

Kainic Acid로 처리한 해마박편배양 마우스 간질모델에서 치아이랑 Parvalbumin 면역 반응성 사이신경세포의 형태학적 변화

가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실, 생리학교실*

정희선 · 신미영 · 김영훈 · 이인구 · 황경태 · 김명석*

The Morphologic Changes of Parvalbumin- Immunoreactive Interneurons of the Dentate Gyrus in Kainate-Treated Mouse Hippocampal Slice Culture Epilepsy Model

Hee Sun Chung, M.D., Mi-Young Shin, M.D., Young-Hoon Kim, M.D.
In-Goo Lee, M.D., Kyung-Tai Whang, M.D. and Myung-Suk Kim, M.D.*

Department of Pediatrics and Physiology*, College of Medicine,
The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose : Loss of hippocampal interneurons in dentate gyrus has been reported in patients with severe temporal lobe epilepsy and in animals treated with kainic acid(KA). Interneurons contain Ca²⁺- binding protein parvalbumin(PV). The effects of kainic acid on parvalbumin-immunoreactive (PV-IR) interneurons in dentate gyrus were investigated in organotypic hippocampal slice cultures.

Methods : Cultured hippocampal slices from postnatal day nine C57/BL6 mice were exposed to 10 μM KA, and were observed at 0, 8, 24, 48, 72 hours after a one hour KA exposure. Neuronal injury was determined by morphologic changes of PV-IR interneuron in dentate gyrus.

Results : Transient(1 hour) exposure of hippocampal explant cultures to KA produced marked varicosities in dendrites of PV-IR interneuron in dentate gyrus and the shaft of interbeaded dendrite is often much thinner than those in control. The presence of varicosities in dendrites was reversible with KA washout. The dendrites of KA treated explants were no longer beaded at 8, 24, 48 and 72 hours after KA exposure. The number of cells in PV-IR interneurons in dentate gyrus was decreased at 0, 8 hours after exposure. But there was no significant difference in 24, 48 and 72 hours recovery group compared with control group.

Conclusion : The results suggested that loss of PV-IR interneurons in dentate gyrus is transient, and is not accompanied by PV-IR interneuronal cell death. (J Korean Pediatr Soc 2002;45:1551-1558)

Key Words : Kainic acid, Interneuron, Parvalbumin-immunoreactivity, Dentate gyrus

본 연구는 보건복지부 뇌의약학 연구개발사업(HMP-99-N-02-0003) 연구비 지원으로 이루어졌음.

접수 : 2002년 7월 24일, 승인 : 2002년 9월 13일

책임저자 : 김영훈, 가톨릭의대 의정부성모병원 소아과

Tel : 031)820-3000 Fax : 031)820-3104

E-mail : pedkyh@catholic.ac.kr

서 론

경련성 질환을 일으키는 세포기전으로는 주신경세포

의 소실, 신경교증, 가지돌기의 소실 등이 있지만 최근에는 해마의 억제성 사이신경세포의 손상이 간질발생과 관련된다고 알려져 있다¹⁻⁵⁾. 또한 간질동물모델과 간질환자 모두에서 다양한 사이신경세포의 손상이 관찰되고 있다⁶⁻¹²⁾. 척추동물 중추신경계통에서 억제성연접은 신경전달물질인 γ -aminobutyric acid(GABA)에 의하여 주로 매개된다. GABA 활성의 이상은 신경세포의 과흥분으로 이어지고, 이것이 간질발생과 관련된다. 따라서 GABA 활성을 향진시키는 항경련제는 경련치료에 효과적인 것이다¹³⁾.

측두엽간질은 성인에서 가장 흔한 경련성 질환으로 해마에 경화현상이 있으면 다른 국소성 간질에 비하여 항간질약제에 의한 치료효과가 불량한 것으로 알려져 있다. 특히 내측두엽간질은 약물치료 보다는 수술치료로서 발작 조절의 예후가 양호하다는 주장이 대두되어 측두엽간질에 대한 수술이 활발히 시행되고 있다^{14, 15)}. 측두엽간질 환자의 수술 병변에서 발견되는 조직병리학적 소견 중에서 억제성 사이신경세포의 선택적 소실이 해마경화를 동반한 측두엽간질의 병태생리에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 비록 억제성 사이신경세포는 해마에 존재하는 신경세포 중 소수에 불과하지만 이들의 광범위한 축삭분지는 많은 수의 추체세포와 연접을 형성하고 있다⁴⁾. 따라서 사이신경세포 흥분성의 조절은 전체 해마의 출력을 변화시키는 직접적인 역할을 할 수 있다¹⁷⁾.

