

유기인제에 의한 뇌 손상에 있어서 흥분성 아미노산의 역할

고봉우 · 박은혜 · 김동식 · 방성현 · 진주연 · 김대성 · 주창완 · 이경갑
조문제¹ · 김소미¹ · 이봉희¹ · 류기중² · 박민경³ · 이영재*

제주대학교 수의학과, ¹제주대학교 의학과, ²제주대학교 원예생명과학부,
³청운대학교 식품영양학과

(2001년 8월 13일 접수, 2001년 8월 18일 수리)

본 연구에서는 유기인제에 의한 뇌 손상유발에 있어서 흥분성 아미노산계의 역할을 규명하고자 하였다. Diisopropylfluorophosphate(DFP)를 투여하여 뇌 손상을 유발한 흰쥐에 있어서, 뇌 해마부위에서의 aspartate 및 glutamate의 농도를 측정함으로써 경련유발에 따른 신경전달계의 변화와, 이에 따른 신경조직의 변화를 관찰하였다. 치료약물로 항콜린 약물인 atropine과 NMDA 수용체 길항제인 procyclidine을 각각 단독 또는 병합 투여하여 DFP에 의한 뇌신경독성에 대한 방어효과를 관찰하였다. DFP를 투여한 흰쥐는 경련유발과 더불어 해마부위에서의 현저한 aspartate와 glutamate의 농도 증가를 보였으며, 병리조직학적으로 해마의 신경세포 감소를 보였다. DFP에 의하여 상승되어진 해마부위의 aspartate와 glutamate의 수준은 procyclidine에 의하여 현저히 억제되었으나, atropine에 의하여는 DFP 투여군과 유의한 차이를 보이지 않았다. Procyclidine과 atropine 병합 투여 시에는 procyclidine 단독 투여시와 동일한 효과를 관찰할 수 있었다. 조직염색조건에서도 DFP에 의하여 현저하게 소실되어진 신경세포는 atropine 단독 투여시보다 procyclidine 단독 투여군 또는 atropine과 procyclidine 병합 투여군에서 뚜렷한 신경세포의 손상 및 소실을 방어하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 DFP에 의하여 유발된 경련은 흥분성 아미노산 신경전달계를 활성화시키고 이에 따라 뇌신경의 손상이 유발되는 것으로 생각된다. 특히 procyclidine은 DFP에 의한 경련유발과 뇌 세포손상을 효과적으로 방어할 수 있었으며, 이는 흥분성 아미노산계 중 NMDA 수용체가 DFP에 의한 뇌 손상기전에 관여됨을 시사한다. 이상의 결과로 DFP에 의하여 유발된 경련은 일차적으로 콜린성 신경계를 과도하게 자극하여 이에 따른 흥분성 아미노산의 과도한 분비를 유발하고 특히 NMDA 수용체를 활성화하여 뇌의 손상을 가져온다고 사료된다.

Key words : 경련, 유기인제, 미세투석법, 흥분성 신경전달물질, acetylcholine, aspartate, atropine, glutamate, procyclidine

서 론

살충제로서 개발된 유기인제(organophosphates)는 그 특성상 신경작용제(nerve agents)의 목적으로 2차대전을 전후하여 화학 무기로도 사용되기 시작하였다. 대부분의 유기인제는 생체 내에서 acetylcholine(ACh)을 가수분해하는 acetylcholinesterase(AChE)를 비가역적으로 억제함으로써 세포외액 중의 ACh의 과도한 축적을 초래하게 된다, 이에 따라 전형적인 중독증상으로 muscarine양(muscarinic), nicotine양(nicotinic) 증상이 나타나며, 더불어 혼수와 경련과 같은 중추신경계 증상이 나타나게 된다.¹⁾ 몇몇 종류의 특정 유기인제에 있어서는 만성적으로 중독되었을 때나 급성중독의 후유증으로 심부전증, 지속적인 뇌과 이상, 신경행동학적 이상, 기억 및 학습능력의 저하 등의 증상도 나타난다.^{2,3)}

