

고체온으로 경련이 유발된 경우 경련의 양상과 쥐 해마부의 Neuronal Nitric Oxide Synthase 발현

동국대학교 의과대학 소아과학교실, 동아대학교 의과대학 생리학교실*

김 두 권 · 정 동 근*

Characteristics of Seizures and Neuronal Nitric Oxide Synthase Expression of Hippocampus in Hyperthermia-Induced Seizures of Developing Rat

Doo-Kwun Kim, M.D. and Dong-Keun Jung, M.D.*

*Department of Pediatrics, Dongguk University College of Medicine, Kyungju,
Department of Physiology*, Donga University College of Medicine, Busan, Korea*

Purpose : Our study was aimed to investigate the characteristics of seizures as well as to determine whether the expression of neuronal nitric oxide synthase expression(nNOS) of hippocampus has an affect in the hyperthermic seizure in developing rat.

Methods : Hyperthermic seizures were repeatedly induced twice a week for four weeks in 20-day old Sprague-Dowley rats. Fifty two rats were used as a hyperthermic group and 30 rats used as a normothermic control group. Hyperthermic seizures were induced in a water bath at 45°C ± 1 for 4 min. The characteristics of seizures were recorded. Using western blot, hippocampal nNOS expression was measured in normothermic control, hyperthermic non-seizure, and hyperthermic seizure groups, respectively.

Results : Eighty seven percent of hyperthermia exposed rats showed generalized tonic-clonic seizure most frequently. The duration of seizure was ranged from 12 to 145 sec(mean 55 sec) and the latency to seizure ranged from 158 to 240 sec(mean 204 sec). The duration of seizure was prolonged but there was no significant difference in the seizure latency as the rat exposed more number of hyperthermia. Interestingly, the expression level of hippocampal nNOS in hyperthermic seizure and hyperthermic non-seizure groups was not different from each other, however, the expression in these groups was lower than that of the control group.

Conclusion : Our results indicate that nNOS do not have an affect in this repeated hyperthermic seizures. Further studies are required to clarify a role of nNOS in hyperthermic seizure. (**J Korean Pediatr Soc 2002;45:629-636**)

Key Words : Hyperthermic seizures, Neuronal nitric oxide synthase, Sprague-Dowley rat

서 론

* 본 연구는 동국대학교 전문학술지 논문게재연구비 지원으로 이루어졌음.

접수 : 2001년 11월 6일, 승인 : 2002년 2월 5일

책임저자 : 김두권, 동국의대 경주병원 소아과

Tel : (054)770-8254 Fax : (054)741-2093

E-mail : pedepi@hotmail.com

소아의 열성경련은 대부분 6개월에서 5세 사이에서 발생하는 것으로 많은 연구자들에 의하여 측두엽 간질의 원인적 요소가 될 수 있다고 생각되고 있다^{1, 2)}.

특히 부분적인 경련이나 15분 이상 지속되는 경련 또는 24시간 이내에 반복되는 복잡성 열성경련일 경우 나중에 측두엽 간질을 일으키는 경우가 많다고 보고되었다³⁻⁵⁾. 열성경련이 후에 측두엽 간질을 일으키는 신경학적 결과는 해마부 암본각의 경화증(sclerosis)으로 알려지고 있으며 해마부 경화증으로 불리기도 한다^{6, 7)}. 약물로 치료되지 않는 난치성 간질환자의 수술소견에서 해마부의 상당한 부분에서 경화증을 보였고 이런 환자들 사이에 열성경련의 과거력이 있는 것으로 알려져 있으며⁸⁾, Kim 등⁹⁾은 열성경련이 있었던 경우 그렇지 않은 경우보다 더 심한 해마부의 신경세포 손상이 있었다고 하였다. 지금까지 많은 연구자들이 병리학적 연구를 통한 열성경련과 해마부의 경화증의 관계를 조사하였으나 열성경련 후 해마부에서 일어나는 neuronal nitric oxide synthase(nNOS) 발현의 변화에 대한 연구결과는 문헌상으로 찾아보기가 매우 어렵다.

이에 저자들은 어린 쥐를 이용하여 고체온에 의하여 유발된 반복적 경련에서 해마부의 nNOS 발현의 변화를 관찰하여 열성경련과 nNOS와의 관계를 알아보고자 이 연구를 시작하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

일곱마리의 어미 쥐에서 태어난 82마리의 출생 20일된 몸무게 50-100 gm 정도의 Sprague-Dawley rat(서창 science, 대전, 대한민국)를 이용하였다. 사육실의 온도는 20℃, 습도는 40-60% 정도로 유지하고 일반적인 사료로 사육하였다. 실험에 사용된 쥐는 사람에게 있어서 열성경련이 호발하는 연령을 고려하여 생후 20일된 쥐를 이용하였다¹⁰⁾.

