

외상성 뇌손상 후 해마내 칼슘결합단백질 면역반응의 변화

오윤정, 김백선, 박대균, 박경호, 고정식, 김덕수*

순천향대학교 의과대학 해부학교실

Alterations of Calcium-binding Protein Immunoreactivities in the Hippocampus Following Traumatic Brain Injury

Yun-Jung Oh, Baek-Seon Kim, Dae-Kyoon Park, Kyung-Ho Park,
Jeong-Sik Ko and Duk-Soo Kim*

Department of Anatomy, College of Medicine, Soonchunhyang University, Cheonan 330-090, Korea

(Received September 27, 2011; Revised December 12, 2011; Accepted December 20, 2011)

ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) is one of the leading causes of death and disability in children and adults and is a major risk factor for the development of posttraumatic epilepsy (PTE). Recent studies have provided significant insight into the pathophysiological mechanisms underlying the development of epilepsy. Although the link between brain trauma and epilepsy is well recognized, the complex biological mechanisms that result in PTE following TBI have not been fully elucidated. Therefore, this study investigated in order to identify whether or not the abnormal expression of calcium-binding proteins in the lesioned hippocampus plays a role in neuronal damage by brain trauma and whether or not the expressions may change in the contralateral hippocampus during the adaptive stage as early time point following TBI.

During early time point following TBI, both parvalbumin (PV) and calbindin D-28k (CB) immunoreactivities were decreased with in the lesioned hippocampus. However, these expressions were recovered to control levels as depend on time courses. On the other hand, PV immunoreactivity in contralateral hippocampus was transiently reduced as compared to the control levels, whereas CB expression was unchanged.

These findings indicate that the alterations of the calcium-binding proteins, especially PV and CB, may contribute to the neuronal death and/or damage induced by abnormal inhibitory neurotransmission at early time period following brain trauma and the development of epileptogenesis in patients with traumatic brain injury.

Keywords : Calbindin D-28K, Epileptogenesis, Parvalbumin, Posttraumatic epilepsy, TBI

서 론

외상성 뇌손상 (traumatic brain injury, TBI)은 외부적인 요인에 의해 직접 뇌 조직이 손상 받았을 때 변성된 뇌신경세

포가 지연성 병태생리학적인 변화를 수반하는 것으로 잘 알려져 있다 (Gaetz, 2004). 이러한 뇌손상은 그 정도에 따라 다양한 인지기능을 저하시키고, 운동능력을 손상시키는 것으로 알려져 있으며, 특히, 일부 환자에서는 뇌손상의 후유증으로 회귀성 간질발작을 일으킬 수 있다. 이러한 후유증은

* Correspondence should be addressed to Duk-Soo Kim, Department of Anatomy, College of Medicine, Soonchunhyang University, Cheonan 330-090, Korea. Ph.: (041) 570-2470, Fax: (041) 574-1770, E-mail: dskim@sch.ac.kr

개인에 따른 차이가 존재하나, 회귀성 간질발작을 경험한 환자의 50% 이상이 1년 이내 외상 후 간질 (posttraumatic epilepsy, PTE)로 진행 된다(Willmore & Ueda, 2009). 또한, 이러한 간질환자로서의 이환율은 뇌손상의 정도가 심할수록 증가 한다(Caveness, 1976; Weiss et al., 1983, 1986).

한편, 칼슘결합단백질 (calcium-binding proteins, CBPs)은 세포내에서 칼슘완충작용 및 칼슘확산의 촉진자로 작용하는 것으로 잘 알려져 있다. 특히, 이들 단백질은 중추신경계통에서 특별한 신경세포의 표식자로 유용하게 사용되고 있다(Baimbridge et al., 1992). 이 중 parvalbumin (PV)과 calbindin D-28K (CB)는 대뇌의 해마에 존재하는 일부 신경세포에 대한 우수한 표식자로 널리 이용되고 있다(Celio, 1990; Andressen et al., 1993). PV는 주로 basket cells과 axo-axonic cells과 같은 GABAergic interneurons에 함유되어 있고, CB는 dentate gyrus에 위치한 granule cells와 일부 사이신경세포에 함유되어 있다(Jande et al., 1981; Baimbridge & Miller, 1982; Toth & Freund, 1992; Hwang et al., 2004a). 최근의 연구결과에 의하면 간질의 원인이 비정상적인 신경세포의 과도한 흥분 또는 억제성 신경전도체제의 이상에서 기인하는 것으로 보고되고 있다(Missiaen et al., 2000; Rogawski, 2000; Guerrini, 2001; Meldrum, 2002; Rozycka & Trzeciak, 2003). 따라서, 이러한 간질의 병태생리학적 특성 중 주된 원인은 억제성 신경전달물질인 GABA의 생성이상 또는 흥분성 신경전달물질인 glutamate의 대사이상에서 기인하는 것으로 추측되고 있다. 또한, 최근 신경세포 막전위의 변화를 통해 신경세포의 신호전달과정에 관여하는 다양한 신경전달물질 수용체 (neurotransmitter receptor) 또는 ion channel의 변이 또는 발현저하에 의한 간질발생이 확인됨은 물론, 이러한 발현변화가 GABA 또는 glutamate 대사이상과 밀접한 연관성이 있음이 보고되고 있다(Kang et al., 2004; Kim et al., 2005; Kwak et al., 2005). 그러나 이러한 노력에도 불구하고, 아직까지 간질발생 (epileptogenesis)의 기본적인 기전은 명확히 밝혀지지 않고 있다. 이것은 간질발생 과정이 단순히 신경세포의 이상에서 기인하는 것이 아니라, 보다 복잡한 과정과 기전을 통해 일어남을 시사한다. 특히, 현재까지 진행되어온 외상성 뇌손상 후 간질의 발병원인에 대한 연구결과, hemorrhage, free radicals 및 glutamate의 비정상적인 작용, GABA_A 또는 glutamate receptor subunits의 변화, heat shock protein의 변화 등과 같은 여러 가지 다양한 원인에 의해 뇌신경의 과흥분 (excitotoxicity)이 나타나며, 이와 같은 현상은 glutamate를 포함한 다양한 종류의 흥분성 신경전달물질에 의한 것으로 알려져 있다(Agrawal et al., 2006; Gupta & Gupta, 2006; Mani & Barry, 2006; Willmore & Ueda, 2009; Kharlamov et al., 2011). 더욱이, 이러한 뇌신경의 과흥분이 억제성 신경세포가 감소 또는 손상될 때 나타나는 것으로 알려져 있으며 (Mani & Barry, 2006), 신경세포의 과흥분에

따라 세포 내부에서 증가하는 칼슘을 조절해주는 칼슘결합단백질이 간질과 같은 특정한 뇌질환에서 다양한 신경세포의 변성을 나타내는 표식자로 알려져 있다(Magloczky et al., 1997; Fritschy et al., 1999; Sutch et al., 1999).

이러한 결과들을 종합해 볼 때 외상성 뇌손상 후 나타나는 간질의 발생기전에서 GABAergic interneurons의 기능부전과 다양한 종류의 억제성 사이신경 (inhibitory interneurons)의 작용이 외상성 뇌손상 후 간질의 발병에 매우 중요한 역할을 하고, 이 과정동안 칼슘결합단백질의 변화가 수반될 개연성이 충분히 있는 것으로 사료된다. 따라서, 이 연구에서는 외상성 뇌손상 실험동물모델을 이용하여, 뇌손상의 초기단계에서 이러한 GABAergic interneurons의 작용이 외상성 뇌손상 후 간질의 발생과 전파에 미치는 영향을 분석하고, 이들 간의 연관성을 규명하고자 한다. 또한, 외상성 뇌손상 후 나타나는 간질의 발생기전에서 이러한 요인들의 역할과 기능에 대한 기초학적인 데이터를 마련함으로써 향후 간질환자의 치료 및 예방과 신규 항간질치료약의 개발에 필요한 실험적 근거를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에는 체중 300~350 g의 Sprague-Dawley (SD) rats를 이용하였다. 실험동물들은 NIH 가이드라인과 규정에 따라 순천향대학교 실험동물윤리위원회에서 정한 규칙에 따라 취급하였다. 실험에 사용될 실험동물들은 항온항습실 (온도: 22±2°C, 습도: 55±10%)에서 실험기간 동안 사육하였으며, 모든 동물들은 12:12시간 인공조명 하에서 사료 및 물을 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

2. 외상성 뇌손상수술

실험에 사용된 동물은 대조군 (n=5)과 외상성 뇌손상을 유발한 실험군 (n=5, respectively)으로 구분하였다. 실험군에 사용된 동물은 ketamine (90 mg/kg)과 xylazine (4 mg/kg)을 복강에 주사하여 전신마취시킨 후 수술을 시행하였다. 마취된 동물을 뇌정위고정장치 (stereotaxic frame)에 고정시킨 후 실험동물의 머리뼈 위의 피부를 정중절개하고, 이마마루 겹질 (frontoparietal cortex)이 위치한 지점을 흰쥐뇌지도 (rat brain atlas)를 이용하여 표시하였다. 이 후 뇌 경질막 (dura matter)을 손상시키지 않는 범위 내에서 머리뼈에 머리뼈절제술 (craniotomy, 지름 6 mm)을 시행하여 앞이마마루 겹질을 노출시켰다. 노출된 뇌의 특정부위에 극저온손상을 유발시키기 위해 노출된 뇌의 피질부분에 dry ice를 이용하여 60초 동안 극저온손상을 유도하였다. 수술과정 및

회복기에 동물의 직장온도가 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 가 유지될 수 있도록 가열장치 (heating blanket, Harvard Apparatus, MA, USA)를 이용하여 적절한 체온을 유지시켰다. 수술이 끝난 동물은 머리피부를 봉합하여 회복실에서 회복기를 거친 후 뇌손상 후 계획된 시간단계에 따라 뇌조직 표본을 제작하였다. 대조군은 대뇌피질만 노출시킨 후, 회복기를 거쳐 사용하였다. 외상성 뇌손상 수술의 결과를 확인하기 위하여 실험이 끝난 동물의 뇌조직을 cresyl violet을 이용하여 닛슬염색 (Nissl Staining)을 수행하였으며, 극저온손상에 노출된 대뇌피질에 존재하는 신경세포의 형태학적인 변성을 확인하였다.

