KISEP Experimental Research J Korean Neurosurg Soc 29 : 1161-1170, 2000

배양조건에 의한 일과성 저산소상태 후 신경세포회복의 차이

고려대학교 의과대학 신경외과학교실, 건국대학교 의과대학 충주병원 신경외과학교실*

문수현* · 오재인 · 박윤관 · 정흥섭 · 이훈갑 · 이기찬

= Abstract =

Difference of Neuronal Recovery by Incubation Condition after Transient Hypoxia

Soo-Hyeon Moon, M.D.,* Jae-Inn Oh, M.D., Youn-Kwan Park, M.D., Heung-Sub Chung, M.D., Hoon-Kap Lee, M.D., Ki-Chan Lee, M.D.

Department of Neurosurgery, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea
Department of Neurosurgery, Konkuk University Nedical Center Chungju Hospital, Chungju, Korea*

Objective : The transverse hippocampal slice is one of the most commonly studied in vitro models of mammalian brain physiology. However, despite its broad usage, there has been no standardization of slice preparation techniques or recording condition. It is well known that variations in recording conditions can result in profound different effects to neuronal responses. Evoked field potentials, recorded extracellularly, were used to investigate the effects of variations in hippocampal slice preparation protocol on hypoxia responses of CA1 neurones.

Material & Methods : Before hypoxic injury, hippocampal slices were incubated for 4 hours. During incubation period, the slices were placed in a incubation chamber(21℃) for recovery from preparation injury and then transferred to recording chamber(34℃) for more recovery and baseline electric recording with current stimulation(0.1Hz). Various time periods in incubation chamber and recording chamber were applied to each experimental group(group 1= 60min : 180min, group 2=90min : 150min, group 3=180min : 60min, time in incubation chamber : time in recording chamber) before 10 min hypoxia produced by replacing 95% O_2+5% CO_2 mixed gas to 95% N_2+5% CO_2 gas. Calcium, Magnesium ions and several drugs effecting on glutamate receptor also were studied. Recoveries from hypoxic injury of hippocampal slices were estimated by percent recovery of population spike(PS). Statistic analysis of study were performed using paired t-test.

Results : The percent recovery of PS after 10min hypoxia was considerably enhanced by increasing the period of current stimulation during incubation period before hypoxic injury. Temperature effect on the result of this experiment was also studied(group 4) but the result from this showed no statistic significance. Low magnesium ion concentration of artificial CSF(Mg-free aCSF) during incubation period enhanced the recovery of PS but low calcium (calcium-free) and high magnesium ion concentration(2mM) reduced it after hypoxic injury. L-glutamate(100μM) and AP-5(50μM) had no effect on the recovery of PS but CNQX(10μM) in artificial CSF during incubation period markedly enhanced the recovery of PS. Co-treatment of AP-5(50μM), CNQX(10μM) and high magnesium concentration(2mM) enhanced recovery of PS in immediate following period of hypoxic injury but the effect of cotreatment after then decayed rapidly and lost statistic significance.

Conclusions : Judging from above results, the condition of baseline recording is important in observing the recovery of population spike after hypoxia, and the time and the condition should be controled more strictly to obtain reliable results.

KEY WORDS : CA1 · Hippocampal slice · Hypoxia · Population spike · Incubation condition.

서 론

해마조직절편을 산소가 결핍된 환경에 노출시킴으로써 세포괴사를 유발시키는 실험모델은 뇌혈관계의 효과를 제외시킴으로써 허혈에 대한 순수한 신경조직의 효과만을 관찰할 수 있고, 세포외 환경을 조절할 수 있다는 장점이 있어 실험에 많이 이용되어 왔다[4)14)17)19)]. 그러나 이런 많은 이용에도 불구하고 조직절편의 준비 기술(slice preparation technique)이나 기록 상태에 대한 표준화가 이루어지지 않아 각각의 실험마다 결과를 평가하는데 주의를 요한다. 실험의 결과에 영향을 주는 주요 변수들로는 온도[27)], 기록조 배열[6)], 전기침의 위치[7)], 전기자극의 변화[30)], 인공 뇌척수액의 구성성분[22)], 미세유리관의 구성용액 성분[29)]등이 있다고 알려져 있으며 다양한 해마조직절편 준비과정의 변수들의 영향에 대하여 현재 많은 연구가 진행되고 있다[1)15)].

일반적으로 조직절편의 상태는 절편의 제작에 따른 물리적 손상과 준비과정에서 발생하는 저산소 손상에 의해 악화되었다가 배양기(1 2시간)가 지나면서 그 상태는 최고에 이르고 이후로 시간이 경과하면서 서서히 반응이 감소하며 8시간 이후에는 실험을 진행하기 어렵다고 알려져 있다[24)]. 이에 따라 대부분의 실험에서는 배양기간과 기저측정을 일정하게 진행하도록 하지만 제작된 여러 절편 중에서 좋은 반응을 보이는 것에 실험기기를 설치하는 작업은 때로 많은 시간을 소비하여 결과적으로 배양과 기저측정의 시간배정이 달라지는 경우가 많다. 이러한 경우가 실험의 결과에 미치는 영향에 대하여는 아직 상세히 알려진 바가 없다. 따라서 보다 객관적인 실험결과를 얻기 위해서는 실험전 배양조건의 변화가 실험결과에 어떤 영향을 미치는 지에 대한 지식이 필요하다는 점에 착안하여 본 저자들은 해마조직절편을 이용한 실험에서 배양기간 동안의 조건변화가 실험결과에 미치는 영향을 알아보고자 본 실험을 계획하였다.

재료 및 방법

1. 해마조직 절편 준비

체중 100 150g의 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 암수 구분없이 실험동물로 사용하였으며 할로텐으로 마취한 뒤 두부를 신속절개하여 두뇌를 적출하였다. 적출된 두뇌를 섭씨 4도의 생리식염수에 옮긴 뒤 해마부위를 적출, 중간 1/3부위를 tissue chopper(Electron Microscopy Sciences, USA)를 사용하여 450 μm 두께로 횡절단하여 4 5개의 해마조직절편을 얻었다. 얻어진 조직절편은 인공뇌척수액(NaCl 130, KCl 3.5, $NaHPO_4$ 1.25, $NaHCO_3$ 2.4, $CaCl_2$ 1.2, $MgSO_4$ 1.2, glucose 10mM, pH 7.4)이 들어있는 배양조(incubation chamber)에 넣고 실온상태(21℃)에서 95% 산소와 5% 이산화탄소로 구성된 혼합가스를 환기하면서 절편으로 만들 때 발생한 손상에서 회복하도록 하였다.

