

# 간질성 발작의 뇌신경 세포 손상에 대한 동물 실험적 증거

연세대학교 원주의과대학 소아과학교실

차 병 호

## The Evidence of Epileptic Seizure-induced Neuronal Injury by Animal Study

Byung Ho Cha, M.D.

Department of Pediatrics, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Korea

### 서 론

간질성 발작(epileptic seizure)은 뇌신경 세포의 과 흥분에 의해 나타나는 행동의 변화로 소아기에 발생하는 신경학적 질환 중 가장 흔히 접하게 되는 상황이다. 하지만 인간을 대상으로 간질성 발작에 의한 뇌신경 세포의 손상을 포함한 변화들을 연구하는데에는 발생 원인, 연령, 발작의 형태, 횟수, 기간, 및 항 경련제의 사용 등과 같은 여러 요인에 영향을 받기 때문에 상당히 어려운 점이 많다. 반면에 동물을 이용한 실험은 위와 같은 여러 요인을 인위적으로 조절할 수 있기 때문에 발작에 의한 생리적 또는 병리학적인 변화를 이해하는 데에 많은 도움을 줄 수 있다.

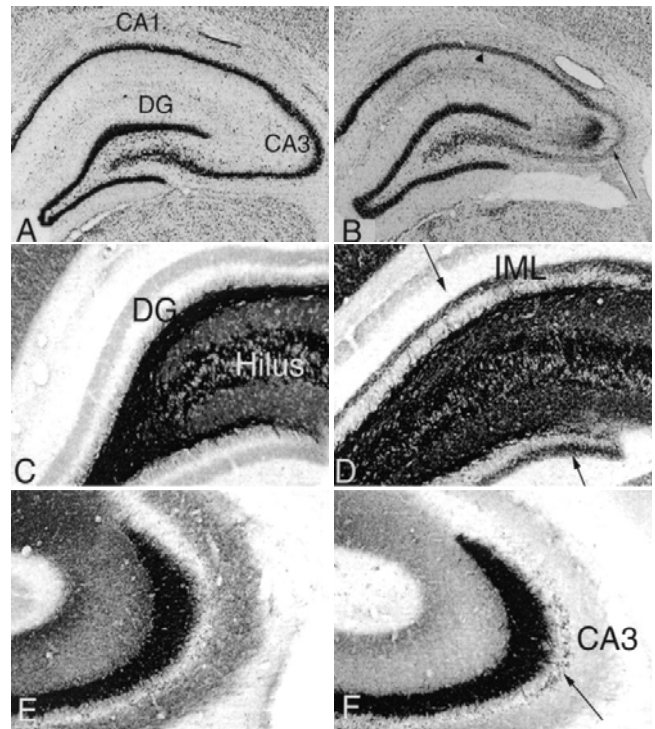
이에 저자는 장시간 발작이 지속되는 간질 중첩증과 비록 짧지만 반복적인 발작이 뇌신경 성숙 정도에 따라 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 동물 실험적 증거에 대해 논하고자 한다.

### 간질 중첩증과 연관된 뇌신경 세포의 손상 및 변화

간질 중첩증은 30분 이상 발작이 지속되거나, 발작간에 의식의 회복 없이 반복적인 발작이 지속되는 경우를 이르는 응급 상황이다. 동물 실험적으로 간질 중첩증 즉 장시간 지속되는 발작의 유발은 kindling이나 약물(kainic acid, lithium-pilocarpine 등)을 이용한 여러 종류의 방법이 이용되고 있다. 이러한 장시간의 발작은 뇌의 여러 부위에 변화를 초래하지만 이로 인해 가장 예민하게 손상을 받는 해마(hippocampus) 부위에 대한 연구가 널리 시행된다. 해마 부위는 인지 기능의 일부와 연관되어 있어 간질 중첩증 후에 나타날 수 있는 다양한 신경심리학적 변화 중 인지 능력 저하와 관련된 기전을 연구하는데 유용하다. 설치류를 이용한 여러 간질 모델에서 해마 부위의 구조적 변화와 인지 능력 저하는 밀접한 관계가 있다는 사실은 널리 알려져 있다.