중증 측두엽간질환자와 kainic acid(KA)로 처리한 측두엽간질동물모델에서 해마의 사이신경세포가 소실되어 있으며, 특히 parvalbumin(PV) 면역반응성 사이신경세포는 cornus ammonis(CA)1과 치아이랑에서 비가역적으로 소실되는 것으로 보고되고 있다^{18, 19)}. 칼슘결합단백질인 PV는 해마의 경우 억제성 사이신경세포에만 존재하는 것으로 알려져 있고, 해마에서 PV는 GABA성 사이신경세포의 일부에서 발현되는데 이들은 바구니세포와 축삭-축삭세포로서 방추층이나 치아이랑의 파립층 가까이에 주로 존재한다^{20, 21)}. 최근에 Loup 등¹⁶⁾은 해마경화를 동반한 측두엽간질 환자의 해마조직에서 GABA_A 수용체 발현 사이신경세포의 소실을 CA1, CA3 및 치아이랑에서 관찰하였으며, 살아있는 사이신경세포일지라도 가지돌기가 변형되어있음을 관찰하였다. 이와 유사한 변화양상은 신경세포 추적법이나 면역조직화학법을 통하여도 밝혀졌다^{12, 22)}. 해마나 치아이랑에 존재하는 이들 억제성 사이신경세

포의 소실이나 형태학적 변화는 동물모델과 인간에서 경련을 일으키는 중요한 요소인 것으로 생각되며, 따라서 측두엽간질에서 간질발생과 관련하여 치아이랑의 사이신경세포의 형태학적 혹은 전기생리학적 이상에 대한 연구는 중요한 과제중의 하나이다. 특히 경련 및 경련지속상태에 대한 감수성은 연령 의존적이며 흰쥐의 경우 생후 9-19일 사이에 가장 높은 것으로 알려져 있다²³⁾.

이 논문에서는 9일된 마우스해마를 기관형 배양시킨 후 KA로 처리하여 측두엽간질 모델을 만들었으며 억제성 사이신경세포에 특이한 칼슘결합단백인 PV의 항체를 이용한 면역조직화학법으로 치아이랑에 분포하는 PV 면역반응성 사이신경세포를 감별염색하여 세포체 및 가지돌기의 형태학적 변화를 광학현미경으로 관찰함으로써 측두엽간질의 병태생리의 일단을 규명하고자 한다.

대상 및 방법

1. 해마조직박편의 제작과 배양

이 실험에 사용한 동물은 출생 후 9일된 C57/BL6 마우스로서 Stoppini 등²⁴⁾의 방법에 의거하여 무균환경에서 적출한 해마박편을 배양하였다. 마우스에서 적출한 해마를 관상단면으로 절단하여 375 μ m 두께의 박편을 만들었다. 해부액은 Hank's balanced salt solution(HBSS)(Gibco Brl, USA)과 14 mM D-glucose(Gibco, USA)로 만들었다. 각 해마는 조직절단기를 사용하여 전체길이를 따라 절단한 뒤 조직박편을 해부현미경으로 보고 형태학적으로 사용할 수 있는 것을 선택하였다. 이 조직박편을 Millipore막(Bedford, USA)(3-4 박편/막)에 놓고 막을 멸균된 6 공배양용기(6 well tray)에 위치시키고 배양액에 잠기도록 하였다.

배양액은 25% 말 혈청(Summi Biotechnologies, USA), 50% minimum essential medium(MEM; Gibco Brl, USA), 24% HBSS, L-glutamine(200 mM; Gibco, USA)로 하였다²⁴⁾. 배양액은 멸균 여과하여 pH 7.11-7.13에 맞추었다. 배양된 조직박편은 배양기(37°C; 5% CO₂)에서 약물로 처리하기 전 1주일 동안 안정화시켰다.

2. 대조군과 실험군의 설정

실험은 대조군과 실험군으로 나누어 대조군에서는 배양된 조직박편을 새로운 배양액으로 1시간 동안 처리하였으며 실험군은 5군으로 나누어 10 μM Kainic acid(KA; Sigma, USA)를 1시간 동안 처리한 군(KA 처리군), 1시간 동안 KA로 처리한 후 KA를 제거한 배양액에서 8시간 배양한 군(KA제거 후 8시간 회복군), 24시간 배양한 군(KA제거 후 24시간 회복군), 48시간 배양한 군(KA제거 후 48시간 회복군), 72시간 배양한 군(KA제거 후 72시간 회복군)으로 나누었다. 각 군의 조직박편은 4°C, 4% paraformaldehyde완충 용액에 하루 동안 고정하였다.