2. 실험과정

배양조에서 일정시간(대조군 ; 90분) 동안 회복된 해마절편을 기록조(recording chamber)에 옮겨 고정하고 혼합가스(95% O_2+5% CO_2)를 환기시킨 34℃의 표준 인공뇌척수액을 2 3ml/min의 속도로 계속해서 관류시키면서 미세전기침과 미세 유리전극을 설치하고 전 실험과정 동안 일정하게 전기자극을 주면서 발생하는 PS(Population spike)를 측정하였다. 저산소손상을 주기전 일정기간(대조군 ; 150분) 동안 측정된 PS를 기저측정(baseline recording)으로 하였다. 기저측정 기간이 끝나면 10분 동안 N_2 95%+CO_2 5%의 혼합가스가 환기된 인공뇌척수액을 관류시켜 저산소 손상을 주고 다시 정상의 인공 뇌척수액으로 전환하였다. 저산소 손상 후 120분 동안 PS를 측정하여 손상후의 변화를 기록하였다.

3. 전기 생리학적 기록 방법

기록조에 고정된 조직절편의 CA2와 CA3 사이를 미세한 나이프를 이용하여 분리시키고 Schaffer collateral-commissural bundle을 전기적으로 자극하기 위하여 말단이 50 μm 노출된 양극성 미세전기침(bipolar stimulating electrode)을 stratum radiatum에 위치시키고, 저항이 5 15MΩ이 유지되게 150mM의 NaCl 용액을 채운 미세유리전극을 해마의 CA1부위의 stratum pyramidale에 약 100

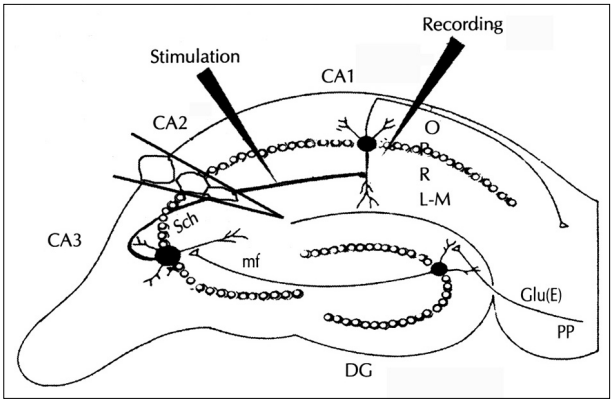

Fig. 1. Schematic drawing of stimulation of the Schaffer collateral and recording on the CA1 area(O : stratum oriens, P : stratum pyramidale, R : stratum radiatum, L-M : stratum lacunosum-moleculare, Sch : Schaffer collateral, mf : Mossy fiber, DG : dentate gyrus, pp : perforant pathway).

μm 깊이로 삽입하였다. 미세전기침을 통하여 전기자극(test input, 100 200mA, 150μsec, 0.1Hz)을 지속적으로 가하면서 미세유리전극을 통하여 PS를 측정하였다(Fig. 1). PS는 high input impedance amplifier를 이용하여 증폭시킨 다음 oscilloscope을 통해 관찰하였고 그 곡선을 개인컴퓨터에 수치화하여 디스크에 저장하였다. PS의 진폭은 Fig. 2에서와 같이 PS상단의 두 극점을 연결한 선의 중간에서 PS의 하단까지의 거리로 측정하였다. 저산소 손상을 주기 직전의 안정화된 기저측정의 진폭을 기준으로 하고 각각의 측정된 PS의 진폭을 기준이 된 안정화된 진폭에 대한 백분율로 표시하여 데이터 값으로 하였다. 단, 실험초기에 PS의 크기가 2mV 이하인 경우는 실험에서 제외하였다.

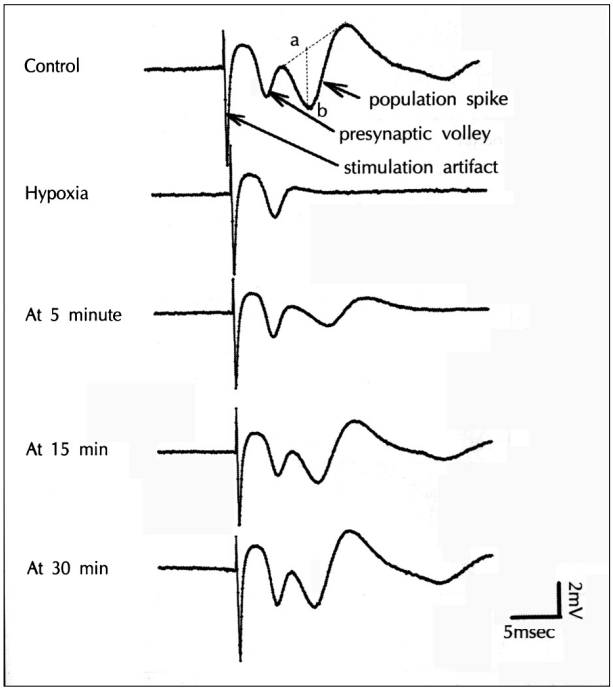

Fig. 2. Sequential changes of population spike evoked by electric stimulation of Schaffer collateral before and after hypoxic injury. The amplitude of population spike is a to b.

4. 배양조건(Incubation condition)의 변화

실험 1 4군은 배양기간 내의 전기자극 시간이 저산소 손상후 나타나는 실험 결과에 미치는 영향을 관찰하기 위해 고안하였다. 즉 1군(n=8)은 60분간 배양조에서 회복시킨 뒤 180분 동안 기록조에서 전기자극을 주었고 2군(n=15)은 배양조에서 90분간 머무른 뒤 150분간 기록조에서 전기자극을 주었으며 3군(n=8)은 배양조에서 180분, 기록조에서 90분간 전기자극을 주었다. 4군은 2군과 같이 90분간 배양조에 머무르고 180분간 기록조에서 전기자극을 주었으나 기록조의 초기 90분간을 21℃로 함으로써(3군의 온도변화와 같음) 온도의 변화가 실험결과에 미치는 영향을 관찰하였다(Table 1).

5. 이온 및 약물 실험군

이온 및 약물 실험군은 2군과 시간배정 및 온도변화를 동일하게(배양조, 21℃, 90분 ; 기록조, 34℃, 150분) 적용하였다. 용액내 이온의 변화는 저칼슘군(n=6), 저마그네슘군(n=7) 및 고마그네슘군(n=8)으로 하였으며 약물 투여군은 L-glutamate(100μM)(n=6), AP-5(D,L-2 amino-5-phosphonovaleric acid, 50μM)(n=7), CNQX(6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, 10μM)(n=6)를 실험하였다. 이온의 변화와 약물적용은 기록조로 이동한 뒤 30분 후부터 2 3ml/min의 속도로 관류되는 정상의 인공뇌척수액을 이온의 변화가 있거나 약물이 함유된 인공뇌척수액으로 변환시켜 60분간 적용하였으며 저산소 손상을 주기 60분전에 정상의 인공뇌척수액으로 다시 변환, 유지시켰다.

