 후 다음 단계로 진행하였다.

통계처리 : 실험에 사용한 각 개체마다 bregma -2.56 mm에서 bregma -4.52mm 사이의 염색된 조직중 뇌경위도 상에서 bregma -3.14mm의 조직과 전후 약 0.2mm씩 간격을 두고 4개의 조직을 선택하여 총 5개 조직에서 parvalbumin 발현 신경세포의 수를 digital image analysis system(Meta-Morph, Universal Imaging Co.)을 이용하여 측정하였다. 얻어진 parvalbumin 발현 신경세포의 수에 대한 평균을 구하여 각 개체를 대표하는 값으로 정한 뒤 대조군의 값과 비교하여 Student *t*-test로 통계처리하였다.

결 과

대뇌 허혈시 해마에서 parvalbumin 발현 신경세포의 면역반응 및 수적변화 : 허혈로 인한 parvalbumin 발현 신경세포의 면역반응 변화 및 수적 변동을 관찰하기 위해 허혈유발후 1일, 3일 및 5일이 경과한 후 parvalbumin에 대한 면역조직화학법을 실시하였다. 허혈을 유발하지 않는 sham 대조군에서 CA1의 plexiform layer, CA3 area 및 dentate gyrus의 stratum granulare에서 다수의 parvalbumin 발현 신경세포가 관찰되었다(Fig 1A,C,E,G). 그러나 허혈유발 1일후부터 특히 CA1 부위에서 parvalbumin 발현 신경세포의 수가 70% 이상 감소하기 시작하여 3일과 5일이 경과함에 따라 parvalbumin 발현 신경세포의 손상

Table 1. Number of parvalbumin-immunoreactive neurons in the sham control and cerebral ischemia induced group

Time after reperfusion	CA1 region of Hippocampus		Total hippocampus and dentate gyrus	
	Sham	Ischemia	Sham	Ischemia
1 day	24.1±0.8	7.8±0.6*	77.4±1.6	52.2±2.9*
3 day	23.1±0.6	4.8±1.2*	76.1±2.1	51.8±3.1*
5 day	22.1±0.8	5.1±1.9*	77.5±1.9	44.4±2.5*

The numbers of parvalbumin immunoreactive neurons in CA1 region of hippocampus as well as total hippocampal area including CA1, CA2, CA3 and dentate gyrus, were significantly decreased at 1 day, 3 days and 5 days after ischemic induction compared to that of sham control group. Each value denotes the mean with SEM(n=3).

*: Significantly different from the values of sham-operated control group(p < 0.05).

정도가 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig 1-B, Table 1). 허혈유발후 CA2에서도 parvalbumin 발현 신경세포의 수가 감소하였으며 parvalbumin에 대한 염색성도 감소하여 5일 경과군에서는 신경섬유의 가지들이 관찰되지 않았다(Fig 1-D). 3일 경과군 및 5일 경과군의 CA3(Fig 1-F)와 dentate gyrus(Fig 1-H)에서도 역시 parvalbumin 발현 신경세포의 수와 염색성이 크게 감소하였다. 이와같이 parvalbumin 발현 신경세포수가 CA1, CA2, CA3 및 dentate gyrus를 포함한 해마전체에서 허혈유발후 시간경과에 따라 단계적으로 유의성 있게 감소하는 경향을 나타내었다(Table 1).

GR89696 및 naltrexone 처치가 parvalbumin 발현 신경세포의 수적 변화에 미치는 영향 : Saline 전처치후 허혈을 유발한 대조군의 CA1 부분에서 관찰된 parvalbumin 발현 신경세포의 수는 1일 경과군부터 대조군에 비하여 현저히 감소하기 시작하여 3, 5일 경과군에서 80% 이상의 감소를 나타내었다(Fig 2, Fig 3-B). 그러나 kappa opioid agonist인 GR을 전처치한 허혈유발군에서는 parvalbumin 발현 신경세포의 수 및 면역염색성의 감소가 관찰되지 않아 sham 대조군과 동일한 양상의 parvalbumin 발현 신경세포의 면역염색성 및 수를 나타내었다(Fig 2, Fig 3-C). Opioid 수용체의 비선택적 길항제로 알려진 naltrexone을 전처치한 후 허혈을 유발한 군에서는 saline을 투여한 대조군에 비해 허혈로 인한 parvalbumin 발현 신경세포의 숫자감소가 현저히 억제되었으나 GR 처치군에 비해서는 억제정도가 낮은 것으로 관찰되었다(Fig 2, Fig 3-D). Naltrexone과 GR을 동시에 투여한 경우 GR 투여군에서 관찰할 수 있었던 parvalbumin 양성 신경세포에 대한 보호효과가 길항되는 것으로 관찰되었으며 naltrexone 단독투여시와 유사한 결과를 관