3. 면역조직화학염색

고정 후 모든 조직박편은 조심스럽게 Millipore막에서 들어올려 각각의 시험관에 넣고 0.05 M Tris buffered saline(TBS, pH 7.2)으로 자유부유(free-floating)시켜 세척하였다. 조직은 내인성 peroxidase를 차단하기 위하여 30분 동안 3% hydroxidase peroxide(Sigma, USA)에 처리한 후 10-15분 간격으로 TBS로 3회 세척하였다. 이후 2시간 동안 차단단계(blocking step)를 시행하였다. 차단액은 TBS에 10% 정상 말 혈청(NHS; Gibco, USA), 1% 소 혈청 알부민(BSA; Boehringer Mannheim, USA), 0.3% triton X-100(Sigma, USA), 0.1% sodium azide(Sigma, USA)로 하였다. 이후 조직박편은 일차항체가 포함된 용액에 4°C에서 24시간 처리하였다. 일차항체 용액은 TBS에 5% NHS, 0.25% BSA, 0.3% triton X-100, 0.1% sodium azide, 그리고 단일클론항체 antiparvalbumin(1 : 4,000, Sigma, USA)으로 하였다. 다시 조직박편을 TBS로 3회 세척하고 5% NHS와 0.3% triton X-100이 포함된 TBS에 녹인 horse anti-mouse antibody(1 : 200, Vector, USA)로 처리하였으며, 이어서 TBS로 3회 세척하고 avidin-biotin complex solution(ABC)(Vector, USA)으로 1시간 30분 가량 처리하였다. 이후 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)(Sigma, USA)를 이용한 정색반응에 앞서 TBS에 3회 세척하였다.

정색반응은 TB(0.1 M, pH 7.2)에 녹인 0.25% DAB(Sigma, USA)과 2% nickel ammonium sulfate(Fisher, USA)로 10분간 사진처리 하였고, hy-

drogen peroxide(최종농도가 0.0008%)(Sigma, USA)한 방울을 첨가하였다. 정색반응단계에서의 반응도는 광학현미경으로 관찰하면서 결정하였으며 이 반응은 TBS로 세척하면서 중단시켰다. 모든 조직 슬라이드는 공기 중에서 말려 DPX 봉입액과 유리 coverslip으로 덮어 봉입하였다.

4. 형태학적 변화에 대한 분석

모든 군의 표본에서 PV 면역반응성 사이신경세포의 형태학적 변화를 정량하고 비교 관찰하였다. 광학현미경에서 100배 확대하여 치아이랑경계를 정하고 경계내의 모든 PV 면역반응성 사이신경세포의 수를 각 군당 10개의 박편을 택하여 계수하였으며 200배 확대된 상태에서 PV 면역반응성 사이신경세포의 형태학적 변화와 돌기의 변화를 관찰하였다.

4. 통계분석

모든 군에서의 PV 면역반응성 사이신경세포의 수는 평균±표준편차로 표시하였으며 대조군과 실험군 간 성적의 통계학적 유의성은 Student's t-test로 결정하였고 유의수준은 5% 이하로 하였다.

결 과

1. 대조군에서 PV 면역반응성 사이신경세포

치아이랑에서 PV 면역반응성 사이신경세포의 세포체는 과립층과 이층에 가까운 다형층에 집중적으로 분포되어 있었으며(Fig. 1A), 분자층에는 거의 없었다. 사이신경세포는 많은 돌기가 나 있는 다극신경원이었으며, 세포체에서 뻗어온 몇 개의 1차 가지돌기로부터 많은 2차 및 3차 가지돌기들이 광범위하게 퍼져 있고, 축삭은 과립세포의 세포체, 근위 가지돌기 및 축삭에까지 이르고 있었다.