6. 통계처리

본문, Table 및 Figure에 나타낸 측정치는 저산소 손상을

Table 1. Pre-injury treatment protocol during 4 hour incubation period before 10 minute hypoxic injury

Experimental groups	Incubation chamber	Recording chamber	
		Electric stimulation	Ion change or drug
Group 1(n=8)	60 min(21℃)	180 min(34℃)	None
Group 2(n=15)	90 min(21℃)	150 min(34℃)	None
Group 3(n=8)	180 min(21℃)	60 min(34℃)	None
Group 4(n=6)	90 min(21℃)	150 min(21℃ for 90 min 34℃ for 60 min)	None
Low-Ca^{2+}(n=6)	90 min(21℃)	150 min(34℃)	Low Ca^{2+}(60min)
Low-Mg^{2+}(n=7)	〃	〃	low Mg^{2+}(60min)
High-Mg^{2+}(n=8)	〃	〃	high Mg^{2+}(60min)
L-glutamate(n=6)	〃	〃	L-glutamate 100μM(60 min)
AP-5(n=7)	〃	〃	AP-5 50μM(60 min)
CNQX(n=6)	〃	〃	CNQX 10μM(60 min)

주기 직전의 안정화된 PS의 진폭을 기준으로 하여 각각의 측정된 PS의 진폭을 백분율로 변환시켜 평균과 표준 편차로 표시하였다. 통계 처리는 Sigma stat 1.0(Jandel Scientific Co.)을 사용, paired t-test를 통해 검증하였고 p값이 0.05 이하인 경우를 유의 수준으로 하였다.

결 과

1. 저산소 손상전후 PS의 변화

CA1부위를 분리한 해마조직절편의 Schaffer collateral-commissural bundle을 전기자극한 후 CA1 stratum pyramidale에서 기록한 세포외 전위는 Fig. 2와 같다. 인공 뇌척수액에서 PS의 진폭은 Fig. 2에서와 같이 저산소 상태에서 모두 소실되었다가 산소를 재공급한 후 서서히 회복됨을 볼 수 있었다. Fig. 3에서와 같이 대조군으로 삼은 2군에서의 저산소 손상후 PS의 진폭은 산소 재공급 후 약 1시간 안에 회복 가능한 부분은 거의 다 회복됨을 볼 수 있었으며 그 회복정도는 2시간까지 반응의 감소 없이 잘 유지되었다.

2. 저산소 손상전 전기자극(Test input)의 시간의 변화가 PS의 회복에 미치는 영향

1군, 2군 및 3군의 저산소 손상후 회복은 Fig. 4에서와 같이 차이를 보이며 통계적 유의성을 보였다($p<0.05$). 즉 저산소증의 유발 전에 최장 180분간 자극을 받은 1군의 해마조직절편에서의 PS의 회복이 2군, 3군과 비교하여 현저히

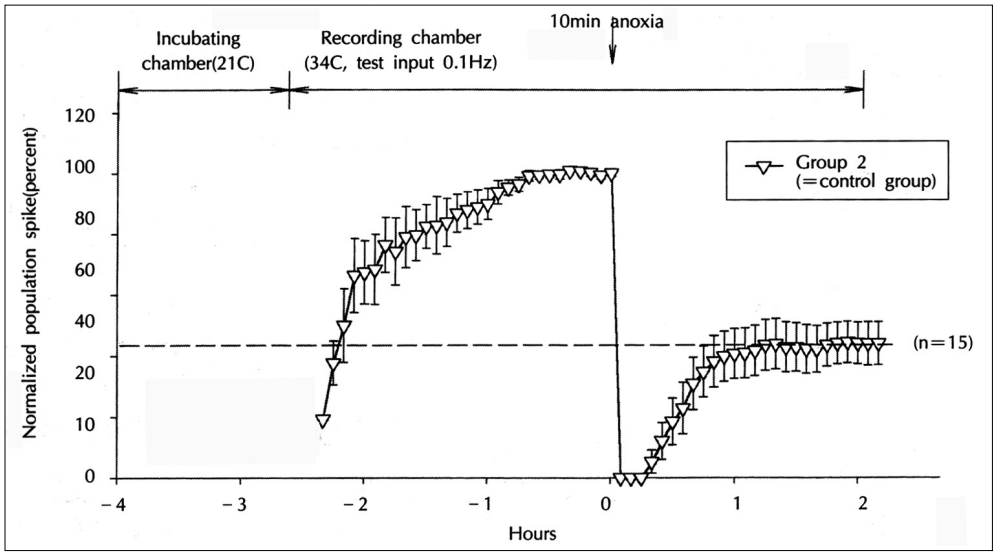

Fig. 3. Example of changes in poulation spike amplitute before and after hypoxia in control group.

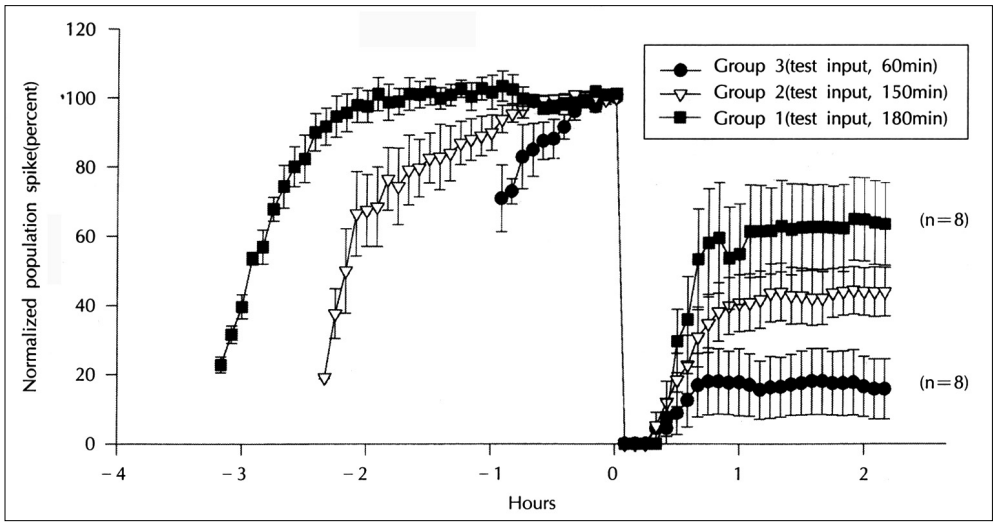

Fig. 4. Duration of test input in hippocampal slice preparation period effects on recovery from hypoxia. * : statistical significance($p<0.05$).

증가되었음을 알 수 있었으며, 가장 짧게 60분 동안만 자극을 받은 3군은 2군과 비교하여 PS의 회복이 적게 이루어짐을 알 수 있었다.

