

## 흰쥐 해마절편에서 포도당/산소 고갈에 의한 5-hydroxytryptamine 유리변동에 미치는 Adenosine의 영향

이 경 은 · 차 광 은 · 배 영 숙

이화여자대학교 의과대학 약리학교실

**Effect of Adenosine on the Release of [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine during Glucose/Oxygen Deprivation from Rat Hippocampal Slices.** Kyung Eun Lee, Kwang Eun Cha, and Young Sook Pae  
Department of Pharmacology, Ewha Womans University College of Medicine, Seoul 158-056, Korea

The effects of adenosine, adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist (DPCPX), or NMDA receptor antagonist (APV) on the spontaneous release of [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine ([<sup>3</sup>H]-5-HT) during normoxic/normoglycemic or hypoxic/hypoglycemic period were studied in the rat hippocampal slices. The hippocampus was obtained from the rat brain and sliced 400 μm thickness with the tissue slicer. After 30 min's preincubation in the normal buffer, the slices were incubated for 30 min in a buffer containing [<sup>3</sup>H]-5-HT (0.1 μM, 74 μCi/8 ml) for uptake, and washed. To measure the release of [<sup>3</sup>H]-5-HT into the buffer, the incubation medium was drained off and refilled every ten minutes through sequence of 14 tubes. Induction of glucose/oxygen deprivation (GOD; medium depleting glucose and gassed with 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) was done in 6th and 7th tube. The radioactivities in each buffer and the tissue were counted using liquid scintillation counter and the results were expressed as a percentage of the total radioactivities.

When slices were exposed to GOD for 20 mins, the spontaneous release of [<sup>3</sup>H]-5-HT was markedly increased and this increase of [<sup>3</sup>H]-5-HT release was blocked by adenosine (10 μM) or DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV; 30 μM). Adenosine A<sub>1</sub> receptor specific antagonist, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) exacerbate GOD-induced increase of spontaneous release of [<sup>3</sup>H]-5-HT.

These results suggest that Adenosine may play a role in the GOD-induced spontaneous release of [<sup>3</sup>H]-5-HT through adenosine A<sub>1</sub> receptor activity.

**Key Words:** Adenosine; glucose/oxygen deprivation; hippocampal slice; [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine release

### 서 론

정상적인 뇌기능 유지를 위해서는 적절한 혈액공급이 필수적이다. 뇌혈류량이 감소되면 전해질 평형장애(ionic imbalance)를 초래하여 세포외 칼륨증가 및 세포내 칼슘 증가를 일으키게 되고 세포의 신진대사 장애로 유리지방산 증가, ATP 감소 및 유산(lactic acid) 함량이 증가되어 세포내 산증(intracellular acidosis) 및 세포부종을 나타내게 된다(Frederick et al, 1992). 초기 허혈에는 신경접합부

전달(synaptic transmission)을 감소시킴으로써 뇌허혈에 대한 보호작용을 나타낼 수 있는 여러 기전이 존재한다고 알려져 있다. 저산소증(Zetterstrom et al, 1982), 허혈(Hagberg et al, 1987) 및 경련(seizure)(Winn et al, 1980)시에 뇌조직내 adenosine 농도가 급격히 증가되며, 유리된 adenosine은 뇌세포의 에너지 공급을 증가시키거나 에너지 소모를 감소시키는 작용을 나타내므로(Fredholm et al, 1985) adenosine 또는 그 유도체는 중추 및 말초신경 계에서 신경보호효과(neuroprotective effect)를 나타내는 내인성 신경전달물질(endogenous neuromodulator)로 인정되고 있다(Fredholm & Hedqvist, 1980; Burnstock & Brown, 1981; Schubert et al, 1982).

Adenosine 수용체, 특히 A<sub>1</sub> 수용체는 흥분성 신경말단에 분포하며(Goodman et al, 1983) 뇌혈류가 25 ml/100 g/min 이하로 감소되면 adenosine이 유리되어(Lipton & Robacker, 1982) 신경흥분(neuronal firing)을 억제하고(Phillis et al, 1974) 흥분성 신경전달물질의 유리를 억제하여 흥분성 신경독성에 대하여 보호효과를 나타낸다(Goldberg et al, 1987; Evans et al, 1987). 또한 비선택성 adenosine 길항제인 theophylline 투여로 허혈시 흥분성 신경전달물질의 유리가 촉진되고 허혈성 손상이 더욱 증가된다고 한다(Rudolphi et al, 1987). Adenosine은 수용체에 결합하여 혈관이완(vasodilation)(Phillis, 1989), 허혈부위 세포내로의 칼슘이동 억제(Rudolphi et al, 1992), 접합전 신경의 칼륨통로 개방(Heurteaux et al, 1995), 포도당이동(glucose transport)을 통한 에너지 생성증가(Wyatt et al, 1989) 및 특히 glutamate 유리억제(Rudolphi et al, 1992) 등을 통하여 허혈에 대한 신경보호효과를 나타낸다고 한다.