특히 중추신경 계재성 경련 발작은 soman과 같은 신경작용제로 사용되는 유기인제의 전형적인 증상으로,⁴⁾ 이런 경련증상은 심각한 뇌손상과 깊은 연관성이 있는 것으로 알려져 있으며,⁵⁾ 생명을 위협하는 직접적인 요인으로 간주되고 있다.⁶⁾ 유기인제에 의한 경련 유발은 뇌조직내에 ACh의 축적에 의한 콜

린성신경의 과도흥분과 이에 따른 흥분성신경계의 흥분 등이 관여하는 것으로 예측되고 있다.⁷⁾ 그러나 현재까지는 관련 신경계에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

근래의 보고에 의하면, dizocilpine(MK-801), procyclidine과 같은 N-methyl-D- aspartate(NMDA)수용체에 대한 길항약물이 유기인제에 의한 경련유발을 억제함으로써 뇌손상을 완화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.^{8,9)} 따라서 유기인제에 의한 뇌손상과 관련해서 콜린성 신경계와 흥분성 또는 억제성 신경전달계 등의 서로 다른 종류의 신경전달계 및 신경전달물질이 관여할 것으로 예측된다. 그러므로 효율적으로 유기인제에 의한 경련발작을 방지하는 것이 뇌손상의 최소화와 더불어 후유증을 방지하는 방법으로 제시되고있다. 이상과 같은 연구를 토대로 본 연구에서는 유기인제에 의한 뇌손상 유발에 있어서 흥분성 신경계의 관여를 확인하고자, DFP를 투여하여 경련을 유발한 흰쥐의 뇌에 microdialysis법을 사용하여 유기인제 중독 진행에 따른 경련 유발과 신경전달물질의 시간별 변화양상을 생체에서 직접 측정하였다.

재료 및 방법

실험동물. 실험동물은 Sprague-Dawley계 체중 250 g 전후의 웅성 흰쥐로 (주)대한바이오링크로부터 분양 받아 실험할 환경

*연락저자

Phone: 82-64-754-3371; Fax: 82-64-756-3354
E-mail: yjlee3@cheju.cheju.ac.kr

에 1주 이상 순화시킨 후 사용하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있게 하였고 사육환경은 온도 24±1°C, 상대습도 55 ± 10%, 명암교대 12시간을 유지하였다.

DFP는 식용유에 녹여 LD₅₀에 해당하는 2.67 mg/kg을 피하주사 하였으며,¹⁰⁾ muscarinic antagonist로 atropine(15 mg/kg, i.m.)과, muscarinic 및 NMDA antagonist인 procyclidine(30 g/kg, i.m.)을 사용하였다.

Microdialysis 실험. 흰쥐를 ketamine(30 mg/kg)과 xylazine (3 mg/kg)을 근육내 주사하여 마취하고 뇌정위장치(stereotaxic apparatus, David Kopf, USA)에 고정시켰다. Paxinos와 Watson¹¹⁾의 brain map에 따라 guide cannula를 흰쥐의 dorsal hippocampus에 위치시켜 고정하였다. 수술 후 3일이 경과된 다음 깨어있는 상태의 흰쥐에 microdialysis probe를 guide cannula내로 삽입함으로써 microdialysis를 수행하였다. probe의 위치는 좌측의 ventral hippocampus로 AP: -5.8 mm, L: +4.8 mm, H: 4.0 mm이었다. 관류액은 high K⁺ Ringer's solution (Na⁺ 51, K⁺ 100, Ca²⁺ 2.3, Cl⁻ 15.6 mM)으로, 2 µl/min의 유속으로 관류시켜 주었다.