3. 해마조직절편의 준비시 온도의 변화와 PS 회복의 관계

위의 결과에서 2군과 3군의 차이가 배양조와 기록조 사이의 온도차에 의한 것인지를 알아보기 위하여 2군과 동일한 시간에 기록조에 옮겼으나 첫 90분간 온도를 실온(21℃)으로 유지하여 3군과 같은 온도변화를 주었던 4군의 PS의 회복은 그림 5에서와 같이 2군보다는 약간 감소되었지만 통계적인 의의는 없었다.

4. 칼슘과 마그네슘 농도의 변화가 PS의 회복에 미치는 영향

이온변화 실험군은 2군과 같은 시간 및 온도변화를 주면서 기록조에서 저산소 손상을 주기 120분전에 이온변화-인공뇌척수액을 60분간 관류시키면서 결과를 관찰하였다.

저칼슘군에서는 배양기간 중에 저칼슘 상태가 되면 PS는 빠르게 소실되었고 다시 정상 인공뇌척수액을 관류시키면 PS가 정상으로 회복하는 것을 알 수 있었으며 일과성 저산소 손상후 PS의 회복은 대조군인 2군에 비해 의미있게 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 저마그네슘군에서는 저마그네슘 상태에서 PS의 뚜렸한 변화는 관찰되지 않았으나 저산소 손상후 대조군에 비하여 PS의 의미있는 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 7). 반대로 고마그네슘군에서는 고마그네슘 인공척수액을 관류시키는 동안 PS의 증가가 관찰되었고 저산소 손상후에는 PS의 회복이 대조군에 비해 의미있게 낮음을 알 수 있었다(Fig. 8).

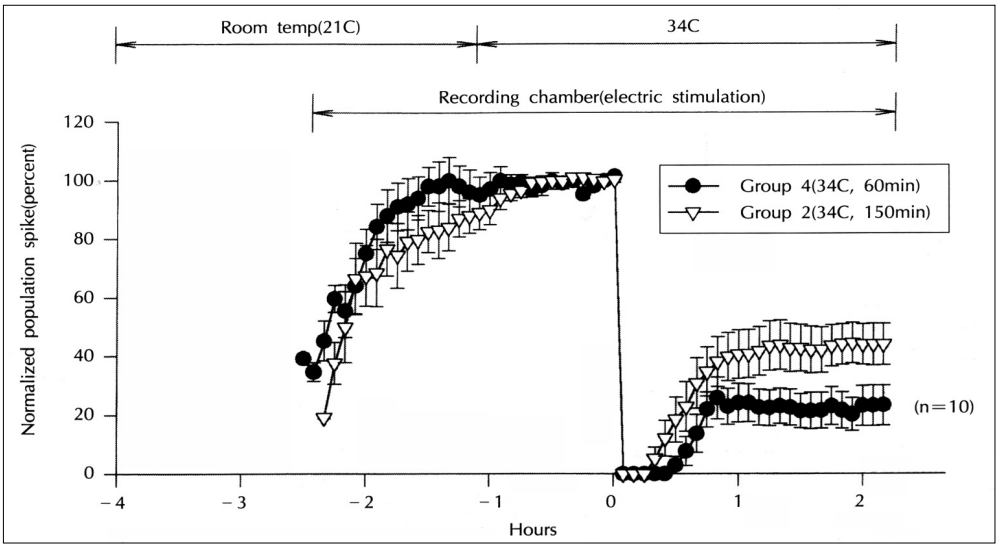

Fig. 5. Difference of temperature in recording had no influence on recovery from hypoxia.

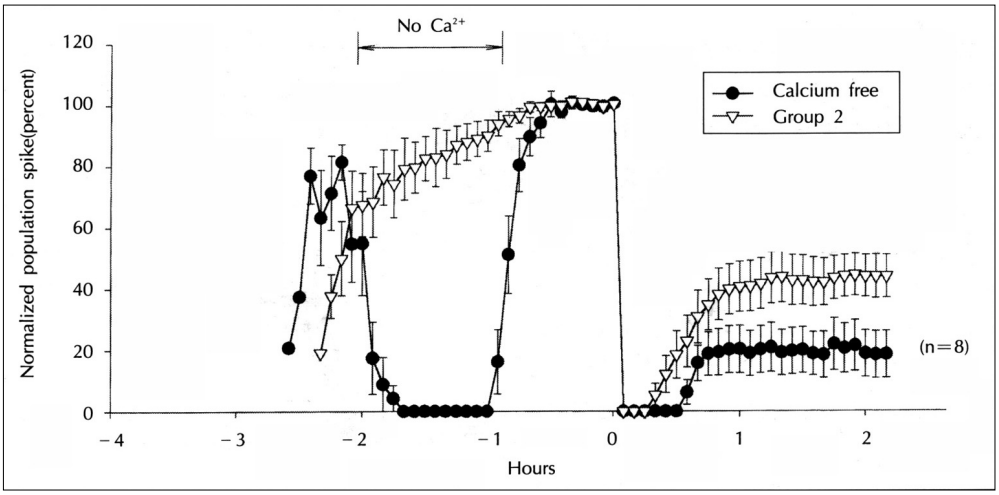

Fig. 6. Brief exposure of slices(60min) to calcium-free medium in recording chmaber. * : statistical significance($p<0.05$).

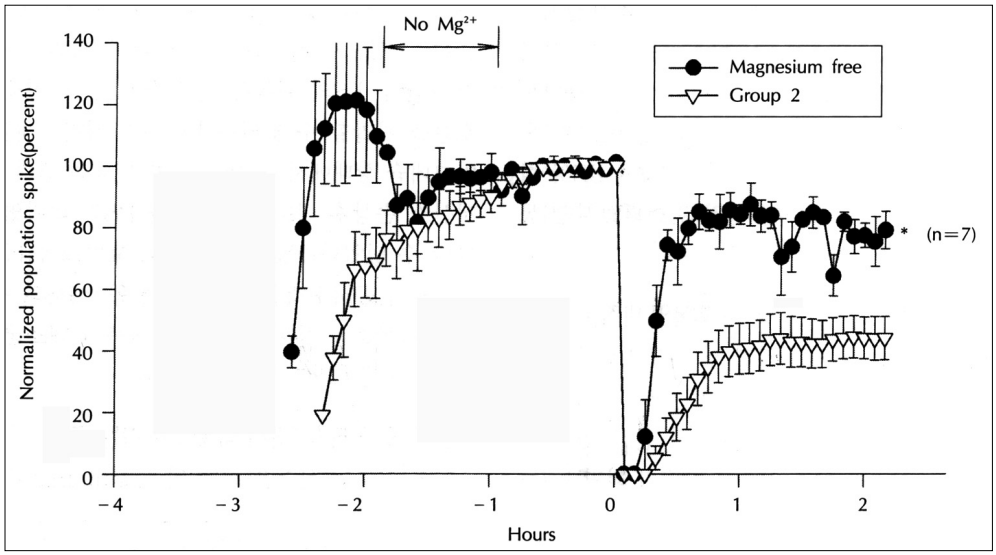

Fig. 7. Brief exposure of slices(60min) to magnesium-free medium in recording chmaber. * : statistical significance($p<0.05$).