2. 열성경련 유발

모두 82마리의 쥐를 암수 구분 없이 사용하였으며, 이 중 52마리는 실험군으로 온수에 노출시켰고, 30마리는 대조군으로 이용하였다. 70×40×30 cm 크기의 항온조에 물을 넣어서 수온 온도계로 수온을 측정하는 방법을 반복하여 45℃ 정도의 수온을 유지하는 시간을 반복하였으며 필요한 열량을 정하였다. 항온조 내 물의 양은 어린 쥐가 뒷다리로 섰을 때 머리를 수면 위로 낼 수 있는 정도를 유지할 수 있도록 하였고

시간이 지나 쥐의 키가 변할 때마다 물의 양을 적당히 조절하였다. 입수 후 약 1분 30초 정도 지나면 쥐의 운동량이 많아지고 지치게 되므로 자세하게 쥐의 움직임을 관찰하면서 만일 익사의 위험이 있으면 관찰자로 하여금 지지하도록 하였다.

연속적으로 수온 및 쥐의 중심체온을 측정하였으며, 쥐는 4분 동안 항온조에 넣어서 관찰하였다. 비디오키메라를 이용하여 입수 후 경련이 시작되는 시점과 경련이 지속된 시간 및 경련 후의 행동 등 참고가 될 수 있는 점을 관찰하였다. 쥐의 중심체온이 40℃ 이상 올라가기에 충분하고 고체온으로 인한 뇌손상을 최소화하기 위하여 Klauenberg와 Sparber¹¹⁾의 실험을 참고로 하여 입수 시간을 4분으로 정하였고, 4분 이내에 경련이 발생하면 즉시 쥐를 항온조에서 들어내고, 4분이 지나면 모든 쥐는 경련 유무에 관계없이 항온조에서 들어내었다. 대조군으로 이용된 쥐들은 37℃의 온도를 유지하면서 4분 동안 입수시켰다.

온수 노출은 실험군의 모든 쥐를 대상으로 출생 후 20일된 쥐를 이용하여 4주 동안, 일주일에 3-4일 간격으로 2회 실시하였으며 온수에 노출된 횟수는 모두 8회였다. 쥐의 중심체온 측정은 너무 많은 시간이 소요되기 때문에 모든 쥐에서 시행하지는 못하였으며 실험 초기에 10마리의 쥐를 대상으로 PhysiLab P800(Sarotech, Seoul)을 이용하였고 온도 탐색자(probe)를 직장에 넣어 연속적으로 측정하였다.

입수하여 경련이 나타날 때까지의 시간을 잠복기(latency)로 정하고, 경련의 첫 행동으로 근간대성 경련이 나타나서 의식을 회복하고 일어설 때까지의 시간을 경련 지속기간(seizure duration)으로 정하였다. 경련이 끝나면 수건으로 닦아주고, 체온이 떨어지지 않도록 랩트 아래에 둔 다음 물기가 마르면 사육실로 옮겼다.

3. Western Blot

고체온에 의한 경련을 유발하고 해마부에서 nNOS 단백질 발현을 조사하기 위하여 대조군과 온수에 의한 고체온에 노출되었으나 경련이 나타나지 않았던 군(hyperthermic non-seizure group) 및 경련이 나타났던 군(hyperthermic seizure group)의 해마부와 대뇌피질을 대상으로 하여 western blot을 시행하였다. 실험이 끝나고 5일 후에 쥐의 뇌를 신속하게 분리하였으며 각 실험군의 대뇌반구와 소뇌 및 해마부로

나누어 절단하여 단백질을 분리하였다. 적출된 조직은 차가운 PBS로 2회 세척 후 단백질분해효소 억제제 (0.5 mM leupeptin; 1 mM pepstin A; 1 mM apro-tinin; 10 mM PMSF)가 첨가된 균질용액(100 mM KCl, 2 mM EDTA; 6 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 20 mM Hepes, pH 7.4)에 넣고 조직분쇄기(tissue homogenizer)를 이용하여 균질액을 만들었다. 이 균질액에 2% Tween 20을 첨가하여 4°C에서 1시간 처리한 뒤 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 실험에 사용하였다. 단백질의 농도는 BSA를 표준 단백질로 하여 Bradford 방법¹²⁾으로 정량하였다.

단백질 발현 정도를 측정하기 위하여 위에서 쥐의 대뇌피질 및 해마부에서 얻은 단백질을 전기영동으로 분리하였다. 7.5% polyacrylamide gel(0.38 M Tris-HCl, pH 8.3) 위에 4.5% polyacrylamide(0.13 M Tris HCl, pH 6.8)가 놓이는 불연속 gel을 만들어 위에서 추출한 단백질을 gel-loading buffer(50 mM Tris-HCl, pH 6.8; 5% mercaptoethanol; 2% SDS; 0.1% bromophenol blue; 10% glycerol)에 처리하여 100°C에서 3분간 가열한 후 급냉시켜 각 lane 당 50 µg씩 gel에 부하하였다. 이것을 Tris-glycine buffer (0.025 M Tris HCl, pH 8.3; 190 mM glycine; 1% SDS)를 사용하여 100 V에서 3시간 동안 전기영동을 시행하였다.