Glutamate(Glu) 및 aspartate(Asp) 분석. microdialysis에 의하여 분석된 관류액 중의 Glu와 Asp는 1, 2-phthalic dicarboxaldehyde(OPA)로 형광 유도체화하여 분석하였다.¹²⁾ RF-10AXL fluorescence detector(Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)를 이용하여 excitation wavelength는 330 nm, emission cut-off filter는 418 nm로 설정하였다. Column은 Nova-Pak C₁₈ ODS(4.6×150 mm, 4 µm, Waters)이었으며, 이동상은 A 용액(92.5% 0.1 M sodium acetate, pH 6.95, 5% methanol, 2.5% tetrahydrofuran)과 B 용액(97.5% methanol, 2.5% tetrahydrofuran)을 binary gradient 조건으로 1.2 ml/min의 유속으로 흘려 주었다.

관류액 22 µl에 OPA 용액을 11 µl 가하여 4°C에서 2분간 반응시킨 후 30 µl를 HPLC에 주입하여 분석하였다.

조직검사. microdialysis가 끝난 후 실험동물의 뇌를 10% 중성포르말린으로 관류고정하고 cresyl violet 염색을 수행하여 probe의 위치 확인 및 조직검사를 수행하였다.

결과 및 고찰

DFP(2.67 mg/kg, s.c.)를 투여한 흰쥐에서 31.7±4.2분 후에 경련이 시작되었으며, atropine(15 mg/kg, i.m.)을 같이 투여한 군에서는 58.3±2.9분, procyclidine(30 mg/kg, i.m.)을 같이 투여한 군에서는 47.3±2.5분으로 경련시작 시간이 지연되었다.

Microdialysis probe는 hippocampus의 CA1 부위에 위치하였으며, 실험에 사용된 dialysis probe의 회수율은 실험관 내에서 Glu 15.1±7.6%(n=3), Asp 12.1±8.5%(n=3)이었다. Asp와 Glu의 검출한계는 0.125 fmol/ml이었으며, 그림 1에서 표준물질 및 microdialysate에서의 전형적인 chromatogram을 나타내고 있고, 각각의 표준 정량선은 그림 2와 같다.

Microdialysate에서 Asp와 Glu의 basal level은 각각 7,016±785 pM(n=3), 952±46 pM(n=3)이었다. DFP에 의한 뇌해마조직의 세포외액 중의 Glu 양의 변화는 그림 3에서와 같다. 대

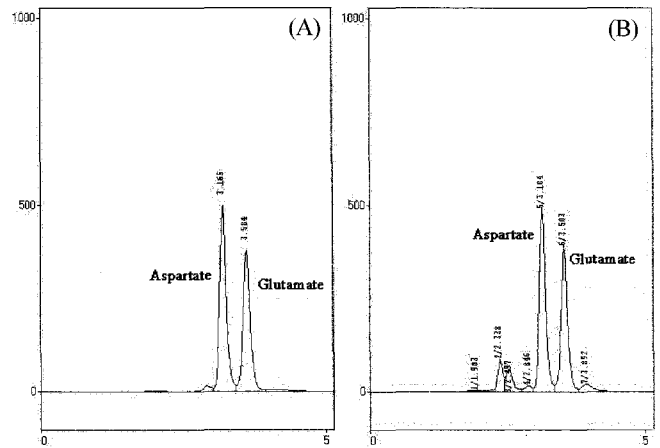


Fig. 1. Typical chromatograms of (A) standard Asp and Glu (0.125 pmol), and (B) hippocampal microdialysate (5 µl) collected from a rat brain post DFP administration (2.67 mg/kg, s.c.).