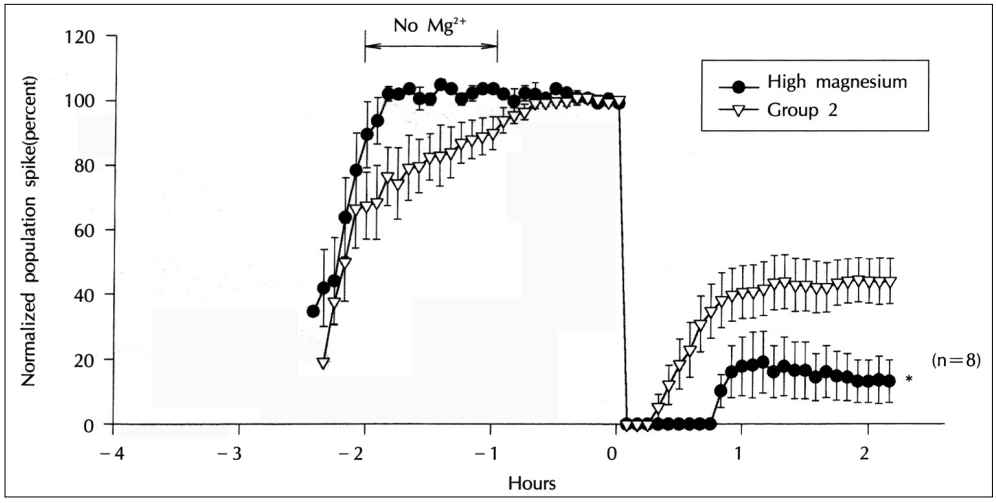

Fig. 8. Brief exposure of slices(60min) to high magnesium medium(2.0mM) in recording chmaber. * : statistical significance ($p<0.05$).

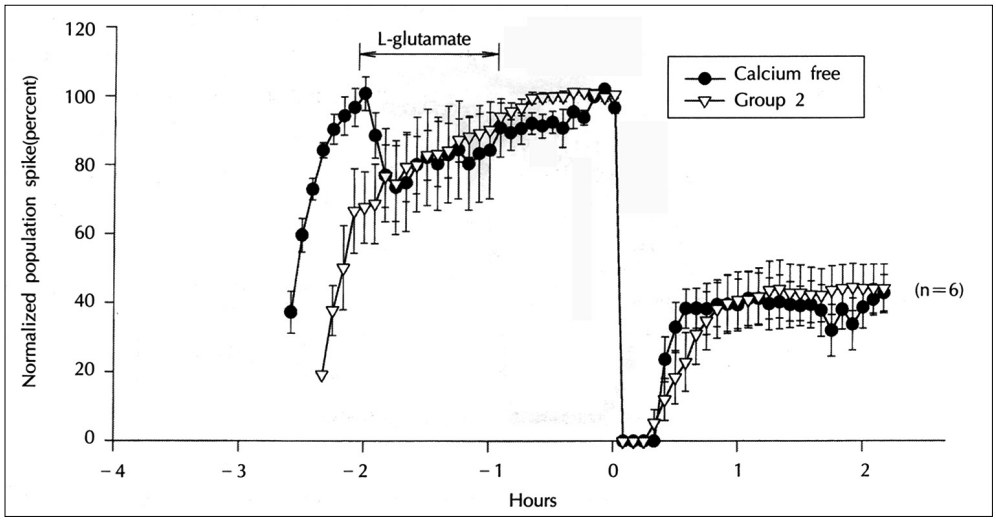

Fig. 9. Brief exposure of slices(60min) to L-glutamate(100uM) in recording chmaber.

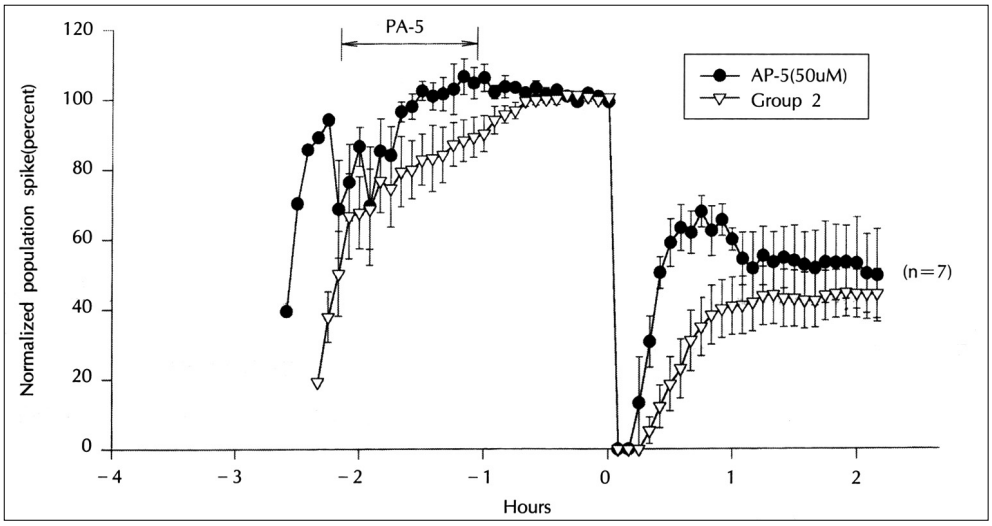

Fig. 10. Brief exposure of slices(60min) to AP-5(50uM) in recording chmaber.

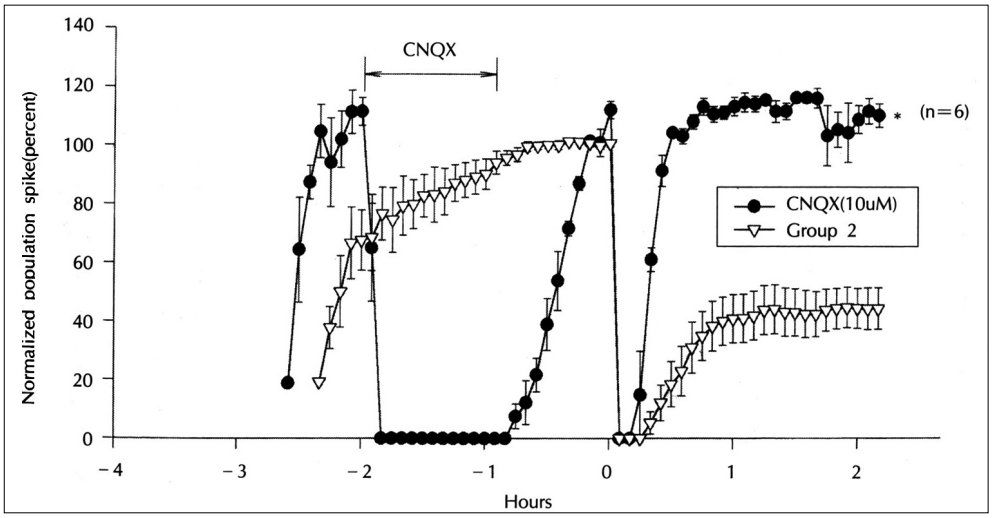

Fig. 11. Brief exposure of slices(60min) to CNQX(10uM) in recording chmaber. * : statistical significance($p<0.05$).