2. 실험군에서 PV 면역반응성 사이신경세포

배양 중인 해마조직박편에 10 μM KA를 1시간 처리한 치아이랑에서 PV 면역반응성 사이신경세포의 수는 감소하였다. PV 면역반응성 사이신경세포의 돌기에는 염주상이 형성되었다(Fig. 1B). 염주상은 1차 가지돌기보다 2차, 3차 가지돌기에서 더욱 뚜렷하게 보였다. 일반적으로 염주상의 크기는 다양하였다. 염주상사이의 가지돌기 두께는 대조군의 가지돌기와 비

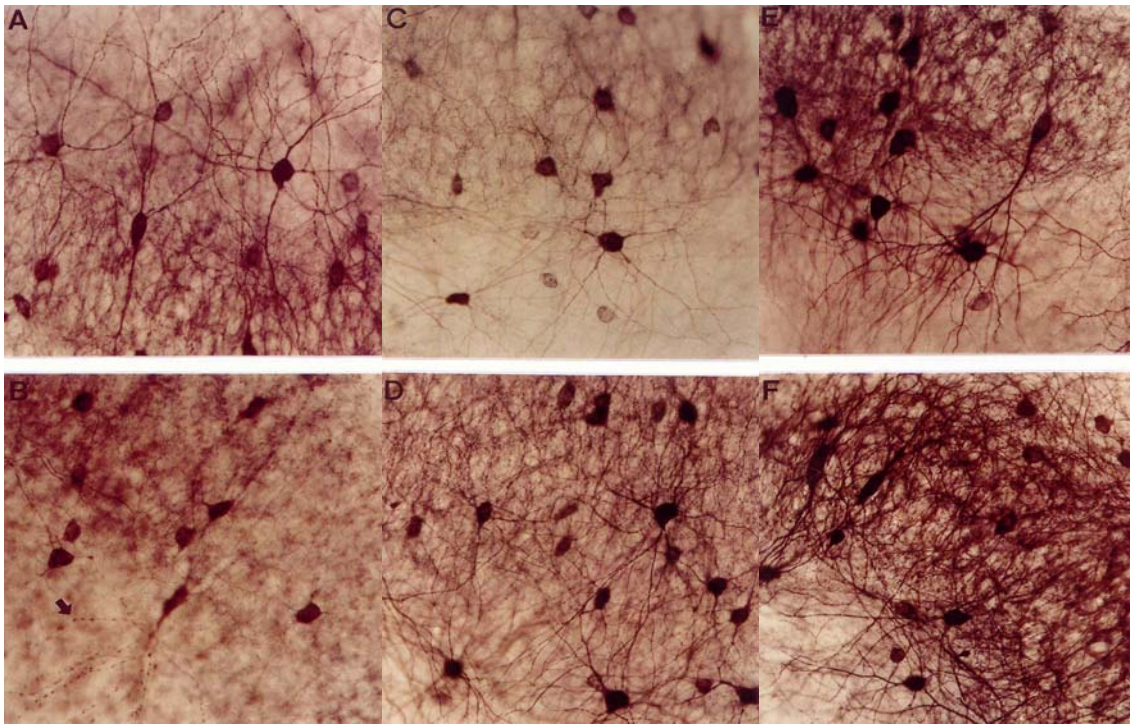


Fig. 1. PV-immunoreactive interneurons with radial dendritic trees are mainly scattered in the granular layer of the dentate gyrus in mouse hippocampal slice culture. **(A)** In control explant, somas and their dendrites have a normal appearance. **(B)** In explant exposed for 1 hour to 10 μ M KA, PV-IR interneurons have fine dendrites with numerous varicosities(arrow). **(C)** Explant exposed 10 μ M KA for 1 hour and subsequently returned to normal culturing media for 8 hours. The dendrites of PV-IR interneurons have thin dendrites without varicosities. **(D)** Explant exposed 10 μ M KA for 1 hour and subsequently returned to normal culturing media for 24 hours. The PV-IR interneurons are similar to the control in morphology of their soma and dendritic trees. **(E)** Explant exposed 10 μ M KA for 1 hour and subsequently returned to normal culturing media for 48 hours. **(F)** Explant exposed 10 μ M KA for 1 hour and subsequently returned to normal culturing media for 72 hours. The morphology of somas and dendrites of PV-IR interneurons have been recovered to the control. Magnification, $\times 200$. KA : kainic acid, PV : parvalbumin, PV-IR : parvalbumin immunoreactive.

교하여 가늘어져 있었다.

PV 면역반응성 사이신경세포는 KA 처리 후 KA 를 제거한 뒤 시간경과에 따라 형태학적 회복을 보여 KA 제거 후 8시간 회복군에서는 염주상은 거의 볼 수 없었으며 가지돌기는 가늘어져 있었다(Fig. 1C). 그리고 KA 제거 후 24시간 회복군, KA 제거 후 48 시간 회복군, KA 제거 후 72시간 회복군에서도 염주 상은 거의 볼 수 없었으며 가지돌기의 두께는 KA 제 거 후 8시간 회복군보다는 두꺼워져 KA 제거 후 72 시간 회복군에서는 완전히 회복되었다(Fig. 1D-1F).

