

생후 7일, 16일된 circling mouse 청각 뇌줄기에서 N-메틸-D 아스파르트산염 수용체 (NMDA receptor)에 대한 면역염색학적 분포

최인영, 박기섭, 김혜진, 디라즈 마스키, 김명주*
단국대학교 의과대학 해부학교실

Immunohistochemical Localization of NMDA Receptor in the Auditory Brain Stem of Postnatal 7, 16 Circling Mouse

In-young Choi, Ki Sup Park, Hye Jin Kim, Dhiraj Maskey and Myeung Ju Kim*

Department of Anatomy, Dankook University College of Medicine,
Cheonan, Chungnam 330-714, Korea

(Received March 26, 2010; Revised June 18, 2010; Accepted June 19, 2010)

ABSTRACT

Glutamate receptors may play a critical role in the refinement of developing synapses. The lateral superior olivary nucleus (LSO)-medial nucleus of trapezoid body (MNTB) synaptic transmission in the mammalian auditory brain stem mediate many excitatory transmitters such as glutamate, which is a useful model to study excitatory synaptic development. Hearing deficits are often accompanied by changes in the synaptic organization such as excitatory or inhibitory circuits as well as anatomical changes. Owing to this, circling mouse whose cochlea degenerates spontaneously after birth, is an excellent animal model to study deafness pathophysiology. However, little is known about the development regulation of the subunits composing these receptors in circling mouse. Thus, we used immunohistochemical method to compare the N-Methyl-D-aspartate receptor (NMDA receptor) NR1, NR2A, NR2B distribution in the LSO which project glutamergic excitatory input into the auditory brainstem, in circling mouse of postnatal (p) 7 and 16, which have spontaneous mutation in the inner ear, with wild-type mouse.

The relative NMDAR1 immunoreactive density of the LSO in circling mouse p7 was 128.67 ± 8.87 in wild-type, 111.06 ± 8.04 in heterozygote, and 108.09 ± 5.94 in homozygote. The density of p16 circling mouse was 43.83 ± 10.49 in wild-type, 40 ± 13.88 in heterozygote, and 55.96 ± 17.35 in homozygote. The relative NMDAR2A immunoreactive density of LSO in circling mouse p7 was 97.97 ± 9.71 in wild-type, 102.87 ± 9.30 in heterozygote, and 106.85 ± 5.79 in homozygote. The density of LSO in p16 circling was 47.4 ± 20.6 in wild-type, 43.9 ± 17.5 in heterozygote, and 49.2 ± 20.1 in homozygote. The relative NMDAR2B immunoreactive density of LSO in circling mouse p7 was 109.04 ± 6.77 in wild-type, 106.43 ± 10.24 in heterozygote, and 105.98 ± 4.10 in homozygote. the density of LSO in p16 circling mouse was 101.47 ± 11.5 in wild-type, 91.47 ± 14.81 in heterozygote, and 93.93 ± 15.71 in homozygote.

이 연구는 2008년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

* Correspondence should be addressed to Myeung Ju Kim, Department of Anatomy, College of Medicine, Dankook University, San # 29, Anseo-dong, Cheonan-si, Chungnam 330-714, Korea. Ph.: (041) 550-3856, Fax: (041) 556-6461, E-mail: mjukim99@dku.edu

These results reveal alteration of NMDAR immunoreactivity in LSO of p7 and p16 circling mouse. The results of the present study are likely to be relevant to understand the central change underlying human hereditary deafness.

Keywords : Circling mouse, Lateral superior olivary nucleus (LSO), Medial nucleus of trapezoid body (MNTB), NMDA receptor, Deafness

서 론

청각계통의 중요한 기능 중의 하나는 소리가 들려오는 방향을 감지하는 것으로 오름청각로(ascending auditory pathway)에서 양쪽 귀 사이의 소리의 세기를 첫번째로 조절하는 곳은 가쪽위올리브핵(Lateral superior olivary nucleus, LSO)이다(Kandler et al., 2002).

가쪽위올리브핵의 신경세포들은 소리가 나는 쪽에서 자극되고, 그 반대쪽 신경핵의 신경세포들은 억제된다(Ene et al., 2003). 흥분성 신경의 신호는 소리가 나는 쪽의 앞배쪽 달팽이핵(anteroventral cochlear nucleus, AVCN)에 있는 덩불세포(bushy cell)에서 오는 글루타메이트성투사(glutamatergic projection)를 거쳐 가쪽위올리브핵에 닿고(Thompson and Schofield, 2000), 억제성 신경의 신호는 안쪽마름섬유체핵(medial nucleus of trapezoid body, MNTB)에서 나오는 글리신성투사(glycinergic projection)를 통해 가쪽위올리브핵에 닿는다(Ene et al., 2003). 흥분성과 억제성 신경의 신호 전달은 둘 다 음위상으로 구성되어 정밀한 주파수 특이적 방법(frequency-specific manner)으로 한 개의 가쪽위올리브핵 신경세포로 보내진다(Kandler et al., 2002). 가쪽위올리브핵의 정상적 발달은 들신경신호와 연결활성도의 존재에 의존하며(Sanes & Friauf, 2000), 만약 달팽이를 제거(ablation)하는 등의 방법으로 소리가 나는 쪽의 흥분성 신호전달을 폐쇄하면 가쪽위올리브핵의 부피와 세포 수가 줄어든다는 보고도 있다(Sanes & Friauf, 2000). 그 뿐 아니라, 달팽이가 제거되지 않은 쪽 신경세포들도 흥분성 신호의 신경연접을 통한 전달이 감소하였다(Kotak & Sanes, 1997). 억제성 신호의 신경연접 활성도의 감소는 가쪽위올리브핵 신경세포 가지돌기의 정상적 성장이 되지 못하게 할 뿐 아니라, 안쪽마름섬유체핵에서 축삭이 끝나는 종말부위에서는 형태학적 변화도 초래되었다(Ene et al., 2003). 이런 형태학적 변화뿐만 아니라, 몇 가지 비정상적인 억제성, 흥분성 신호전달, 그리고 신경연접간의 이동 등에서도 기능적인 변화가 동반되었다(Sanes & Friauf, 2000). 이처럼 가쪽위올리브핵은 흥분성과 억제성의 입력이 국소해부학적으로 잘 구성되어 있어 청각계통에서 신경전달물질의 기능을 연구하기에 적합한 곳이다. 정상 쥐의 발달과정에서 안쪽마름섬유체핵-가쪽위올리브핵 신경연접에서 흥분성인 글루타메이트와 억제성인 gamma-amino butyric acid (GABA)와 글리신이 모

두 출생시에 분비된다. 그 후, 글루타메이트는 분비가 감소하고, 억제성 물질인 GABA는 거의 분비되지 않게 되고 글리신만 분비된다(Kotak, 1998; Gillespie et al., 2005). 선천성 난청은 대개 하나의 유전자 이상에 의한 것으로 대부분 상염색체 열성(autosomal recessive)으로 유전된다(Kaye et al., 1992). 이런 유전적 난청과 관련된 여러 유전자들이 규명되어(Avraham et al., 1997; Liang et al., 1998) 유전적 난청을 가진 생쥐들을 이용한 연구들(Noben-Trauth et al., 1997; Blanton et al., 2002)이 이뤄졌다. 이런 유전적 난청을 갖는 생쥐들 가운데 선천성 귀먹음의 자연발생적 돌연변이인 선회생쥐(circling mouse)는 한국에서 처음 보고된 것으로, 정상으로 태어나지만 태생 13, 14일경에 머리를 계속 끄덕이거나, 선회하는 행동을 보이는 특징을 갖는다(Lee et al., 2001). 세포수준에서의 병리적인 특징으로 속귀의 달팽이기관 세포와 코티기관(organs of Corti)이 점차 퇴행되어 소실되며 나선판가장자리(spiral limbus)의 세포성분이 현저하게 줄어들었다(Lee et al., 2001). 생쥐의 속귀는 사람 속귀와의 형태학적 유사성 때문에 형태학적 변화를 동반한 병리적인 과정을 연구하기에 최적의 동물모델이다.

흥분성 신경전달 물질인 글루타메이트의 대표적인 수용체인 N-메틸-D-아스파르트산염(N-methyl-D-aspartate, NMDA) 수용체는 중추신경계통에서 장기강화(long-term potentiation, LTP)를 통해 학습과 기억의 신경연접에 필수적인 역할을 하는 이온성 글루타메이트(ionotropic glutamate) 수용체의 아형이다(Bliss & Collingridge, 1993). NMDA 수용체(NMDA receptor, NR)들은 중추신경계통에서 이런 중요한 역할을 할 뿐 아니라, 이 외에도 발생과 퇴행성 변화에도 관여한다(McDonald & Johnston, 1990). NMDA 수용체들은 NR1아형과 갖가지 형태의 NR2아형(A, B, C, D)이 결합된 이형형태(heteromeric form)의 복합체로서 뇌의 다른 영역들에 존재한다(Bi & Sze, 2002).