5. 약물 처치가 PS의 회복에 미치는 영향

약물 처치는 신경전달물질인 L-glutamate(100 μM)와 N-MDA 수용체 억제제인 AP-5(50 μM), AMPA 수용체 억제제인 CNQX(10 μM)를 실험하였다. 신경전달물질인 L-gultamate를 투여하였을 때는 대조군인 2군과 차이가 없었으며(Fig. 9) AP-5도 별다른 차이가 없었다(Fig. 10). 하지만 CNQX(10 μM)를 처치하였을 때는 빠른 속도로 PS의 소실을 보였으고 약물을 제거하였을 때는 PS의 회복이 관찰되었으나 저칼슘군에 비하여 더디게 나타났다. 하지만 일과성 저산소 손상후에는 PS의 회복이 손상전의 형태와 같은 정도로 대조군에 비하여 매우 증가하였다(Fig. 11).

고 찰

해마조직편의 CA1 부위의 stratum radiatum을 전기적으로 자극하여 얻게 되는 평균유발전위(average evoked potentials, AEP)는 population excitatory postsynaptic potentials(EPSPs), population inhibitory postsynaptic potentials(IPSPs)[16] 및 population postsynaptic spikes(PSs)[2]로 구성된다. 그중 PS는 해마조직편의 Schaffer collateral-commissural bundle을 전기적으로 자극한 후 발생하는 주위의 pyramidal cell들의 동기 활동전류(synchronized action current)로서 세포외 전기장의 형태로 측정된다. 이러한 PS는 서면파 수면중의 흰쥐를 전기적으로 자

극하여 유발되는 반응과 아주 유사하며 대뇌의 전기활동의 척도로 자주 이용되고 있다[28]. 해마 조직절편을 이용한 실험모델은 허혈에 대한 순수한 신경의 효과만을 관찰할 수 있으며, 또 세포외 환경을 조절할 수 있는 장점이 있어 실험연구에 많이 이용되는데[4)14)17)19)] 이 때 측정되는 PS의 진폭의 변화를 신경세포의 생존력(viability)의 척도[2]로써 자주 이용되어 왔다. 하지만 해마조직절편을 이용한 실험모델은 조직절편의 준비기술(slice preparation technique)이나 기록상태에 대한 표준화가 이루어지지 않아 실험마다 결과의 차이가 많은 편이다. 따라서 이런 해마조직절편의 준비과정 때 발생하는 여러 변수들이 신경세포의 시냅스 전달(synaptic transmission)이나 허혈손상후 회복에 미치는 영향들에 대한 연구가 필요한 상태이다.

Schurr 등[25]은 해마조직절편을 준비할 때 자극하게 되는 전기자극(test input)의 빈도에 따라 해마조직절편의 생존력(viability)이 다르다고 주장하였다. 즉 1Hz로 자극하는 경우가 1/600Hz로 자극하는 경우보다 PS의 진폭이 50%로 감소하게되는 시간이 적어도 5배는 빠르다고 하였으며 1Hz로 자극하는 경우는 2시간 이내에 유발전위 모두가 소실되지만 1/600Hz로 자극하는 경우는 적어도 9시간 이상 유발전위가 유지된다고 보고하였으며 이에 대한 기전으로는 해마조직편에서는 in vivo 상태보다 고에너지 인 대사(high-energy phosphate metabolism)가 약 50% 이상 감소하는데 지속적인 고빈도의 전기자극은 고에너지 물질들의 수요를 증가시키고 이로 인해 ATP의 대사물질인 adenosine과 그 유도체의 축적이 유발되며 이 때 축적된 adenosine은 억제성 신경조절인자로 작용하여 PS의 감소를 유발시킨다고 설명하였다. 하지만 본 실험에서 0.1Hz의 빈도로 test input을 주었을 때는 자극을 오래 받은 군에서 허혈손상후의 신경회복이 더 좋았으며(Fig. 4) 이는 adenosine이 생리적 상태에서는 신경보호 효과를 나타내기 때문이라고 생각되며 이러한 adenosine의 신경보호 효과는 여러 저자들에 의해 입증된 바 있다[3)11)12)].

해마조직절편을 배양할 때의 온도가 시냅스 전달에 미치는 영향에 대하여 Schiff 등[23]은 29℃에서 33℃, 37℃로 상승시킴에 따라 EPSP는 증가하고 PS는 감소한다고 주장하였다. 이는 후시냅스의 pyramidal cell들이 온도가 상승함에 따라 과분극(hyperpolarization)화되고, 이런 과분극화는 시냅스 전류의 추진력(driving force)으로 작용하여 주어진 구심성 자극에 대하여 EPSP의 증가를 가져오게 되나, 후시냅스막의 역치와 차이를 벌어지게 함으로써 역치에 도달하는 pyramidal cell들의 수적인 감소로 인해 주어진 자극에 대한 PS의 감소를 일으키게 된다고 하였다. 하지만 Watson 등[26]은 해마 조직편의 배양온도가 19℃와 30℃ 사이에서는 조직의 전기생리학적인 차이는 없었으며, 흰쥐를 단두한 후 해마조직절편을 13 15℃로 유지되는 곳으로 재빨리 옮긴 후 서서히 상온으로 온도를 상승시키는 ' cold-shock protocol(CSP) '을 적용한 경우에만 multiple PS의 빈도가 증가함을 관찰했으며, CSP을 적용한 경우에서도 저산소증후의 PS의 회복에는 변화가 없었다고 주장하였다. 본 실험에서도 그림 5에서와 같이 해마조직절편의 준비기간동안에 온도의 차이를 두고 이에 대한 신경보호작용을 관찰하였으나 의미있는 차이를 보이지는 않았다.