그러나 adenosine은 신경세포에 대한 직접적인 보호작용 이외에 혈관이완효과(Grome et al, 1986) 및 항혈전(antithrombotic)효과(Seiffge & Kremer, 1986)를 가지는데 이러한 효과들은 전반적인 뇌혈류를 개선시켜 허혈에 대한 신경보호작용을 나타낼 수 있다. 따라서 본 연구자는 adenosine의 항허혈 작용이 신경세포에 대한 직접작용인 지 뇌혈류개선을 통한 이차적인 효과인지를 알아보기 위하여 혈관성 요인이 배제된 생체의 실험을 통하여 허혈에 미치는 adenosine의 작용기전을 규명할 필요를 느끼게 되었다.

허혈에 의한 이온 및 대사장애는 신경조직손상을 유발하며 이러한 손상은 신경연접부(synapse)에서 특히 심하게 나타나서 acetylcholine(Gibson & Peterson, 1982; Hirsch & Gibson, 1984; Freeman et al, 1987), dopamine(Globus et al, 1988; Vulto et al, 1988), norepinephrine(Saito et al, 1985; Miwa et al, 1987; Yoshinobu et al, 1993), 5-hydroxytryptamine(황성희등, 1994; 이경은, 1996),  $\gamma$ -aminobutyric acid(Hillered et al, 1989; Yao et al, 1990) 또는 glutamate(Hauptman et al, 1984; Freeman et al, 1987)와 같은 여러 신경 전달물질의 생성 및 유리에 영향을 미치게 된다. 따라서 이러한 신경전달물질 생성 또는 유리변동이 허혈성 뇌기능 장애의 중요한 parameter로 이해될 수 있으나 adenosine이 신경전달물질 유리변동에 미치는 영향에 관하여는 주로 glutamate와의 상호 연관성이 연구되었을 뿐이다(Rudolphi et al, 1992).

따라서 이번 연구에서는 허혈에 매우 민감한 해마절편(Brierley & Graham, 1984)을 이용하여 포도당/산소 고갈에 의한 [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine ([<sup>3</sup>H]-5-HT) 유리 변동상을 관찰하고 이에 미치는 adenosine 및 그 길항제의 영

향을 관찰함으로써 포도당/산소 고갈시 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리를 조절하는 adenosine의 역할을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 실험군

실험동물로는 몸무게 200 g 안팎의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley계)를 사용하였으며 실험군은 대조군 및 포도당/산소 고갈군으로 나누었다. 다시 두 군을 투여약물에 따라 adenosine(10  $\mu$ M) 투여군, 8-cyclopentyl-1, 3-dipropylxanthine(DPCPX, 30  $\mu$ M)투여군 또는 DL-2-Amino-5-phosphono-valeric acid (APV, 30  $\mu$ M) 투여군으로 세분하였다.

### 해마절편 제작

실험동물을 단두하여 희생시킨 뒤 재빨리 뇌를 적출하고 얼음위에서 대뇌반구를 반으로 자르고 대뇌피질을 제거한 후 양측에서 2개의 해마 전부위를 구하였다. 차가운 영양액(2~4°C, 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>)을 적신 여과지위에 4개의 해마를 가로 방향으로 위치하도록 하여 차가운 영양액을 뿌려 주면서 tissue slicer(Stoelting, Illinois, USA)를 이용하여 400  $\mu$ m 두께로 잘라주어 가로방향의 해마 연속 절편을 얻었다.

실험에 사용한 영양액의 조성은 다음과 같다(mM). NaCl: 124, KCl: 4, CaCl<sub>2</sub>: 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.25, NaHCO<sub>3</sub>: 25, Glucose: 10 Mg<sup>++</sup>이 NMDA의 작용을 방해하므로 전 실험이 진행되는 동안 영양액내에 Mg<sup>++</sup>을 첨가하지 않았으며 5-HT가 대사되는 것을 방지하기 위하여 monoamine oxidase 억제제인 nialamide(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)를 12.5  $\mu$ M 농도로 영양액 내에 첨가시켰다.

### 포도당/산소 고갈 유도 및 사용약물

4개의 해마로부터 얻은 절편을 8 ml의 영양액(95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>)에 담근 뒤 37°C를 유지하면서 30분간 shaking water bath내에서 해마 절편이 가볍게 흔들리도록 하면서 방치하여 조직을 안정시켰다. 30분 후 0.1  $\mu$ M의 [<sup>3</sup>H]-5-HT (74  $\mu$ Ci/8 ml, Amersham International plc., Buckinghamshire, England)가 첨가된 영양액으로 갈아주고 30분간 방치하여 조직으로 [<sup>3</sup>H]-5-HT가 흡착되도록 하였다. 이후 영양액을 버리고 동일한 조성의 신선한 영양액으로 씻어준 후 해마절편들을 무작위로 각각 2 ml의 영양액이 든 4개의 vial에 나누어 담았다. 분비되어 나온 [<sup>3</sup>H]-5-HT가 다시 흡착되는 것을 방지하기 위하여 이때부터 사용되는 영양액에는 5-HT 흡착억제제인 zi-

melidine(Research Biochemical Incorporated, Natick, MA, USA)을 10  $\mu$ M 농도로 첨가하였고 이후 매 10분마다 140 분간 반복해서 영양액을 갈아주며 실험을 시행하였다. 포도당/산소 고갈은 60분째 부터 20분간 영양액 내의 포도당을 제거하고 삼투압을 맞추기 위하여 mannitol을 동일 농도(10 mM)로 투여한 영양액을 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 포화시켜 유도하였다. Adenosine (10  $\mu$ M), DPCPX (30  $\mu$ M) 또는 APV (30  $\mu$ M) 등의 약물은 포도당/산소 고갈과 동일한 기간동안 영양액 내로 투여하였다.