SDS-PAGE에 의하여 분획된 단백질을 nitrocellulose membrane(Biorad)으로 전기적인 전이를 시행하였는데, 이 때 electrotransfer buffer(50 mM Tris base, pH 8.3; 384 mM glycine; 20% methanol)를 사용하여 4°C에서 약 100 V의 전압으로 90분 동안 전이하였다. 이렇게 전이된 nitrocellulose membrane을 PBS(80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5)에 5% 탈지분유와 0.1% Tween 20이 함유된 blocking buffer로 4°C에서 하루 밤 동안 담귀 두었다. 일차 항원-항체결합에 사용하는 항체 (nNOS; Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1 : 1,000으로 희석하여 첨가시킨 blocking buffer에 nitrocellulose membrane을 담귀 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS와 PBS에 0.1% Tween 20이 함유된 PBS-T로 5분 간격으로 5회 수세한 후, horse radish peroxidase가 결합된 이차 항체(anti-rabbit IgG)를 다시 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 일차 항체반응 때와 같은 방법으로 다시 수세한 다음, ECL

reagent(Amersham)를 1분간 nitrocellulose membrane에 반응시킨 후 이 필터를 랩으로 싼 뒤, 암실에서 30초에서 15분간 방치한 후 X-ray 필름에 현상시켜 결과를 검출하였다. 이와 함께 발색반응을 보기 위해서는 다시 nitrocellulose membrane을 PBS-T로 수 차례 세척한 후 alkaline phosphatase가 결합된 이차 항체를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Nitrocellulose membrane을 PBS와 PBS-T로 각각 5회 수세한 후, 3% 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphate p-toluidine salt(BCIP)와 0.015% p-nitroblue tetrazolium chloride(NBT)가 포함된 alkaline phosphatase buffer(100 mM Tris-HCl, pH 9.5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂)에 담군 후 발색시켜 필름에 나온 결과와 비교하여 관찰하였다.

4. 통계처리

통계처리 소프트웨어는 SPSS for windows, version 10.0을 이용하였다. 총 8회의 고체온에 의한 경련실험을 통해 얻어진 데이터를 이용하여 잠복기와 경련 지속시간에 미치는 영향을 보기 위하여 일반 선형 모델(general lineal model)의 반복측정을 이용한 분산분석(repeated measured ANOVA)을 이용하였다. 또한 고체온 노출횟수에 따른 경련 발생률이 증가하는가를 보기 위하여 카이제곱 경향분석을 실시하였다.

결 과

1. 경련의 양상

실험 과정에서 실험군 52마리 중 7마리가 사망하였는데 6마리는 입수 후 지속적으로 경련을 한 후 의식을 회복하지 못하고 사망하였고 1마리는 사육실에서 사망하였다. 대조군에서도 사육실에서 5마리가 사망하였고 실험 중 단 한 마리에서도 경련은 관찰되지 않았다. 결국 실험군 40마리와 대조군 25마리를 대상으로 통계처리 하였다.

어린 쥐를 45°C의 항온조에 입수시킨 후 행동을 관찰한 결과 처음 1분 정도는 움직이지 않거나 느린 움직임을 수영을 하였다. 그 후 2분 정도 경과할 때 빠른 속도로 불규칙하게 항온조를 뿔뿔다다 지치면 항온조의 벽에 뒷다리로 서서 앞다리나 머리로 항온조 벽에 기대어 있다가는 또 다시 수영을 하거나 빠른 속

도로 허둥대는 듯한 행동을 하였다. 경우에 따라서는 항온조의 지붕을 향하여 뛰어 오르기도 하였으며 쥐가 성장하면서 지붕에 부딪치기도 하였다. 초기 실험 중 익사하는 경우가 발생하였기 때문에 경련이 발생하는 경우 조심스럽게 지켜보았다. 입수하기 전 중심체온은 $38.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 를 보였고 경련 시점에는 $43.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$ 의 중심체온을 보였다.

고체온에 노출되어 경련을 보인 쥐의 87%에서 전신성 강직-간대 발작을 보였다. 경련의 양상은 처음에 머리의 움직임을 동반한 근간대성 경련이 나타났다. 그 후 자세가 흐트러지면서 바닥에 쓰러지고 앞발에 이어 곧바로 뒷발에 간대성 경련이 나타났으며, 마지막으로 전신의 강직성 경련이 나타났다. 시간이 경과함에 따라 강직성 경련이 서서히 약해지면서 숨을 가쁘게 몰아쉬고 잠깐 동안 누운 상태로 있다가 점점 호흡이 정상으로 회복되면서 눈을 뜨고 몸을 크고 빠르게 좌우로 움직여서 몸에 있는 물을 털어 내고, 앞발로 얼굴을 비비는 행동을 하였으며 이때 정신상태는 완전히 회복된 것으로 보였다. 어떤 경우에는 근간대성 경련 후 쾅거루가 뒤로 가는 모습을 하면서 뒷다리로 서서 앞발에 간대성 경련을 보이고 그후 쓰러지면서 강직성 경련을 보이는 경우도 있었다. 또한 한번 경련 후 숨을 가쁘게 몰아쉬고 의식이 회복되지 않은 상태에서 다시 천천히 간대성 경련을 하다가 빨라지면서 강직성 경련으로 나타나는 반복적인 경련을 하는 경우를 관찰 할 수 있었는데 온수에 의한 고체온 노출횟수가 많을수록 반복적인 경련이 더 많이 나타났다. 다른 경우에는 오랫동안 간대성 경련만 하다가 회복되는 경우도 있었고, 짧게 간대성 경련을 한 후 바로 좋아지는 경우도 있었다. 결과적으로 경련은 대부분 강직-간대성 경련을 하였으나 경련은 다양성을 보였다.