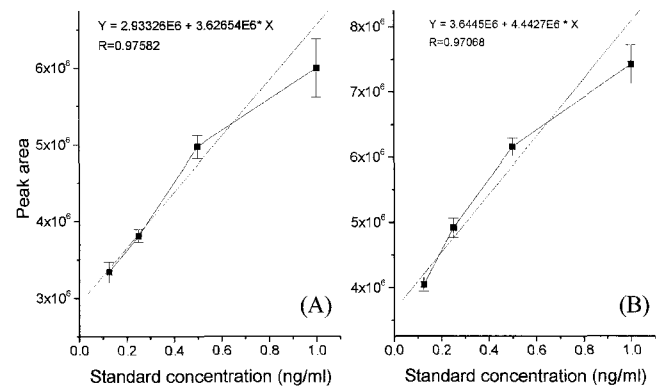


Fig. 2. Linear relationship between peak area and concentration for standard solutions of Glu (A), and Asp (B). Standard solutions (4 concentrations, 3 points per concentration) were prepared by diluting the stock solutions with a microdialysis buffer. Data are corrected with the appropriate external standard and are expressed mean ± SD.

조군과 비교 시 DFP는 투여 후 30분에 79%, 1.5시간 후에 최고 224%의 Glu 상승을 보였으며, muscarinic antagonist인 atropine을 DFP와 병용한 군에서는 DFP 단독투여군에 비하여 다소 Glu의 유리가 감소되는 경향은 보였지만 개체간 변동이 매우 심하였다. 항콜린 작용 및 NMDA 길항작용을 같이 보이는 procyclidine을 DFP와 동시에 투여한 군에서는 DFP에 의한 Glu 유리증가를 완전히 차단 할 수 있었다. Atropine과 procyclidine을 DFP 투여와 동시에 병용투여 군에서는 투여 후 30분 이내에 Glu 양이 대조군의 26%로 저하되었으며, 2시간 후에는 최저치를 보였다.

약물투여에 따른 시간별 해마의 Asp 변화는 그림 4에서와 같다. DFP단독 투여군에서는 초기 30분간은 정상 대조군과 차이가 없었으나, 이후 지속적으로 증가하여 2시간 후에 최고 대조군의 312%에 도달하였다. Atropine 투여군, procyclidine 투여군, atropine 및 procyclidine의 동시 투여군에서 모두 DFP 단독 투여군에서 보이는 현저한 Asp 유리량 증가를 억제하는 것이 관찰되었다.