뿐만 아니라, 선택적 스플라이싱(alternative splicing)과 전령 RNA(messenger RNA)의 수정으로 더 다양한 NMDA 수용체들이 만들어지므로 최소 8종류가 존재한다(Bi & Sze, 2002). NMDA 수용체의 다른 이형형태들은 다른 생리적·약리적 특성을 반영하는 것일 뿐만 아니라, 뇌의 다른 영역에서의 다른 기능들을 수용체들이 반영하는 것이라 할 수 있다(Nakanishi et al., 1994). 광범위한 생화학적, 약리학, 생리학 그리고 형태학적 연구를 통해 글루타메이트가 오름청각신경로에서 중요한 신경전달물질임이 밝혀졌다(Hun-

ter et al., 1993; Bilak et al., 1996; Suneja et al., 1998; Sato et al., 1999; Nakagawa et al., 2000). 이전의 연구에서 NMDA 수용체가 가쪽위올리브핵에서 발현되는 것이 mRNA와 단백질 수준 모두에서 보고되었으며 (Caicedo & Eybalin, 1998; Sato, 1999), 생리학적 연구를 통해 달팽이핵의 신경섬유에서부터 온 신호가 신경연접을 통해 이런 NMDA 수용체를 활성화시키는 것을 증명하였다 (Ene et al., 2003). 하지만, 생쥐에서 일반적으로 듣기가 가능한 생후 16일째 동형접합체 선회생쥐의 안쪽마름섬유체핵-가쪽위올리브핵 신경연접에서 면역염색으로 연구한 결과에 의하면, 동형접합(homozygote) 선회생쥐는 이형접합(heterozygote) 선회생쥐에 비해 억제성 신경전달물질인 글리신(glycine)의 수용체가 현저하게 감소하였고, 반면에 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트의 수용체인 N-메틸-D-아스파르트산염(N-methyl-D-aspartate, NMDA) 수용체 가운데 NR1과 NR2A의 아형에서는 작은 감소가 관찰되었고, NR2B에서는 거의 감소가 없어 (Hong et al., 2008), 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트성 물질이 발달 과정에서 줄어들지 않고 지속되어진다는 것을 보였다. 이런 수용체 아형 분포의 변화는 감각기능의 시작과 관련이 있을 뿐 아니라 (Sheng et al., 1994), NMDA 수용체 가운데 NR2A와 NR2D의 아형은 채널을 통과하는 칼슘의 변화와도 관련성을 갖기 (Grant et al., 1997) 때문에, 발달 과정에 따른 흥분성 신경전달물질의 변화를 연구하는 것은 기능적으로도 대단히 중요한 의미를 갖는다. 하지만, 아직까지 선회생쥐에서 흥분성 신경전달물질이 출생 후, 언제부터 글루타메이트가 증가하는지 그리고, NMDA 수용체 아형이 어떻게 변하는지에 관한 연구가 보고된 적이 없었다. 이런 변화에 따른 청각 기능과의 연관성을 알기 위해서는 발달 과정에 따른 형태학적인 조사가 반드시 이뤄져야 할 필요성이 있다.

그러므로, 본 연구에서는 선천적인 유전자 돌연변이를 갖는 선회생쥐의 가쪽위올리브핵에서 생후 7일과 16일째의 선회생쥐에서 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트에 의해 활성화 되는 NMDA 수용체의 분포 및 아형에 따른 변화를 알아보고자 면역조직화학기법을 이용하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 ICR 생쥐의 무작위 교배계에서 16세대 이상을 연속적으로 교배해 확립된 자연발생적 돌연변이에 의해 속귀가 손상된 선회생쥐를 사용하였다. 이 선회생쥐는 가톨릭의과대학연구소의 실험동물센터에서 연속적으로 교배하여 확립한 동물모델로 삼성생명연구소 (Samsung biomedical Research Institute, SBRI)의 실험동물연구소에서 분

양받았다. 삼성생명연구소의 승인을 받아 분양 받은 이 선회생쥐를 철저히 격리시켜 유전형질이 유지되도록 하였다. 정상군은 C57BL/6를 대한 바이오링크사에서 구입하여 사용하였다. 정상군과 선회생쥐는 섞이지 않게 철저히 격리시켜 사육하였다. 선회생쥐는 분양 받아 이형접합체 암컷과 (+/cir) 동형접합체 수컷 (cir/cir)을 교배하여 얻는다. 실험동물은 사료를 먹도록 하였고, 22~26°C의 온도를 유지하고 55~60%의 습도를 유지하여 자유롭게 사육하였다.

2. PCR분석

본 실험에 사용된 생쥐의 세균 정상군, 이형접합체 (+/cir), 동형접합체 (cir/cir)를 유전적으로 확인하기 위해서 transmembrane inner ear의 exon1에 해당하는 서열을 이용해 아래의 시발체(primer)를 만들었다.

Forward : 5'-AGC TGT AGC TCT GAA ATC T-3'

Reverse : 5'-TCT GGC AGA ATG CAT GGA GGC T-3'

실험에 사용할 동형접합체와 이형접합체를 구별하기 위해서 생쥐의 꼬리에서 게놈유전자(genomic DNA)를 추출하여 Polymerase chain reaction (PCR) 분석을 하였다. 게놈유전자의 추출은 제조사의 사용방법에 따라 분리했다 (K-3032, Bioneer Corporation, Korea). 분리한 유전자 100 ng을 주형 유전자(template DNA)로 해서 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 mM dNTP, 각각의 primer 100 pmol과 1 U Taq DNA polymerase (KRP, USE)을 포함하는 최종 20 µL의 반응용액을 만들고 이 반응용액으로 PCR 반응을 Thermal cycler (C1000 TM, Bio-Rad, Singapore)에서 실시하였다. 처음 PCR 반응의 조건은 96°C에서 5분, 59°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분으로 4회 반복해 실시하였고, 두 번째 조건은 96°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 30회 반복 실시한 후 72°C에서 10분간 안정화 하였다. 실험결과 얻어진 PCR산물의 크기는 1% agarose gel에서 전기영동(93 V)을 통해 확인하였다.

3. 조직준비 및 처리

태어난 지 7일된 생쥐와 16일된 생쥐의 정상군, 이형접합체 (+/cir), 동형접합체 (cir/cir)의 체중을 모두 측정하여 ketamine HCl (0.5 mg/kg, i.p.)과 xylazine HCl (0.15 mL/kg, i.p.)을 실험동물에 주사하여 마취시켰다. 그리고 가슴을 열어 좌심실로 0.1 M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.5)에 heparin (1 IU/mL)을 넣어 15분간 관류세척하고 0.1 M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.5)에 녹인 4% paraformaldehyde로 30분간 관류고정을 시행하였다. 관류고정이 끝난 뒤, 뇌를 적출하여 4°C의 4% paraformaldehyde에 12시간 후고정을 실시하였

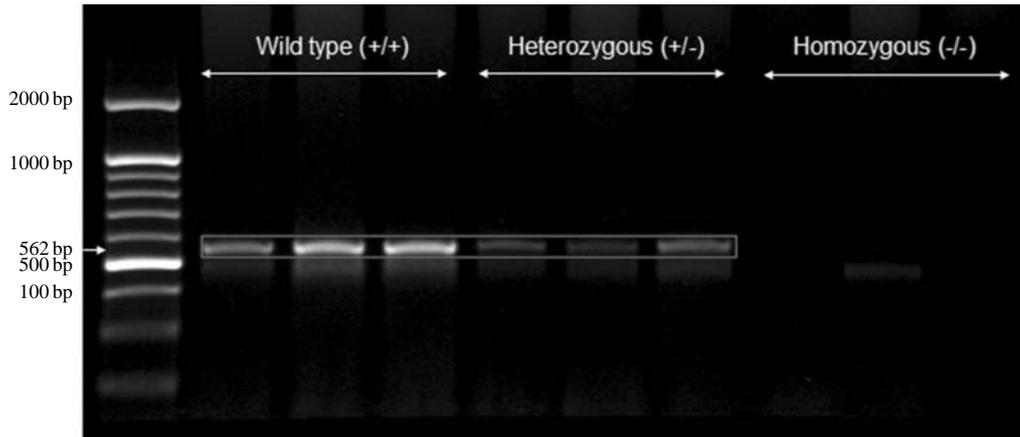


Fig. 1. PCR analysis of tmie gene fragment in the wild (+/+), heterozygous (+/cir), homozygous (cir/cir) mice for anti-NMDAR immunostaining. Primer pairs designed for the sequence of tmie gene were used. Equivalent amount of each PCR reaction derived from each templates were electrophoresed in each lanes of a 1% agarose gel. The expected tmie gene products (562 bp) representing the exon 1 coding region were amplified from the wild (+/+) and heterozygous (+/cir) mice DNA. Sizes of molecular standards are indicated on the left, in bp.