3. PV 면역반응성 사이신경세포의 수

PV 면역반응성 사이신경세포의 수는 대조군에 비 하여 KA 처리군에서는 현저한 세포수의 감소($P < 0.01$)가 있었고 KA 제거 후 8시간 회복군에서도 통

계적으로 유의한 세포수의 감소($P < 0.05$)가 있었다. 그러나 KA 투여 후 회복군인 KA 제거 후 24시간 회복군, KA 제거 후 48시간 회복군 및 KA 제거 후 72시간 회복군에서의 PV 면역반응성 사이신경세포의 수는 대조군과 차이가 없었다(Fig. 2). 각 군의 세포 수를 보면 대조군 47.2 ± 9.7 , KA 처리군 29.0 ± 9.9 , KA 제거 후 8시간 회복군 38.9 ± 11.6 , KA 제거 후 24시간 회복군 43.4 ± 17.9 , KA 제거 후 48시간 회복 군 53.3 ± 13.8 , KA 제거 후 72시간 회복군 55.2 ± 14.3 이었다.

고 찰

흥분성 신경독성물질의 일종인 KA를 실험동물에 전신적으로 투여하면 복합부분발작 유형의 간질이 유

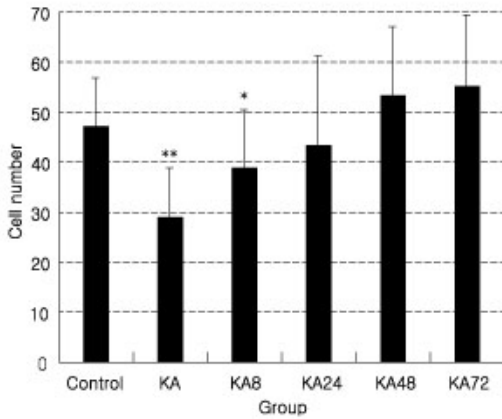


Fig. 2. Histogram depicting the soma number as seen acutely(1 hour after) and following 8, 24, 48, 72 hours recovery period. * $P < 0.05$ vs. the control. Control: Group of explant cultured in culturing media for 1 hour without kainic acid. KA: Group of explant exposed to 10 μ M KA for 1 hour. KA8: Group of explant exposed to 10 μ M KA for 1 hour and subsequently returned to normal culturing media for 8 hours. KA24: Group of explant exposed to 10 μ M KA for 1 hour and subsequently returned to normal culturing media for 24 hours. KA48: Group of explant exposed to 10 μ M KA for 1 hour and subsequently returned to normal culturing media for 48 hours. KA72: Group of explant exposed to 10 μ M KA for 1 hour and subsequently returned to normal culturing media for 72 hours.

발되어 측두엽간질 기전의 연구와 치료수단 개발을 위해 널리 사용되고 있다. KA를 전신적으로 투여하면 후엽피질, 편도체, 해마, 시상 및 신피질 등에서 광범위한 신경세포 소실이 일어난다²⁵. 특히 해마에서는 신경세포 피사 및 2차적인 신경아교증에 의하여 특징적인 해마경화증 소견이 나타나며, CA3, CA4 및 CA1 등의 추체신경세포가 손상을 잘 받지만 CA2 추체신경세포와 치아이랑의 과립세포는 비교적 손상을 덜 받는다²⁶.

최근에는 측두엽간질의 해마에서 소실되는 또 다른 세포가 있다는 사실이 밝혀졌다²⁷. 중증 측두엽간질과 KA로 처리한 측두엽간질 동물모델에서 해마의 사이신경세포가 소실된다는 보고가 있다^{18, 19}. KA 처리 2 주 후 CA1에서 억제성 사이신경세포인 Glutamic acid decarboxylase(GAD) 양성 세포의 소실이 보고되고 있다²⁸. 해마에서 주세포 억제는 국소적인 회로의 세포나 사이신경세포를 통하여 이루어진다. 해마에서는 사이신경세포의 80% 이상이 면역조직화학법에서 억제성 신경전달물질인 GABA나 그 합성효소인 GAD

에 면역반응한다. 따라서 CA1 영역의 억제성 사이신경세포의 소실은 CA1 추체세포의 과흥분성에 영향을 주어 경련을 유발할 수 있는 요인이 될 수 있다²⁸. 또한 쥐에서 KA의 뇌실내주입이 치아이랑 신경세포와 해마 CA3 추체세포의 소실을 일으키는데 이것이 치아이랑 과립세포와 CA1 추체세포를 과흥분시키고 해마 GAD 양성 사이신경세포의 지속적인 감소를 초래하는 것으로 보고하고 있다. KA 뇌실내주입 후 해마 사이신경세포에서의 GAD 발현 소실은 결과적으로 CA3 구심성 입력의 변성을 일으킨다²⁹.