3. 실험동물처리

수술이 끝난 동물은 수술 후 30분, 1, 3, 6, 12, 24시간, 3, 5, 7일 (각 실험군 및 대조군당 5마리)에 뇌조직을 만들었다. 각 동물은 pentobarbital sodium으로 마취시킨 다음 흉강을 열고 심장을 노출시킨 후 캐눌러 (cannula)를 좌심실을 통하여 오름 대동맥 (ascending aorta)에 삽입하고, 우심방을 통하여 방혈시킴과 동시에 관류수세기 (Master Flex, CA, USA)를 이용하여 생리식염수 (pH 7.4) 500 mL로 관류 수세하였다. 이어서 4°C 의 4% paraformaldehyde-용액 (0.1 M phosphate buffer; pH 7.4; 이하 PB) 500 mL로 30분간 관류 고정하였다. 관류 고정이 끝난 동물은 골절단기를 이용하여 뇌를 적출한 다음 동일 고정액에서 4~6시간 후고정 하였다. 후고정이 끝난 조직은 냉동절편 제작 시 생길 수 있는 동결손상방지를 위하여 0.1% M PB에 희석한 30% sucrose (pH 7.4)용액에 넣어 바닥에 가라앉을 때까지 침적시켰다. 이 후 뇌를 embedding medium에 포매하여 sliding microtome을 이용하여 $30\mu\text{m}$ 의 두께로 관상절단 (coronal section)한 냉동조직절편을 제작하였으며, 면역염색 할 때까지 저장용액 (storing solution)을 넣은 6-well plate에 넣어 보관하였다.

4. 면역조직화학염색

이 실험에서는 부유법을 이용한 ABC 염색방법을 수행하였다. 각 조직절편은 0.1 M PBS (pH 7.4)로 10분 동안 3회 수세하고, 면역염색 중 나타날 수 있는 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 조직절편을 10% normal goat serum에 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 후 각 조직은 0.3% Triton X-100 및 2% bovine serum albumin이 혼합되어 있는 PBS에 혼합한 rabbit anti-parvalbumin (PV) 또는 rabbit anti-calbindin D-28k (CB) 항체 (diluted 1 : 1,000; Chemicon, CA, USA)에 실온에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 0.1 M PBS로 10분 동안 3회 수세하고, 계속하여 goat anti-rabbit IgG (Vector, CA, USA) 등의 이차항체 및 ABC complex (Vector, CA, USA)에 실온에서 각각 2시간씩 반응시켰다.

각 단계의 반응 후에는 PBS-용액으로 10분간 3차례 세척하였다. 항원항체 반응이 끝난 조직은 0.03% 과산화수소와 0.05% DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrachloride, Sigma, USA)가 함유된 Tris buffer (pH 7.4)용액에서 1~2분간 발색시켰다. 발색반응이 끝난 조직은 수세 후 통상적인 탈수와 투명화 과정을 거쳐 Canada Balsam으로 봉입한 후 광학현미경으로 각각의 면역반응성을 관찰하였다.

5. 세포계수

면역조직화학염색의 결과를 정량화하기 위하여 각 실험군에서 PV 및 CB에 면역반응성을 나타내는 세포를 계수하였다 (Kim et al., 2007a, b, 2008). 각각의 실험군에 속하는 조직절편은 AxioCam HRc camera (CarlZeiss, Germany)를 통하여 PC monitor에 연결된 현미경을 통하여 관찰하였다. 25~50배의 배율에서 해마 (hippocampus)의 윤곽을 관찰하였고, PV 및 CB에 면역반응성을 나타내는 신경세포는 100배의 배율에서 계수하였다. 모든 면역반응을 나타내는 신경세포들은 반응성의 정도에 관계없이 계수하였다. 신경세포의 계수는 선입견에 따른 오차를 줄이기 위해 뇌조직에 대하여 전문지식이 없는 두 명이 계수하였다. 신경세포의 숫자는 각 대조군 및 실험군에서 15개의 인접한 조직절편으로부터 얻어진 값의 평균치로 나타내었다. 핵의 크기에 대한 치수가 잠재적인표본추출편의 (potential sampling bias)를 교정하는데 사용되었기 때문에 샘플모집단에서 각 핵의 평균 직경은 200배의 배율에서 측정하였다. 이때, 신경세포수는 Abercrombie correction method를 이용하여 계산되었다; $N (\text{per mm}^2) = n [T/(T+D)]/A$, N은 정확한 신경세포숫자, T는 조직의 두께, 그리고 A는 각 해마지역의 측정면적 (mm^2).

6. 농도분석

면역조직화학염색의 결과에 대한 농도분석을 위하여 각 실험군에 속하는 조직절편을 CCD camera를 통하여 PC monitor에 연결된 현미경을 통하여 관찰하였다. 각 조직은 25 및 200배의 현미경배율로 monitor를 통하여 사진 촬영하였다. 모든 측정 및 사진촬영은 동일한 광학상태와 밝기 아래서 수행하였으며, 면역염색의 농도분석을 위하여 각 대조군 및 실험군에서 15개의 인접한 조직절편으로부터 얻어진 값의 평균치로 나타내었다. 각각의 사진파일의 밝기와 명암은 Adobe Photoshop version 8.0을 이용하여 조정하였으며, NIH Image 1.59 software를 이용하여 자료를 분석하였다. 배경에 대한 농도값은 면역반응성이 나타난 농도 값으로부터 빼고 측정하였다. 농도의 측정은 256 그레이스케일 (256 gray scale)의 숫자로 묘사하였다 (Kim et al., 2007a, b, 2008).

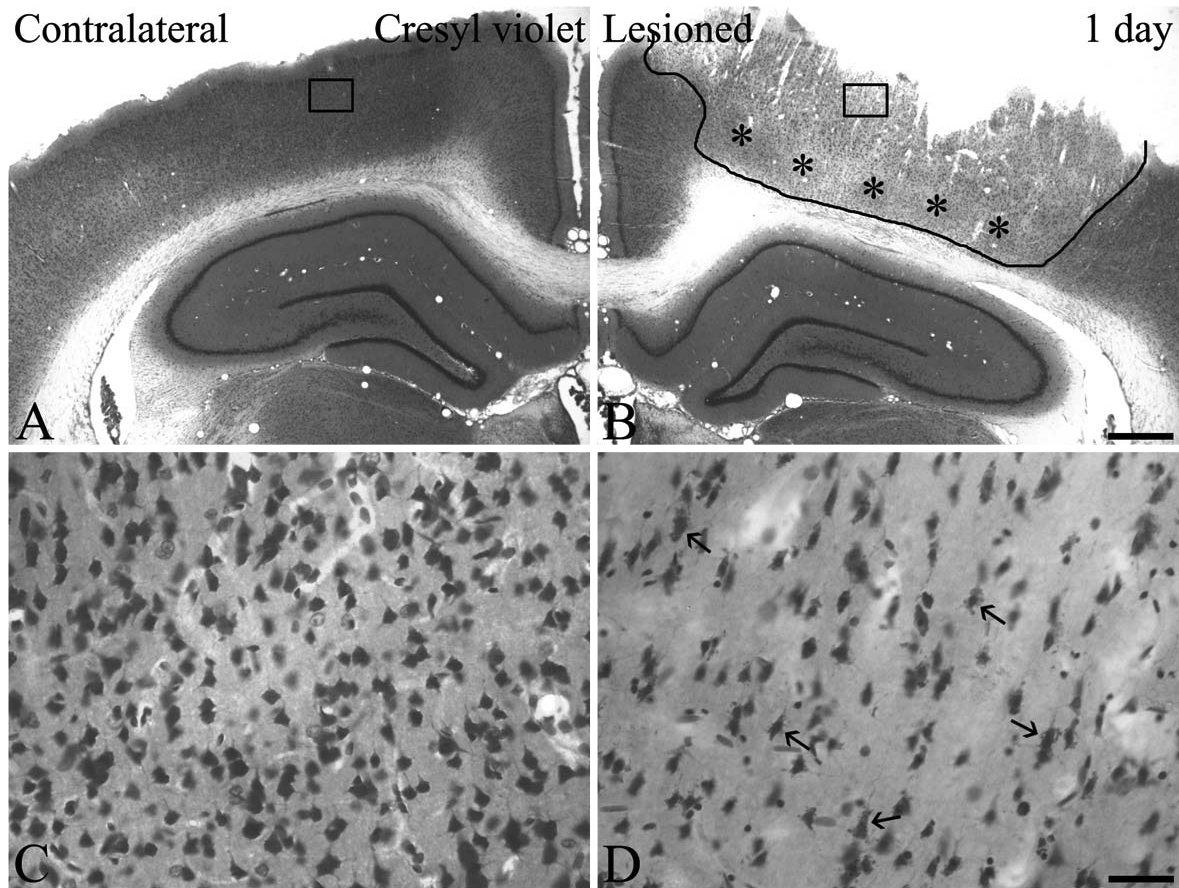


Fig. 1. Neuronal loss was assessed with cresyl violet staining (A-D). A representative cresyl violet stained coronal section shows the evidence of morphological changes in the ipsilateral cerebral cortex (B, D) compared to the contralateral side (A, C). An asterisk (*) represents the morphological alteration of cortical neurons at the cortical impact site following TBI. The arrows in panel D indicate the necrotic neuronal changes in ipsilateral cerebral cortex. A line in Panel B shows the cryolesion injury volume in lesioned cerebral hemisphere. Rectangles in panels A and B indicate the regions of panels C and D. Bar=400 μ m (panels A and B) and 25 μ m (panels C and D).