조직학적으로 해마 CA1 부위에 특징적인 변화가 관찰되는

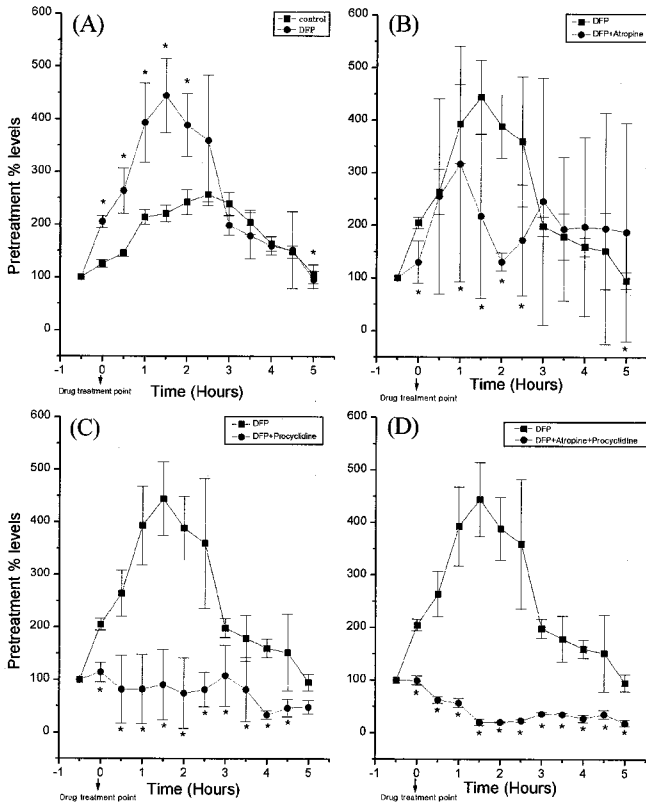


Fig. 3. Time course of Glu levels in microdialysate collected from hippocampus of awaking rats before and after drug treatments. A, Control group and DFP treated group: B, DFP treated group and DFP plus atropine treated group: C, DFP treated group and DFP plus procyclidine treated group: D, DFP treated group and DFP+atropine+procyclidine treated group. Atropine (15 mg/kg) and procyclidine (30 mg/kg) were injected intramuscularly immediately after DFP (2.67 mg/kg, s.c.) injection. The collection time was 30 minutes. Concentrations are expressed as % of mean baseline value. Data are expressed mean \pm SD. Data are obtained from the average of 3 rats (*: $P < 0.05$).

데, 정상대조군(Fig. 5A)에 비하여, DFP 투여군에서는 pyramidal cell layer의 두께가 감소되었으며, 신경세포의 위축 및 세포핵의 농축 등의 괴사성 변화가 관찰되었다(Fig. 5B). Atropine에 의하여는 이러한 해마조직의 손상을 방어하기 어려웠으나, procyclidine 투여군과 또는 atropine 및 procyclidine 병합 투여군에서는 뚜렷한 신경세포 보호효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 5C).

본 연구에서는 유기인체에 의하여 유발되는 뇌손상 과정에 있어서 흥분성 신경전달물질의 역할에 대하여 조사하고자 하였다. 항콜린에스테라제로 작용하는 신경작용제를 비롯한 유기인체에 의한 뇌손상을 방어하기 위하여 기존의 대표적 치료약물로 atropine과 2-PAM 이외에 benzodiazepine류의 항경련 약물들이 사용되고 있다.⁸⁾ 이는 억제성 신경전달계인 γ -aminobutyric acid(GABA) system의 활성화를 통한 경련 억제 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 경련 및 뇌조직의 손상은 흥분성 신경전달계, 특히 NMDA 수용체의 활성화와 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다.¹³⁾ 유기인체에 의하여 cholinesterase가 억압되면 콜린성 신경계가 과도하게 흥분되어 신경독성에 관여하는 생화학적 기전이 시작되어 결국 뇌신경