다. 뇌조직을 다시 0.1 M PBS로 1시간 동안 수세하고 동결 손상을 방지하기 위해 동일 PBS용액에 sucrose를 각각 10%, 20%, 30%를 넣은 용액에 12시간 동안 담가 4°C에서 보관했다.

보관했던 뇌조직들은 동결절편기 (CM1850, Leica, Germany)를 이용하여 약 40 μ m의 두께로 관상연속절편을 만들어 조직보관액에 담아 4°C 냉장고에 보관하였다.

4. 면역조직화학염색

면역조직화학염색은 free-floating 방법을 사용하였다. 면역조직화학염색에 사용한 1차 항체는 rabbit Anti-NMDAR1 monoclonal antibody (AB9864, Chemicon international, USA)와 Anti-NMDAR2A (rabbit polyclonal IgG) (#07-632, Upstate cell signaling solutions, USA)와 Anti-NMDAR2B (rabbit polyclonal IgG) (#06-600, Upstate cell signaling solutions, USA)를 사용하였다. 태어난 지 7일과 16일된 생쥐의 조직에서 가쪽위올리브핵의 염색을 위해 정상군과 실험군 각각의 조직절편들을 입체현미경으로 관찰하여 핵이 포함된 조직절편들만을 골랐다. 고른 절편들은 0.1 M PBS로 15분씩 3번 수세한다. 항체희석액 [1% bovine serum albumin (BSA), 0.3% triton X-100, 1% normal horse serum과 1차 항체인 Anti-NMDAR1, Anti-NMDAR2A, 그리고 Anti-NMDAR2B를 각각 1:500, 1:1000, 그리고 1:2000의 비율로 희석한 1차 항체 용액]에 조직절편을 두고 4°C에서 24~48시간 동안 반응시켰다. 각 그룹의 조직절편들은 모두 동일한 실험 조건에서 동시에 진행되므로, 실행되는 실험조건에 따른 다른 실험 결과가 나올 확률을 배제할 수 있다. 1차 항체의 반응이 끝난 후, 조직절편들을 인산염완충식염수 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.5)로 실온에서 10분간 3회 세척

한 후에 biotinylated anti-rabbit IgG (BA-1000, Vector laboratory, CA)를 항체희석액과 1:250의 비율로 섞은 용액에 다시 1차 항체와 반응한 절편들을 1시간 30분간 실온에서 반응시켰다. 그 후, 다시 10분간 3회 인산염완충식염수 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.5)로 수세한 후에 avidin-biotin peroxidase complex (PK-6100, Vector laboratory, CA)의 A, B 용액에 실온으로 반응시켰다. 반응이 끝난 후 다시 10분간 3회 인산염완충식염수 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.5)로 수세하고 0.003% H₂O₂를 포함한 diaminobenzidine (D5637, Sigma-Aldrich, USA) 용액에 넣어 5~6분간 실온에서 발색하였다. 발색이 끝난 조직절편은 젤라틴을 입힌 슬라이드 위에 차례로 얹어 완전 건조시킨 후 2차 증류수에서 5분간 수세해 염분을 제거한다. 순차적으로 80%, 90%, 95% 알코올 단계 후, 100% 알코올단계를 3회 거쳐 완전 건조시킨 후 90%, 95%, 100% xylene에 다시 통과시켜 조직의 투명화 과정을 시행하였다. 실험이 끝난 조직절편은 마운트액 (Polymount)으로 봉입해 덮개유리로 덮은 후, 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

5. 영상분석 및 통계

면역조직화학염색의 데이터를 양적으로 분석하기 위해 microscope digital camera system (DP50, Olympus, Japan)을 이용하여 태어난 지 7일, 16일 된 생쥐 조직절편들의 가쪽위올리브핵에서 면역반응성을 띄는 세포들을 400배 (1시야 = 0.196 mm²) 배율로 촬영하였다. 절편들을 각각 세 시야 이상 촬영해서 이들의 영상을 얻어 NIH 영상 프로그램 (Image J)으로 면역반응성의 정도를 측정한다. 면역반응성의 측정 시에 각 이미지들의 배경 밀도도 동시에 측정하여 측정된 면역반응성의 값에서 배경의 밀도값을 빼서 데이터의 측정

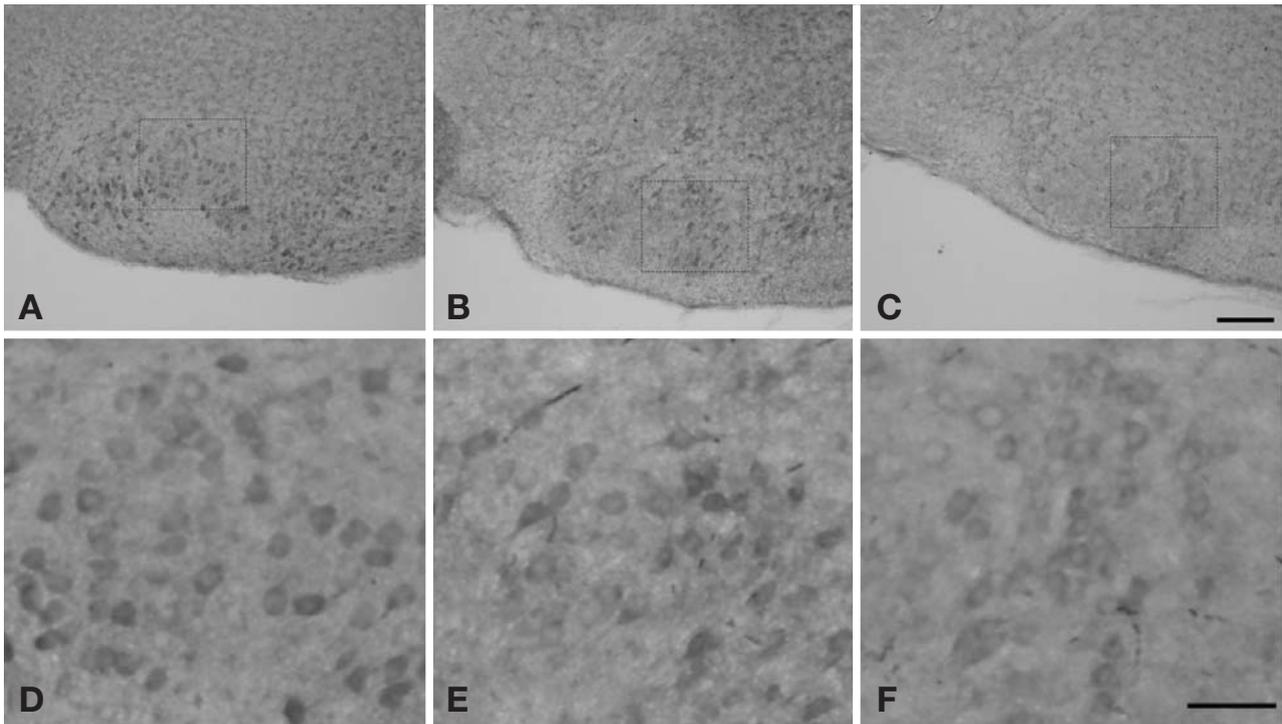


Fig. 2. Expression of NMDAR1 immunoreactivity (IR) in the lateral superior olivary nucleus (LSO) of post natal 7 (p7) +/+ (A & D), +/cir (B & E) and cir/cir (C & F). Oval shaped cells displayed high NMDAR1 IR which was most prominent in the +/+ while it was much faintly stained in the +/cir and cir/cir. Note the decrease in the NMDAR1 expression in the neurons of cir/cir as compared with +/+. Scale bar: A~C=100 μ m, D~F=50 μ m.

오차를 보정하였으며, 이렇게 측정된 정상군과 실험군의 면역반응성에 대한 평균값을 구하였다. 다른 실험군과 비교할 때 이 평균값을 $n=1$ 로서 사용하였고, 결과는 평균값 \pm 표준편차 (SD)로서 나타내었다. 각 결과들을 Student's t-test를 사용하여 정상군과 실험군을 비교하였으며 $p < 0.05$ 이면 통계적으로 유의한 것으로 표시하였다.