7. 분석

이 실험의 결과로 얻어진 모든 자료는 통계학적인 유의성을 검증하기 위하여 one-way ANOVA를 사용하여 분석하였다. Bonferroni's test는 사후비교 (post-hoc comparison)를 위하여 사용하였다. 0.01이나 0.05 이하의 P 값은 통계학적인 유의성을 고려하여 표시하였다(Kwak et al., 2005; Kim et al., 2007a, b, 2008).

결 과

대조군에 비해 극저온손상에 노출시켜 외상성 뇌손상을 유발한 실험군은 대뇌피질에서 광범위한 신경세포의 변성이 나타났다(Fig. 1). 이러한 대뇌피질의 신경세포변성은 극저온손상이 효과적으로 대뇌의 특정 피질부위를 파괴시켰기 때문이라고 생각된다. 또한, 뇌손상 후 특정한 시간대별

로 PV 및 CB에 면역반응성을 나타내는 신경세포의 변화가 다양하게 나타났으며, 이러한 변화는 외상성 뇌손상에 노출되지 않은 반대측 대뇌의 해마에서도 일정부분 나타났다.

1. PV 면역반응성

대조군의 해마에 존재하는 바구니세포(basket cell), 축삭-축삭간세포(axo-axonic cells), 해마의 피라밋세포층(pyramidal cell layer) 및 치아이랑의 과립세포층(granule cell layer)에 인접한 사이신경을 포함한 다양한 사이신경의 세포체 및 돌기에서 PV 면역반응성이 관찰되었다(Fig. 2A1-A4). 또한, 해마에서 관찰되는 PV 면역반응 사이신경세포의 수는 치아이랑의 hilus에서 15.2 ± 3.13 , CA1 구역에서 9.8 ± 1.80 , CA2-3 구역에서 17.8 ± 2.46 으로 나타났다(Fig. 2A, F). 이러한 결과는 PV의 발현양상을 보고한 Celio의 결과와 유사하였다(Celio, 1990). 외상성 뇌손상 후 30분 군에서 PV의 면역반응성이 현저하게 저하되었다. 극저온손상에 노출된 쪽

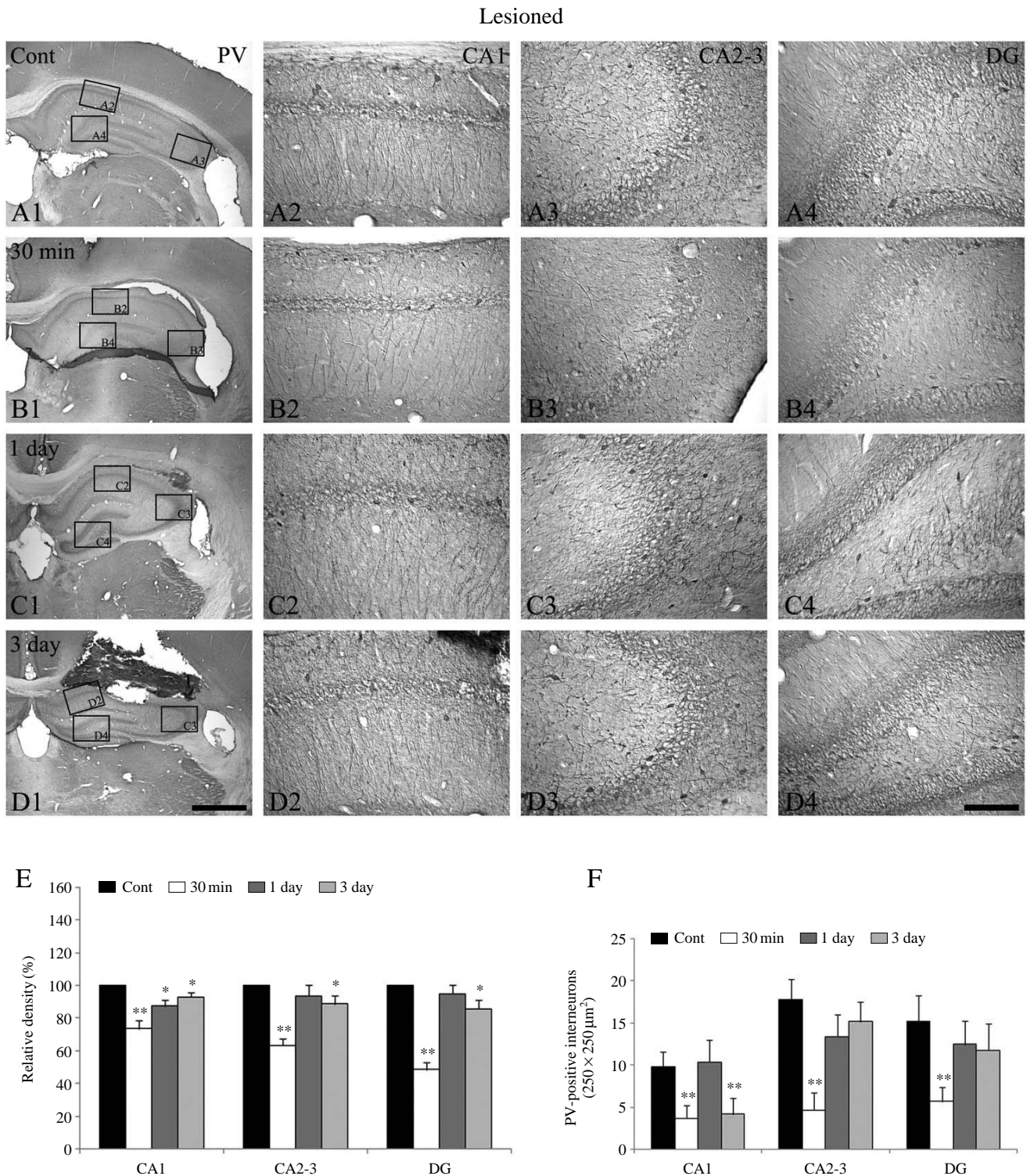


Fig. 2. PV immunoreactivity in the ipsilateral hippocampus following cryolesion. In the control animal, PV immunoreactive neurons are localized in the hilus and in the subgranular cell layer of the dentate gyrus (A4). PV immunoreactive neurons are also abundantly observed in the CA1 (A2) and the CA2-3 region (A3). Following TBI, PV immunoreactivities are changed as depending on the time courses (B, C and D). Rectangles in panels A1, B1, C1 and D1 indicate the high-magnification of panels A2-A4, B2-B4, C2-C4 and D2-D4. Bars represent 400 μm in A1, B1, C1 and D1 and 50 μm in A2-A4, B2-B4, C2-C4 and D2-D4. Quantitative analyses of PV immunoreactivities in lesioned hippocampus (E, mean \pm S.E.M). Significant differences from control hippocampus, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. Average cell numbers of PV immunoreactive interneurons in the lesioned hippocampus following TBI (F, mean \pm SD). Note the down-regulation of PV-positive interneurons in the CA1 region at 3 day following TBI seem to be indicative of physical damage. Significant differences from the controls, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