방사능 측정

실험종료까지 해마절편에 잔존하는 [<sup>3</sup>H]-5-HT의 방사능과 해마절편으로부터 유리된 [<sup>3</sup>H]-5-HT의 방사능을 모두 측정하였다. 즉, 실험이 끝난 조직은 1 ml의 조직용해제(Lumasolve, Lumac LSC, Groningen, Netherlands)에 60 분 노출시켜 조직을 완전히 녹인 후 이중 100  $\mu$ l 취하여 5 ml의 liquid scintillation cocktail(READY SAFE, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)이 든 scintillation vial에 옮겨 잘 흔들어 준 후 liquid scintillation counter(Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)로 방사능을 측정하였다. 또한 각각의 vial에서 얻은 2 ml의 영양액중 500  $\mu$ l 취하여 역시 5 ml의 liquid scintillation cocktail을 넣어주고 방사능을 측정하였다.

통계학적 분석

유리 [<sup>3</sup>H]-5-HT 농도는 연속적인 14개의 vial의 영양액에서 얻은 값과 조직에서 얻어진 값을 모두 합하여 조직으로 섭취된 총 방사능 양을 구하였고 각 vial의 영양액에 유리된 방사능 양을 총 방사능 양에 대한 분획유리(fractional release)로 나타내었다. 50분경부터 분획유리가 거의 일정하였으므로 50분 값을 기준(100%)으로 퍼센트로 표시하였다. 얻은 실험자료는 평균±표준오차로 표시하였으며 실험군간의 변화양상을 비교하기 위하여 분산분석(analysis of variance)을 이용하였고, 대조군과의 차이는 Dunnett 법으로 비교하였다.

결 과

해마 절편의 [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine 유리

정상 영양액내에서 해마 절편은 자발적으로 [<sup>3</sup>H]-5-HT를 유리하였는데 첫 10분째는 전체 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리량의 60.4%를 유리하였고 점차 감소되어 마지막 140분째는 9.1±0.6%를 유리하였다. 40~50분째부터 유리량이 안정된 것으로 판단하여 60분째에서 70분째에 20분간 포도당

/산소 고갈 영양액에 노출하거나 약물투여를 실시하였으며 이후에는 50분 값을 기준(100%)으로 표시하였다(Fig. 1).

포도당/산소 고갈에 의한 [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine 유리변동

허혈과 동일한 조건을 만들어 주기 위하여 20분간 포도당/산소 고갈 영양액에 노출시켰을 때, 60분째부터 [<sup>3</sup>H]-5-HT유리가 증가되기 시작하여 70분째에 가장 많은 [<sup>3</sup>H]-5-HT유리 증가를 보여 대조군 81.3±2.2%에 비하여 128.4±10.2%유리로 1.6배 증가되었다. 정상 영양액

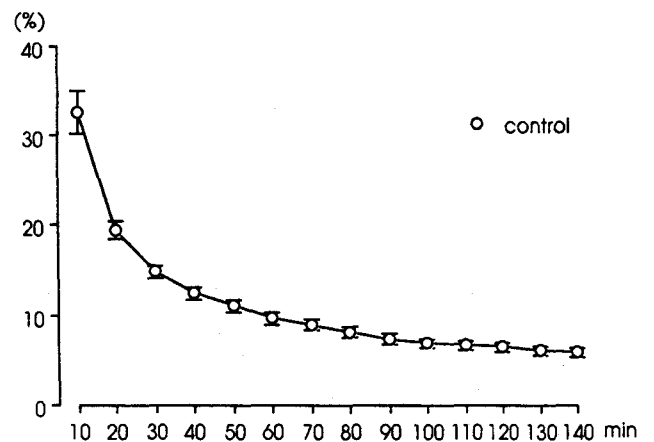


Fig. 1. Spontaneous release of [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine from the rat hippocampal slices.