성숙 뇌신경에 대한 실험에서 간질 중첩증은 해마 CA1과 CA3의 추체 세포, 치상(dentate)의 과립 세포 및 폐문(hilus) 부위의 신경 세포 손상을 초래한다<sup>1)</sup>(Fig. 1). 이러한 뇌신경 세포의 손상은 흥분성 신경 전달 물질의 분비를 증가시켜 이로 인

해 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체 및 전압-의존성 칼슘 이온 통로가 활성화 돼서 세포 내로 칼슘 이온의 유입을 증가시킨다. 칼슘과 다른 이온들의 변화는 세포 내 생화학적 변화를 야기 시켜 세포 사(death)를 유발한다. 세포 내 칼슘은 여러 종류의 생리적 과정에 중요한 역할을 하지만, 고 농도의 칼슘은 정상적인 생리적 과정의 과도 자극으로 세포의 손상을 야기하게



**Fig. 1.** Histologic changes after status epilepticus. (A, B) Thionin staining for evaluation of cell loss. (A) normal rat. The CA1, CA3, and dentate gyrus(DG) are noted. (B) Rat subjected to status epilepticus. Note extensive cell loss in CA3(arrow) and CA1(arrowhead). (C-D) Timm staining for evaluation of mossy fiber sprouting. (C, E) Normal rat. (D, F) Rat subjected to status epilepticus, (D) Note dark staining in the inner molecular layer(IML) of dentate gyrus(arrow). This represents aberrant sprouting of the mossy fibers to a region not normally innervated by mossy fiber. (F) Aberrant sprouting of mossy fibers in CA3(arrow).

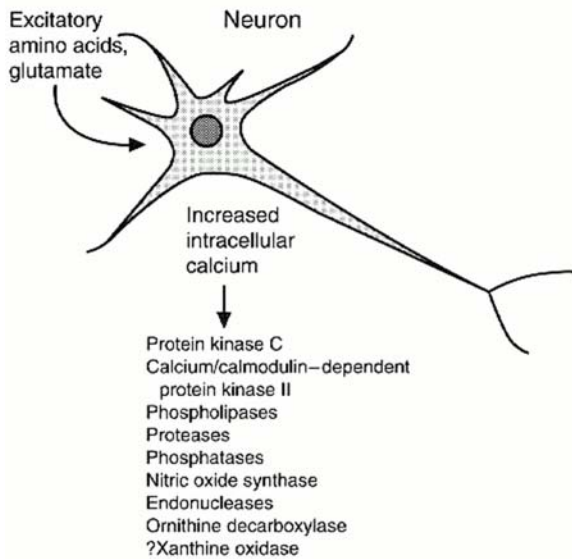
된다. NMDA 수용체의 활성화와 신경 세포 내 칼슘의 증가는 protein kinase C, protein phosphatases, nitric oxide synthase, phospholipase, proteases, endonucleases 등의 이화성 효소를 활성화 시킨다(Fig. 2). Phospholipase A<sub>2</sub>의 활성화 후에 arachidonic acid와 그 대사물질 및 platelet-activating factor가 형성된다. Platelet-activating factor는 글루탐산염의 분비를 증가시켜 세포 내 칼슘의 농도를 높이게 되며, arachidonic acid는 NMDA 유도 전류를 항진시키고 정상 세포와 신경 세포 내로 글루탐산염의 재흡수를 방해한다. 또한 arachidonic acid의 대사 과정에서 oxygen free radicals이 형성되며 이로 인해 phospholipase A<sub>2</sub>가 다시 활성화 돼서 이러한 과정이 반복되면서 신경 세포의 손상을 야기하게 된다. 세포 내 고 농도의 칼슘은 endonucleases와 같은 핵 내의 효소를 활성화하여 핵염색질의 농축을 야기하고 결국에 가서는 테옥시리보핵산의 분절화와 핵의 파괴를 야기하는 'apoptosis' 과정을 겪게 된다. Free radicals도 테옥시리보핵산의 분절화를 통한 'apoptosis'를 초래한다<sup>2)</sup>.