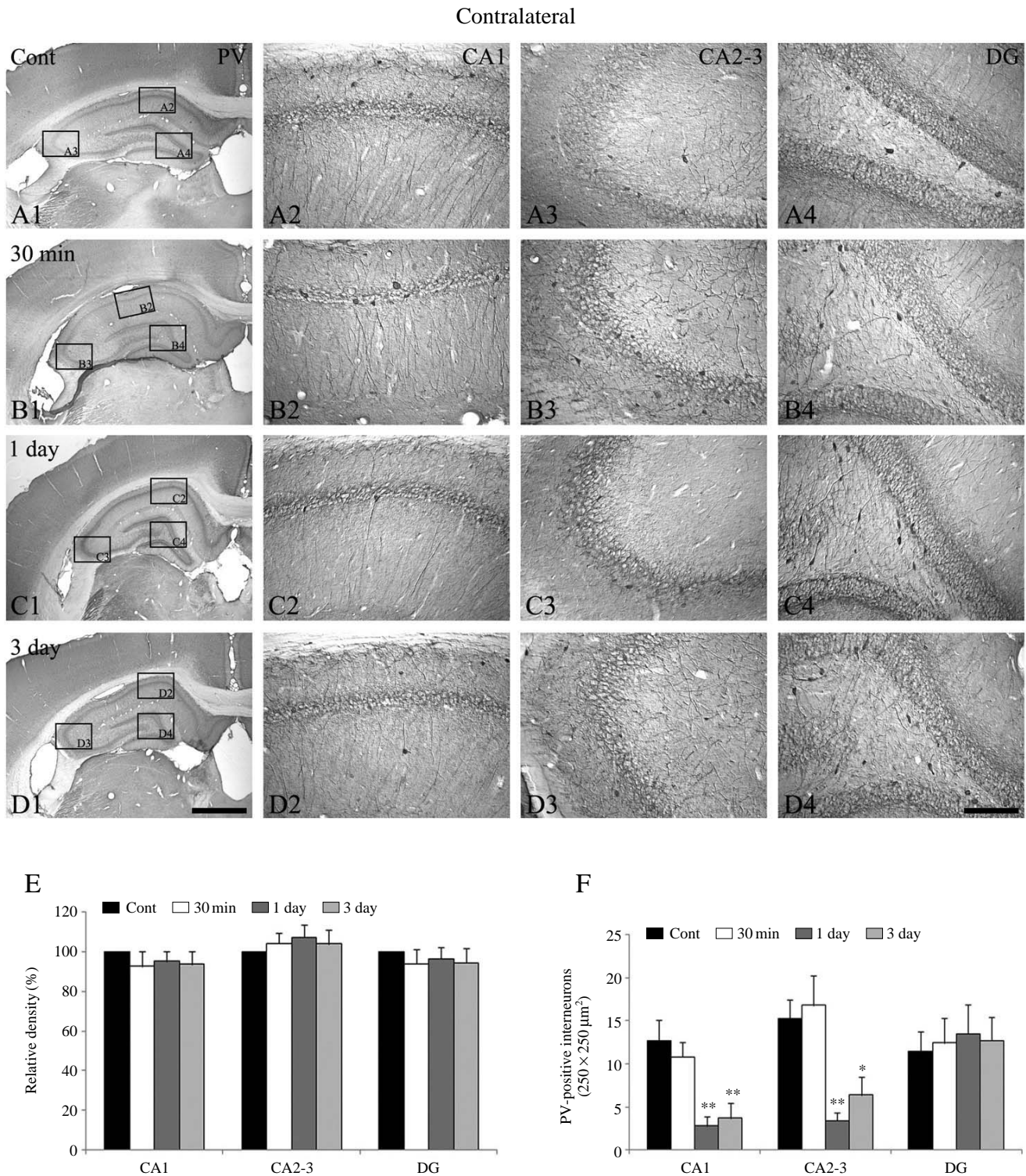


Fig. 3. PV immunoreactivity in the contralateral hippocampus following TBI. In the control animal, PV immunoreactivities are similar to control of lesioned hippocampus (A1-A4). One day following TBI, although PV immunoreactivity is unchanged, PV immunoreactive neurons are reduced in CA1-3 region as compared to control levels (C1-C4). These change are maintained until 3 day following TBI (D1-D4). Rectangles in panels A1, B1, C1 and D1 indicate the high-magnification of panels A2-A4, B2-B4, C2-C4 and D2-D4. Bars represent 400 μm in A1, B1, C1 and D1 and 50 μm in A2-A4, B2-B4, C2-C4 and D2-D4. Quantitative analyses of PV immunoreactivities in contralateral hippocampus (E, mean ± S.E.M). Average cell numbers of PV immunoreactive interneurons in the contralateral hippocampus following TBI (F, mean ± SD). Note the down-regulation of PV-positive interneurons in the CA1-3 region at 1~3 day following TBI. Significant differences from the controls, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

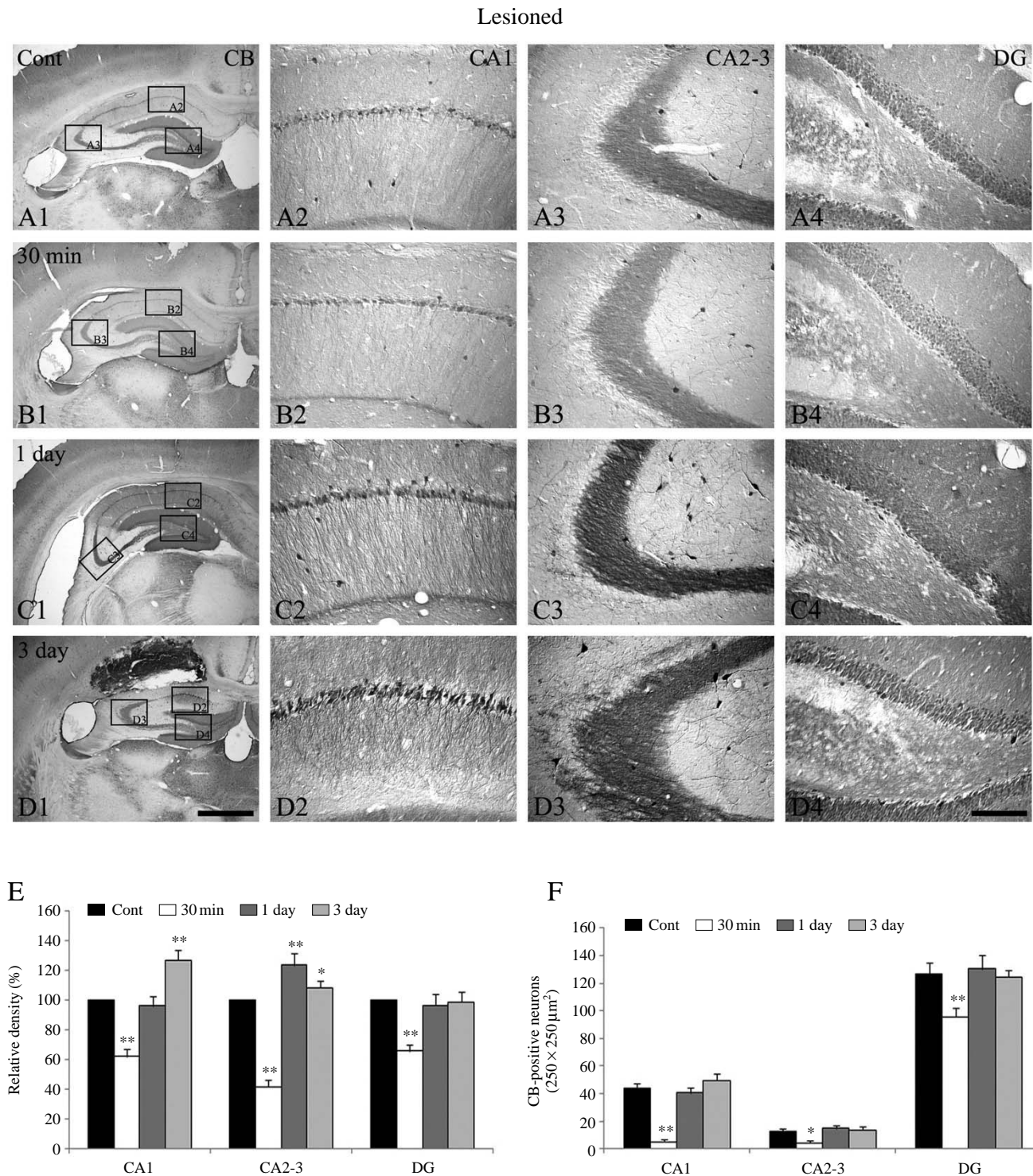


Fig. 4. CB immunoreactivity in the ipsilateral hippocampus following TBI. At 30 min after TBI (B1-B4), CB immunoreactivity is altered in all of lesioned hippocampus as compared to control levels (A1-A4). CB immunoreactive neurons are also reduced except the dentate gyrus. One day following TBI, although CB immunoreactivity in the CA2-3 region is enhanced over control levels, CB immunoreactive neurons are recovered to control levels (C1-C4). Three day following TBI, CB immunoreactive neurons are unaltered (D1-D4). Rectangles in panels A1, B1, C1 and D1 indicate the high-magnification of panels A2-A4, B2-B4, C2-C4 and D2-D4. Bars represent 400 μm in A1, B1, C1 and D1 and 50 μm in A2-A4, B2-B4, C2-C4 and D2-D4. Quantitative analyses of CB immunoreactivities in lesioned hippocampus (E, mean ± S.E.M). Significant differences from control hippocampus, ** $P < 0.01$. Average cell numbers of CB immunoreactive interneurons in the lesioned hippocampus following TBI (F, mean ± SD). Note the down-regulation of CB-positive neurons in the CA1-3 region at 30 min following TBI. Significant differences from the controls, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