2. 경련의 잠복기 및 경련 지속시간

입수 후 비디오카메라로 촬영을 하면서 쥐의 움직임을 관찰하였다. 경련 발생률은 5마리에서는 8번의 온수에 의한 고체온 노출에서 모두 경련이 발생하였고 4마리에서는 한번의 경련도 발생하지 않았으며 나머지는 1회에서 7회까지 다양하게 나타났고, 일곱번째까지 경련이 있었으나 여덟번째는 경련이 발생하지 않은 경우도 있었기 때문에 첫번째 경련 후 다음 경련 가능성을 예측하기는 매우 어려웠다. 고체온 노출

횟수에 따른 경련의 빈도는 40마리 중 첫번째에 21마리에서 발생하여 52.5%, 두번째에 24마리로 60%, 세번째에 25마리로 62.5%, 네번째에 30마리로 75%, 다섯번째에 23마리로 57.5%, 여섯번째에 24마리로 60%, 일곱번째에 29마리로 72.5%, 여덟번째에 28마리로 70%로 나타났으며 고체온 노출횟수에 따른 경련 발생률은 통계적으로 유의성이 없었다($P>0.05$)(Fig. 1).

대부분 쥐들은 입수 후 2분 정도 지나면 격렬하게 움직이거나 지친 모습을 보이고 3-4분 사이에 경련이 시작되었다. 경련의 잠복기는 입수 후 처음 경련이 나타날 때까지의 시간으로 정하고 처음 경련은 근간대성 경련이 나타나는 시점으로 정하였다. 결과적으로 경련이 나타날 때까지의 잠복기는 158에서 240초였고 평균 204초였으며, 고체온 노출횟수에 따른 잠복기는 통계적으로 유의하지는 않았다($P>0.05$)(Fig. 2).

경련 지속시간은 매우 다양하였으며 경련이 끝나고 쥐가 일어서서 움직이는 시점까지로 정하였고, 의식이

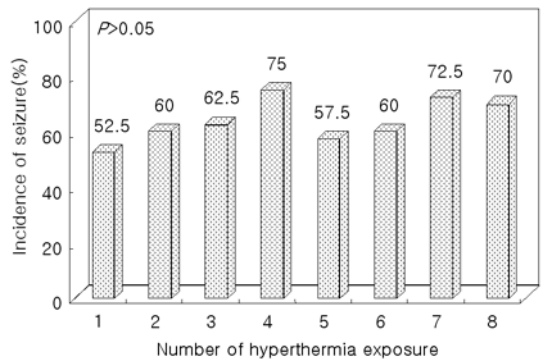


Fig. 1. Incidence of seizure according to number of hyperthermic exposure.

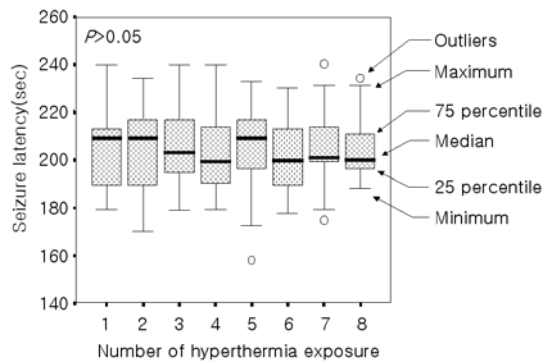


Fig. 2. Relation between seizure latency and number of hyperthermic exposure.

회복되지 않고 다시 경련이 시작되면 두번째 경련이 끝나는 시점으로 측정하였다. 경우에 따라서는 의식을 완전히 회복하고 난 후 다시 경련이 나타나는 경우가 있었는데 이 경우는 따로 측정하였다. 결과적으로 경련 지속시간은 12에서 145초였고 평균 55초로 측정되었으며, 고체온 노출횟수에 따른 경련 지속시간은 통계적으로 유의하게 나타났다($P<0.05$)(Fig. 3).

따라서 고체온 노출횟수에 따른 경련 발생률과 잠복기 및 경련 지속시간을 측정할 결과 노출횟수가 증가할수록 경련 지속시간은 의미있게 증가하였으나 잠복기와 경련 발생률은 차이가 없었다.