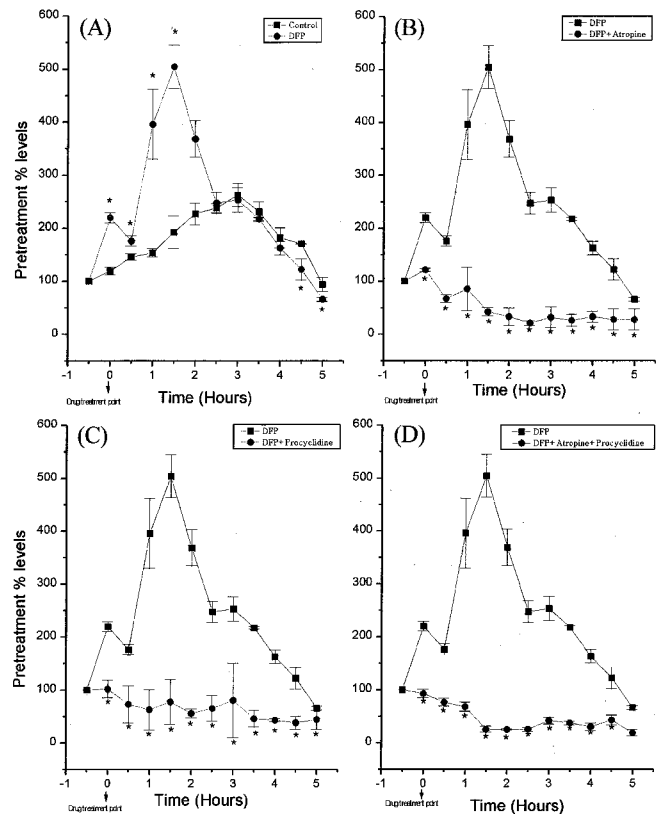


Fig. 4. Time course of Asp levels in microdialysate collected from hippocampus of awaking rats before and after drug treatments. A, Control group and DFP treated group: B, DFP treated group and DFP plus atropine treated group: C, DFP treated group and DFP plus procyclidine treated group: D, DFP treated group and DFP + atropine + procyclidine treated group. Atropine (15 mg/kg) and procyclidine (30 mg/kg) were injected intramuscularly immediately after DFP (2.67 mg/kg, s.c.) injection. The collection time was 30 minutes. Concentrations are expressed as % of mean baseline value. Data are expressed mean \pm SD. Data are obtained from the average of 3 rats (*: $P < 0.05$).

특히 해마조직의 손상을 초래하는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾

그러나 유기인체의 중독에 의한 뇌손상에 관여하는 신경전달물질의 역할에 대하여는 콜린성 신경흥분에 따른 흥분성 신경전달계의 동반 흥분이 제시되고 있으나 자세한 작용기전은 알려져 있지 않다. 본 연구의 결과에 의하면 DFP는 실험동물에서 투여후 약 30분 경에 경련증상을 보였으며, 이와 더불어 해마세포 외액 중으로의 Glu의 유리를 증가 시켰다. 또한 이렇게 경련 및 Glu 유리량의 증가를 보인 동물의 뇌조직은 조직학적으로 CA1 층의 감소와 더불어 세포사의 소견을 나타내었다. 또한 ACh은 DFP 투여 직후 15분 경부터 급격히 증가하였다(미발표 결과). 이런 결과로 미루어 볼 때 유기인체에 의한 뇌손상은 뇌세포외액 중의 ACh의 증가, 흥분성아미노산의 유리증가와 이에 따른 경련의 유발 등의 순차적인 작용에 의하여 일어나는 것으로 생각된다.

Atropine은 DFP에 의한 경련유발을 지연시켰으나, Glu의 유리증가는 효과적으로 방어할 수 없었다. 조직소견 상으로도 DFP에 의한 세포손상을 효과적으로 방어하지 못했다. atropine은 대표적인 항콜린성 작용약물로 muscarinic 수용체에 작용하여 ACh의 작용을 차단할 수 있다. 그러나 atropine은 콜린성신경

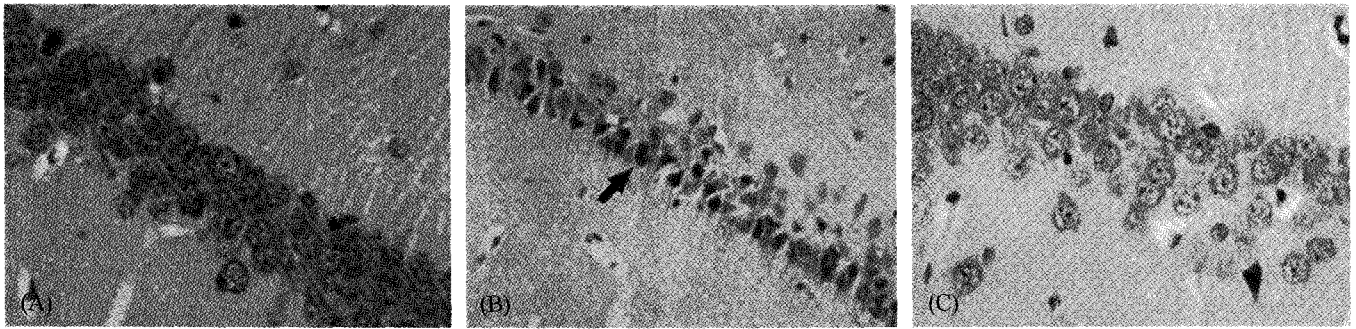


Fig. 5. Photomicrographs of the hippocampus stained with cresyl violet, showing CA1 area 7 day after drug treatment. A, control group; B, DFP treated; C, DFP and procyclidine treated group. Necrotic dark degeneration of CA1 hippocampal pyramidal cells are indicated by the arrow.