성숙 뇌신경에서 간질성 발작은 long-term potentiation을 포함한 여러 형태의 시냅스 가연성(plasticity)을 형성할 뿐 아니라 뇌피질 신경망의 변화를 초래하여 경련의 역치를 낮춘다. 장시간의 발작으로 인해 치상 근막(fascia dentate)의 과립세포 상부 및 해마의 CA3 추체 세포 하부에 과립 세포의 축삭(axon)인 mossy 섬유질의 발아를 초래하여 경련의 역치를 낮추는 시냅스의 재정렬을 야기한다<sup>3, 4)</sup>(Fig. 1). 또한 해마의 신경조직발생(neurogenesis)을 증가시키게 된다<sup>5)</sup>(Fig. 3). 이러한 일련의 변화로 뇌피질 신경망의 흥분성을 증가시키는 결과를 초래하게 된다.

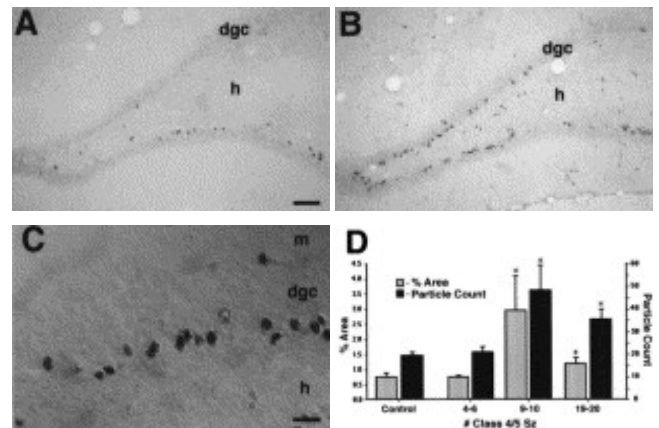
반면에 미성숙 뇌신경에 대한 장시간의 발작은 성숙된 뇌신경과 다른 결과를 초래하게 되는데, 뇌신경 세포의 손상이나 결손

과 같이 성숙 뇌신경에서 광범위하게 나타나는 병리학적 변화가 적다. 이는 미성숙 뇌신경 세포의 특성과 관련이 있다. 예를 들어 미성숙 해마의 신경 세포는 성숙 신경 세포보다 무 산소 환경에 노출되었을 경우에 더욱 오래 동안 시냅스의 반응이 유지되며, 비가역적인 신경망의 손상을 야기 시키기 위해서는 더 장시간의 무 산소 상태를 유지하여야 한다<sup>6)</sup>. 또한 미성숙 뇌신경 세포는 글루탐산염의 독성에 더 저항적이다. 해마의 CA1 신경 세포에서 글루탐산염에 대한 반응으로 칼슘의 세포 내 유입과 이로 인한 세포의 손상은 연령과 직접적인 관련이 있어, 생후 1일에서 3일 사이의 신경 세포는 글루탐산염에 의해 미세한 양의 칼슘이 세포 내로 유입이 되지만, 생후 21일에서 23일 사이의 신경 세포에서는 다량의 칼슘이 유입되어 세포의 부종 및 수상 돌기의 수축이 발생된다<sup>7)</sup>. 이러한 저항성은 미성숙한 뇌신경에서 활동적인 시냅스의 농도가 떨어지며, 에너지 흡수가 적고, 세포사를 유발시키는 세포 내 생화학적 폭포(cascade) 과정이 미성숙하기 때문인 것으로 추정된다. 또한 동일시간 동안 발작을 유발하는 경우에도 발작 후에 보이는 mossy 섬유 발아도 미성숙 뇌신경의 경우에 더 적게 나타난다<sup>8)</sup>. 하지만 미성숙 뇌신경이라도 이러한 발작에 모두 저항적인 것은 아니다. 발작에 의한 해마 신경 세포의 손상은 최소한 생후 2주 후부터 나타나지만, 시상(thalamus)의 경우에는 생후 2주 이내에도 간질 중첩증을 유발할 경우에 피사성 뇌 손상이 나타나는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>.

간질 중첩증 후에 보이는 간질화 현상(epileptogenesis), 즉 반복적이고 자발적인 발작이 나타나는 만성 간질화 현상도 연령과 간질 모델에 따라 그 가연성에 영향을 받는다. 생후 21일령



**Fig. 2.** Pathophysiologic consequences of the activation of cellular enzyme systems by excitatory amino acid-evoked increases in intracellular calcium.