3. Western blot

대조군의 해마부, 대뇌 피질 및 소뇌, 고체온에 노출되었으나 경련이 나타나지 않았던 군(hyperthermic non-seizure group) 및 경련이 나타났던 군(hyperthermic seizure group)의 해마부와 대뇌피질을 대상으로 하여 western blot을 시행한 결과 대뇌 피질에서는 각 그룹간에 nNOS 발현에 변화가 없었다. 그러나 각 그룹의 해마부에서 nNOS 단백질 발현은 대조군에 비하여 hyperthermic non-seizure group과 hyperthermic seizure group에서 약하게 나타났고, 이

두 군간에는 차이가 없었다(Fig. 4).

고 찰

열성경련은 중추신경계의 감염이나 질환이 없이 상기도 감염, 중이염, 폐렴, 위장관염, 요로감염, 돌발진 등 열성 질환을 가진 6개월에서 5세 사이의 소아에서 3-4% 정도가 경험하는 것으로서, 열성경련의 80-90%가 대칭적 강직, 강직-간대 또는 탈력발작을 한다. 경련 지속시간은 15분 이내로 짧고, 국소성이 없는 단순열성경련이며, 나머지 경우는 경련이 비대칭적이고, 경련이 장시간 지속되거나, 하루에 2번 이상 경련이 반복되고, 발작 후 신경학적 후유증이 남을 수 있는 복합열성경련으로서 후에 2-7%에서 간질로 이행할 가능성이 있는 것으로 보고되고 있다⁴⁾.

최근에 많은 연구자들이 소아의 열성경련이 측두엽 간질의 원인적 요소가 될 수 있다는 것을 보고하였다¹³⁾. 특히 소아의 복합열성경련이 후에 복합부분발작의 발생과 연관이 있는 것으로 생각되고 있으며 특히 열성경련의 신경학적 후유증으로서 해마부의 경화증과 관계가 있는 것으로 보고되고 있다^{6, 7)}.

일반적으로 열성경련 모델은 적외선 램프를 이용하는 방법¹⁴⁾, 고온 열풍을 이용하는 방법¹⁵⁾, 45°C 정도의 온수를 이용하는 방법¹¹⁾ 등이 있다. 이 중 온수를 이용하는 방법이 중심체온을 빨리 올릴 수 있는 것으로 보고되었다¹¹⁾.

열성경련 모델에서 고온 열풍을 이용할 경우 경련이 시작될 때까지의 잠복기는 16-22분이며¹⁵⁾, 적외선 램프를 이용할 경우 5-10분으로 보고되었다¹⁶⁾. 이에 비하여 온수를 사용할 경우 2-6분으로 다른 두 방법에 비하여 짧은 것으로 보고되었다¹¹⁾. 본 연구에서는 이 방법들 중에서 중심체온을 빨리 올릴 수 있고 경련 유발시간이 가장 짧은 45°C 정도의 온수를 이용한 방법을 사용하였고, 익수에 의한 사망이나 뇌손상을

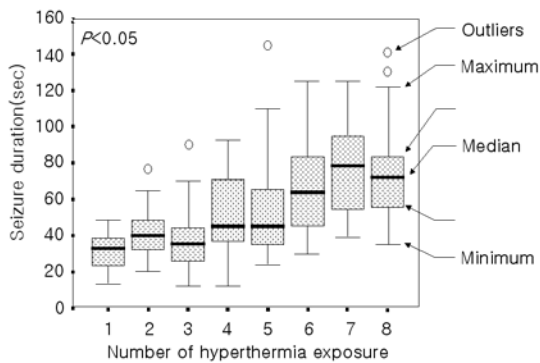


Fig. 3. Seizure duration according to number of hyperthermic exposure.

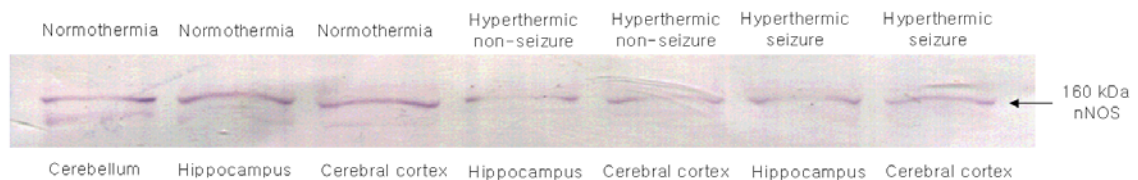


Fig. 4. The expression level of hippocampal nNOS in hyperthermic seizure and non-seizure groups was not different from each other, but the expression in these groups was lower than that of the control group.

최소화하기 위하여 입수시간을 4분으로 제한하였다. 또한 인간에서 45℃ 정도의 온수에 한시간 이내로 노출되었을 경우 피부 손상이 거의 없기 때문에 물의 온도를 45℃로 정하였고 실제로 실험 중 쥐들이 화상으로 인한 피부손상은 관찰할 수 없었다.