의 절전섬유 말단에 존재하는 ACh의 autoreceptor를 차단함으로써 ACh의 분비를 증가시킬 수 있다. 또한 상승된 ACh는 glutamatergic 신경 말단에 존재하는 콜린성 수용체에 작용하여 Glu 분비를 촉진시키는 것으로 생각된다.¹⁵⁾ 비록 atropine에 의하여 초기 콜린성 효과는 차단할 수 있었지만 세포외액 중의 ACh의 상승(미발표 결과)에 의한 효과는 차단할 수 없는 것으로 생각된다.

반면 procyclidine은 항콜린성 작용과 더불어 NMDA 길항약물로 알려져 있다.¹⁶⁾ 본 연구에서 이 약물이 DFP에 의한 경련을 완화시키며, 뇌조직의 손상을 방어하여 준 것은 이 약물의 특성상 항콜린 작용에 의한 콜린신경계의 차단과 더불어 NMDA 수용체의 차단에 의한 결과로 생각된다. 한편 procyclidine을 투여한 군에서 Glu 및 Asp의 유리가 DFP 투여군에 비하여 현저히 감소된 것은 procyclidine이 glutamatergic 신경말단에서의 Glu 분비를 억제한 결과이거나 또는 재흡수 기전을 촉진한 결과일 수도 있다. 그러나 이러한 결과에 대하여는 보다 자세한 연구가 요구된다.

이상의 결과로 미루어 볼 때, 유기인제 급성중독에 의한 경련유발 및 뇌세포 손상은 콜린성 신경계의 과도흥분과 이에 따른 glutamatergic 신경계의 흥분이 관여하는 것으로 생각된다. 또한 atropine과 같은 항콜린성 약물만으로는 DFP에 의한 뇌조직의 Glu 양의 상승과 신경세포 손상을 억제하지 못한 반면, procyclidine에 의하여 Glu 양의 상승과 뇌손상을 억제하는 사실로 볼 때, 콜린성 신경계와는 다른 경로로 흥분성 신경전달체가 유기인제에 의하여 활성화되어 이에 따른 뇌손상기전이 작동될 수 있음을 시사한다. 그러나 이에 대한 연구는 더 진행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(1999-1-213-003-2) 및 제주대학교 아열대 원예산업연구센터의 연구비지원에 의해 수행되었기에, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Moretto, A (1998) Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agents. *Toxicol. Lett.* **102**, 509-513.
- Philippens, I. H. C. H. M., Melchers, B. P. C., DeGroot, D. M. G. and Wolthuis, O. L. (1992) Behavioral performance, brain histology and EEG sequela after immediate combined atropine/diazepam treatment of soman-intoxicated rats. *Biochem. Behav.* **42**, 711-719.
- Duffy, F. H., Burchfiel, J. L., Bartels, P. H., Gaon, M. and Sim, V. M. (1979) Long-term effects of an organophosphate upon the human encephalogram. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **47**, 161-176.
- Ahlbom, J., Fredriksson, A. and Eriksson, P. (1995) Exposure to an organophosphate (DFP) during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behaviour in adult mice. *Brain Res.* **677**, 13-19.
- Singer, A., Jaax, N. K. and Graham J. (1987) Acute neuropathology and cardiomyopathy in soman and sarin intoxicated rats. *Toxicol. Lett.* **36**, 243-249.
- Rickett, K. L., Glenn, J. F. and Beers, E. T. (1986) Central respiratory effects versus neuromuscular actions of nerve agents. *Neurotoxicology* **7**, 225-236.
- Yoram, S. and Michael, B. (1997) The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agent central poisoning. *TIPS.* **18**, 183-185.
- Sparenborg, S., Brennecke, L. H., Jaax, N. K. and Braitman, D. J. (1992) Dizocilpine (MK-801) arrests status epilepticus and prevents brain damage induced by soman. *Neuropharmacol.* **31**, 357-368.
- Price, M. T., Stewart, G. R. and Olney, J. W. (1989) Procyclidine protects against soman neurotoxicity, even when administered after onset of convulsions. *Soc. Neurosci. Abstr.* **15**, 1349.
- Sivain, S. P., Hoskins, B. and Ho, I. K. (1989) An assessment of comparative acute toxicity of diisopropylfluorophosphate, tabun, sarin and soman in relation to cholinergic and gabanergic enzyme activities in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* **4**, 531-538.
- Paxinos G and Watson C (1997) In *The rat brain*. (3rd ed.) Academic Press, San Diego.
- Lindroth, P. and Mopper, K (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precoulmn fluorescence derivatization with *O*-phthaldehyde. *Anal. Chem.* **51**, 1667-1674.
- Choi, D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.
- Lallement, G., Dorandeu, F., Filliat, P., Carpentier, P., Baille, V.