뇌허혈 후의 신경세포에서 보이는 주요 변화는 세포내의 칼슘이온농도의 지속적인 상승이며[5] 131 이런 세포내 상승된 칼슘이온이 신경세포의 괴사를 유발시킨다고 알려져 왔다[4]. 예를 들면 실험적으로 세포외 칼슘이온의 농도를 낮춘 상태에서 일시적인 허혈상태를 유발시켰을 때 시냅스 전달의 회복은 표준 인공뇌척수액을 세포외 환경으로 사용하였을 때보다 더 항진되었다[14]. 하지만 세포외 용액의 칼슘이온을 완전히 제거한 상태에서는 Fig. 6에서 처럼 PS의 현저한 감소를 유발시킨다. 이는 시냅스 전달때 신경전달물질의 시냅스내 방출 개시에 필요한 전시냅스내 칼슘이온의 부족이 원인으로 사료된다. Niesen등[21]은 세포 투과성 칼슘이온 흡착제인 1,2-bis-(2-aminophenoxy)ethrane-N,N,N′,N′-tetra-acetic acid acetoxy methyl ester(BAPTA-AM)를 해마 조직편에 투여하였을 때의 PS의 감소를 이런 기전으로 설명하였다. 칼슘 제거용액에서 다시 칼슘이 함유되어 있는 표준인공뇌척수액으로 대치한 경우 PS의 회복을 관찰할 수 있었고, 이 상태에서 일시적인 허혈을 유발하였을 경우에 PS의 회복은 대조군보다 감소된다는 것을 본 실험에서 알 수 있었다. 즉, 허혈손상전의 해마조직편의 준비시간동안에서의 세포외 칼슘이온의 감소는 다음에 발생하는 허혈에 대하여 신경보호작용을 갖지 못하고 오히려 PS회복의 감소를 일으킴을 알 수 있었다.

생리적인 상태에서 신경세포들은 정상안전막전위를 갖게 되고 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체는 마그네슘이온의 차단효과로 인해 시냅스전달에 영향을 미치지 않는다. 하지만 마그네슘이온이 제거된 상태에서의 해마조직절편에서의 pyramidal cell은 epileptiform activity를 보이는 것으로 알려져 있다. 즉 마그네슘이온의 NMDA수용체의 차단효과가 소멸되어 epileptiform activity를 보이는데 이런 효과는 NMDA수용체의 길항물질인 AP-5를 투여하면 epileptiform activity는 사라진다고 알려져 있다[20]. Fig. 7에서와 같이 해마조직편의 준비기간동안에 마그네슘제거용액에 노출되면 허혈손상후 PS의 회복이 증가되었는데 이는

아마도 마그네슘제거용액에 노출될 때 이미 많은 NMDA 수용체들이 활성화되어 다음에 오는 허혈손상시 활성화되는 NMDA수용체의 수적 감소로 이어져 신경보호작용이 일어나지 않았나 사료된다. 즉 허혈손상 전 높은 농도의 마그네슘에 의해 억제되었던 NMDA수용체는 오히려 허혈손상이 진행되면서 더욱 활발히 작용하게 되고 그로 인해 Fig. 8에서와 같이 PS의 회복이 대조군에 비해 감소되며 반대로 세포외 마그네슘이온이 제거된 상태에 노출되었던 신경세포들은 epileptiform activity를 나타내면서 NMDA수용체의 포화로 인해 다음에 오는 허혈손상시 NMDA수용체의 작용을 약화시켜 Fig. 7에서와 같이 PS의 회복이 대조군에 비해 매우 향상되었으리라 생각된다.

저산소증, 저혈당증 또는 간질 같은 병적인 상태에서 glutamate는 신경퇴행의 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다[8)10)18)]. 하지만 glutamate는 생리적인 신경전달물질중의 하나이고 어떤 기전을 통해 이 생리적인 물질이 신경독소(neurotoxin)로 전환되는지는 완전히 밝혀지고 있지 않다. Glutamate의 수용체중 Schaffer collateral-commissural bundle을 전기 자극하여 발생하는 정상적인 시냅스 전달에는 NMDA수용체가 관여하지 않고 주로 α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazola-propionate(AMPA)수용체가 관여하며[9)] 이는 Fig. 11에서와 같이 AMPA수용체의 길항물질인 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione(CNQX)를 투여시 관찰되는 PS의 현저한 감소로 알 수 있다. 반면에 NMDA수용체는 생리적인 상태의 시냅스 전달보다 long-term potentiation, epileptiform activity, synaptic plasticity에 주로 관여한다. NMDA수용체의 길항물질인 AP-5는 시냅스 전달에는 영향을 미치지 않지만 허혈손상에 대하여 신경보호 작용을 하는 것은 널리 알려져 있다. 하지만 본 실험에서처럼 해마조직편의 준비기간동안에 일시적으로 처리하고 난 후의 허혈손상에 대하여는 신경보호 작용이 없었다. 하지만 AMPA수용체의 길항물질인 CNQX의 경우 일시적인 처치후의 허혈손상에 대하여 PS의 회복이 Fig. 11에서처럼 대조군에 비해 증가되었다. 이것은 CNQX를 처리후 현저히 감소된 PS가 완전히 회복되지 않은 상태, 즉 CNQX의 효과가 잔존하는 상태에서 허혈손상을 받으므로 인해 발생한 것으로 사료된다.

해마조직편의 준비기간동안에 발생할 수 있는 여러 변수(test input의 기간, 온도, 세포외 용액의 이온의변화, 약제)들에 의해 허혈손상후의 회복은 영향을 받으며, 손상전에 시냅스의 활성화를 유도하는 조작을 하였을 경우에는 손상후 신경세포의 활력향상을 기대할 수 있었다. 따라서 in vitro상태에서 해마조직편을 이용한 실험의 결과를 판단하는 경우 실험준비과정에서의 변수를 고려하여야만 할 것이다.

결 론

해마조직절편을 이용한 실험에서 적절한 모델을 찾고 준비과정 중에 발생하는 변수들에 의해 실험결과가 어떻게 영향을 받을 수 있는지를 알아보기 위하여 본 실험을 시행하였다. 준비된 조직절편을 21℃의 배양조에서 90분간 배양후 34℃의 기록조로 옮겨 150분간 0.1Hz의 전기자극(test input)을 주면서 안정시킨 뒤 10분간의 저산소 손상을 유발하고 그 결과를 관찰한 2군(대조군)에서 PS는 산소 재공급후 약 1시간 안에 회복가능한 부분은 거의 회복되며 2시간까지 그 상태가 잘 유지되어 해마조직절편을 이용한 실험의 한 모델로서 의의가 있다고 판단되었다.

배양기간 동안 전기자극을 길게 할수록 일과성 저산소손상후 PS의 회복이 증가됨을 관찰할 수 있었으며 이 때 극단적이지 않은 온도변화는 별다른 영향이 없다고 판단되었다.

시냅스의 활성을 저하시켰던 저칼슘군과 고마그네슘군에서 저산소손상후 PS의 회복이 저하되었으며 NMDA 수용체가 활성화되었던 저마그네슘군에서 PS의 회복이 증가되었음을 볼 때 준비기간 동안 시냅스의 활성화 정도와 종류가 실험결과에 영향을 줄 것이라고 판단되었다. 또한 L-glutamate 투여군과 AP-5 투여군에서는 대조군과 별다른 차이가 없는 반면 CNQX 투여군에서는 일과성 저산소 손상후 PS의 증가를 관찰할 수 있어 본 실험모델에서 배양기간 중에 전기자극에 의해 주로 활성화되는 수용체는 AMPA 수용체로 판단된다.