인간에서 열성경련은 대부분 6개월에서 5세 사이에서 발생하기 때문에 쥐의 연령을 정하는 것이 중요한데 사람과 쥐 사이의 정확한 연령관계를 알기는 어려우나 보고에 의하면 5-7일된 쥐는 사람의 신생아기에 해당하고, 15일된 쥐는 사람의 경우 수개월에서 1세 정도이며, 28-30일된 쥐는 인간에서 2세 정도로 추정되고 있다¹⁰⁾. 따라서 본 연구에서는 실험이 끝나는 시점을 고려하여 출생 후 20일된 쥐를 이용하여 실험하였다. Morimoto 등¹⁷⁾은 출생 후 1개월 이후에 신경전달물질이 성숙한 쥐의 수준에 도달하기 때문에 출생 10일 이전의 쥐는 뇌가 미숙하여 열성경련 모델로서 적당하지 않으며 적어도 출생 1개월 이후의 쥐가 적당하다고 하였다.

경련 역치 온도는 나이에 따라 차이가 있는 것으로 보고되고 있다. Morimoto 등¹⁸⁾은 출생 후 30일까지는 경련 역치 온도가 점점 증가하며 그 이후에 점점 감소한다고 하였으며 GABA가 경련의 역치와 연관이 있는 것으로 보고하였다. Gilbert와 Cain¹⁹⁾은 연령이 증가함에 따라 열성경련을 유발하기 위하여 더 높은 직장 온도가 필요하다고 하였다. 또한 이들은 나이가 어릴수록 열성경련의 잠복기가 더 짧다고 하였다. 본 연구에서 잠복기는 범위가 158-240초로서 평균 204초였으며, 쥐의 중심체온은 경련 시점에는 $43.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$ 였고 이 두 결과는 Morimoto 등¹⁷⁾의 결과와 비슷하였다. Jiang 등²⁰⁾도 비슷한 시기에 온수를 이용한 반복적인 열성경련 실험을 시행하였으며 실험 결과 역시 경련 횟수에 따른 잠복기는 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타났다. Gulec과 Noyan²¹⁾도 역시 온수를 이용한 고체온에 의한 반복적 열성경련 시 경련이 시작되는 잠복기와 고체온 노출횟수와는 통계학적으로 차이가 없었다고 보고하였다. 본 연구에서도 잠복기의 변화는 없었다. 따라서 잠복기는 쥐의 중심체온이 증가하는 생리적 반응과 관계가 있는 것으로 추정되며 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 고체온 노출횟수에 따른 경련 지속시간은 범위가 12-145초였고 평균 55초로 측정되었으며 통계적으로 의미있게 증가되었다. Jiang 등²⁰⁾은 온수

를 이용한 고체온에 의한 열성경련 실험에서 고체온 노출횟수에 따라 경련 지속시간은 통계적으로 의미있게 증가하는 것으로 보고하였고 경련 지속시간은 30초에서 6분으로 나타났으며 대부분의 쥐에서는 세포손상은 보이지 않았으나 치상회(dentate)의 이끼섬유발아(mossy fiber sprouting)를 보이는 경우가 관찰되었다. 그러나 지속성 경련을 보였던 쥐에서는 해마부에 신경세포 손상과 함께 이끼섬유발아를 관찰할 수 있었다고 보고하였다. 따라서 반복적이고 지속적인 열성경련의 경우 해마부에 형태학적 변화가 나타나고 결과적으로 경련에 대한 감수성에 영향을 줄 것으로 생각된다. Anderson 등²²⁾은 영아기의 쥐에 파상풍(tetanus) 독소를 이용하여 반복적인 경련을 유발한 후 시간이 지난 다음 해마부의 변화를 관찰한 결과 해마부의 신경손상은 없었으나 이끼섬유발아를 관찰하였고 자발적 경련이 발생한다는 것을 보고하였다. 또한 성숙한 쥐에서는 해마부에 신경손상 뿐만 아니라 이끼섬유발아를 동시에 관찰함으로써 발달하고 있는 쥐와 성숙 쥐 사이의 경련발생에 차이점이 있다고 하였다. 따라서 어린 쥐에서 고체온에 의한 열성경련이 뇌의 신경학적 변화를 유발하여 경련의 감수성 및 지속시간에 영향을 줄 수 있을 것으로 추정된다.