찰할 수 있었다(Fig 2).

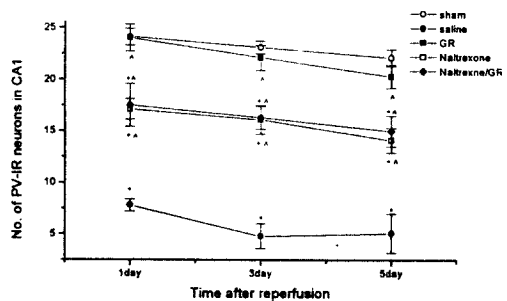


Fig 2. The number of parvalbumin-immunoreactive(PV-IR) neurons in hippocampal CA1 region of vehicle treated group, GR, and naltrexone treated group. *: Significantly different from the value of sham-operated control group(p < 0.05), ^: Significantly different from the values of saline treated group(p < 0.05).

허혈로 인한 신경세포의 MAP2의 손상 : 허혈로 인한 신경세포의 구조적 손상을 검증하기 위하여 대뇌 허혈유발후 MAP2 면역염색법을 실시하였다. MAP2 염색성은 sham 대조군에서 해마의 CA1, CA2, CA3 pyramidal cell layer와 dentate gyrus의 granular cell layer에서 신경세포의 섬유가지들에 강하게 관찰되었다(Fig 4-A). 투여약물의 vehicle인 saline을 투여하고 대뇌허혈 유발한 후 1일 경과군에서는 MAP2 면역염색성이 sham 대조군과 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나(Fig 4-B,G), 3일 경과군(Figure 4-C) 및 5일 경과군(Figure 4-D)에서는 각각 해마의 CA1 부분에서 염색성이 현저히 감소하였다. MAP2 면역염색성이 감소한 부분을 확대하여 관찰한 결과 신경세포 dendritic process의 구조적 손상이 관찰되었으며

대조군에서 관찰되었던 신경세포의 섬유가지들에서는 면역염색성을 관찰할 수 없었다(Fig 4-H). 한편 GR을 전 처치한 후 허혈을 유발한 군에서는 1일, 3일 및 5일 경과 군 모두에서 sham 대조군과 동일한 양상으로 MAP2 면역염색성이 유지되는 것으로 관찰되었다(Fig 4-E). Nal-trexone을 전 처치한 후 허혈을 유발한 경우 GR 투여군에 비해 MAP2 면역염색성이 현저히 감소하였으나 saline 투여군에 비해서는 손상정도가 억제되는 것으로 관찰되었다(Fig 4-F).

고 찰

중추신경계에서 칼슘은 신경전달물질의 분비, 신경세포의 신호전달 및 학습과 기억 등 다양한 생리적 현상에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁸. 그러나 비정상적으로 증가된 세포내 칼슘은 세포활성을 과도하게 증가시킴으로써 세포의 손상을 초래하는 것으로 알려져 있다¹⁹. 따라서 최근에 들어 비정상적으로 증가된 세포내 칼슘으로 야기되는 세포의 손상을 감소시키기 위해 세포내 칼슘농도의 조절기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다²⁰. 이들 조절기전중 칼슘과 높은 친화력으로 결합하여 세포내 칼슘농도를 조절하는 것으로 알려진 calcium binding protein인 calbindin D28k, parvalbumin 및 calretinin 등이 알려져 있으며 특히 calbindin-D28k와 parvalbumin은 칼슘의 운반과 세포내 칼슘의 완충역할을 담당하여 'transport/ buffer protein'이라고 알려져 있다²¹.