따라서 본 실험에서 제시한 모델은 하나의 실험방법으로 유용할 것으로 판단되며 신뢰할 수 있는 결과를 얻기 위해서는 엄격한 변수관리가 필요하리라 사료된다.

• 논문접수일 : 1999년 12월 22일
• 심사완료일 : 2000년 8월 3일
• 책임저자 : 박 윤 관
152-703 서울 구로구 구로 2동 80
고려대학교 의과대학 신경외과학교실
전화 : 02) 818-6065, 전송 : 02) 863-1684
E-mail : ykapa@ns.kumc.or.kr

References

1) Aitken PG, Breese GR, Dudek FF, Edwards F, Espanol MT, Larkman PM, et al : *Preparative methods for brain slices : a discussion. J Neurosci Methods 59 : 139-149, 1995*
2) Andersoen P, Bliss TVP, Skrede KK : *Unit analysis of hippocampal population spikes. Exp Brain Res 13 : 208-221, 1971*

3) Arvin B, Neville LK, Roberts PJ : *2-Chloroadenosine prevents kainic acid-induced toxicity in rat stratum. Neurosci Lett 93 : 336-340, 1988*
4) Ashton D, Reid K, Willems R, Wauquier A : *N-methyl-D-aspartate and hypoxia-induced Ca^{2+}-changes in the CA1 region of the hippocampal slice. Brain Res 385 : 185-188, 1986*
5) Ashton D, Willems R, Wauquier A : *Selective vulnerability of synaptic transmission in hippocampus to exvivo ischemia : effect of extracellular ionic substitution in the postischemic period. Brain Res 487 : 402-406, 1989*
6) Bortolotto ZA, Collingridge GL : *ACPD-induced LTP in the hippocampus : differnece between interface and submerged slice preparation. J Neurosci Methods A2, 1984*
7) Brunner H, Misgeld U : *Synaptic activation in guineapig dentate area : dependence on the stimulation site. Pflugers Arch 423 : 497-503, 1993*
8) Choi DW : *Calcium-mediated neurotoxicity : relationship to specific channel types and role in ischemia. J Neurosci 10 : 311-316, 1990*
9) Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H : *Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. J Physiol 334 : 33-46, 1983*
10) Drejer J, Benveniste H, Diemer NH, Schousboe A : *Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. J Neurochem 45 : 145-151, 1985*
11) Evans MC, Swan JH, Meldrum BS : *Adenosine analogue, 2-chloroadenosine, protects against long term development of ischemic cell loss in the rat hippocampus. Neurosci Lett 83 : 287-292, 1987*
12) Goldberg MP, Monyer H, Weiss JH, Choi DW : *Adenosine reduces cortical neuronal injury induced by oxygen or glucose deprivation in vitro. Neurosci Lett 89 : 323-327, 1988*
13) Hansen A : *Ion and membrane changes in the brain during anoxia. Behav Brain Res 14 : 93-98, 1984*
14) Kass IS, Lipton P : *Mechanisms involved in irrevercibe anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice. J Physiol (Lond) 332 : 459-472, 1982*
15) Langmoen IA, Andersen P : *The hippocampal slice in vitro. A description of the technique and some examples of the opportunities it offers, in : Kerkut, G.A., Wheal, H.V. (Eds.), Electrophysioloy of Isolated Mammalian CNS Preparations, Academic Press, London., pp51-105, 1981*
16) Leung LW : *Orthodromic activation of hippocampal CA1 region of the rat. Brain Res 176 : 49-63, 1979*
17) Lipton P, Whitingham TS : *The effect of hypoxia on evoked potentials in the in vitro hippocampus. J Physiol (Lond) 287 : 427-438, 1979*
18) Mcdornald JW, Silverstein FS, Johnston MV : *MK-801 protects the neuronal brain from hypoxic-ischemic damage. Eur J Pharmacol 140 : 359-361, 1987*
19) Misgeld U, Frotscher M : *Dependence of the viability of the neurons in hippocampal slices on oxygen supply. Brain Res Bull 8 : 95-100, 1982*
20) Mody I, Lambert JDC, Heinemann U : *Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. J Neurophysiol 57 : 869-888, 1987*
21) Niesen C, Charlton MP, Carlen PL : *Postsynaptic and presynaptic effects of the calcium chelator BAPTA on synaptic transmission in rat hippocampal dentate granule neurons. Brain Res 555 : 2, 319-325, 1991*
22) Reid KH, Schurr A, West CA : *Effects of duration of hypoxia temperature and ACSF potassium concentration on probability of recovery of CA1 synaptic function in the in vitro rat hippocampal slice : Schurr, A., Teyler, T.J., Tseng, M.T., (Eds.), Brain Slices Fundamentals, Applications and Implications, Karger, Basel, pp143-146, 1987*
23) Schiff ST, Somjen GG : *The effect of temperature on synaptic transmission in hippocampal tissue slices. Brain Res 345 : 279-284, 1985*
24) Schurr A, Reid KH, Tseng MT, Edmonds HL Jr : *The stability of the hippocampal slice preparation : an electrophysiological and ultrastructural analysis. Brain Res 297 : 357-362, 1984*
25) Schurr A, Reid KH, Tseng MT, Edmonds HL Jr, West CA, Rigor BM : *Effect of electrical stimulation on the viability of the hippocampal slice preparation. Brain Res Bull 16 : 299-301, 1986*
26) Watson PL, Weiner JL, Carlen PL : *Effects of variations in hippocampal slice preparation protocol on the electrophysiological stability, epileptogenecity and graded hypoxia responses of CA1 neurons. Brain Res 775 : 134-143, 1997*
27) Williams JH, Li YG, Nayak A, Errington ML, Murphy KP, Bliss TV : *The surpression of long-term potentiation in rat hippocampus by inhibitors of nitric oxide synthase is temperature and age dependent. Neuron 11 : 877-884, 1993*
28) Winson J, Abzug C : *Neuronal transmission through hippocampal pathways dependent on behavior. J Neurophysiol 41 : 716-732, 1978*
29) Zhang L, Weiner JL, Valiante TA, Velumian AA, Watson PL, Jahromi SS, et al : *Whole-cell recording of the Ca^{2+}-dependent slow afterhyperpolarization in hippocampal neurones : effects of internally applied anions. Pfugers Arch 426 : 247-253, 1994*
30) Zhuo M, Kandel ER, Hawkins RD : *Nitric oxide and cGMP can produce either synaptic depression or potentiation depending on the frequency of presynaptic stimualtion in the hippocampus. NeuroReport 5 : 1033-1036, 1994*