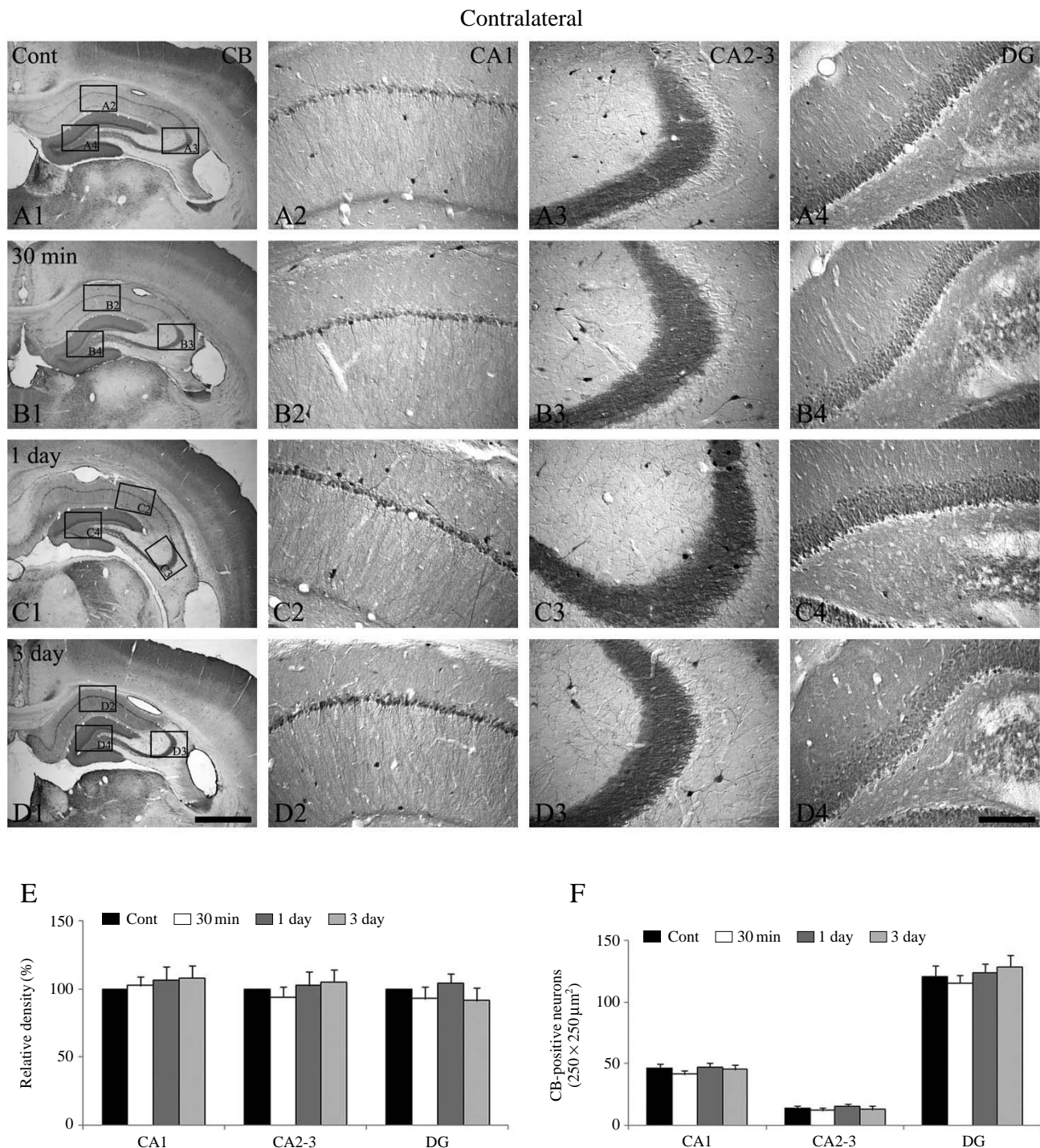


Fig. 5. CB immunoreactivity in the contralateral hippocampus following TBI. In the control animal, CB immunoreactivities are similar to control of lesioned hippocampus (A1-A4). Following TBI, CB immunoreactivity is unaltered in all of contralateral hippocampus as depend to time course (B1-D4). Rectangles in panels A1, B1, C1 and D1 indicate the high-magnification of panels A2-A4, B2-B4, C2-C4 and D2-D4. Bars represent 400 μm in A1, B1, C1 and D1 and 50 μm in A2-A4, B2-B4, C2-C4 and D2-D4. Quantitative analyses of CB immunoreactivities in contralateral hippocampus (E, mean ± S.E.M). Average cell numbers of CB immunoreactive neurons in the contralateral hippocampus following TBI (F, mean ± SD).

해마의 암몬뿔1 (Cornu ammonis, CA1), 암몬뿔2-3 (Cornu ammonis, CA2-3) 및 치아이랑에서 PV 면역반응성은 전체

적으로 대조군에 비해 현저하게 감소되었으며, PV에 면역 반응을 나타내는 사이신경세포의 수는 치아이랑의 hilus

에서 5.7 ± 1.75 , CA1 구역에서 3.7 ± 1.51 , CA2-3 구역에서 4.7 ± 2.13 으로 두드러지게 감소하였다 (Fig. 2B1-B4, E, F). 이러한 PV 면역염색성의 감소는 손상 후 1일군부터 대조군 수준으로 회복되었다. 외상성 뇌손상 후 1일군 해마에서 PV 면역반응성이 증가하여 PV 면역염색성을 나타내는 사이신경세포의 수가 치아이랑의 hilus에서 12.5 ± 2.81 , CA1 구역에서 10.4 ± 2.62 , CA2-3 구역에서 13.4 ± 2.64 로 증가하였다 (Fig. 2C1-C4, E, F). 이러한 PV 면역반응의 변화는 3일군 이후까지 유지되었다 (Fig. 2D1-D4).

외상성 뇌손상에 노출되지 않은 반대쪽 해마에서는 PV 면역반응이 대조군에 비해 손상 후 30분~12시간 군에서 특이한 변화는 나타나지 않았다 (Fig. 3A1-B4). 그러나 뇌손상 후 1일군 해마에서는 PV 면역반응성의 변화는 없으나 PV에 면역반응성을 나타내는 사이신경세포의 숫자는 치아이랑을 제외한 해마의 구역에서 1일군부터 현저하게 감소되어 3일군까지 유지되었다 (Fig. 3C1-C4, D1-D4, E, F).

2. CB 면역반응성

대조군의 해마에서 나타나는 CB 면역반응성은 치아이랑의 granule cell, 일부의 CA1-2 구역의 pyramidal cell 및 CA1-3 구역의 사이신경세포에서 볼 수 있었다 (Fig. 4A1-A4). 또한, 해마에서 나타나는 CB 면역반응 사이신경세포의 평수는 치아이랑의 hilus에서 126.4 ± 8.34 , CA1 구역에서 43.5 ± 3.78 , CA2-3 구역에서 12.7 ± 2.14 이었다 (Fig. 4A, F). 이러한 결과는 CB의 발현양상을 보고한 Celio의 결과와 유사하였다 (Celio, 1990). 외상성 뇌손상 후 30분 군에서 CB의 면역반응성은 해마의 전 영역에서 현저하게 저하되는 것을 확인 할 수 있었으며, CB 면역반응 사이신경세포의 수는 치아이랑의 hilus에서 95.8 ± 5.97 , CA1 구역에서 5.1 ± 1.75 , CA2-3 구역에서 4.1 ± 1.94 로 DG를 제외한 나머지 구역에서 두드러지게 감소하였다 (Fig. 4B1-B4, E, F). 이러한 CB 면역염색성의 감소는 손상 후 1일 군에서부터 대조군 수준으로 회복되었으며, 이러한 면역염색성의 회복수준은 치아이랑을 제외한 CA1 및 CA2-3에서 대조군에 비해 현저하게 증가하였다 (Fig. 4C1-C4, E). 그러나, CB에 면역반응성을 나타내는 세포의 숫자는 치아이랑의 hilus에서 130.4 ± 9.74 , CA1 구역에서 40.7 ± 3.26 , CA2-3 구역에서 14.8 ± 2.46 으로 대조군과 유사한 수준으로 증가하였다 (Fig. 4F). 이러한 CB 면역반응성의 증가는 대조군에 비해 뇌손상 후 3일군 CA1 구역에서 유의한 변화를 보였으나, CB에 면역반응성을 나타내는 신경세포의 수에는 특이한 변화가 없었다 (Fig. 4D1-D4, E, F).

외상성 뇌손상에 노출되지 않은 반대측 해마에서 나타나는 CB 면역반응성이 해마의 전 영역에서 대조군과 비슷한 수준을 유지하였다 (Fig. 5A1-B4, E). 또한 CB에 면역반응성

을 나타내는 세포의 수도 특이한 변화가 없었으며, 이러한 발현양상은 손상 후 3일군까지 유지되었다 (Fig. 5C1-D4, E, F).