이러한 calcium binding protein은 칼슘과 높은 친화력으로 결합할 수 있는 EF hand family로 알려져 있으며 이중 parvalbumin을 생산하는 신경세포는 성숙한 rat의 해마부위에서 주로 관찰되고 일반적으로 허혈로 인해 증가된 세포내 칼슘농도를 조절할 수 있을 것으로 추측되고 있다¹⁹. 이외에도 parvalbumin이 안정상태에서 마그네슘과 결합하고 있다가 세포가 활성화되면 마그네슘을 칼슘과 교환하는 것으로 알려져 있어 마그네슘이 강력한 효소활성제라는 점을 감안할 때 여러 중간 대사과정과 인산화에 관계하는 효소들의 활성화에 관여하는 것으로 보고되고 있다¹⁹. 그러나 허혈로 인해 급격하게 증가된 세포내 칼슘농도를 parvalbumin이 어느 시기까지 조절할 수 있는지의 여부와 parvalbumin을 발현하고 있는 신경세포가 다른 신경세포들에 비해 허혈로 인한 신경세포의 손상에 저항성을 가지는가에 대해서는 연구가

미약한 실정이다.

본 실험은 대뇌 허혈유발후 허혈로 인한 parvalbumin 발현 신경세포의 수적변화를 관찰하기 위해 1일, 3일 및 5일이 경과한 군에서 parvalbumin에 대한 면역조직화학법을 실시하였다. 허혈유발군의 해마부위에서는 대조군과 비교하여 시간경과에 따라 parvalbumin 발현 신경세포의 수적감소 및 면역염색성의 감소를 관찰할 수 있었다. 특히 해마의 CA1에 발현된 parvalbumin 발현 신경세포들은 허혈유발후 다른 신경세포보다 허혈로 인해 시기적으로 빨리 손상받아 1일 경과군에서도 다른 부위에 비해 대조군과 현저한 차이를 보이며 감소한 것으로 관찰되었다. 허혈로 인한 parvalbumin 발현 신경세포의 수는 1일 경과군부터 5일군까지 지속적으로 감소되어 허혈유발 5일 경과군의 해마 CA1 부분에서 parvalbumin 발현 신경세포들을 거의 관찰할 수 없었다. 이와같이 CA1에 발현되어 있는 parvalbumin 발현 신경세포들이 다른 부위에 발현되어 있는 parvalbumin 발현 신경세포들보다 먼저 손상을 입는 것은 이 부분이 다른 부위보다 허혈손상에 대해 더 취약성을 가지고 있다고 보고한 Mossakowski *et al*²²의 연구결과와 일치한다.

위와 같은 parvalbumin 발현 신경세포의 감소가 관찰된 부위에서 다른 신경세포들의 허혈에 대한 손상정도를 알아보기 위해 허혈유발후 1일, 3일 및 5일 경과군의 해마 CA1, CA2, CA3 및 dentate gyrus를 중심으로 MAP2의 면역조직화학법을 실시하였다. MAP2는 신경세포의 dendritic process와 관련된 단백질로 허혈초기에 신경세포의 손상정도를 알 수 있는 marker로서 이용되고 있다. 대뇌허혈시 MAP2가 손상받는 기전에 대해서는 연구가 미약하나 갑자기 증가된 세포질내 칼슘의 농도증가로 인해 calcium-activated proteinase들이 활성화되어 MAP2의 급격한 손상을 가져오는 것으로 알려져 있다²³. 허혈유발후 1일 경과군에서 MAP2의 염색성은 CA1을 포함한 해마 전체에서 감소되지 않았으며 dendritic process의 구조도 유지되는 것으로 관찰되었다. 해마의 CA2, CA3와 dentate gyrus에서도 역시 MAP2의 염색성과 구조는 sham 대조군과 동일한 양상으로 나타났다. 그러나 대뇌 허혈에 의해 delayed neuronal cell death가 본격적으로 나타나는 것으로 알려져 있는 3일부터 해마의 CA1에서의 MAP2의 염색성이 감소하기 시작하여 5일 경과군에서는 감소의 정도가 대조군에 비해 현저하게 나타났다. 이러한 MAP2의 결과와 parvalbumin을 발현하고 있는 신경세