nNOS는 nitric oxide(NO)를 생성하는데 필요한 효소로서 신경세포에서 생리적인 조건에서 존재한다. 그러나 최근의 연구에 의하면 nNOS는 다양한 형태의 세포 손상에 의하여 발현의 변화가 타나날 수 있다고 보고하였다²³⁾. 본 연구에서는 신경계에서 경련을 유발하는 것으로 알려진 nNOS가 열성경련에서 어떤 관계가 있는지 알아보기 위하여 nNOS 항체를 이용하여 western blot을 시행하였다. nNOS는 해마부에 풍부하게 존재하며 열성경련과의 관계는 아직 확실히 알려진 바가 없다. Morimoto 등²⁴⁾은 고체온에 의하여 뇌피질의 세포외 글루탐산의 농도가 증가하며 이때 증가된 글루탐산은 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 활성화시켜서 경련을 유발한다고 보고하였다. Pedder 등²⁵⁾은 NMDA 수용체에 대한 길항제가 열성경련을 억제한다고 하였다. 또한 NO는 NMDA 수용체를 자극하는 생리적, 병리학적 매개역할을 하는 것으로 알려져 있다^{26, 27)}. 따라서 저자들은 반복적 열성경련에서 각 군간에 nNOS의 발현 정도를 측정하여 열성경련과 어떤 관계가 있는지 알아보기 위하여 실험을 시행하였으며, 그 결과 대조군에 비하여 hy-

perthermic non-seizure group과 hyperthermic seizure group에서 약하게 나타났고, 이 두 군간에는 nNOS 발현의 차이가 없었다. Gulec과 Noyan²¹⁾는 온수를 이용한 열성경련 실험에서 NO의 생성에 필요한 L-argine을 경련유발 전에 투여하였으나 잠복기나 경련 지속시간에 있어서 대조군과 통계적인 차이점을 발견하지 못하였다. 또한 김과 서²⁶⁾는 모래쥐에서 뇌허혈 후 고체온에서 nNOS의 변화를 관찰한 결과 대뇌 피질에서는 각 그룹간의 nNOS 발현에 변화가 없었으나 해마부에서는 각 그룹의 nNOS 발현이 대조군에 비하여 약하게 나타났다. 따라서 nNOS는 열성경련에서 경련유발과는 연관이 없는 것으로 생각되고 오히려 고체온에 의한 신경세포 손상과 연관이 있을 것으로 추정되며, 쥐가 고체온에 노출되었을 때 nNOS가 감소하는 기전이 아직 알려져 있지 않기 때문에 열성경련에 의한 해마부의 형태학적인 변화와 함께 많은 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

목적 : 고체온에 의하여 유발된 반복성 열성경련에서 경련의 양상과 해마부의 nNOS 발현을 비교관찰하고 열성경련과 nNOS의 관계를 알아보기 위하여 연구를 시행하였다.

방법 : 생후 20일된 Sprague-Dowley rat을 이용하여 1주일에 2회씩 4주간 모두 8회 온수에 노출시켜 고체온에 의한 반복적인 열성경련을 유발하였다. 실험에 이용된 쥐는 모두 82마리로서 이중 52마리는 실험군으로서 항온조에서 4분간 45°C 정도의 온수에 노출시켰고, 30마리는 대조군으로서 4분간 37°C에 노출시켰다. 입수 후 경련이 발생할 때까지를 잠복기로 정하였고, 경련의 첫 증상으로서 근간대성 경련이 보이고 난 후 의식을 회복하여 정상적인 활동을 보이는 시점까지를 경련 지속시간으로 정하였다. 대조군과 고체온에 노출될 때마다 경련을 보였던 hyperthermic seizure group 및 경련이 전혀 발생하지 않았던 hyperthermic non-seizure group 간의 nNOS 발현을 관찰하기 위하여 western blot을 시행하였다.

결과 : 고체온에 노출되었던 쥐의 87%에서 전신성 강직-간대 발작을 보였고, 고체온 노출횟수에 따른 경련 발생률은 통계적으로 유의성이 없었다($P>0.05$). 입수 후 경련이 나타날 때까지의 잠복기는 158에서

240초였고 평균 204초였으며, 고체온 노출횟수에 따른 잠복기는 통계적으로 유의하지 않았다($P>0.05$). 경련 지속시간은 12에서 145초였고 평균 55초로 측정되었으며, 고체온 노출에 따른 경련 지속시간은 통계적으로 유의하게 나타났다($P<0.05$). 결과적으로 고체온 노출횟수가 증가할수록 경련 지속시간은 의미있게 증가하였으나 경련 발생률 및 잠복기는 차이가 없었다. 쥐 해마부에서 nNOS 단백질의 발현을 조사하기 위하여 대조군의 해마부, 대뇌피질 및 소뇌, hyperthermic non-seizure group 및 hyperthermic seizure group의 해마부와 대뇌 피질을 대상으로 하여 western blot을 한 결과 대뇌 피질에서는 각 그룹간에 nNOS 발현에 변화가 없었으나 각 그룹의 해마부에서의 nNOS 단백질 발현은 대조군에 비하여 hyperthermic non-seizure group과 hyperthermic seizure group에서 약하게 나타났고, 이 두 군간에는 차이가 없었다.