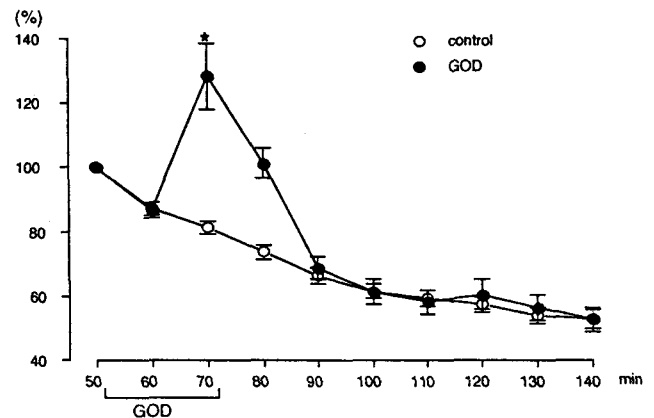


Fig. 2. Glucose/oxygen deprivation-induced changes of spontaneous release of [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine from the rat hippocampal slices. Glucose/oxygen deprivation(GOD) was induced by depleting glucose in the incubation medium aerated with 95% N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> gas for 20 min. \*p<0.05 compared to control

으로 바꾸어 준 후 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리는 대조군에 비하여 별 다른 변동을 보이지 않아 140분째에 대조군은 53.0±2.9%를, 포도당/산소 고갈군은 52.8±3.6%를 유리하였다 (Fig. 2).

정상 영양액내에 투여한 adenosine, DPCPX 또는 APV에 의한 [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine 유리변동

허혈시 유리되어 신경보호효과를 나타낸다고 알려진 adenosine(10μM), adenosine A<sub>1</sub> 수용체 선택적 봉쇄제인 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX; 30 μM) 또는 NMDA 수용체 봉쇄제인 DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV; 30 μM)를 정상 영양액 내로 20분간(60분째~

70분째) 투여하였을 때 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리는 대조군과 별다른 차이를 보이지 않아 60분째에 각각 90.9±1.4%, 92.6±4.2%, 88.5±1.6%를, 마지막 140분째에는 각각 51.3±3.3%, 60.2±1.1%, 51.0±2.1%를 유리하였다(Fig. 3).

포도당/산소 고갈에 의한 [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine 유리 변동에 미치는 adenosine의 효과

20분간 포도당/산소 고갈 영양액에 노출시키면서

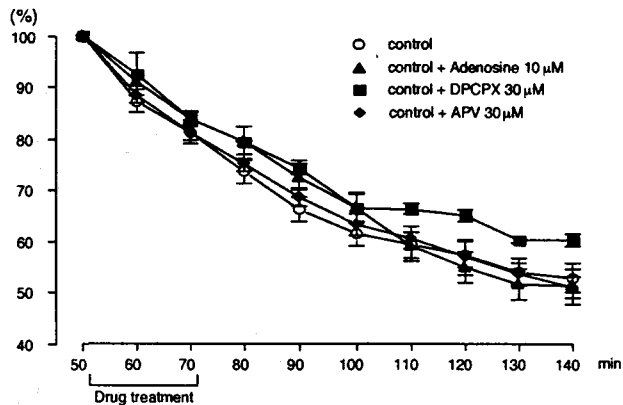


Fig. 3. Adenosine-, DPCPX-, or APV-induced changes of spontaneous release of [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine from the rat hippocampal slices. DPCPX: 8-cyclopentyl-1, 3-depropylxanthine, APV: DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid.

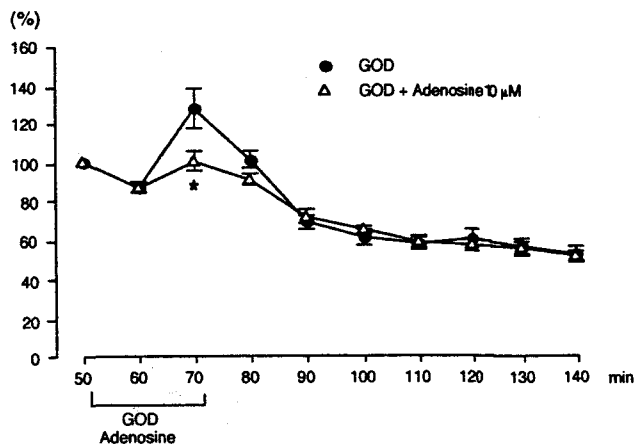


Fig. 4. Effect of adenosine on the spontaneous release of [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine release during glucose/oxygen deprivation for 20 min from the rat hippocampal slices. Other legends are the same as in Fig. 2.

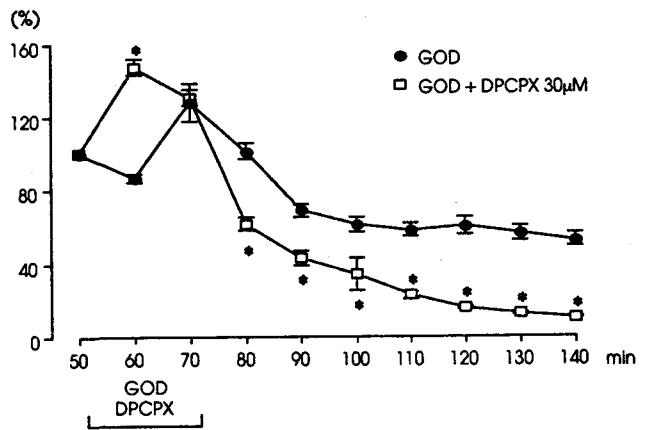


Fig. 5. Effect of DPCPX on the spontaneous release of [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine during glucose/oxygen deprivation for 20 min in the rat hippocampal slices. EPCPX: 8-cyclopentyl-1, 3-dipropylxanthine. Other legends are the same as in Fig. 2.