포의 소실시기를 비교해볼 때 parvalbumin 발현 신경세포가 다른 신경세포보다 허혈로 인한 신경손상에 더욱 민감하게 반응하는 것을 알 수 있다. 따라서 parvalbumin을 발현하는 신경세포가 허혈유발후 시간경과에 따라 수적인 변화를 나타내므로 허혈로 인한 신경세포의 손상정도를 평가할 수 있는 또다른 지표로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

최근에 들어 허혈시 일어나는 신경세포의 손상기전에 있어 내인성 opioid peptide들의 역할에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 허혈시에 내인성 mu opioid 수용체에 작용하는 것으로 알려진 beta-endorphin의 분비가 증가됨이 보고되어 있는 반면⁹ 내인성 kappa opioid 수용체에 작용하는 dynorphin의 경우 유리가 감소하며 dynorphin 생산에 관여하는 mRNA 또한 지속적으로 감소됨이 보고되었다^{24,25}. 이는 허혈시에 mu opioid 수용체의 활성은 증가하는 반면 kappa opioid 수용체의 활성은 상대적으로 감소하는 것을 의미하고 있다. 실제로 허혈시에 kappa opioid agonist인 dynorphin-A과 U50488H가 허혈손상부위를 감소시키며 뇌부종을 억제하여 생존율을 증가시키는 것으로 알려져 있다²⁶. 또한 kappa opioid agonist인 CI-977을 국소허혈에 적용하였을 때 뇌부종과 경색 및 신경세포 손상을 경감시키는 효과가 있음이 보고되었고¹², GR은 전뇌허혈과 국소허혈모델에서 모두 세포손상억제 효과를 나타내며 허혈이 유발된 후에 사용하여도 그 효과는 유효하다고 밝혀져 있다¹¹. 이들 kappa agonist가 가지는 허혈손상에 대한 억제기전은 voltage dependent Ca²⁺ current를 감소시키고¹⁵, presynaptic terminal에서의 glutamate의 유리를 감소시킴으로써 나타나는 것으로 알려져 있다¹³. 뿐만 아니라 kappa agonist는 NMDA receptor channel의 활성을 억제하는 것으로 보고되어 있어¹⁴, 허혈시 세포손상의 주요한 원인인 세포내 칼슘증가를 효과적으로 억제함으로써 효과를 나타내는 것으로 추측된다. 더욱이 Decoster *et al*²⁷은 또다른 kappa agonist인 enadoline이 NMDA 길항제인 MK-801과 같은 강도로 NMDA 수용체의 작용을 길항한다고 하였으며, dynorphin은 opioid수용체를 통하지 않고 직접적으로 NMDA 수용체의 활성을 억제한다고 보고하였다²⁸. NMDA 수용체의 선택적 길항제인 MK-801도 NMDA 수용체의 활성을 억제시킴으로써 칼슘의 유입을 차단하여 허혈에 대한 방어효과를 가지고 있다고 보고되어 있지만²⁹ MK-801은 허혈유발전에 미리 투여해야만 세포손상을 경감시키는 반면

kappa agonist인 GR은 허혈유발후에 투여하여도 효과를 보이는 것으로 알려져 있다³⁰. 본 실험에서는 GR을 전뇌 허혈시에 적용하였는데 허혈유발후 1일부터 손상을 보이기 시작한 parvalbumin의 수적인 감소가 효과적으로 억제되었을 뿐만 아니라 해마의 CA1 세포의 구조적 손상의 지표인 MAP2 단백질의 손상도 억제되었다. 여러 연구결과에서 나타난 결과와 같이 kappa agonist는 허혈손상에 세포내로의 과도한 칼슘유입을 억제하여 세포내의 칼슘농도가 과도하게 높아지는 것을 막는데 이러한 작용이 parvalbumin의 염색성의 보존과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 추측된다. 그러나 허혈시에 이러한 calcium binding protein이 어떠한 작용을 나타내는지에 대해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