최근에는 CA1 영역의 사이신경세포 뿐 아니라 치아이랑 사이신경세포의 변화가 중요한 연구대상이 되고 있다. Loup 등¹⁶은 해마경화를 동반한 측두엽간질 환자의 해마조직에서 GABA_A 수용체를 발현하는 사이신경세포의 소실이 CA1, CA3 및 치아이랑에서 관찰되었으며 살아있는 사이신경세포도 가지돌기에 변형이 있음을 관찰하였다. 해마 등쪽에 KA를 주입한 측두엽간질 마우스모델에서 급성반응으로 주로 치아이랑에 현저한 세포소실을 보였으며 CA1 영역과 치아이랑의 PV 면역반응성 사이신경세포가 비가역적으로 소실된다고 보고하고 있다¹⁹. PV는 해마에서 GABA성 사이신경세포의 일부에서 발현되는데 바구니세포와 축삭-축삭세포를 포함하여 해마의 방추층이나 치아이랑의 과립층 가까이에서 주로 존재한다^{20, 21}. 최근에 Seress 등³⁰은 치아이랑의 PV 면역반응성 사이신경세포의 가지돌기와 세포체에서 이끼섬유의 연결상을 연구하였는데, 이끼섬유 종말의 95%가 과립세포에서 비롯되며, 이들은 치아이랑의 방추층 및 투명층에 있는 PV 양성 세포의 가지돌기와 비대칭 연결을 형성한다는 사실을 밝혔다.

Benedikz 등³¹은 KA로 처리한 해마박편 배양 간질모델에서 KA에 의하여 유발된 간질과와 사이신경세포의 소실의 관계를 연구하였는데 1 μ M KA로 가역적인 간질과를 유발시켰으며 5 μ M KA에서는 비가역적인 간질과와 신경독성을 유발시켰다. 이러한 비가역적 간질과는 CA3 영역의 추체세포 뿐 아니라 PV 면역반응 사이신경세포의 소실을 유발하였다. Magloczky와 Freund⁹도 유사한 실험을 하였는데 해마의 한쪽 CA3 영역에 KA를 주입하였을 때 다른 쪽 해마에서 치아이랑과 CA3 투명층에 있는 calretinin 반응 사이신경세포가 12-24시간 사이에 사라짐을 보고하였다. 또한 PV 면역반응성도 1-4일 사이에 사이

신경세포의 세포체와 가지돌기로부터 사라진다는 보고를 하고 있다. 그러나 치아이랑의 사이신경세포는 상대적으로 손상이 적다는 보고도 있다. Best 등³²⁾은 5 μM KA에 지속적인 노출로 CA1과 CA3 영역의 PV 면역반응성 사이신경세포 수는 감소하였으나 치아이랑의 PV 면역반응성 사이신경세포 수에는 변화가 없었다고 보고하고 있다. 그러나 간질환자를 대상으로 한 최근의 연구에 의하면 PV 면역반응성 사이신경세포와 그 가지돌기의 수가 치아이랑에서 감소하되 특히 치아이랑문에서 감소가 뚜렷하며, 감소의 정도는 해마 경화의 정도와 상관관계가 있다고 보고되고 있다¹⁶⁾.