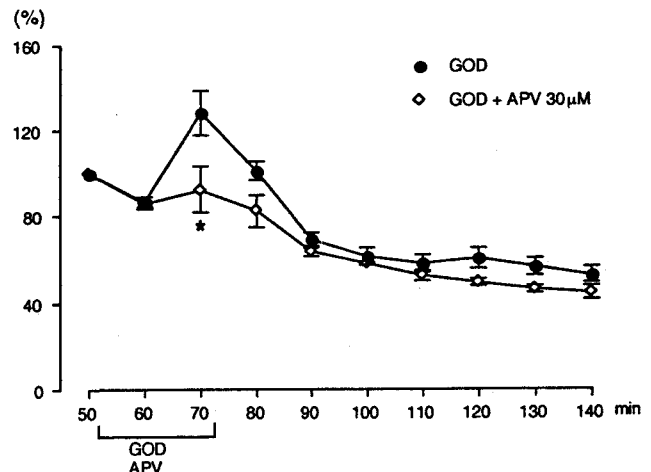


Fig. 6. Effect of APV on the spontaneous release of [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine during glucose/oxygen deprivation for 20 min from the rat hippocampal slices. APV: DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid. Other legends are the same as in Fig. 2.

adenosine을 투여하면 70분째에  $100.7 \pm 5.2\%$ 를 유리하여 포도당/산소 고갈시 관찰되는  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$ 의 유리 증가 ( $128.4 \pm 10.2\%$ )가 봉쇄되었으며 정상 영양액으로 환원시에는 포도당/산소 고갈군과 별다른 차이를 나타내지 않았다(Fig. 4).

포도당/산소 고갈에 의한  $[^3\text{H}]-5\text{-hydroxytryptamine}$  유리변동에 미치는 DPCPX의 효과

20분간 포도당/산소 고갈 영양액에 노출시키면서 DPCPX를 투여하면 60분째에  $147.6 \pm 4.3\%$ , 70분째에  $130.7 \pm 10.0\%$ 의 유리를 보여 포도당/산소 고갈군의  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  유리증가가 더욱 증폭되었으며 정상 영양액으로 환원시에는 오히려 포도당/산소 고갈군에 비하여 급격한  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  유리감소를 나타내어 140분째에는  $10.7 \pm 0.7\%$ 를 유리하였다(Fig. 5).

포도당/산소 고갈에 의한  $[^3\text{H}]-5\text{-hydroxytryptamine}$  유리변동에 미치는 APV의 효과

20분간 포도당/산소 고갈 영양액에 노출시키면서 APV를 투여하면 포도당/산소 고갈시 70분째에 관찰되는  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$ 의 유리 증가( $128.4 \pm 10.2\%$ )가 일부 봉쇄되어  $92.7 \pm 11.0\%$ 를 유리하였고 정상 영양액으로 환원시에는 포도당/산소 고갈시와 유사한  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  유리양상을 나타내었다(Fig. 6).

## 고 찰

Adenosine 및 그 유사물질은 허혈동안 신경보호작용을 나타내며(Rudolphi et al, 1992) 따라서 경련(seizure), 뇌졸중(stroke) 및 기타 퇴행성 신경질환(neurodegenerative disease)의 치료에 adenosine에 근거한 치료가 시도되고 있다(Von Lubitz et al, 1995). Adenosine이 신경보호 효과를 나타내는 데에는 신경전달 물질 유리억제 작용이 중요하며 adenosine에 의해 acetylcholine, norepinephrine, glutamate 등의 유리가 억제됨이 보고된 바 있다(Fredholm & Hedqvist, 1980).

뇌허혈이 발생하면 뇌조직에 신경전달 물질의 함량, 유리 및 대사변동을 일으킬 수 있다(Grossman & Williams, 1971; Tower, 1979). 이번 실험에서 흰쥐 해마 절편을 포도당이 제거되고 95%  $\text{N}_2/5\%$   $\text{CO}_2$ 로 포화시킨 영양액에 20분간 노출시켜 허혈을 유발하면  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  자발유리가 급격히 증가되었다. 이러한 결과는 저산소증만을 유발시킨 황 등(1994)의 결과와는 상이한 것으로 이들에 의하면 흰쥐 해마 절편에 저산소만을 유발시키면

$[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  자발 유리가 감소되고 재산소 공급시 반동성 유리증가가 나타난다고 하였다. 그러나 강 및 안(1995)은 영양액내 포도당을 변화(0 mM~20 mM)시키면서 저산소상태를 유발시키면 포도당 농도변화에 따라  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  유리가 변동되는데 포도당이 1 mM이라도 존재하면 저산소유발시  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  자발유리가 감소하지만 포도당을 완전히 고갈시키면 오히려  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  자발유리가 증가된다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보고하였다. 허혈이란 산소 및 포도당 감소를 모두 포함하는 상태이므로 이번 실험에서 산소고갈 상태에 덧붙여서 추가로 포도당을 고갈시키면 산소고갈만을 유발시켰을 때 나타났던  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  자발유리 감소가 오히려 급격한 유리증가로 전환되어 포도당/산소 고갈과 저산소증시에는  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  유리양상에 차이가 있음을 알 수 있었다.