결 과

선회생쥐의 꼬리를 이용한 유전자의 PCR분석으로 정상군 (+/+), 이형접합체 (+/cir), 동형접합체 (cir/cir)의 세 군에서 생후 7일 (p7)된 생쥐와 생후 16일 (p16)된 생쥐의 가쪽위올리브핵에서 면역조직화학 염색을 이용하여 N-메틸-D 아스파르트산염 수용체 (NMDAR receptor)의 면역반응성에 대한 분포를 조사하였다.

1. 생후 7일된 생쥐의 가쪽위올리브핵에서 N-메틸-D 아스파르트산염 수용체 (NMDAR receptor, NR) 아형들 (NR1, NR2A, NR2B)의 면역반응성

조직의 단면에 따라 가쪽위올리브핵의 크기나 모양에 약간의 차이가 발생하지만 생후 7일된 서로 다른 세 군의 생

쥐에서 모두 NMDA 수용체의 아형인 NR1, NR2A, NR2B의 면역반응성이 관찰되었고, 동전지감 모양의 형태가 뚜렷하게 나타났다. 가쪽위올리브핵은 세 군 모두에서 NR1에 대한 NR2B의 면역반응성을 관찰할 수 있었으며, 타원형의 세포가 가쪽위올리브핵에서 염색되었다. 가쪽위올리브핵에서 가쪽위올리브달팽이 신경세포 (lateral olive cochlear neuron)로 추정되는 작고 편평한 신경세포들도 관찰되었다. 정상군에서 가장 진하게 염색된 반면 이형접합체와 동형접합체에서는 면역반응성이 약하게 관찰되었다 (Fig. 2). 이미지 분석에서 가쪽위올리브핵에 존재하는 세 군의 NR1의 면역염색성은 서로 차이가 있었으며, 면역염색성의 세기반응은 정상군에서 128.67 ± 8.87 로 가장 높았고 이형접합체와 동형접합체는 각각 111.06 ± 8.04 , 108.09 ± 5.94 의 순으로 나타났다. NR1의 면역반응성의 세기가 이형접합체에서 정상군에 비해 13.68% 낮았고 동형접합체에서는 15.99% 낮았다. 정상군과 비교했을 때, 가쪽위올리브핵에서의 NR1의 면역염색성 세기의 차이는 이형접합체, 동형접합체 각각에서 모두 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.005$).

세 군 모두에서 NR2A의 면역반응성을 관찰할 수 있었지만, 면역반응성의 세기는 군에 따라 차이를 보였다. 세 군 모두 가쪽위올리브핵에서 면역반응성을 나타내는 타원형 세포들이 관찰되었다 (Fig. 3). 이미지 분석에서 세 군의 NR2A

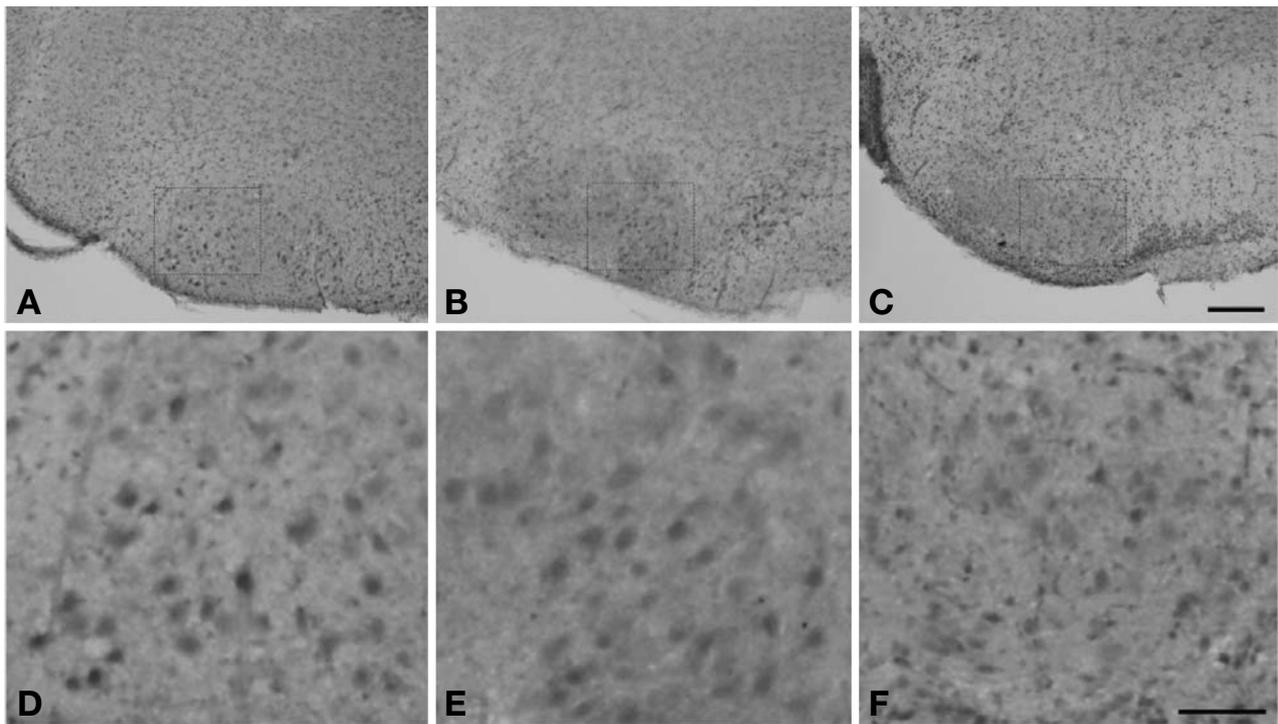


Fig. 3. Expression of NMDAR2A immunoreactivity (IR) in the lateral superior olivary nucleus (LSO) of post natal 7 (p7) $+/+$ (A & D), $+/cir$ (B & E) and cir/cir (C & F). NMDAR2A IR was highly expressed in all the groups with varying intensity. Darkly stained oval shaped neurons appears to be prominently stained in $+/+$ while the staining was faint in cir/cir and $+/cir$ in comparison with $+/+$. Scale bar: A~C=100 μ m, D~F=50 μ m.

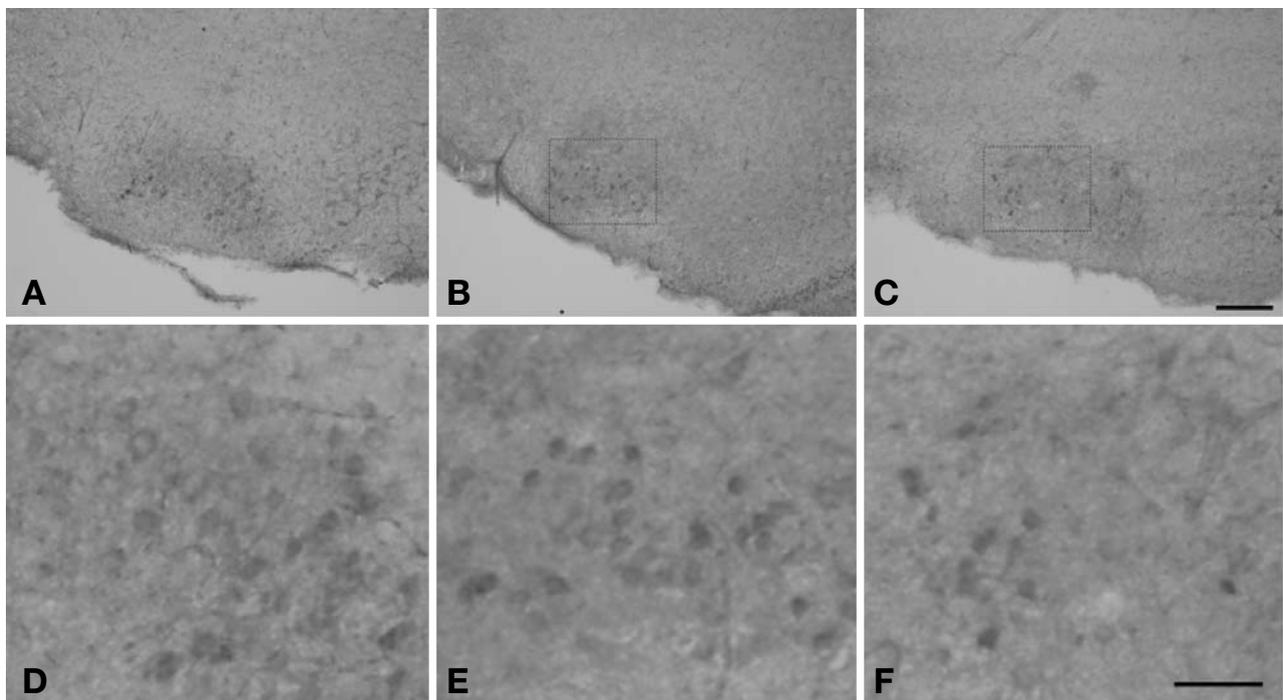


Fig. 4. Expression of NMDAR2B immunoreactivity (IR) in the lateral superior olivary nucleus (LSO) of post natal 7 (p7) $+/+$ (A & D), $+/cir$ (B & E) and cir/cir (C & F). Substantial reduction in NMDAR2B IR was noted in $+/cir$ and cir/cir when compared with $+/+$ both quantitatively and qualitatively. Scale bar: A~C=100 μ m, D~F=50 μ m.