**Fig. 3.** BrdU labeling and immunohistochemistry in the adult dentate gyrus after amygdala kindling or sham stimulation. Increased BrdU-immunoreactive(IR) nuclei are seen at the border of the granule cell layer and hilus in an animal that experienced nine class 4/5 kindled seizures(B, C) compared to a sham-stimulated control(A). Densitometric quantification(D) of BrdU-IR by percentage area of staining(left ordinate) and particle count(right ordinate) is shown for controls(n=10) and treatment groups that experienced 4-6(n=4), 9-10(n=3),or 19-20 (n=3) kindled class 4/5 seizures. Data are the mean±SE; \*statistically significant differences from controls(P<0.05, Student's t-test). Scale bars, (A, B) 100 μm; (C) 25 μm. dgc: dentate granule cell layer, h: hilus, m: molecular layer.

위의 경우 perforant path 자극에 의한 간질 중첩증 후에 만성 간질의 발생율은 생후 35일령 보다 낮다. 그러나 리튬-필로카핀 모델에서는 두 연령 군에서 모두 높은 만성 간질 발생율을 보인다. 이는 간질 중첩증 후에 활성화되는 해마나 해마 외 신경망의 변화 정도와 연관이 있으며, c-Jun 면역화학 검사를 이용한 생후 21일령 쥐 실험에서 perforant path 자극에 의한 발작은 리튬-필로카핀 보다 적은 신경망의 변화를 보인다<sup>10</sup>.

생후 1주 이내의 미성숙 뇌신경은 간질 중첩증에 의한 분명한 신경 세포 결손이나 시냅스의 재 정렬이 없다고는 하나, 이차적인 자극이 가해질 경우에 손상의 정도가 증가할 수 있다. Kainic acid(KA)를 이용한 실험에서 생후 15일령의 경우에는 KA로 장시간의 발작을 유발한 후에도 팔목할 만한 신경 세포 손상이나 세포 사의 증후가 없지만, 성숙한 후에 다시 KA를 주사하여 발작을 유발할 경우 더욱 광범위한 신경 손상이 관찰된다. 또한 미성숙 상태에서 발작을 경험한 경우에 당시에는 학습이나 인지 능력 저하의 정도가 심하지 않으나, 성숙한 후에 다시 발작을 경험하게 되면 인지 능력에 더욱 심각한 영향을 받게 된다. 따라서 미성숙 상태에서 야기된 발작은 성인이 돼서 발작과 같은 자극을 다시 받게 되면 더욱 심각한 손상을 야기하게 되는 원인이 된다<sup>11</sup>. 다른 연구에서도 신생아 경련의 병력이 있는 쥐를 대상으로 간질 중첩증을 야기하면 병력이 없었던 쥐보다 더욱 광범위한 뇌신경 손상이 관찰되었다<sup>12</sup>. 하지만 이러한 현상이 나타나는 기전은 아직 명확하지 않아, 이를 설명하기 위해서는 세포 손상에 의한 효과 이외의 다른 기전이 밝혀져야 할 것이다.

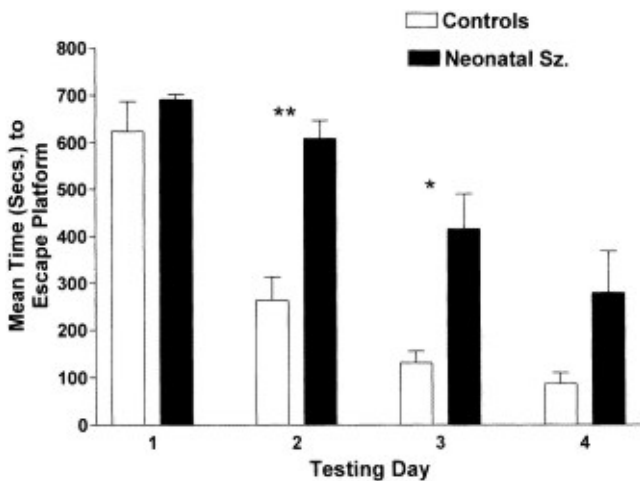


Fig. 4. Comparison of escape latencies to platform in the water maze(mean±S.E.M.) in controls and rats subjected to recurrent neonatal seizures. Rats were tested at P20. Note that both groups demonstrated a learning effect with escape latencies shorter on the fourth day of testing than the first day. The animals subjected to neonatal seizures were significantly slower in finding the escape platform than the controls(\* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.001$ ).