저산소증(Zetterstrom et al, 1982) 및 허혈(Hagberg et al, 1987)시에 뇌조직내 adenosine 농도가 급격히 증가되며, adenosine은 혈관이완(Phillis, 1989), 허혈부위 세포내로의 칼슘이동 억제(Rudolphi et al, 1992), 접합전 신경의 칼륨통로 개방(Heurteaux et al, 1995), 포도당이동(glucose transport)을 통한 에너지 생성증가(Wyatt et al, 1989) 및 특히 glutamate 등 여러 신경 전달물질 유리억제(Rudolphi et al, 1992)등을 통하여 허혈에 대한 신경보호효과를 나타낸다고 한다. 그러므로 이번 실험에서 나타난 포도당/산소고갈에 의한  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  자발유리에 신경보호효과를 나타낸다고 알려진 adenosine (Fredholm & Hedqvist, 1980)이 어떠한 역할을 담당하고 있는지를 밝히기 위하여 포도당/산소 고갈시 adenosine을 투여하여 이에 따른  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  자발유리 변동양상을 관찰하였다. 정상 영양액내에서 adenosine은  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  자발유리에 별다른 영향을 미치지 않았으나 포도당/산소 고갈상태에 투여하면 포도당/산소 고갈에 의한  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  자발유리 증가가 봉쇄되었다. 따라서 이번 실험에서 나타난 포도당/산소 고갈에 의한  $[^3\text{H}]-5\text{-HT}$  자발유리 증가에는 adenosine 함량감소 또는 adenosine 작용감소가 어떠한 역할을 담당할 수 있을 것으로 생각되었다.

Adenosine 수용체는  $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_{2\text{A}}$ ,  $\text{A}_{2\text{B}}$  및  $\text{A}_3$ 의 아형(subtype)이 존재하고(Tucker & Linden, 1993), adenosine에 의한 신경전달물질 유리억제에는 adenosine 수용체 중  $\text{A}_1$  수용체 연관성이 가장 높다고 알려져 있으며(Jakisch et al, 1985; Fredholm et al, 1986; Fredholm & Lindgren, 1987) 허혈에 민감한 해마 조직에 특히  $\text{A}_1$ -adenosine 수용체가 많이 존재한다고 한다.  $\text{N}^6$ -cyclopentyladenosine(CPA)와 같은  $\text{A}_1$  수용체 효현제를 투여하면 국소성(focal) 및 전반성(global) 허혈에 의한 신경손상 모두에 대하여 보호작용을 나타내며(Rudolphi et al, 1992; Von Lubitz et al, 1995)

선택성 A<sub>1</sub> 수용체 길항제 투여는 신경세포 파괴를 급격히 증가시킨다고 한다(Von Lubitz et al, 1989; Rudolphi et al, 1992; Von Lubitz et al, 1994; Von Lubitz et al, 1995). 이번 연구에서 허혈성 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리 증가가 adenosine, 특히 A<sub>1</sub> 수용체를 통한 것인지를 확인하고자 adenosine A<sub>1</sub> 수용체의 선택적 길항제인 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine(DPCPX)을 투여하였을 때 산소/포도당 고갈에 의한 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리증가가 더욱 증폭되었다. 따라서 산소/포도당 고갈에 의한 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리 증가에 adenosine A<sub>1</sub> 수용체 활성 감소가 연관되어 있음을 알 수 있었다.

한편 DPCPX 투여후 정상 영양액 환원시 오히려 급격한 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리감소가 나타났다. 이는 아마도 5-hydroxytryptamine성 신경의 adenosine A<sub>1</sub> 수용체가 DPCPX에 의해 차단된 후 오히려 adenosine에 대하여 과민한 반응을 나타내게 되었거나 또는 포도당/산소 고갈시 DPCPX에 의하여 과다한 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리가 있을 후, 해마절편이 손상을 입어 더 이상 정상적인 [<sup>3</sup>H]-5-HT 자발 유리가 일어나지 못한 것이라 생각되었다. 이를 확인하기 위하여 향후 실험 진행 전 기간동안 DPCPX를 투여하여 정상적인 [<sup>3</sup>H]-5-HT 자발 유리가 유지되는지를 확인하여야 할 것으로 생각되었다.