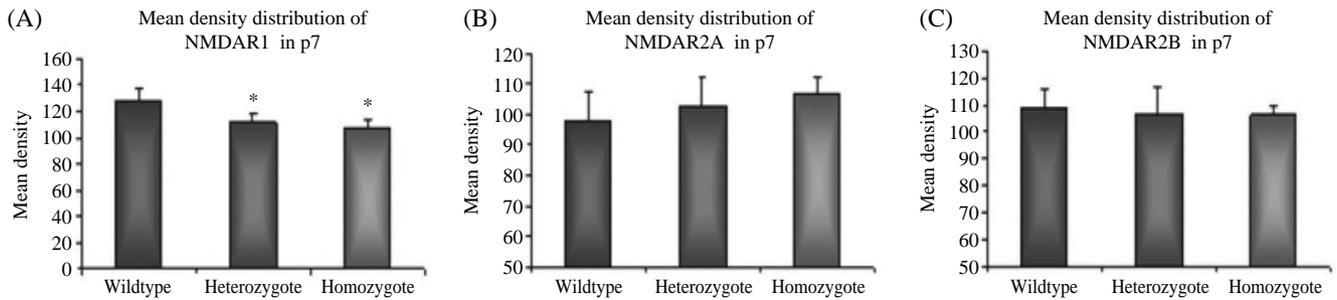


Fig. 5. Graph comparing the mean density for the expression of NMDAR1 (A), NMDAR2A (B) & NMDAR2B (C) in the lateral superior olivary nucleus (LSO) of post-natal 7 (p7) wildtype (+/+), heterozygote circling mouse (+/cir) and homozygote circling mouse (cir/cir) (*, $p < 0.005$).

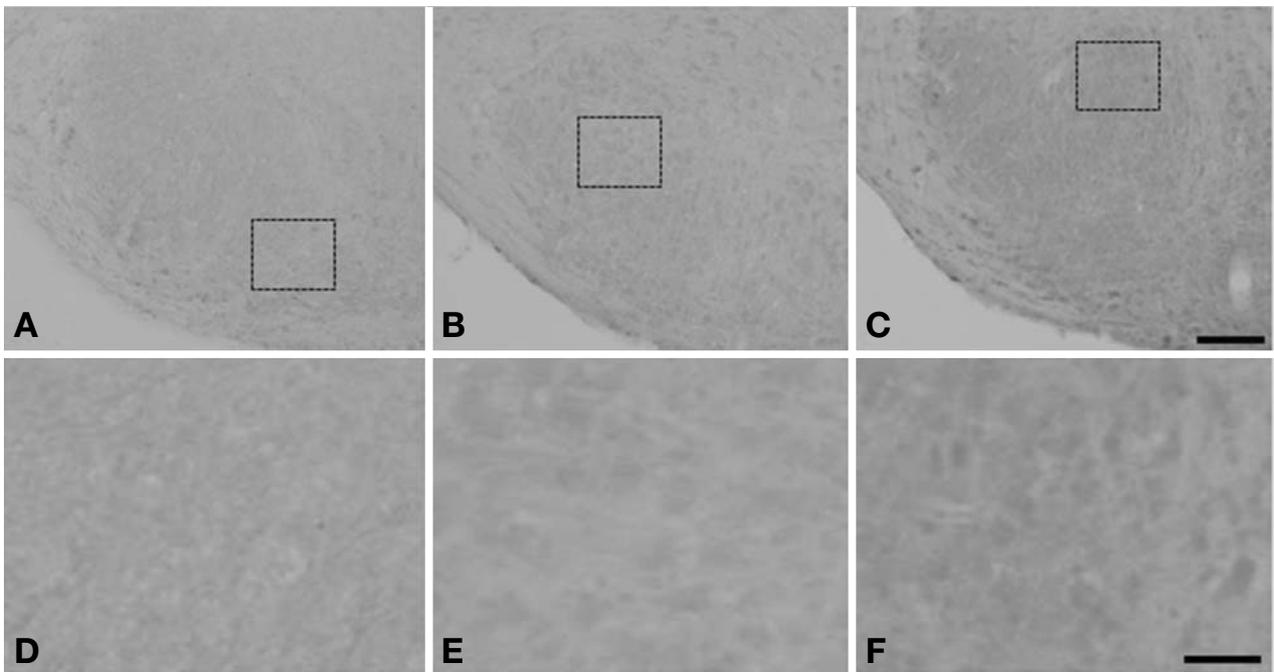


Fig. 6. Expression of NMDAR1 immunoreactivity (IR) in the lateral superior olivary nucleus (LSO) of post natal 16 (p16) +/+ (A & D), +/cir (B & E) and cir/cir (C & F). NMDAR1 IR appears to increase substantially in +/cir and cir/cir when compared with +/+. The staining appears to be highest in the cir/cir with visualization of small elliptical shaped neurons. Scale bar: A ~ C=100 μm, D ~ F=50 μm.

의 면역염색성은 가쪽위올리브핵에서 명확히 관찰되었고, 면역염색성의 세기를 대조군과 비교했을 때 군에 따른 차이를 보이는 것이 관찰되었다. NR2A의 면역염색성의 세기는 동형접합체에서 106.85 ± 5.79 로 나타났고, 이형접합체와 정상군에서는 각각 102.87 ± 9.30 과 97.97 ± 9.71 로 나타났다. NR2A의 면역반응성의 세기는 이형접합체에서는 정상군에 비해 5% 정도 높았고, 동형접합체에서는 9.06% 정도 높았다. 정상군과 비교했을 때, 가쪽위올리브핵에서의 NR2A의 면역염색성의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

저배율에서 NR2B의 면역반응성도 마찬가지로 세 군 모두에서 가쪽위올리브핵에서 관찰되었다. 저배율에서는 염색성이 이형접합체와 동형접합체 보다 대조군에서 약간 더 진하

게 나타났다 (Fig. 4). NR2B에 대한 특이항체로 염색된 세포들의 수는 정상군과 비교했을 때, 동형접합체에서 적게 나타났다. 이미지 분석에서 가쪽위올리브핵에 존재하는 세 군의 NR2B는 다양한 정도의 면역반응성을 보였으며, 세 군의 가쪽위올리브핵 면역염색성이 지속되는 것을 나타냈다. NR2B의 농도는 정상군에서 109.04 ± 6.77 로 가장 높은 면역반응성은 보였고, 이형접합체와 동형접합체에서는 각각 106.43 ± 10.24 와 105.98 ± 4.10 의 면역반응성을 나타냈다 (Fig. 4). NR2B의 면역반응성의 세기는 정상군과 비교하여 이형접합체에서는 2.39% 낮았고, 동형접합체에서는 2.80% 낮았다. 대조군의 면역반응성과 비교했을 때, 이형접합체와 동형접합체의 면역반응성의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