고 찰

외상성 뇌손상은 유아청소년 및 성인에서 사망과 사지불구의 발생률을 높이는 요인으로 잘 알려져 있으며, 특히 외상성 뇌손상 후 후천적으로 발병하는 간질발생의 주요한 요인 중의 하나로 잘 알려져 있다 (Kharlamov et al., 2011). 최근 이러한 과정의 이해를 위해 많은 종류의 질환동물모델을 이용하여 실험을 진행하고 있으며, 이를 통하여 간질 질환으로의 이환에 대한 병태생리학적인 중요한 단서들을 많이 제공하고 있다. 그러나, 외상성 뇌손상과 간질발생간의 연관관계가 많이 연구되고 있음에도 불구하고, 뇌손상 후 간질이 발병되는 복잡한 생물학적인 작용기전은 여전히 논의의 대상이 되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 외상성 뇌손상 후 초기시간대에 뇌의 해마에서 나타나는 신경전달과정의 이해를 높이기 위해 칼슘결합단백질의 변화를 확인하는 연구를 수행하였다. 연구결과 뇌손상 후 특정한 시간대에 칼슘결합단백질의 발현에 변화가 나타나는 것을 확인 할 수 있었으며, 이러한 변화는 시간경과에 따라 다양한 발현양상을 나타내었다. 이러한 연구의 결과는 외상성 뇌손상이 유발된 후 초기시간대에 억제성 및 흥분성신경전달과정의 부조화가 나타나고 이러한 변화에 의해 외상성 뇌손상 후 간질발생이 진행되는 것으로 생각된다.

1. 외상성 뇌손상 후 동측 해마에서 나타나는 칼슘결합단백질의 발현변화

뇌신경세포는 다양한 병태생리학적인 손상에 의해 세포내의 칼슘농도가 증가하게 되면 신경변성과 관련된 다양한 분자의 변화를 유도하게 되며, 특히 이러한 과정 중 칼슘결합단백질의 감소는 간질을 포함한 다양한 뇌질환에서 신경세포의 사멸을 유도하기도 한다 (Magloczky et al., 1997; Fritschy et al., 1999; Sutcliffe et al., 1999). 특히, 선행연구에 따르면 간질질환동물 및 간질환자의 해마복합체에서 칼슘결합단백질이 함유되어 있는 신경세포가 감소된다고 보고되고 있다 (Sloviter, 1987, 1991a, b; De Lanerolle et al., 1989; Buckmaster & Jongen-Relo, 1999; Magloczky et al., 2000; Gorter et al., 2001). 따라서, 칼슘결합단백질의 발현감소는 간질질환을 가지고 있는 해마에서 일어나는 신경세포의 변성을 나타내는 하나의 표시자로 인식되고 있다 (Magloczky et al., 1997; Fritschy et al., 1999; Sutcliffe et al., 1999). 본 실험의 결과 외상성 뇌손상 후 30분 군에서 손상 받은쪽 해마

에 위치한 일부 신경세포에서 칼슘결합단백질의 감소가 나타났다. 일부 간질질환 해마에서 나타나는 억제성 신경전달 체계 (GABAergic system)의 결손에 근거하여 (Kang et al., 2001a, b, 2003a, b; Hwang et al., 2004a, b), 이 실험결과는 극저온노출로 유발된 뇌손상 후 해마에서 볼 수 있는 칼슘결합단백질 면역반응성의 변화가 이 시간대에 나타나는 신경세포의 사멸보다는 GABAergic inhibition이 감소될 때 일어나는 신경세포의 과흥분에서 기인하는 것으로 생각된다. 특히, 간질질환동물모델의 해마에서 다양한 GABA_A receptor agonist/antagonist가 칼슘결합단백질의 발현을 조절한다는 보고도 있다 (Kwak et al., 2005). 따라서, 이 연구에서 보이는 해마에서 칼슘결합단백질에 면역반응성을 나타내는 신경세포의 감소는 GABA_A receptor를 통한 inhibitory neurotransmission의 감소에 의해 해마내 신경세포들의 과흥분성 신경전달이 증가되어 있다는 것을 의미한다고 생각된다. 해마의 해마이행부(subiculum) 및 CA1 구역으로 투사되는 신경섬유가 GABAergic interneurons의 억제성 조절을 받는다는 보고들은 (Jones & Lambert, 1990a, b; Empson & Heinemann, 1995; Fritschy et al., 1999) 이 시간대에 CA1 구역으로 들어오는 흥분성 신경전달의 조절기능에 손상이 나타나고, 해당 구역에서의 흥분성 신경전달이 증가하는 결과를 유발하는 것으로 생각된다. 이는 이 실험의 결과와 유사한 결과로 외상성 뇌손상 후 빠른시간대에 CA1 구역의 억제성사이신경에서 칼슘결합단백질의 감소가 신경세포의 과흥분성에 관여하는 것으로 생각된다.

한편, 이 실험에서 외상성 뇌손상 후 1일 이후 뇌손상을 받은 쪽 해마에서 칼슘결합단백질의 발현이 증가되었으며, 이러한 증가양상은 손상 후 3일군까지 유지되었다. 간질질환 해마에서 손상되지 않고 남아있는 사이신경들은 GABAergic inhibition의 감소에 대한 보상작용으로 과흥분성을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Rowley et al., 1995; Beau & Alger, 1998; Isokawa, 1998; Cossart et al., 2001). 또한, 외상성 뇌손상 후 3일내의 초기 시간대에 손상된 뇌의 특정구역에서 axonal sprouting과 같은 비정상적인 반응이 시작되며, 이러한 변화가 1주일간 유지된다 (Yang et al., 1996; King et al., 2001). Tetrodotoxin (TTX)으로 외상성 뇌손상을 치료할 경우 손상 후 3일 이내에 이루어져야 하며, 치료가 지연되면 손상된 뇌조직의 간질발생을 악화시킨다고 한다 (Graber & Prince, 2006). 특히, 손상된 대뇌피질에서 interictal epileptiform activity가 나타나며, c-fos 면역반응성이 손상 후 일주일내 급격하게 증가한다 (Jacobs et al., 2001). 이러한 변화는 뇌손상 후 초기시간대에 비정상적인 신경의 활성화가 시작된다는 것을 의미한다. 따라서, 이 실험의 결과 외상성 뇌손상 후 30분에는 감소하였으나 1일과 3일군에서 칼슘결합단백질의 발현이 회복되는 것은 이 시간대에 외상성 뇌손상을 직접 받은 쪽 해마에서 나타나는 다양한 병태생리학적

인 작용으로부터 신경세포를 보호하기 위한 일련의 보상작용에서 기인하는 것으로 생각된다.

2. 외상성 뇌손상 후 반대측 해마에서 나타나는 칼슘결합단백질의 발현변화

외상성 뇌손상 후 손상된 뇌구역에서 나타나는 억제성 및 흥분성 신경전달과정의 비정상적인 변화에 따라 신경세포의 흥분성이 증가하고, 오랜 시간에 걸친 신경세포의 과흥분성이 점차 가속화된다는 보고에 비추어 볼 때 (Reeves et al., 1995; Coulter et al., 1996; Bush et al., 1999; Golarai et al., 2001; Graber & Prince, 2004; Prince et al., 2009) 이러한 과정들은 외상성 뇌손상 후 간질발생에 있어서 중요한 요인으로 작용하는 것으로 생각된다. 외상성 뇌손상 후 해마 및 대뇌피질에서 나타나는 간질발생에서 신경연접 후 억제 (postsynaptic inhibition) 및 억제성 사이신경의 감소가 나타난다는 보고가 있다 (Neumann-Haefelin et al., 1995; Williamson et al., 1999; Zhu & Roper, 2000; Andre et al., 2001; Sayin et al., 2003). 특히, 손상을 받지 않은 반대측 대뇌피질에서 pyramidal cell의 세포체에 형성되어 있는 fast-spiking (FS) interneurons을 포함한 억제성 신경연접이 현저하게 감소된다는 보고도 있다 (Prince et al., 2009). 이러한 과정을 통해 대뇌피질에서의 간질발생과정 중 FS interneurons에서 구조적인 변화가 나타나고, 이것이 GABAergic neurotransmission의 효과를 감소시키는 하나의 요인으로 작용하는 것으로 보고하고 있다. 또한 kainate에 의해 유발된 해마의 간질 발생과정 중에서도 이와 같은 기능적인 억제성신경전달의 손실이 나타난다 (Franck et al., 1988). 이 실험에서 외상성 뇌손상에 노출되지 않은 반대측 해마에서 나타나는 칼슘결합단백질의 변화는 CA1-3 구역에 위치한 억제성 사이신경세포에서 관찰되었다. 즉, CB에 면역반응성을 나타내는 사이신경세포에는 특이한 변화가 없는 반면, PV에 면역반응성을 나타내는 사이신경세포는 뇌손상 후 1일 이후에 감소하였다. 허혈성 뇌손상을 포함한 특정한 병태생리학적 상황에서 해마를 포함한 반대측 대뇌반구에서 GABAergic inhibition의 감소가 나타난다는 보고에 비추어 볼 때 (Witte et al., 2000) 이 시간대에 반대측 해마에서 나타나는 사이신경세포에서의 PV 면역반응감소는 GABAergic inhibition의 손상에 기인하는 것으로 생각된다.