억제성 신경전달물질인 adenosine은 흥분성 신경전달물질로서 허혈시 독작용을 나타낸다고 알려진 glutamate와 균형상태를 이루고 있어 뇌혈류가 25 ml/100 g/min 이하가 되면 adenosine이 유리되어(Lipton & Robacker, 1982; Dunwiddie & Hass, 1985) 허혈에 대하여 보호작용을 나타내지만(Phillis et al, 1974; Goldberg et al, 1987; Evans et al, 1987) 허혈이 더욱 진행되어 뇌혈류가 20 ml/100 g/min 이하로 감소되면 더 이상 adenosine은 보호작용을 나타내지 못하고 오히려 이때에는 glutamate의 농도 증가에 따른 세포독성을 나타내게 된다고 한다(Lipton & Robacker, 1982; Dunwiddie & Hass, 1985). 그러므로 이번 실험에서 나타난 포도당/산소 고갈에 의한 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리증가에 adenosine/glutamate 균형, 즉 포도당/산소 고갈에 의하여 adenosine 작용이 감소되고 오히려 glutamate 유리가 증가되어 상기 반응 양상을 나타내게 되었는지를 알아보기 위하여 glutamate의 N-methy-D-aspartate (NMDA) 수용체 길항제인 DL-2-amino-5-phospho- novaleric acid(APV)를 30 μM 농도로 투여하였을 때 포도당/산소 고갈에 의한 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리증가가 차단되었다. 따라서 포도당/산소 고갈에 의하여 adenosine과 NMDA 수용체 활성을 통한 glutamate와의 상호작용이 작용하고 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 포도당/산소 고갈에 의한 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리 증가는 adenosine에 의해 억제되고, adenosine A<sub>1</sub> 수용체 길항제인 DPCPX에 의해 더욱 증가

되며, NMDA 수용체 봉쇄제인 APV에 의하여 봉쇄되므로, 포도당/산소 고갈에 의한 [<sup>3</sup>H]-5-HT 유리 조절에 A<sub>1</sub> 수용체를 통한 adenosine의 역할이 관여할 수 있을 것으로 생각되었다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1995년도 이화여자대학교 교내연구비의 지원에 의하여 이루어졌음.

## 참 고 문 헌

- 이경은, 흰쥐 해마절편에서 저산소증에 의한 [<sup>3</sup>H]-5-hydroxytryptamine의 유리변동에 미치는 Dimethylsulfoxide의 효과. *이화의대지* 19: 417-423, 1996
- 황성희, 이경은, 김동구, 방혜련, 안영수. 해마절편에서 저산소증에 의한 5-hydroxytryptamine유리 변동과 NMDA 수용체와의 관련성. *대한신경과학회지* 12: 193-205, 1994
- Brierley JB, Graham DJ. Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. In: Adams JH, Corsellis JN, Duchon LW eds, *Greenfield's Neuropathology*. Edward Arnold, London, p125-205. 1984
- Burnstock G, Brown CM. An introduction to purinergic receptors. In: Burnstock G ed, *Purinergic receptors*. Chapman and Hall, New York, p1-45. 1981
- Dunwiddie TV, Haas HL. Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. *J Physiol Lond* 369: 365-377, 1985
- Evans MC, Swan JH, Meldrum BS. An adenosine analogue, 2-chloroadenosine, protects against long-term development of ischemic cell loss in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 83: 287-292, 1987
- Frederick E, Sieber, Richard J, Traystman, FCCN. Special issues; Glucose and the brain. *Critical Care Medicine* 20: 104-113, 1992
- Fredholm BB, Jonzon B, Lindstrom K. Effect of adenosine receptor agonists and other compounds on cyclic AMP accumulation in forskolin-treated hippocampal slice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 332: 173-178, 1986
- Fredholm BB, Bergman B, Fastbom J, Jonzon B. The role of adenosine in the actions of xanthines on the central nervous system. In: Persson, CGA & Andersson, KE Excerpta eds, *Anti-asthma xanthines and adenosine*. Medica, p291-308, 1985
- Fredholm BB, Hedqvist P. Modulation of neurotransmission