반복적 발작과 연관된 뇌신경 세포의 손상 및 변화

성숙 뇌신경은 간질 중첩증과 같은 장시간의 발작뿐 아니라 kindling 등을 이용하여 비록 짧은 시간이지만 반복적인 발작을 유발할 경우에도 역시 신경 세포의 결손과 해마의 CA3 부위와 치상 상부에 발아 현상을 보이게 되며<sup>13,14</sup>, 비록 한번의 발작이라도 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>15</sup>. 하지만 모든 반복적 발작이 이와 같은 세포의 결손을 유발하는 것은 아니며,

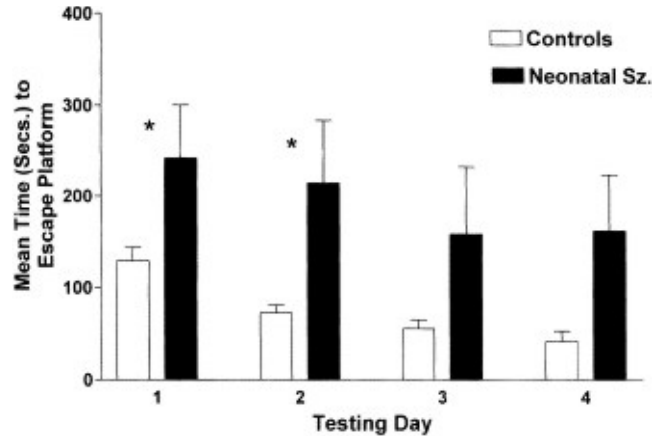


Fig. 5. Comparison of escape latencies to platform in the water maze(mean±S.E.M.) in controls and rats subjected to recurrent neonatal seizures. Rats were tested at P35. Note that both groups demonstrated a learning effect with escape latencies shorter on the fourth day of testing than the first day. The animals subjected to neonatal seizures were significantly slower in finding the escape platform than the controls (\* $P < 0.05$ ).

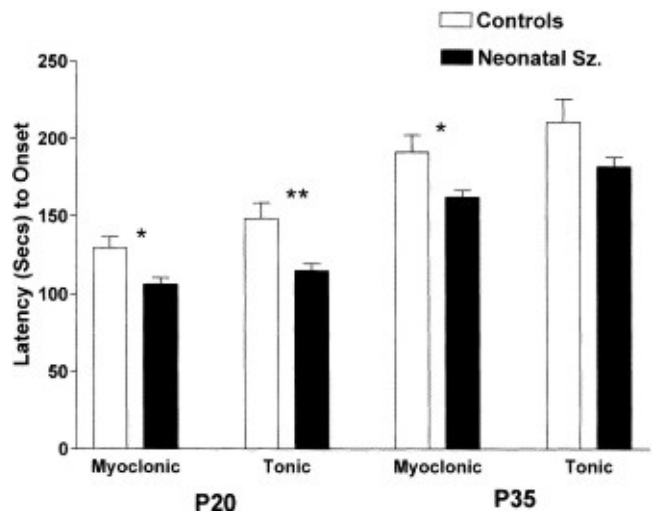
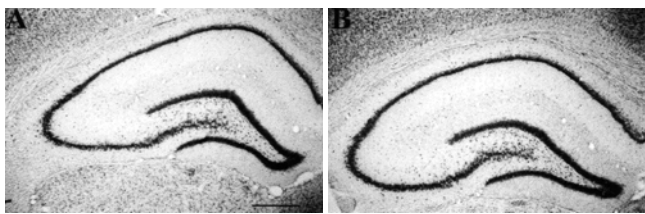