결론 : 고체온에 의한 반복성 열성경련에서 nNOS는 경련유발에 영향을 주지 않을 것으로 추정되며 앞으로 열성경련에 의한 해마부의 형태학적인 변화와 함께 많은 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Lennox WG. Significance of febrile convulsions. Pediatrics 1953;11:341-57.
- 2) Aicardi J, Chevrie JJ. Convulsive status epilepticus in infants and children; a study of 239 cases. Epilepsia 1970;11:187-97.
- 3) Maher J, McLachlan RS. Febrile convulsions; is seizure duration the most important predictor of temporal lobe epilepsy. Brain 1995;118:1521-8.
- 4) Annegers JH, Hauser WA, Elveback LR, Kurland LT. The risk of epilepsy following febrile convulsions. Neurology 1979;29:297-303.
- 5) Fujiwara T, Ishida S, Miyakoshi M. Status epilepticus in childhood; a retrospective study of initial convulsive status and subsequent epilepsies. Folia Psychiatr Neurol Jpn 1979;33:337-44.
- 6) Shinnar S. Prolonged febrile seizures and medial temporal sclerosis. Ann Neurol 1998;43:411-2.
- 7) Lewis DV. Febrile convulsions and mesial temporal sclerosis. Curr Opin Neurol 1999;12:197-201.
- 8) Sagar HJ, Oxbury JM. Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy; correlation with early childhood convulsions. Ann Neurol 1987;22:334-40.

- 9) Kim JH, Guimaraes PO, Shen MY, Masukawa LM, Spencer DD. Hippocampal neuronal density in temporal lobe epilepsy with and without gliomas. *Acta Neuropathol* 1990;80:41-5.
- 10) Nealis JGT, Rosman NP, Depiero TJ, Qulette EM. Neurologic sequelae of experimental febrile convulsions. *Neurology* 1978;28:246-50.
- 11) Klauenberg BJ, Sparber SB. A kindling like effect induced by repeated exposure to heated water in rats. *Epilepsia* 1984;25:292-301.
- 12) Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- 13) Dube C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, Brunson K, Solltesz I, Baram TZ. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Ann Neurol* 2000;47:336-44.
- 14) Holtzman D, Obana K, Olson J. Hyperthermia-induced seizures in the rat pup: a model for febrile convulsions in children. *Science* 1981;213:1034-6.
- 15) Morimoto T, Nagao H, Sano N, Takahashi M, Matsuda H. Electroencephalographic study of rat hyperthermic seizures. *Epilepsia* 1991;32:289-93.
- 16) McCaughran JAJ, Schechter N. Experimental febrile convulsions; long-term effects of hyperthermia-induced convulsions in the developing rat. *Epilepsia* 1982;23:173-83.
- 17) Morimoto T, Yoshimatsu M, Nagao H, Takahashi M, Matsuda H. Three types of hyperthermic seizure in rats. *Brain Dev* 1992;14:53-7.
- 18) Morimoto T, Nagao H, Sano N, Takahashi M, Matsuda H. Hyperthermia-induced seizures with a servo system; neurophysiological roles of age, temperature elevation rate and regional GABA content in the rat. *Brain Dev* 1990;12:279-83.
- 19) Gilbert ME, Cain DP. A single neonatal pentylenetetrazole or hyperthermia convulsion increases kindling susceptibility in the adult rat. *Dev Brain Res* 1985;22:169-80.
- 20) Jiang W, Duong TM, de Lanerolle NC. The neuropathology of hyperthermic seizures in the rat. *Epilepsia* 1999;40:5-19.
- 21) Gulec G, Noyan B. Do recurrent febrile convulsions decrease the threshold for pilocarpine-induced seizures? Effects of nitric oxide. *Brain Res Dev Brain Res* 2001;28:223-8.
- 22) Anderson AE, Hrachovy RA, Antalffy BA, Armstrong DL, Swann JW. A chronic focal epilepsy with mossy fiber sprouting follows recurrent seizures induced by intrahippocampal tetanus toxin injection in infant rats. *Neuroscience* 1999;92:73-82.
- 23) Regidor J, Montesdeoca J, Ramirez-Gonzalez JA, Hernandez-Urquia CM, Divac I. Bilateral induction of NADPH-diaphorase activity in neocortical and hippocampal neurons by unilateral injury. *Brain Res* 1993;631:171-4.
- 24) Morimoto T, Nagao H, Yoshimatsu M, Yoshida K, Matsuda H. Pathogenic role of glutamate in hyperthermia-induced seizures. *Epilepsia* 1993;34:447-52.
- 25) Pedder SC, Wilcox RI, Tucek JM, Johnson DD. Attenuation of febrile seizures in epileptic chicks by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Can J Physiol Pharmacol* 1990;68:84-8.
- 26) Dawson TM, Zhang J, Dawson VL, Snyder SH. Nitric oxide: cellular regulation and neuronal injury. *Prog Brain Res* 1994;103:365-9.
- 27) Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell? cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991;14:60-7.
- 28) 김두권, 서덕준. 모래쥐에서 뇌허혈 시 neuronal nitric oxide synthase 유전자 발현에 미치는 고체온증의 효과. *소아과* 1999;42:1543-51.