- by purine nucleotides and nucleoside. *Biochem Pharmacol* 29: 1635–1643, 1980
- Fredholm BB, Lindgren E. Effect of Nethylmaleimide and forskolin on noradrenaline release from rat hippocampal slices. Evidence that prejunctional adenosine and  $\alpha$ -receptors are linked to N-proteins but not to adenylate cyclase. *Acta Physiol Scand* 130: 95–100, 1987
- Freeman GB, Mykityn V, Gibson GE. Differential alteration of dopamine, acetylcholine and glutamate release during anoxia and/or 3,4-diaminopyridine treatment. *Neurochem Res* 12: 1019–1027, 1987
- Gibson GE, Peterson C. Decreases in the release of acetylcholine with low oxygen in vitro. *Biochem Pharmacol* 31: 111–115, 1982
- Globus MYT, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Intra-ischemic extracellular release of dopamine and glutamate is associated with striatal vulnerability to ischemia. *Neurosci Lett* 91: 36–40, 1988
- Goldberg MP, Weiss JH, Pham PC, Choi DW. N-methyl-D-aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Ther* 243: 784–791, 1987
- Goodman RP, Kuhar M, Hester L, Snyder SH. Adenosine receptors; autoradiographic evidence for their localization on axon terminals of excitatory neurons. *Science* 220: 967–969, 1983
- Grome JJ, Rudolphi K, Harper AM. Cerebrovascular effects of a xanthine derivative propentofylline (HWA 285). *Drug Dev Res* 5: 111–121, 1985
- Grossman RG, Williams VF. Electrical activity and ultrastructure of cortical neurons and synapses in ischemia. In Brierly, JB, Meldrum, BS eds, *Brain hypoxia*. 16, 1971
- Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Butcher S, Sandberg M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotide and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem* 49: 227–231, 1987
- Hauptman M, Nelson D, Wilson DF, Ercinska M. Neurotransmitter amino acids in the CNS. II. Some changes in amino acids levels in rat brain synaptosomes during and after in vivo anoxia and stimulated ischemia. *Brain Res* 304: 23–35, 1984
- Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine  $A_1$  receptors, and ATP-sensitive  $K^+$  channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4666–4670, 1995
- Hillered L, Hallstrom A, Segersvard S, Persson L, Ungerstedt U. Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 607–616, 1989
- Hirsch JA, Gibson GE. Selective alteration of neurotransmitter release by low oxygen in vitro. *Neurochem Res* 9: 1039–1049, 1984
- Jackisch R, Fehr R, Hertting G. Adenosine: an endogenous modulator of hippocampal noradrenaline release. *Neuropharmacology* 24: 499–507, 1985
- Lipton P, Robacker K. Adenosine may cause early inhibition of synaptic transmission during anoxia. *Soc Neurosci Abstr* 8: 993, 1982
- Miwa S, Fujiwara M, Inoue M, Fujiwara M. Effects of hypoxia on the activities of noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat brain. *J Neurochem* 47: 63–69, 1986
- Phillis JW. Adenosine in the control of the cerebral circulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1: 26–54, 1989
- Phillis JW, Kostopoulos K, Limacher I. A potent depressant action of adenosine derivatives on cerebral cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 30: 125–129, 1974
- Rudolphi KA, Keil M, Hinze HJ. Effect of theophylline on ischemically induced hippocampal damage in Mongolian gerbils: A behavioural and histopathological study. *J Cereb Blood Flow Metab* 7: 74–81, 1987
- Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 4: 346–369, 1992
- Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischemia. *Trends Pharmacol Sci* 13: 440–445, 1992
- Saito K, Honda S, Egawa M, Tobe A. Effects of bifemelane hydrochloride(MCI-2016) on acetylcholine and norepinephrine release from cortical slices of bilaterally carotid-artery-ligated Mongolian gerbils. *J Pharmacol Japan* 39: 406–409, 1985
- Schubert P, Lee K, Kreutzberg GW. Neuronal release of adenosine derivatives and modulation of signal processing in the CNS. *Pro Brain Res* 55: 225–238, 1982
- Seiffge D, Kremer E. Effects of propentofylline(HWA 285) on laser induced thrombus formation in healthy and diseased rat mesenteric arterioles. *Curr Med Res Opin* 10: 94–98, 1986
- Tower DB. Effects of ischemia or tissue hypoxia on the neuron. *Adv Neurol* 25: 40–63, 1979
- Tucker AL, Linden J. Cloned receptors and cardiovascular response to adenosine. *Cardiovasc Res* 27: 62–67, 1993
- Von Lubitz, DKJE, Dambrosia JM, Redmond DJ. Protective effects of cycloxy adenosine in treatment of cerebral ischemia in gerbils. *Neuroscience* 30: 451–462, 1989
- Von Lubitz, DKJE, Dambrosia JM, Redmond DJ. Chronic

- administration of selective adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist or antagonist in cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 256: 161–167, 1994
- Von Lubitz, DKJE, Carter MF, Beenhakker FE, Lin RC-S, Jacobson KA. In: Trembly B, Slikker B, Jr eds, Neuroprotective Agents. *New York Acad Sci* 765: 163–178, 1995
- Vulto AG, Sharp T, Ungerstedt U, Versteeg DHG. Rapid postmortem increase in extracellular dopamine in the rat brain as assessed by brain microdialysis. *J Neurochem* 51: 746–749, 1988
- Winn RH, Welsh JE, Rubio R, Berne RM. Changes in brain adenosine during bicuculine-induced seizures in rats. Effects hypoxia and altered systemic blood pressure. *Circ Res* 47: 568–577, 1980
- Wyatt DA. Adenosine stimulates glycolytic flux in isolated perfused rat hearts by A<sub>1</sub>-adenosine receptors. *Am J Physiol* 257: H1952–H1957, 1989
- Yao H, Matsumoto T, Hirano M, Uchimura H, Ooboshi H, Sadoshima S, Fujishima M. Striatal glutamic acid and gamma-aminobutyric acid in transient cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *J Heart Japan* 31: 385–392, 1990
- Yoshinobu T, Fumiki S, Hitoshi K. Possible involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the inhibition of rat central adrenergic neurotransmission under hypoxia. *J Pharmacol Japan* 62: 279–287, 1993
- Zetterstrom T, Vernet L, Ungerstedt U, Tossman U, Jonzon B, Fredholm BB. Purine levels the intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fiber. *Neurosci Lett* 29: 111–115, 1982
-