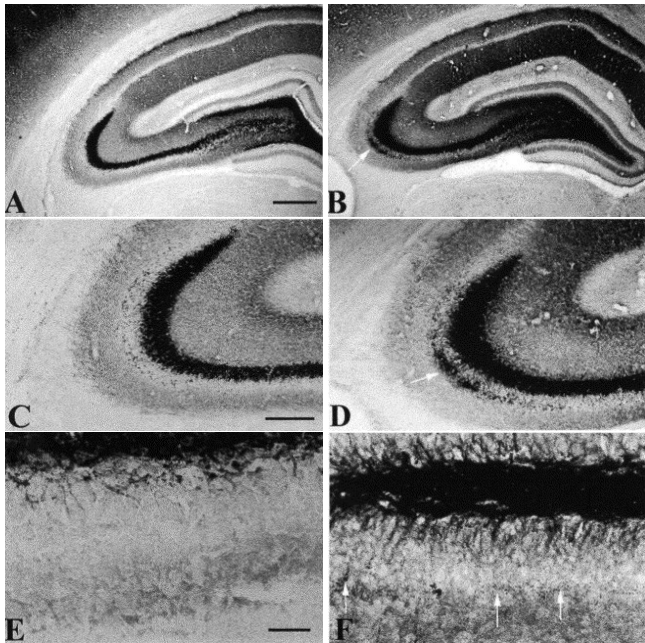
Fig. 6. Seizure threshold to flurothyl in controls and rats with recurrent seizures at P20 and P35. Rats with recurrent seizures had lower thresholds to both the myoclonic and tonic phase when tested at P20 and to the myoclonic phase when tested at P35(\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ).

유전적 간질 모델을 이용한 연구에서는 만성 간질의 발생이 세포의 결손과 연관이 없는 것으로 알려졌다<sup>16)</sup>. 성숙 뇌신경에서 반복적인 발작은 간질 증첩증과 마찬가지로 신경조직발생을 증가시키는 것으로 알려져 있으며<sup>5,17)</sup>, 학습과 기억력의 장애를 초래하게 된다.

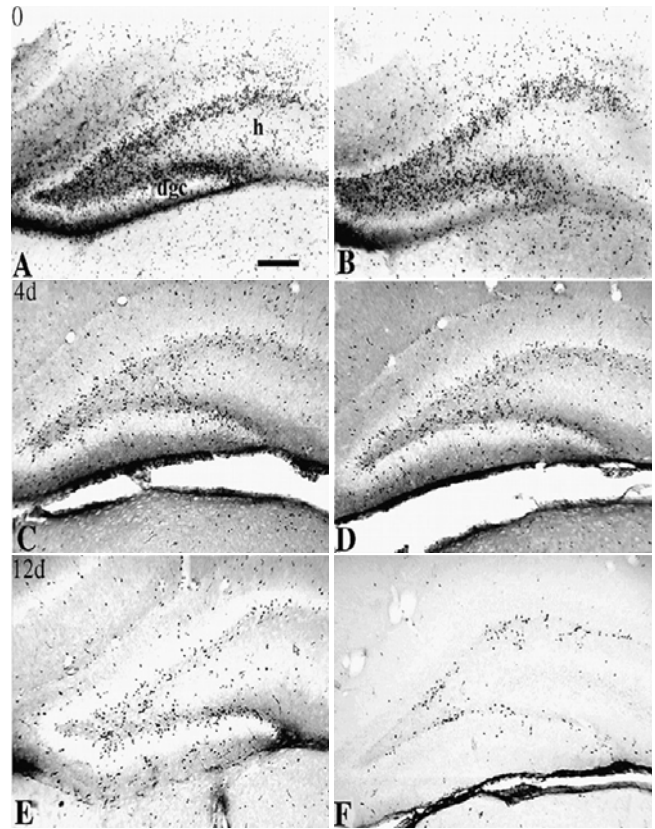
뇌신경이 성숙되는 동안에 경험하게 되는 반복적인 발작은 성인에 이르렀을 때 학습과 기억력 저하의 원인이 되며, 경련의 역치를 변화시켜 쉽게 발작이 나타나게 된다. 출생 후 첫날부터 9일 동안 하루에 5회씩 flurothyl(발화성 경련제)를 이용하여 반복적인 전신발작을 유발한 후에 생후 20일령과 35일령에 인지능력 검사인 Morris 수조 미로 검사 및 경련 역치를 측정 한 실험에서 신생아기의 반복적인 발작은 발작 후 2주 이내에 인지능력 저하 및 경련 역치를 낮추는 결과를 초래하였다<sup>18)</sup>(Fig. 4-