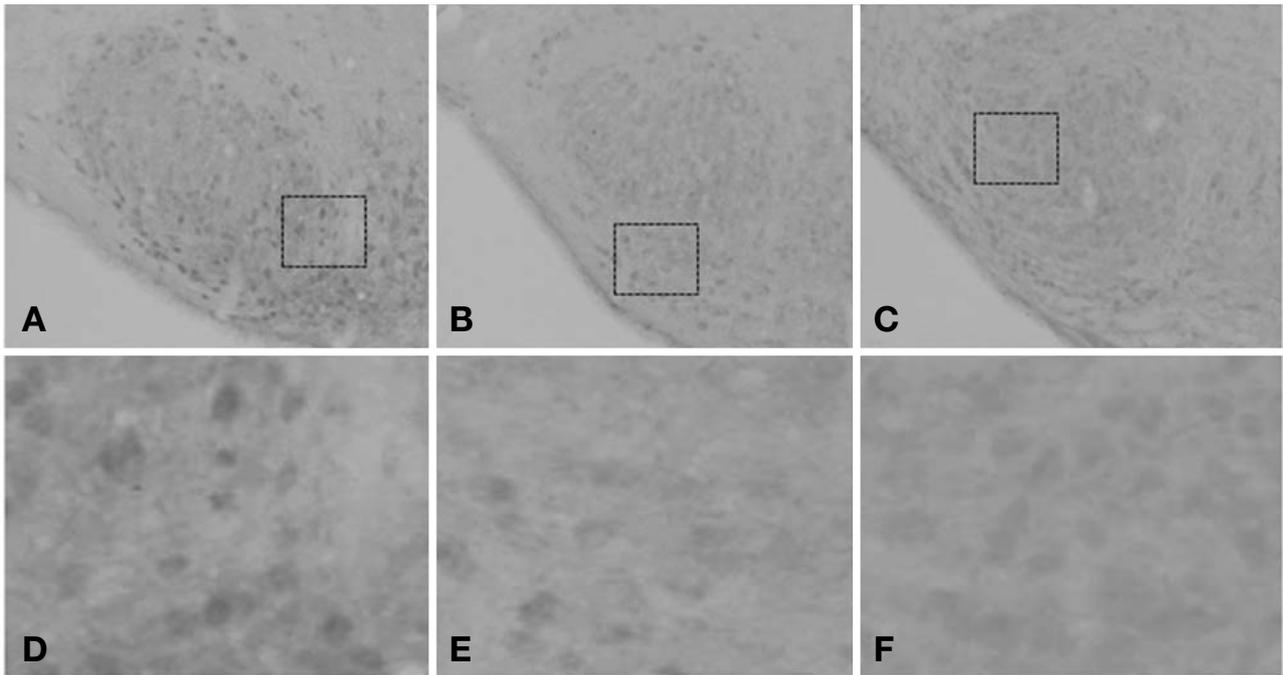


Fig. 7. Expression of NMDAR2A immunoreactivity (IR) in the lateral superior olivary nucleus (LSO) of post natal 16 (p16) +/+ (A & D), +/cir (B & E) and cir/cir (C & F). NMDAR2A IR appears to decrease in both the +/cir and cir/cir when compared with +/+. Note the decrease in the staining intensity of the neurons in +/cir and cir/cir. Scale bar: A ~ C=100 μ m, D ~ F=50 μ m.

2. 생후 16일된 생쥐의 가쪽위올리브핵에서 N-메틸-D 아스파르트산염 수용체 (NMDAR receptor, NR) 아형들 (NR1, NR2A, NR2B)의 면역반응성

조직의 잘린 단면에 따라 핵의 크기와 모양이 차이가 있지만, 생후 16일 된 생쥐의 정상군(+/+), 이형접합체 (+/cir), 동형접합체 (cir/cir)의 가쪽위올리브핵에서 NMDA 수용체의 면역반응성을 각각 관찰하였다.

가쪽위올리브핵은 생후 7일째에서 관찰된 것처럼, 세 군 모두에서 저배율에서는 NR1에 대한 면역반응성이 동전지갑 모양으로 관찰되었다. 가쪽올리브달팽이 신경세포 (lateral olivocochlear neuron)로 생각되는 NR1에 특이적인 항체로 염색된 작고 편평한 모양의 세포들과 타원형의 세포들이 관찰되었다. 동형접합체에서 NR1에 대한 면역반응성이 가장 현저한 반면, 정상군과 이형접합체에서는 면역반응성이 상대적으로 약하게 관찰되었다. NR1의 서로 차이가 있었으며, 면역염색성의 세기는 동형접합체에서 55.96 ± 17.35 로 가장 높았고, 정상군과 이형접합체에서는 각각 43.83 ± 10.49 , 40 ± 13.88 이었다. NR1의 면역반응성 세기는 이형접합체에서는 정상군보다 8.73% 낮았고, 동형접합체에서는 정상군보다 27.67% 정도 높았다. 정상군과 비교했을 때, 가쪽위올리브핵에서의 NR1의 면역염색성 세기의 차이는 이형접합체, 동형접합체 각각에서 모두 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). 세 군 모두에서 NR2A의 면역반응성을 관찰할 수 있었지

만, 면역반응성의 세기는 군에 따라 차이를 보였다. NR2A의 면역반응성 세기는 정상군, 이형접합체, 동형접합체에서 각각 47.4 ± 20.6 , 43.9 ± 17.5 , 49.2 ± 20.1 이었다. NR2A의 면역반응성의 세기는 정상군보다 이형접합체에서 7.38% 낮았고 동형접합체는 3.79%만큼 높았다. NR2A의 면역반응성도 역시 가쪽위올리브핵에서 관찰되었다. NR2A도 NR1과 마찬가지로 신경세포의 면역반응성은 동형접합체에서 가장 두드러지게 나타났다. 정상군과 이형접합체에서는 동형접합체보다 약한 면역반응성이 관찰되었다.

NR2B의 면역염색성은 세 군 모두에서 나타났다. 세 군 모두의 가쪽위올리브핵에서 진하게 염색된 세포들을 관찰할 수 있었다. 이미지 분석에서 NR2B의 농도는 정상군에서 101.47 ± 11.50 으로 가장 높았고, 이형접합체, 동형접합체에서 각각 91.47 ± 14.81 , 93.93 ± 15.71 로 나타났다. NR2B의 면역반응성의 세기는 정상군에 비교하여 이형접합체에서 9.85% 낮았고 동형접합체에서는 7.43% 낮았다. 정상군과 비교했을 때 가쪽위올리브핵의 NR2B의 면역염색성의 차이는 이형접합체에서 유의한 것으로 나타났다 ($p < 0.01$).

고 찰

본 연구는 유전자 돌연변이에 의해 선천성 난청을 갖는 생후 7일과 16일된 선회생쥐의 중추신경계통에서 청각과

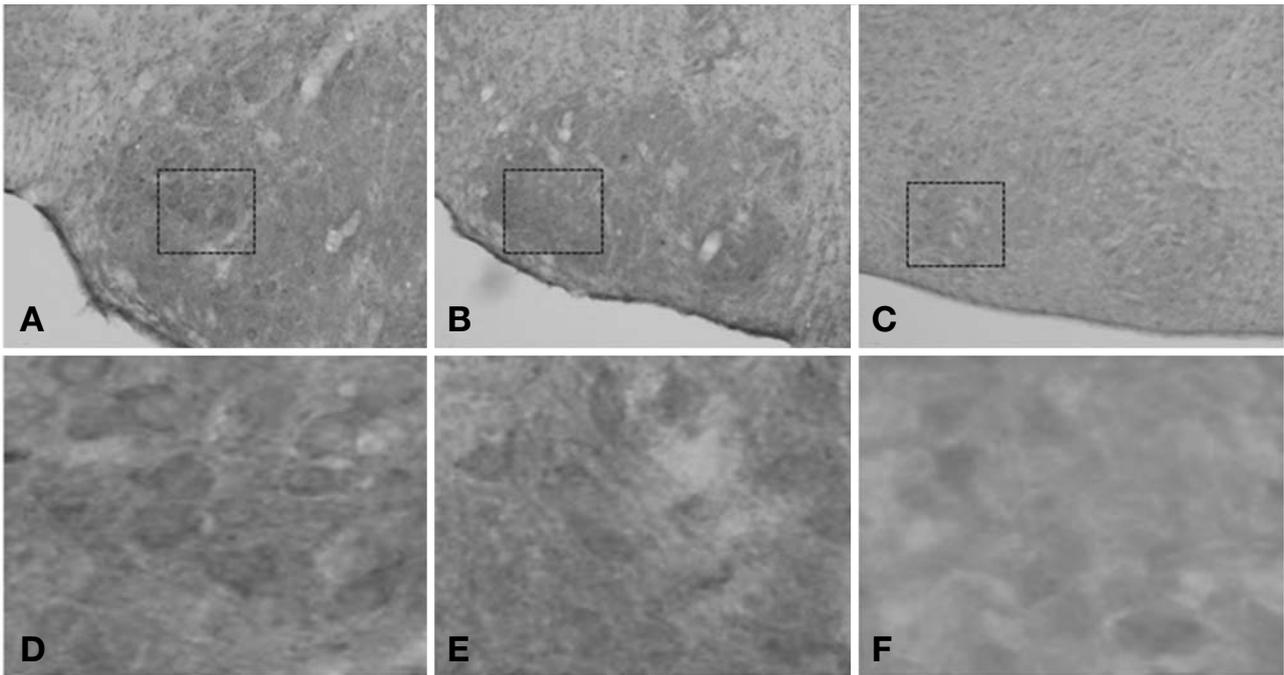


Fig. 8. Expression of NMDAR2B immunoreactivity (IR) in the lateral superior olivary nucleus (LSO) of post natal 16 (p16) $+/+$ (A & D), $+/\text{cir}$ (B & E) and cir/cir (C & F). In comparison with $+/+$, the NMDAR2B IR is reduced substantially in the cir/cir while in the $+/\text{cir}$, the IR shows no reduction in comparison with $+/+$. Darkly stained oval shaped neurons can be noted in $+/+$ and $+/\text{cir}$ while it appears to be faint in cir/cir . Scale bar: A ~ C=100 μm , D ~ F=50 μm .