- and Blanchet, G. (1998) Medical management of organophosphate-induced seizures. *J. Physiology (Paris)* **92**, 369-373.
15. Hersch, S. M. and Levey, A. L. (1995) Diverse pre- and post-synaptic expression of m1-m4 muscaric receptor proteins in neurons and afferents in the rat neostriatum. *Life Sci.* **56**, 931-938.
16. Kim, Y. B., Shin, S. H., Sok, D. E. and Kang, J. K. (1998) Effectiveness of procyclidine in combination with cabamate prophylactics against diisopropylfluoro-phosphate poisoning. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **5**, 43-49.

The Roles of Excitatory Amino Acid System in the Organophosphate-induced Brain Damage

Bong-Woo Ko, Eun-Hae Park, Dong-Sik Kim, Sung-Hyun Bang, Joo-Yeon Jin, Dae-Sung Kim, Chang-Wan Ju, Kyung-Kap Lee, Moon-Jae Cho¹, Somi Kim Cho¹, Bong-Hee Lee¹, Key-Zung Riu², Min-Kyoung Park³ and Young-Jae Lee* (Department of Veterinary Medicine; ¹Department of Medicine; ²Faculty of Horticultural Life Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea; ³Department of Food and Nutrition, Chungwoon University, Hongsung 350-751, Korea)

Abstract: This study investigated the role of excitatory amino acid systems in the initiation of organophosphate-induced seizures and brain damages in rats through quantitative *in vivo* microdialysis. Microdialysates were collected from the hippocampus of rat brain, treated with diisopropylfluorophosphate (DFP; 2.67 mg/kg, s.c.) alone, and/or atropine sulfate (15 mg/kg, i.m.) and procyclidine (30 mg/kg, i.m.). The protective effects of atropine, a muscarinic blocker, and/or procyclidine, a *N*-methyl-D-aspartate and cholinergic antagonist, against DFP were examined. DFP treatment increased the levels of aspartate (Asp) and glutamate (Glu) significantly in the hippocampal persuate with the induction of seizures. Treatment of procyclidine could effectively block the increase of Asp and Glu levels. Atropine treatment showed no significant anticonvulsive effects against DFP-induced seizures. The increases of Asp and Glu levels by DFP were also completely blocked through the combined treatment of atropine and procyclidine. Histopathological findings on the hippocampus confirmed the above results. More effective protection was observed through the treatments of procyclidine alone or of both procyclidine and atropine than atropine alone against DFP-induced brain damage. Procyclidine was shown to be effective in DFP-induced seizures.

Key words: acetylcholine, aspartate, cholinesterase, convulsion, DFP, glutamate, microdialysis, hippocampus, organophosphate

*Corresponding author