한편, 해마에 위치한 NMDA receptor subtypes인 NR1, NR2A 및 NR2B와 AMPA receptor subtype인 GluR1의 발현이 외상성 뇌손상 후 15분경에 현저하게 증가하는 반면에, 손상 받은 쪽 대뇌피질에서는 이들의 발현이 감소된다 (Schumann et al., 2008). 그러나 이러한 발현이 뇌손상 후 24시간군의 반대측 대뇌반구에서는 정상군 수준으로 회복되고 (Kumar et al., 2002), 외상성 뇌손상 이후 1~7일군까지 유지된다는 보고도 있다 (Giza et al., 2006). 또한, 외상성 뇌

손상 후 3시간~6시간대에 GABA_A α 1 receptor subunit의 발현이 증가하였다가 손상 후 24시간과 7일경에 현저하게 감소된다는 보고는 (Gibson et al., 2010) 이 실험의 결과와 유사하게 뇌손상 후 1일 이후부터 반대측 해마에서 증가된 glutamate receptor subtypes에 의한 신경세포의 과흥분성을 효율적으로 조절하지 못하였기 때문에 외상성 뇌손상 후 간질발생이 악화되도록 한다고 생각된다. 실제, GABAergic interneurons는 NMDA receptor의 활성화로 유발되는 세포 내 칼슘유입을 조절하는데 중요한 역할을 하며, 손상 받지 않은 GABAergic interneurons는 해마에 위치한 신경세포의 동시발생적인 탈분극을 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다 (Babb et al., 1989; Masukawa et al., 1989). 더욱이, 외상성 뇌손상은 대뇌피질, 백색질, 해마 및 시상에서 신경세포의 과흥분성을 유발하는 광범위하고, 다양한 분자세포적인 변화를 촉진시키며, 이러한 과정을 통하여 외상성 뇌손상 후 간질이 발병되도록 하는 것으로 알려져 있다 (Santhakumar et al., 2000, 2001; Ratzliff et al., 2004; Hall et al., 2008; Hunt et al., 2009; Yang et al., 2010). 따라서, 이 연구에서 외상성 뇌손상에 노출되지 않은 반대측 해마에서 나타나는 PV 면역반응 신경세포의 감소는 동측 해마에서 나타나는 칼슘결합단백질의 변화와 함께 외상성 뇌손상 후 간질발생에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Agrawal A, Timothy J, Pandit L, Manju M: Post-traumatic epilepsy: An overview. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 108(5) : 433-439, 2006.
- Andre V, Marescaux C, Nehlig A, Fritschy JM: Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 11 : 452-468, 2001.
- Andressen C, Blumcke J, Celio MR: Calcium-binding proteins; selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 271 : 181-208, 1993.
- Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH: Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci* 9 : 2562-2574, 1989.
- Baimbridge KG, Miller JJ: Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat. *Brain Res* 245 : 223-229, 1982.
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH: Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15 : 303-308, 1992.
- Beau FE, Alger BE : Transient suppression of GABAA-receptor-mediated IPSPs after epileptiform burst discharges in CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* 79 : 659-669, 1998.
- Buckmaster PS, Jongen-Relo AL: Highly specific neuron loss preserves lateral inhibitory circuits in the dentate gyrus of kainate-induced epileptic rats. *J Neurosci* 19 : 9519-9529, 1999.
- Bush PC, Prince DA, Miller KD: Increased pyramidal excitability and NMDA conductance can explain posttraumatic epileptogenesis without disinhibition; a model. *J Neurophysiol* 82 : 1748-1758, 1999.
- Caveness WF: Epilepsy, a product of trauma in our time. *Epilepsia* 17 : 207-215, 1976.
- Celio MR: Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35 : 375-475, 1990.
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchán-Pérez A, De Felipe J, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C: Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* 4 : 52-62, 2001.
- Coulter DA, Rafiq A, Shumate M, Gong QZ, DeLorenzo RJ, Lyeth BG: Brain injury-induced enhanced limbic epileptogenesis; anatomical and physiological parallels to an animal model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 26 : 81-91, 1996.
- De Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD: Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 495 : 387-395, 1989.
- Empson RM, Heinemann U: The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice. *J Physiol* 484 : 707-720, 1995.
- Franck JE, Kunkel DD, Baskin DG, Schwartzkroin PA: Inhibition in kainate-lesioned hyperexcitable hippocampi; physiologic, autoradiographic, and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 8 : 1991-2002, 1988.
- Fritschy JM, Kiener T, Bouilleret V, Loup F: GABAergic neurons and GABAA-receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochem Int* 34 : 435-445, 1999.
- Gaetz M: The neurophysiology of brain injury. *Clin Neurophysiol* 115 : 4-18, 2004.
- Gibson CJ, Meyer RC, Hamm RJ: Traumatic brain injury and the effects of diazepam, diltiazem, and MK-801 on GABA-B receptor subunit expression in rat hippocampus. *J Biomed Sci* 17 : 38, 2010.
- Giza CC, Maria NS, Hovda DA: N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes after traumatic injury to the developing brain. *J Neurotrauma* 23 : 950-961, 2006.
- Golarai G, Greenwood AC, Feeney DM, Connor JA: Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *J Neurosci* 21 : 8523-8537, 2001.
- Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, Lopes da Silva FH: Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fiber sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosci* 13 : 657-669, 2001.
- Graber KD, Prince DA: A critical period for prevention of posttraumatic neocortical hyperexcitability in rats. *Ann Neurol* 55 : 860-870, 2004.
- Graber KD, Prince DA: Chronic partial cortical isolation. In Pitkanen

- A, Schwartzkroin P, Moshe S (Eds) Models of seizures and epilepsy. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 477-493, 2006.
- Guerrini R: Idiopathic epilepsy and paroxysmal dyskinesia. *Epilepsia* 42(Suppl 3): 36-41, 2001.
- Gupta YK, Gupta M: Post traumatic epilepsy: A review of scientific evidence. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 50(1): 7-16, 2006.
- Hall ED, Bryant YD, Cho W, Sullivan PG: Evolution of post-traumatic neurodegeneration after controlled cortical impact traumatic brain injury in mice and rats as assessed by the de Olmos silver and glulorejade staining methods. *J Neurotrauma* 25 : 235-247, 2008.
- Hunt RF, Scheff SW, Smith BN: Posttraumatic epilepsy after controlled cortical impact injury in mice. *Exp Neurol* 215 : 243-252, 2009.
- Hwang IK, Nam YS, Chung DW, Lee HS, Yoon YS, Yoo KY, Kang TC, Lee IS, Won MH: Changes in the expression of calbindin D-28k in the gerbil hippocampus following seizure. *Neurochem Int* 44 : 145-152, 2004a.
- Hwang IK, Park SK, An SJ, Woo KY, Kim DS, Jung JY, Won MH, Choi SY, Kwon OS, Kang TC: GABAA, not GABAB, receptor shows subunit- and spatial-specific alterations in the hippocampus of seizure prone gerbils. *Brain Res* 1003 : 98-107, 2004b.
- Isokawa M: Modulation of GABAA receptor-mediated inhibition by postsynaptic calcium in epileptic hippocampal neurons. *Brain Res* 810 : 241-250, 1998.
- Jacobs KM, Parada I, Prince DA: Enhanced c-fos staining in two post-lesional models of cortical hyperexcitability; freeze lesions and partial cortical isolations. *Epilepsia* 42(Suppl 7) : 221, 2001.
- Jande SS, Maler L, Lawson DE: Immunohistochemical mapping of vitamin D-dependent calcium-binding protein in brain. *Nature* 294 : 765-767, 1981.
- Jones RS, Lambert JD: Entorhinal-hippocampal connections; a speculative view of their function. *Trend Neurosci* 16 : 58-64, 1990a.
- Jones RS, Lambert JD: Synchronous discharges in the rat entorhinal cortex in vitro; site of initiation and the role of excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 34 : 657-670, 1990b.
- Kang TC, Park SK, Bahn JH, Jeon SG, Jo SM, Cho SW, Choi SY, Won MH: The alteration of gamma-aminobutyric acid-transaminase expression in the gerbil hippocampus induced by seizure. *Neurochem Int* 38 : 609-614, 2001a.
- Kang TC, Kim HS, Seo MO, Choi SY, Kwon OS, Baek NI, Lee HY, Won MH : The temporal alteration of GAD67/GAD65 ratio in the gerbil hippocampal complex following seizure. *Brain Res* 920 : 159-169, 2001b.
- Kang TC, An SJ, Park SK, Hwang IK, Bae JC, Won MH: Changed vesicular GABA transporter immunoreactivity in the gerbil hippocampus following spontaneous seizure and vagabatratin administration. *Neurosci Lett* 335 : 207-211, 2003a.
- Kang TC, Park SK, Hwang IK, An SJ, Choi SY, Kwon OS, Baek NI, Lee HY, Won MH: The altered expression of GABA shunt enzymes in the gerbil hippocampus before and after seizure generation. *Neurochem Int* 42 : 239-249, 2003b.
- Kang TC, Park SK, Hwang IK, An SJ, Won MH: Altered Na⁺-K⁺ ATPase immunoreactivity within GABAergic neurons in the gerbil hippocampal complex induced by spontaneous seizure and vigabatrin treatment. *Neurochem Int* 45(1) : 179-87, 2004.
- Kharlamov EA, Lepsveridze E, Meparishvili M, Solomon RO, Lu B, Miller ER, Kelly KM, Mchedlishvili ZM : Alterations of GABAA and glutamate receptor subunits and heat shock protein in rat hippocampus following traumatic brain injury and in post-traumatic epilepsy. *Epilepsy Res* 95(1-2) : 20-34, 2011.
- Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Won MH, Choi HC, Son HK, Kwon OS, Kim YI, Choi SY, Kang TC: Bilateral enhancement of excitation via up-regulation of vesicular glutamate transporter subtype 1, not subtype 2, immunoreactivity in the unilateral hypoxic epilepsy model. *Brain Res* 1055(1-2) : 122-130, 2005.
- Kim DS, Kim JE, Kwak SE, Won MH, Kang TC: Seizure activity affects neuroglial Kv1 channel immunoreactivities in the gerbil hippocampus. *Brain Res.* 1151 : 172-87, 2007a.
- Kim DS, Kim JE, Kwak SE, Choi HC, Song HK, Kim YI, Choi SY, Kang TC: Up-regulated astroglial TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel-1 (TASK-1) in the hippocampus of seizure-sensitive gerbils: a target of anti-epileptic drugs. *Brain Res.* 1185 : 346-58, 2007b.
- Kim DS, Kim JE, Kwak SE, Choi KC, Kim DW, Kwon OS, Choi SY, Kang TC: Spatiotemporal characteristics of astroglial death in the rat hippocampo-entorhinal complex following pilocarpine-induced status epilepticus. *J Comp Neurol* 511(5) : 581-98, 2008.
- King CE, Canty AJ, Vickers JC: Alterations in neurofilaments associated with reactive brain changes and axonal sprouting following acute physical injury to the rat neocortex. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27 : 115-126, 2001.
- Kumar A, Zou L, Yuan X, Long Y, Yang K: N-methyl-D-aspartate receptors; transient loss of NR1/NR2A/NR2B subunits after traumatic brain injury in a rodent model. *J Neurosci Res* 67 : 781-786, 2002.
- Kwak SE, Kim JE, Kim DS, Jung JY, Won MH, Kwon OS, Choi SY, Kang TC: Effects of GABAergic transmissions on the immunoreactivities of calcium binding proteins in the gerbil hippocampus. *J Comp Neurol* 485 : 153-164, 2005.
- Magloczky Z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, Freund TF: Loss of cal-binding-D28k immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 76 : 377-385, 1997.
- Magloczky Z, Wittner L, Borhegyi z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, Freund TF: Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 96 : 7-25, 2000.
- Mani J, Barry E: Posttraumatic epilepsy. in Wyllie E, Gupta A, Lachhwani DK: *The Treatment of Epilepsy: Principles and Practice*. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 521-524, 2006.
- Masukawa LM, Higashima M, Kim JH, Spencer DD: Epileptiform discharges evoked in hippocampal brain slices from epileptic