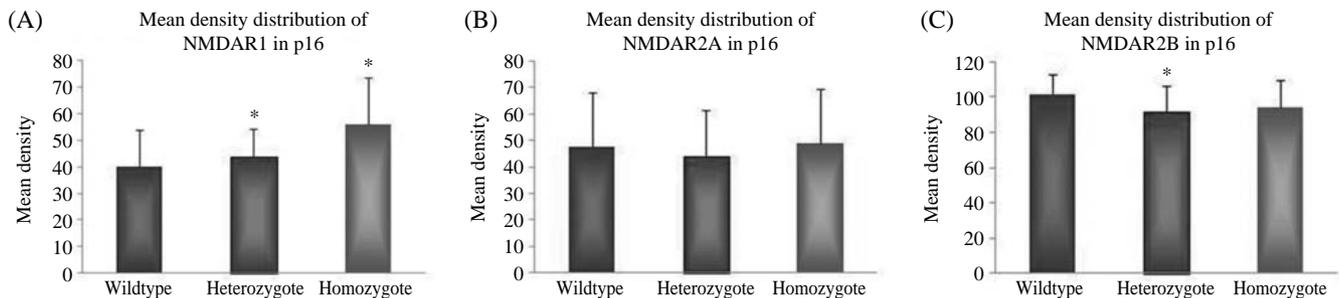


Fig. 9. Graph comparing the mean density for the expression of NMDAR1 (A), NMDAR2A (B) & NMDAR2B (C) in the lateral superior olivary nucleus (LSO) of post-natal 16 (p16) wildtype ($+/+$), heterozygote circling mouse ($+/\text{cir}$) and homozygote circling mouse (cir/cir) (*, $p < 0.005$).

관련된 주요 신경핵인 가쪽위올리브핵에서 NMDA 수용체의 분포를 형태학적으로 분석한 연구이다. 이형접합체와 동형접합체의 가쪽위올리브핵에서 N-메틸-D 아스파르트산염 수용체 (NMDAR)의 아형인 NR1, NR2A, NR2B의 분포를 면역조직화학염색을 통하여 확인한 결과, 생후 7일된 생쥐에서 NR1과 NR2B의 면역염색성의 세기는 정상군에서 가장 높았고, 그 다음이 이형접합체, 동형접합체의 순이었으며, NR2A의 면역염색성은 동형접합체에서 가장 높게 나타났고, 이형접합체와 정상군의 순으로 높았다. 생후 16일된 생쥐에서 NR1의 면역염색성 세기는 동형접합체에서 가장 높았고, 그 다음이 정상군과 이형접합체의 순이었으며, NR2A

의 면역반응성 세기는 정상군, 이형접합체, 동형접합체의 순으로 높았고, NR2B의 면역반응성 세기는 정상군에서 가장 높았고, 동형접합체, 이형접합체의 순으로 높게 나타났다. NR1과 NR2A는 생후 7일된 생쥐에 비해 생후 16일에서 현저한 감소를 보였으나, NR2B는 생후 16일에도 7일과 비슷한 면역반응성이 관찰되었다.

발달과정에서 흥분성과 억제성 신경회로의 연결가소성에서 NMDA 수용체는 매우 중요하여 (Gaiarsa et al., 2002; Dickson & Kind, 2003), 발달과정에 따른 안쪽마름섬유체핵-가쪽위올리브핵 신경연접에서의 글루타메이트성 변화의 추이가 보고되었다. 출생 1일에서 8일 된 흰쥐의 뇌 슬라이스

에서 가쪽위올리브핵에 있는 신경세포의 96%가 안쪽마름섬유체핵 자극에 의한 글루타메이트성 반응을 보인 반면에, 출생 9일에서 12일 된 흰쥐의 뇌 슬라이스에서는 그 비율이 단지 31% 밖에 되지 않았다(Gillespie et al., 2005). 특히 이 글루타메이트성 신경전달이 가장 빈번히 일어나는 시기는 안쪽마름섬유체핵-가쪽위올리브핵 신경연접들에서 기능적인 신경섬유들의 정체가 발생하는 시기와 동시에 발생하였다(Gillespie et al., 2005). 이처럼 NMDA 수용체는 정상적인 중추신경계의 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이런 발달은 신경의 생성, 이동, 증식 뿐만 아니라 세포의 사멸이나 축삭의 발달과 신경연접의 형성 및 정제에도 관여한다(Haberny et al., 2002). 글루타메이트는 신경세포 분화의 각 시기별로 조절하는 데 사용되는 36가지 이상의 요소들 가운데 하나(Haberny et al., 2002)로서 신경의 정상 발달에서 중요한 시기에 NMDA 수용체 활성이 지속적으로 변하게 되면 정상적인 중추신경계통의 발달과 기능에 손상을 초래할 수 있다(Ikonomidou et al., 2001). 흰쥐의 뇌줄기에서 체외(in vitro) 수용체 방사선사진촬영을 통한 연구에서 전체적인 결합과 NMDA 수용체 특이적인 글루타메이트의 결합은 출생에서 9일까지 증가하다가 감소한다고 보고하였다(Rao et al., 1997). 그리고 적외선 비디오 현미경과 전세포 조각집계법(whole cell patch clamp)을 이용해서 흰 쥐의 새줄무늬체(neostriatum)에서 NMDA의 반응을 측정할 바에 따르면, 출생 3일째는 반응이 없다가 7일째에 증가하는 반응을 보이고 14일째에 최고치를 보인 후에 줄어들기 시작한다고 보고하였다(Colwell et al., 1998). 이러한 NMDA 수용체들은 달팽이 핵의 신경섬유에서 오는 신경연접간 신호입력에 의해 활성화된다(Ene et al., 2003). 이전의 연구들에서 가쪽위올리브핵신경세포에서 NMDA 수용체에 대한 단백질과 mRNA가 모두 발현됨을 보였다(Caicedo & Eybalin, 1999; Sato, 1999). NR1, NR2A, 그리고 NR2B에 특이적인 항체를 이용해서 보고된 다른 연구에 의하면 NMDA 수용체가 시간의 경과에 따라 면역반응성이 달라지며, 서로 다른 세포들에서 특이적으로 염색되는 것을 보여줬다. 이런 NMDA 수용체의 아형들이 가장 큰 변화를 보이는 시기는 저빌에서는 생후 7일과 14일 사이로 보고하였으며, 이 시기는 저빌에서 듣기를 시작하는 시기이다(Joelson & Schwartz, 1998). NMDA 수용체 아형의 mRNA 발현을 조사한 연구에 의하면, 중추신경계통의 각 부위들은 다양한 시기의 발달단계에 따른 차별적인 발현이 이뤄진다고 보고하였다(Dunah et al., 1999; Cull-Candy et al., 2001; Ritter et al., 2001). NR1 아형의 mRNA 발현은 출생 6일째부터 증가하기 시작하여 출생 19일째에 최고치를 이룬 후 그 후에는 성숙 흰 쥐의 수준으로 감소한다고 보고하였다(Hofer et al., 1994; Sheetz & Constantine-Paton, 1994). 이와는 대조적으로, 설치류에서 NR2B 아형의 발현은 출생시 최

고 수준으로 높다가 점차 감소하는 것으로 보고하였다(Hofer et al., 1994). NR2 아형만 출생시와 출생 후 듣기가 완료되는 시기에 일정한 수준으로 면역염색성을 보여준 본 연구와는 상반되는 것으로 이런 차이를 보이는 이유는 여러 가지 원인에 기인한 것으로 생각된다. 예를 들면, 사용한 실험동물의 종, 실험방법 그리고 무엇보다도 중추신경계 중 어느 부위를 연구하느냐에 따라 NMDA 아형의 차별적 발현의 증감이 나타나는 것에 의한 것으로 생각된다.