한편 opioid의 비선택적인 길항제인 naloxone은 허혈손상을 경감시키고⁹ 혈류를 증가시킴으로써³¹ 생존율을 증가시키는 것으로 알려져 있다¹⁰. 그러나 다수의 실험자에 의해 이와 반대되는 결과 또한 제기되어 논란의 여지가 되고 있다^{32,33}. 본 실험에서 사용된 opioid의 비선택적인 길항제인 naltrexone은 GR에 비해 효과는 미약하나 허혈시 해마의 CA1에서의 parvalbumin의 감소를 60% 정도 감소시켰으며 MAP2의 염색성의 감소도 미약하나마 부분적으로 경감시켜 허혈에 치료효과를 보였다. 일반적으로 비선택적인 opioid 길항제는 kappa opioid 수용체에 작용하기 보다는 mu opioid 수용체의 활성을 훨씬 강력하게 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 naltrexone이 부분적으로만 parvalbumin과 MAP2 염색성을 보존시킨 것은 허혈손상을 증가시키는 것으로 보고된 mu opioid의 작용을 길항하는 동시에 kappa opioid 수용체의 보호 작용을 억제하는 데서 기인할 것으로 사료된다. 본 실험에서 GR과 naltrexone을 동시에 투여했을 때 GR의 세포손상 경감효과는 길항되어 없어지고 naltrexone 단독투여시와 같은 정도의 세포손상을 보이는 것으로 보아 GR의 효과가 opioid 수용체 매개성임을 시사하고 있다.

결 론

본 실험은 mongolian gerbil의 대뇌허혈시 calcium binding protein중의 하나인 parvalbumin 발현세포의 허혈유발 후 시간에 따른 수적 변동을 분석하고 kappa opioid 수용체의 선택적 agonist로 알려진 GR89696 및 opioid 수용체

의 비선택적 길항제인 naltrexone이 이들 parvalbumin 발현 신경세포의 면역염색성 및 수적변동에 미치는 영향에 대해 알아보려고 하였다. 이에 따른 실험결과는 다음과 같다.

1. 허혈유발 1일, 3일 및 5일후 parvalbumin 발현 세포의 수적 변동을 관찰한 결과 시간경과에 따라 해마에서 parvalbumin 발현 신경세포의 염색성과 수가 대조군에 비해 현저히 감소함을 관찰할 수 있었으며 특히 허혈손상에 민감한 CA1 부분은 허혈유발후 1일부터 parvalbumin 발현 신경세포의 현저한 수적 감소를 관찰할 수 있었다($p < 0.05$).

2. 허혈로 인한 신경세포의 구조적 손상을 관찰하기 위해 MAP2 면역조직화학법을 실시한 결과 허혈유발후 3일 경과군부터 해마의 CA1 부분에서 MAP2 염색성의 감소가 관찰되어 허혈유발후 1일경과 후부터 CA1 부분에서 현저한 수적 감소를 보인 parvalbumin 발현 신경세포가 다른 신경세포에 비해 허혈에 민감하게 반응함을 알 수 있었다.

3. Kappa opioid 수용체의 선택적 agonist인 GR89696을 전처치한 후 허혈을 유발한 결과 앞에서 관찰한 허혈로 인한 parvalbumin 발현 신경세포의 수적 감소가 유의성 있게 억제($p < 0.05$)되는 것으로 나타났다. Saline을 투여한 대조군의 경우에는 허혈로 인한 parvalbumin 발현 신경세포의 수적 감소가 시간경과에 따라 관찰되었다.

4. Opioid 수용체의 비선택적 길항제인 naltrexone을 전처치한 후 허혈을 유발한 결과 GR89696에 의해 억제되었던 신경세포의 손상이 부분적으로 길항됨을 관찰할 수 있었다.

위의 결과로 비추어 보아 parvalbumin 발현 신경세포는 허혈손상에 대해 다른 신경세포보다 민감하게 반응하여 대뇌허혈로 인한 신경세포의 손상을 측정할 수 있는 또다른 marker로 사용이 가능할 것으로 사료되며 이를 바탕으로 kappa opioid 수용체의 agonist인 GR89696이 허혈로 인한 신경손상을 효과적으로 억제함을 관찰할 수 있었다.