- patients. *Brain Res* 493 : 168-174, 1989.
- Meldrum B: Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy Res* 50(1-2) : 33-40, 2002.
- Missiaen L, Robberecht W, van den Bosch L, Callewaert G, Parys JB, Wuytack F, Raeymaekers L, Nilius B, Eggermont J, De Smedt H: Abnormal intracellular Ca^{2+} homeostasis and disease. *Cell Calcium* 28(1) : 1-21, 2000.
- Neumann-Haefelin T, Hagemann G, Witte OW: Cellular correlates of neuronal hyperexcitability in the vicinity of photochemically induced cortical infarcts in rats in vitro. *Neurosci Lett* 193 : 101-104, 1995.
- Prince DA, Parada I, Scalise K, Graber K, Jin X, Shen F: Epilepsy following cortical injury; cellular and molecular mechanisms as targets for potential prophylaxis. *Epilepsia* 50 : 30-40, 2009.
- Ratzliff AH, Howard AL, Santhakumar V, Osapay I, Soltesz I: Rapid deletion of mossy cells does not result in a hyperexcitable dentate gyrus; implications for epileptogenesis. *J Neurosci* 24 : 2259-2269, 2004.
- Reeves TM, Lyeth BG, Povlishock JT: Long-term potentiation deficits and excitability changes following traumatic brain injury. *Exp Brain Res* 106 : 248-256, 1995.
- Rogawski MA: KCNQ2/KCNQ3 K^{+} channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *Trends Neurosci* 23(9) : 393-8, 2000.
- 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* 68 : 415-422, 1995.
- Rozycka A, Trzeciak WH: Genetic basis of autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *J Appl Genet* 44(2) : 197-207, 2003.
- Santhakumar V, Bender R, Frotscher M, Ross ST, Hollrigel GS, Toth Z, Soltesz I : Granule cell hyperexcitability in the early post-traumatic rat dentate gyrus; the 'irritable mossy cell' hypothesis. *J Physiol* 524 : 117-134, 2000.
- Santhakumar V, Ratzliff AD, Jeng J, Toth Z, Soltesz I: Long-term hyperexcitability in the hippocampus after experimental head trauma. *Ann Neurol* 50 : 708-717, 2001.
- Sayin U, Usting S, Hagen J, Rutecki P, Sutula T: Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. *J Neurosci* 23 : 2759-2768, 2003.
- Schumann J, Alexandrovich GA, Biegon A, Yaka R: Inhibition of NR2B phosphorylation restores alterations in NMDA receptor expression and improves functional recovery following traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 25 : 945-957, 2008.
- Sloviter RS: Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 235 : 73-76, 1987.
- Sloviter RS: Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation; GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. *Hippocampus* 1 : 31-40, 1991a.
- 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* 1 : 41-66, 1991b.
- Sutch RJ, Davies CC, Bowery NG: GABA release and uptake measured in crude synaptosomes from genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (GAERS). *Neurochem Int* 34 : 415-425, 1999.
- Toth K, Freund TF: Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus; their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience* 49 : 793-805, 1992.
- Weiss GH, Feeney DM, Caveness WF, Dillon D, Kistler JP, Mohr JP: Prognostic factors for the occurrence of post-traumatic epilepsy. *Arch Neurol* 40 : 7-10, 1983.
- Weiss GH, Salazar AM, Vance SC, Grafman JH, Jabbari B: Predicting posttraumatic epilepsy in penetrating head injury. *Arch Neurol* 43 : 771-773, 1986.
- Williamson A, Patrylo PR, Spencer DD: Decrease in inhibition in dentate granule cells from patients with medial temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 45 : 92-99, 1999.
- Willmore LJ, Ueda Y: Posttraumatic epilepsy: hemorrhage, free radicals and the molecular regulation of glutamate. *Neurochem Res* 34 : 688-697, 2009.
- Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, Hagemann G: Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(8) : 1149-65, 2000.
- Yang L, Afroz S, Michelson HB, Goodman JH, Valsamis HA, Ling DS: Spontaneous epileptiform activity in rat neocortex after controlled cortical impact injury. *J Neurotrauma* 27 : 1541-1548, 2010.
- Yang Q, Wang S, Hamberger A, Haglid KG: Plasticity of granule cell-mossy fiber system following kainic acid induced seizures; an immunohistochemical study on neurofilament proteins. *Neurosci Res* 26 : 57-64, 1996.
- Zhu WJ, Roper SN: Reduced inhibition in an animal model of cortical dysplasia. *J Neurosci* 20 : 8925-8931, 2000.

< 국문초록 >

외상성 뇌손상(trumatic brain injury, TBI)은 다양한 외부요인에 의해 나타나는 직접적인 뇌조직 손상으로, 변성된 뇌신경세포의 지연성 병태생리학적 변화를 수반하는 질환으로 잘 알려져 있다. 이러한 뇌손상은 그 정도에 따라 인지기능저하 및 운동능력의 손상을 야기하는 것으로 알려져 있으며, 특히, 일부 환자에서는 뇌손상 후유증으로 회귀성 간질발작 증상이 나타나는 것으로 알려져 있다. 외상성 뇌손상 후 간질발생기전에 대한 연구에서 GABAergic interneurons의 손상과 다양한 종류의 억제성 사이신경의 작용이 간질질환의 발병에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서는 외상성 뇌손상 후 초기단

계에서 칼슘결합단백질이 발현되는 GABAergic interneurons의 면역반응성이 어떠한 변화를 나타내는지를 분석하고, 이와 같은 발현변화가 외상성 손상 후 간질발생 및 전파에 미치는 영향을 분석하여 이들 사이의 연관성을 규명하기 위하여 연구를 수행하였다.

연구결과 극저온으로 외상성 뇌손상을 주었을 때 극저온 손상에 노출된 대뇌의 해마에서 parvalbumin (PV) 및 calbindin D-28k (CB)와 같은 칼슘결합단백질의 발현이 시간경과에 따라 다양하게 변화되는 것을 확인 할 수 있었다. 극저온에 노출되어 손상을 받은 부위는 뇌손상 후 30분경에 대조군에 비해 PV 및 CB의 발현이 현저하게 감소하였으며, 이들에 면역반응성을 나타내는 신경세포의 숫자도 시간경과에 따라 감소하였으나, 시간이 경

과함에 따라 정상수준으로 회복되었다. 그러나, 외상성 뇌손상에 노출되지 않은 반대측 해마에서는 CB의 면역반응성에는 특이한 변화가 없는 반면, PV의 발현은 뇌손상 후 1일 이후부터 대조군에 비해 특이하게 감소하였다. 따라서, 이 실험의 결과는 뇌손상 후 해마에서 나타나는 칼슘결합단백질의 감소가 GABA_A receptor를 통한 억제성신경전달의 감소에 관여하고, 이러한 작용에 의해 일시적으로 해마내 신경세포들의 과흥분성 신경전달이 증가하는 것으로 생각된다. 또한, 외상성 뇌손상에 노출되지 않은 반대측 해마에서 나타나는 PV 면역반응 신경세포의 감소는 외상성 뇌손상에 노출된 동측 해마에서 나타나는 칼슘결합단백질의 변화와 함께 외상성 뇌손상 후 간질발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.