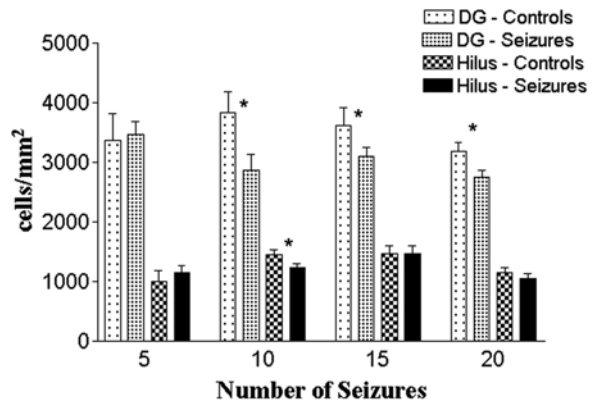
**Fig. 7.** Low power view of hippocampus stained with thionin from control (A) and rat with neonatal seizures (B). No apparent cell loss was noted in either specimen. Calibration BAR=100  $\mu$ m.



**Fig. 8.** Examples of Timm stain in the hippocampus from control(A, C, E) and rat with recurrent neonatal seizures(B, D, F). Note the sprouting of mossy fiber in the CA3 pyramidal cell layer(arrows) in the rats with recurrent seizures(B, D). Modest sprouting was observed in the supragranular region of the dentate gyrus(F, arrows). Calibration bar in A=100  $\mu$ m, C=50  $\mu$ m, E=50  $\mu$ m.



**Fig. 9.** Examples of BrdU-labeled cells in the hours and days in controls and animals subjected to recurrent neonatal seizures. Animals were killed 36hr after BrdU injection. Note the general decline in the number of mitotically active cells in the controls as the animals increase in age. A, C, and E are control animals; B, D, and F are animals subjected to neonatal seizures. The time BrdU was administered was shortly after the 25th seizure in A and B, 4d after the 25th seizures in C and D, and 12d after the 25th seizure in E and F. All specimens were photographed at  $\times 10$ . Scale bar, 100  $\mu$ m. dgc : Dentate granule cell layer, h : hilus.



**Fig. 10.** Comparison of differentiated BrdU-labeled cells per area(in square millimeters)(mean $\pm$ SEM) in the rats with neonatal seizures and controls receiving BrdU immediately after 5, 10, 15, or 20 seizures in the dentate gyrus and hilus in rats killed 36hr later. Asterisks denote statistically significant difference between seizure and control groups(\* $P$ <0.05).

**Table 1.** Histologic and Behavioral Consequences of Status Epilepticus and Recurrent Seizures in Adult and Immature Rats

| Histologic and behavioral consequences | Status epilepticus   |                   | Recurrent seizures |                   |
|--|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|  | Adult                | Pup               | Adult              | Pup               |
| Cell loss                              | Substantial          | Minimal(thalamus) | Mild               | None              |
| Sprouting;                             |                      |                   |                    |                   |
| Supragranular                          | Substantial          | Minimal           | Mild               | Mild              |
| CA3                                    | Minimal              | Minimal           | Mild               | Moderate          |
| CA1                                    | Moderate             | ?                 | ?                  | Moderate          |
| Neurogenesis                           | Substantial increase | Moderate increase | Moderate increase  | Moderate decrease |
| Cognitive impairment                   | Substantial          | Minimal           | Moderate           | Moderate          |
| Subsequent seizure                     |                      |                   |                    |                   |
| Threshold                              | Decreased            | No change         | Decreased          | Decreased         |

6). 또한 생후 12일간 반복적인 발작을 유발했던 실험에서는 신경 세포의 뚜렷한 결손을 발견할 수는 없지만 해마의 CA3 부위에 있는 mossy 섬유는 광범위한 발아 현상을 보이고, 이러한 mossy 섬유의 발아는 인지 능력 저하와 연관이 있었다<sup>19)</sup>(Fig. 7, 8). 미성숙 뇌신경과 성숙 뇌신경에서 반복적인 발작으로 인한 변화의 또 다른 차이로 신경조직발생을 들 수 있다. 성인 쥐에서는 반복적인 발작으로 인해 치상 과립세포의 신경조직발생이 증가되지만 신생아 시기에는 오히려 감소되며, 이러한 현상은 최소한 5회 이상의 반복적인 발작 후에 나타난다<sup>20)</sup>(Fig. 9, 10).