Legends of figures

Fig 1. Parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the mongolian gerbil.

Parvalbumin immunoreactive neurons (arrow) were distributed in the CA1 (A,B), CA2 (C,D), CA3 (E,F), dentate gyrus (G,H) of sham control group (A,C,E,G) and 5 days group after ischemic induction (B,D,F,H). Bar = 50 μ m. Parvalbumin immunoreactive neurons were bipolar or multipolar neurons with slender dendritic processes distributed in the plexiform layer of CA1 region (A,B), pyramidal and granular layers of CA2 (C,D), CA3 (E,F) and dentate gyrus (G,H). The immunoreactivity and number of parvalbumin immunoreactive neurons were significantly decreased in ischemia induced group compared to those of sham control.

Fig 3. Parvalbumin immunoreactivity in hippocampal CA1 region of vehicle treated group, GR, and naltrexone treated group. Parvalbumin immunoreactive neurons (arrows) were observed in the sham control(A), saline-pretreated ischemic group(B), GR treated group(C), and naltrexone treated group(D). Bar=200 μ m.

Fig 4. MAP2 immunoreactivity in hippocampus. Intensive immunoreactivity of MAP2(arrowhead) was observed in the hippocampus of sham control group (A), 1 day group (B), and GR treated group(E). MAP2 immunoreactivity was significantly decreased in 3 days group (C), 5 days group (D) after ischemic induction. Moderate decrease in MAP2 immunoreactivity was observed in the naltrexone treated group (F). Bar = 200 μ m. High magnification of CA1 region in 3 days group (H, arrow) demonstrated significant reduction of MAP2 immunoreactivity compared to 1 day group (G, arrow) after ischemic induction. Bar=50 μ m.

Fig 1.

- 41 -

Fig 3.

Fig 4.

Fig 4.

참 고 문 헌

1. Kirino T, Tamura A, Sano K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta neuropathol (Berl)*, 64:139-147, 1984.
2. Andine P, Jacobson I, Hagberg H. Calcium uptake evoked by electrical stimulation is enhanced postischemically and precedes delayed neuronal death in CA1 of rat hippocampus: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8:799-807, 1989.
3. Deleo J, Toth L, Schubert P, *et al.* Ischemia induced neuronal cell death, calcium accumulation, and glial response in the hippocampus of the mongolian gerbil and protection by propentofylline. *J Cereb Blood Flow Metab*, 7:745-751, 1987.
4. Schurr A, Rigor BM. Cerebral Ischemia and Resuscitation. *CRC Press*, 1990.
5. Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, *et al.* Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp Brain Res*, 72:347-362, 1988.
6. Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, *et al.* GABAergic neurons containing the Calcium binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res*, 419:119-130, 1987.
7. Nitsch C, Scotti AL, Sommacal A, *et al.* GABAergic hippocampal neurons resistant to ischemia induced delayed neuronal death contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Neurosci Lett*, 118:147-150, 1989.
8. Tortosa A, Ferrer I. Parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the gerbil after transient forebrain ischemia: A qualitative and quantitative sequential study. *Neuroscience*, 55:33-43, 1993.
9. Hosobuchi Y, Baskin DS, Woo SK. Reversal of induced ischemic neurological deficits in gerbils by the opiate antagonist naloxone. *Science*, 215:69-71, 1982.
10. Baskin DS, Kuroda H, Hosobuchi Y, *et al.* Treatment of stroke opiate antagonists-effects of exogenous antagonists and dynorphin 1-13. *Neuropeptides*, 5:307-