해마박편배양을 통한 저자들의 연구에서도 치아이랑에서 PV 면역반응성 사이신경세포의 수는 대조군에 비하여 KA 처리군과 KA 제거 후 8시간 회복군에서는 통계적으로 유의한 세포수의 감소가 있었으나 KA 제거 후 24시간 회복군, KA 제거 후 48시간 회복군 및 KA 제거 후 72시간 회복군에서는 대조군과 차이가 없었다. 따라서 급성기에 PV 면역반응성 사이신경세포의 세포수 감소는 PV 면역반응성 사이신경세포의 세포소실에서 비롯되었다고 보기는 어렵다. 그러나 PV 면역반응성의 저하나 PV 면역반응성 사이신경세포 수의 감소가 가지는 의의에 대해서는 아직 밝혀진 것이 없다. 동물모델에선 칼슘과부하로 인한 PV 합성지연 및 PV저하와의 관련성을 제안하였다³³⁾. PV는 세포내 Ca^{2+} 를 완충하는 기능을 가지고 있는데 해마신경세포에서의 그 기능의 의의는 아직 추론에 불과하다³⁴⁾. 칼슘결합단백이 Ca^{2+} 의 과부하를 막아주어 신경세포로 하여금 흥분성에 더 저항하도록 한다는 이론이 제기 되었지만 논란의 여지가 있다³⁵⁾. PV 단백질이 결핍된 knockout 마우스는 육안적인 형태이상이나 행동이상을 보여주지는 못하였다³⁶⁾. 따라서 KA로 처리한 해마박편배양 마우스간질모델에서 치아이랑 PV 면역반응성 사이신경세포의 일시적인 소실이나 면역반응성 저하가 간질발생에 미치는 영향에 관해서는 앞으로 좀더 검토되어야 할 과제이다.

요 약

목적 : 중증 측두엽간질환자와 kainic acid(KA)로 처리한 측두엽간질 동물모델에서 해마 치아이랑의 사이신경세포가 소실된다. 측두엽간질 마우스모델인 마우스해마의 기관형 배양에 의한 KA 간질모델에서

parvalbumin(PV)항체를 이용한 면역조직화학법으로 치아이랑에 분포하는 PV 면역반응성 사이신경세포를 감별염색하여 세포체 및 그 가지돌기의 형태학적 변화를 관찰함으로써 측두엽간질의 병태생리의 일단을 규명하고자 한다.

방법 : 실험적 간질 모델은 C57/BL6 마우스의 해마박편을 이용한 기관형 배양에서 10 μM KA 투여로 유발시켰으며, PV 항체를 이용한 광학현미경적 면역조직화학법으로 치아이랑에 분포하는 PV 면역반응성 사이신경세포를 감별염색하여 형태학적 차이를 관찰하였고, 또한 이들 세포의 세포수를 계측하고 KA 처리 후 배양하면서 시간경과(8, 24, 48, 72시간)에 따라 PV 면역반응성 사이신경세포의 형태학적 변화를 관찰하였다.

결과 : KA 처리를 하지 않고 배양된 해마조직박편(대조군)의 치아이랑에서 PV 면역반응성 세포는 가지돌기 나무가 잘 발달되어 있고 사이신경세포로서 이들은 주로 과립층과 이층 밑의 다형층에 산재하였다. 10 μM KA에 1시간 정도 노출되었을 때 PV 면역반응성 사이신경세포의 돌기에는 염주상이 형성되었고 가지돌기는 가늘어져 있었다. PV 면역반응성 사이신경세포는 KA 처리 후 배양액에서 KA를 제거한 뒤 시간이 경과함에 따라 형태학적 회복을 보여주었다. KA 제거 후 8시간 회복군에서 세포돌기의 염주상은 볼 수 없었으며 가지돌기는 가늘어져 있었다. KA 제거 후 24, 48, 72시간 회복군에서도 염주상은 거의 볼 수가 없었으며 가지돌기의 두께도 회복되었다. PV 면역반응성 사이신경세포의 수는 대조군에 비하여 KA 처리군과 KA 제거 후 8시간 회복군에서는 통계학적으로 유의한 세포수의 감소가 있었으나 KA 제거 후 24시간 회복군, KA 제거 후 48시간 회복군 및 KA 제거 후 72시간 회복군에서는 대조군과 차이가 없었다.

결론 : 이러한 결과는 KA에 의하여 유발된 치아이랑 사이신경세포의 세포소실이 일시적이며 가역적인 현상임을 말해주는 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Sloviter RS. Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance

- to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1991;1:41-66.
- 2) Perreault P, Avoli M. 4-aminopyridine-induced epileptiform activity and a GABA-mediated long-lasting depolarization in the rat hippocampus. *J Neurosci* 1992;12:104-15.
 - 3) Rowley HL, Martin KF, Marsden CA. Decreased GABA release following tonic-clonic seizures is associated with an increase in extracellular glutamate in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience* 1995;68:415-22.
 - 4) Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 1996;16:815-23.
 - 5) Motalli R, Louvel J, Tancredi V, Kurcewicz I, Wan-Chow-Wah D, Pumain R, et al. GABA β receptor activation promotes seizure activity in the juvenile rat hippocampus. *J Neurophysiol* 1999;82:638-47.
 - 6) Sloviter RS. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 1987;235:73-6.
 - 7) de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1989;495:387-95.
 - 8) Best N, Mitchell J, Baimbridge KG, Wheal HV. Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci Lett* 1993;155:1-6.
 - 9) Magloczky Z, Freund TF. Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield. *Neuroscience* 1995;66:847-60.
 - 10) Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM, Kuhlman PA. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res* 1996;26:151-61.
 - 11) Buckmaster PS, Dudek FE. Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J Comp Neurol* 1997;385:385-404.
 - 12) Magloczky Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, et al. Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 2000;96:7-25.
 - 13) Olsen RW, DeLorey TM, Gordey M, Kang MH. GABA receptor function and epilepsy. *Adv Neurol* 1999;79:499-510.
 - 14) Engel J Jr. Etiology as a risk factor for medically refractory epilepsy: a case for early surgical intervention. *Neurology* 1998;51:1243-4.
 - 15) Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 1998;51:1256-62.
 - 16) Loup F, Wieser HG, Yonekawa Y, Aguzzi A, Fritschy JM. Selective alterations in GABA $_A$ receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 2000;20:5401-19.
 - 17) Toth K, Freund TF, Miles R. Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum. *J Physiol* 1997;500:463-74.
 - 18) Fritschy JM, Kiener T, Boullieret V, Loup F. GABAergic neurons and GABA α -receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochem Int* 1999;34:435-45.
 - 19) Boullieret V, Loup F, Kiener T, Marescaux C, Fritschy JM. Early loss of interneurons and delayed subunit-specific changes in GABA $_A$ -receptor expression in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 2000;10:305-24.
 - 20) Celio MR. Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* 1986;231:995-7.
 - 21) Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, Wu JY, Heizmann CW. GABAergic neurons containing the Ca $^{2+}$ -binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res* 1987;419:119-30.
 - 22) Blumcke I, Zusratter W, Schewe JC, Suter B, Lie AA, Riederer BM, et al. Cellular pathology of hilar neurons in Ammon's horn sclerosis. *J Comp Neurol* 1999;414:437-53.
 - 23) Swann JW, Brady RJ. Penicillin-induced epileptogenesis in immature rat CA3 hippocampal pyramidal cells. *Brain Res* 1984;314:243-54.
 - 24) Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1991;37:173-82.
 - 25) Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 1980;5:515-28.
 - 26) Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 1978;271:676-7.
 - 27) de Lanerolle NC, Kim JH, Brines ML. Cellular and molecular alterations in partial epilepsy. *Clinical Neuroscience* 1994;32:286-303.
 - 28) Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC. Selective loss of GABA neurons in area CA1 of the rat hippocampus after intraventricular kainate. *Epilepsy*

- Res 1998;32:363-9.
- 29) Shetty AK, Turner DA. Fetal hippocampal grafts containing CA3 cells restore host hippocampal glutamate decarboxylase-positive interneuron numbers in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 2000;20:8788-801.
- 30) Seress L, Abraham H, Paleszter M, Gallyas F. Granule cells are the main source of excitatory input to a subpopulation of GABAergic hippocampal neurons as revealed by electron microscopic double staining for zinc histochemistry and parvalbumin immunocytochemistry. *Exp Brain Res* 2001;136:456-62.
- 31) Benedikz E, Casaccia-Bonnel P, Stelzer A, Bergold PJ. Hyperexcitability and cell loss in kainate-treated hippocampal slice cultures. *Neuroreport* 1993;5:90-2.
- 32) Best N, Sundstrom LE, Mitchell J, Wheal HV. Pre-exposure to subtoxic levels prevents kainic acid lesions in organotypic hippocampal slice cultures: effects of kainic acid on parvalbumin-immunoreactive neurons and expression of heat shock protein 72 following the induction of tolerance. *Eur J Neurosci* 1996;8:1209-19.
- 33) Scotti AL, Kalt G, Bollag O, Nitsch C. Parvalbumin disappears from GABAergic CA1 neurons of the gerbil hippocampus with seizure onset while its presence persists in the perforant path. *Brain Res* 1997;760:109-17.
- 34) Chard PS, Bleakman D, Christakos S, Fullmer CS, Miller RJ. Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *J Physiol* 1993;472:341-57.
- 35) Magloczky Z, Freund TF. Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. *Neuroscience* 1993;56:317-35.
- 36) Schwaller B, Dick J, Dhoot G, Carroll S, Vrbova G, Nicotera P, et al. Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. *Am J Physiol* 1999;276:395-403.