### 결론

간질 증첩증과 같은 장시간의 발작이나 반복적인 발작은 뇌신경 세포의 손상을 포함한 다양한 병리학적 변화와 행동 변화를 초래한다는 사실이 많은 동물 실험에서 증명되었으며, 이러한 변화는 발작이 발생한 연령과 경련의 형태에 따라 다르다는 사실을 알 수 있다(Table 1). 하지만 발작에 의한 병리학적 변화가 어떠한 기전에 의해 경련의 역치를 낮추고 인지 기능의 저하를 유발하며, 만성 간질로 이행되는 지에 대해서는 아직도 불명확한 부분이 많다. 따라서 앞으로 이와 같은 기전을 밝히는 동물 실험적 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

### 참고 문헌

- Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985;14:375-403.
- Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994;330:613-22.
- Wuarin JP, Dudek FE. Excitatory synaptic input to granule cells increases with time after kainate treatment. *J Neurophysiol* 2001;85:1067-77.
- Smith BN, Dudek FE. Short- and long-term changes in CA1 network excitability after kainate treatment in rats. *J Neurophysiol* 2001;85:1-9.
- Parent JM, Janumpalli S, McNamara JO, Lowenstein DH. Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. *Neurosci Lett* 1998;247:9-12.
- Cherubini E, Ben-Ari Y, Krnjevic K. Anoxia produces smaller changes in synaptic transmission, membrane potential and input resistance in immature rat hippocampus. *J Neurophysiol* 1989;62:882-95.
- Marks JD, Friedman JE, Haddad GG. Vulnerability of CA1 neurons to glutamate is developmentally regulated. *Brain Res Dev Brain Res* 1996;97:194-206.
- Yang Y, Tandon P, Liu Z, Sarkisian MR, Stafstrom CE, Holmes GL. Synaptic reorganization following kainic acid-induced seizures during development. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;107:169-77.
- Kubova H, Druga R, Lukasiuk K, Suchomelova L, Haugvicova R, Jirmanova I, et al. Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats. *J Neurosci* 2001;21:3593-9.
- Sankar R, Shin D, Mazarati AM, Liu H, Katsumori H, Lezama R, et al. Epileptogenesis after status epilepticus reflects age- and model-dependent plasticity. *Ann Neurol* 2000;48:580-9.
- Koh S, Storey TW, Santos TC, Mian AY, Cole AJ. Early-life seizures in rats increase susceptibility to seizure-induced brain injury in adulthood. *Neurology* 1999;53:915-21.
- Schmid R, Tandon P, Stafstrom CE, Holmes GL. Effects of neonatal seizures on subsequent seizure-induced brain injury. *Neurology* 1999;53:1754-61.
- Cavazos JE, Sutula TP. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res* 1990;527:1-6.
- Represa A, Ben-Ari Y. Kindling is associated with the formation of novel mossy fibre synapses in the CA3 region. *Exp Brain Res* 1992;92:69-78.
- Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10432-7.
- Gombos Z, Spiller A, Cottrell GA, Racine RJ, McIntyre BW. Mossy fiber sprouting induced by repeated electroconvulsive shock seizures. *Brain Res* 1999;844:28-33.
- Scott BW, Wang S, Burnham WM, De Boni U, Wojtowicz

- JM. Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neurosci Lett* 1998;248:73-6.
- 18) Sogawa Y, Monokoshi M, Silveira DC, Cha BH, Cilio MR, McCabe BK, et al. Timing of cognitive deficits following neonatal seizures : relationship to histological changes in the hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 2001;131:73-83.
- 19) de Rogalski Landrot I, Minokoshi M, Silveira DC, Cha BH, Holmes GL. Recurrent neonatal seizures : relationship of pathology to the electroencephalogram and cognition. *Brain Res Dev Brain Res* 2001;129:27-38.
- 20) McCabe BK, Silveira DC, Cilio MR, Cha BH, Liu X, Sogawa Y, et al. Reduced neurogenesis after neonatal seizures. *J Neurosci* 2001;21:2094-103.
-