- 310, 1985.
11. Birch PJ, Rogers H, Hayes AG, *et al.* Neuroprotective actions of GR89696, a highly potent and selective κ -opioid receptor agonist. *British J Pharmacol*, 103:1819-1823, 1991.
 12. Kusmoto K, Mackay KB, MacCulloch J. The effect of the kappa-opioid agonist CI-977 in rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 576:147-151, 1992.
 13. MacKay KB, Galbraith TR, Woodruff GN, *et al.* The relationship between glutamate release and cerebral blood flow after focal cerebral ischemia in the cat: effect of pretreatment with enadoline(a kappa receptor agonist). *Brain Res*, 712:329-334, 1996.
 14. Gu Y, Huang LY. Mechanism of action for the block of NMDA receptor channel by the opioid peptide dynorphin. *J Neurosci*, 15(6):4602-4611, 1995.
 15. Gross RA, MacDonald RL. Dynorphin A selectively reduces a large transient(N-type) calcium current of mouse dorsal root ganglion neurons in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:5469-5473, 1987.
 16. Adams JC. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem*, 40:1457-1463, 1992.
 17. Berghorn KA, Bonnett JH, Hoffman GE. c-Fos Immunoreactivity is enhanced with biotin amplification. *J Histochem Cytochem*, 42:1635-1642, 1994.
 18. Eccles JC. Calcium in long term potentiation as a model for memory. *Neuroscience*, 10:1071-1081, 1983.
 19. Celio MR. Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science*, 231:995-997, 1986.
 20. Baudry M, Bundman M, Smith E, *et al.* Micromolar calcium stimulates proteolysis and glutamate binding in rat brain synaptic membranes. *Science*, 212:937-938, 1981.
 21. Heizmann CW. Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein: distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia*, 40:910-921, 1984.
 22. Mossakowski MJ, Gadamski R. Nimodipine prevents delayed neuronal death of sector CA1 pyramidal cells in short-term forebrain ischemia in mongolian gerbils. *Stroke*, 21(suppl IV):IV120-IV122, 1990.
 23. Kitagawa K, Matsumoto M, Handa N, *et al.* Prediction of stroke-prone gerbils and their cerebral circulation. *Brain Res*, 479:263-269, 1989.
 24. Fried RL, Nowak TS. Opioid peptide levels in gerbil brain after transient ischemia: lasting depletion of hippocampal dynorphin. *Stroke*, 18:765-770, 1987.
 25. Heron A, Traiffort E, Allix M, *et al.* Prodynorphin mRNA expression in the rat dentate gyrus after cerebral ischemia. *Neuropeptide*, 30(4):355-358, 1996.
 26. Baskin DS, Widmayer MA, Browning JL, *et al.* Evaluation of delayed treatment of focal cerebral ischemia with three selective κ -opioid agonist in cats. *Stroke*, 25:2047-2054, 1994.
 27. DeCoster MA, Conover JR, Hunter JC, *et al.* The neuroprotective κ -opioid CI-977 alters glutamate-induced calcium signaling *in vitro*. *NeuroReport*, 5:2305-2310, 1994.
 28. Chen L, Gu Y, Huang LY. The opioid peptide dynorphin directly blocks NMDA receptor channels in the rat. *J Physiol*, 482(3):575-581, 1995.
 29. Gass P, Herdegen T, Bravos R, *et al.* Induction and suppression of immediate early genes in specific rat brain regions by the non-competitive N-methyl-D-Aspartate receptor antagonist MK-801. *Neuroscience*, 53:749-758, 1993.
 30. Hayward NJ, McKnight AT, Woodruff GN. The neuroprotective effect of κ -opioid agonists in the gerbil. *Mol Neuropharmacol*, 2:221, 1992.
 31. Avery SF, Crockard H, Russel RW. Improved survival following severe cerebral ischemia using naloxone. *J Cereb Blood Flow Metab*, 3(Suppl 1):S331-S332, 1983.
 32. Holaday JW, D'amato RJ. Naloxone or TRH fails to improve neurological deficits in gerbil model of Stroke. *Life Sci*, 31:385-392, 1982.
 33. Tang AH. Protection from cerebral ischemia by U-50,488E, a specific kappa opioid analgesic agent. *Life Sci*, 37:1475-1482, 1985.