신경생리적인 기법을 통한 연구에서 안쪽마름섬유체핵-가쪽위올리브핵 신경연접에서 각각의 안쪽마름섬유체핵 신경섬유들은 글루타메이트, GABA, 글리신의 세 가지 신경전달물질을 분비함을 증명하여, 안쪽마름섬유체핵-가쪽위올리브핵 신경연접에서 GABAa와 글리신 수용체의 활성과는 별개로 글루타메이트성 신경세포가 흥분할 수 있는 경로가 됨을 제시하였다(Gillespie et al., 2005). 발달하는 뇌에서 활성-의존성 신경연접의 정제는 정확한 신경의 회로를 형성하는데 중심적인 역할을 한다(Gillespie et al., 2005). 글루타메이트성 신경전달은 출생 후, 발달이 진행함에 따라 이런 활성-의존성 신경연접의 정제를 통해서 필요 없는 신경연접을 정제해서 제거하는 과정에서 가장 두드러진다. 아직 미성숙한 GABA성이나 글리신성의 신경연접들이 있는 곳은 흥분성의 글루타메이트도 같이 분비하며 이 글루타메이트 방출에 의한 NMDA 수용체 신경연접에서의 특이적인 활성은 억제성 회로의 활성-의존성 신경연접의 정제에 중요한 작용을 함을 제시하였다(Gillespie et al., 2005). 그 뿐 아니라, 가쪽위올리브핵의 정상적인 발달도 신경연접활성과 들신경신호의 입력에 의존한다(Sanes & Friauf, 2000). 한 쪽 달팽이 제거로 흥분성 들신경신호의 입력이 손상되면 손상 받은 쪽의 가쪽위올리브핵 부피와 세포의 수가 감소하였다(Moore, 1992). 흥분성 신경연접에서 살아남은 신경세포로 흥분성 물질의 전달도 감소할(Kotak & Sanes, 1997)뿐 아니라, 글리신성의 억제성 신경연접의 활성도 변화시켜 가쪽위올리브핵에 있는 신경세포들의 가지돌기의 성장을 저해하였고, 안쪽마름섬유체핵에 있는 신경축삭의 종말부위의 형태도 변화시켰다. 이런 형태학적인 변화는 비정상적인 억제나 흥분 혹은 신경연접간 신경전달 물질의 비정상적 전달을 포함하는 생리적인 변화들을 초래하였다(Sanes & Friauf, 2000).

NR2A 아형뿐만 아니라, 발달하는 가쪽위올리브핵에 있는 신경세포들은 Mg^{2+} 의 농도에 민감함을 보였는데, 이는 왜 NMDA 수용체들이 단지 강한 막의 탈분극에 동반되는 큰 반응에서만 칼슘의 반응에 기여하게 되는지를 설명해 줄 수 있다(Ene et al., 2003). NMDA 수용체가 활성화되기만 하면, NMDA 수용체가 유입되는 칼슘의 약 50% 정도를 담당하게 된다. 그런데 대부분 비-NMDA(non-NMDA) 수용체를 통해 칼슘이 유입된다고 보고(Kandler & Friauf, 1995; Kotak & Sanes, 1996)한 다른 연구들에 비해 NMDA 수용체

를 통한 칼슘의 유입이 높은 수치로 나타나는 것은(Ene et al., 2003), 이 연구가 출생 1주 미만의 흰쥐를 이용해서 얻은 결과이기 때문이다. 즉, NMDA 수용체에 의해 매개되는 칼슘의 유입은 가쪽위올리브핵의 성숙과정에 작용을 한 후 줄어들기 때문으로 이 시기의 NMDA 수용체에 의해 매개되는 칼슘의 유입은 신경세포의 발달, 신경연접 가소성 같은 역할 보다 대부분 가쪽위올리브핵 신경세포의 성숙에 관여하는 것으로 설명할 수 있다.

본 연구에서 사용한 선회생쥐는 선천성 난청을 가진 실험동물로서 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트 뿐만 아니라 여러 가지 억제성 신경전달물질인 GABA와 Glycine 같은 물질의 발달에 따른 변화와 관련돼 더 많은 실험적 증거들이 필요한 것으로 생각되며, 전기생리적인 연구가 추가로 진행되어 가쪽위올리브핵의 성숙과정에서의 여러 가지 억제성, 흥분성 신경전달물질들의 기능적 증거들이 추가된다면 난청의 병태생리를 기전을 파악하는 데 중요한 자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Avraham KB, Hasson T, Sobe T, Balsara B, Testa JR, Skvorak AB, Morton CC, Copeland NG, Jenkins NA: Characterization of unconventional MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice. *Hum Mol Genet* 6(8) : 1225-1231, 1997.
- Bi H, Sze CI: N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messengerRNA levels are altered in the hippocampus and entorhin ancortex in Aazheimer's disease. *J Neurol Sci* 200(1-2) : 11-18, 2002.
- Bilak MM, Bilak SR, Morest DK: Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor in the cochlear nucleus of the mouse. *Neuroscience* 75(4) : 1075-1097, 1996.
- Blanton SH, Liang CY, Cai MW, Pandya A, Du LL, Landa B, Mummalanni S, Li KS, Chen ZY, Qin XN, Liu YF, Balkany T, Nance WE, Liu XZ: A novel locus for autosomal dominant non-syndromic deafness (DFNA41) maps to chromosome 12q24-qtter. *J Med Genet* 39(8) : 567-570, 2002.
- Bliss TV, Collingridge G: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407) : 31-39, 1993.
- Caicedo A, Eybalin M: Glutamate receptor phenotypes in the auditory brainstem and mid-brain of the developing rat. *Eur J Neurosci* 11(1) : 51-74, 1999.
- Colwell CS, Cepeda C, Crawford C, Levine MS: Postnatal development of glutamate receptor-mediated responses in the neostriatum. *Dev Neurosci* 20(2-3) : 154-163, 1998.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M: NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11(3) : 327-335, 2001.
- Dickson KS, Kind PC: NMDA receptors: neural map designers and refiners? *Curr Biol* 2;13(23) : R920-922, 2003.
- Dunah AW, Yasuda RP, Luo J, Wang Y, Prybylowski KL, Wolfe BB: Biochemical studies of the structure and function of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptors. *Mol Neurobiol* 19(2) : 151-179, 1999.
- Ene FA, Kullmann PH, Gillespie DC, Kandler K: Glutamatergic calcium responses in the developing lateral superior olive: receptor types and their specific activation by synaptic activity patterns. *J Neurophysiol* 90(4) : 2581-2591, 2003.
- Gaiarsa JL, Caillard O, Ben-Ari Y: Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci* 25(11) : 564-570, 2002.
- Gillespie DC, Kim G, Kandler K: Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nat Neurosci* 8(3) : 332-338, 2005.
- Grant ER, Bacskai BJ, Pleasure DE, Pritchett DB, Gallagher MJ, Kendrick SJ, Kricka LJ, Lynch DR: N-methyl-D-aspartate receptors expressed in a nonneuronal cell line mediate subunit-specific increases in free intracellular calcium. *J Biol Chem* 272(1) : 647-656, 1997.
- Haberny KA, Paule MG, Scallet AC, Sistare FD, Lester DS, Hanig JP, Slikker W Jr: Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity. *Toxicol Sci* 68(1) : 9-17, 2002.
- Hofer M, Prusky GT, Constantine-Paton M: Regulation of NMDA receptor mRNA during visual map formation and after receptor blockade. *J Neurochem* 62(6) : 2300-2307, 1994.
- Hong SH, Kim MJ, Ahn SC: Glutamatergic transmission is sustained at later period of development of medial nucleus of the trapezoid body-lateral superior olive synapses in circling mice. *J Neurosci* 28(48) : 13003-13007, 2008.
- Hunter C, Petralia RS, Vu T, Wenthold RJ: Expression of AMPA-selective glutamate receptor subunits in morphologically defined neurons of the mammalian cochlear nucleus. *J Neurosci* 13(5) : 1932-1946, 1993.
- Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW: Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 15;62(4) : 401-405, 2001.
- Joelson D, Schwartz IR: Development of N-methyl-D-aspartate receptor subunit immunoreactivity in the neonatal gerbil cochlear nucleus. *Microsc Res Tech* 1;41(3) : 246-262, 1998.
- Kandler K, Friauf E: Development of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in the auditory brainstem of perinatal rats. *J Neurosci* 15(10) : 6890-6904, PubMed PMID: 7472446. 1995.
- Kandler K, Kullmann PH, Ene FA, Kim G: Excitatory action of an immature glycinergic/GABAergic sound localization pathway. *Physiol Behav* 77(4-5) : 583-587, 2002.
- Kaye CI, Martin AO, Rollnick BR, Nagatoshi K, Israel J, Hermanoff M, Tropea B, Richtsmeier JT, Morton NE: Oculoauri-

- culovertebral anomaly; segregation analysis. *Am J Med Genet* 1;43(6) : 913-917, 1992.
- Kotak VC, Sanes DH: Developmental influence of glycinergic transmission: regulation of NMDA receptor-mediated EPSPs. *J Neurosci* 1;16(5) : 1836-1843, PubMed PMID: 8774451. 1996.
- Kotak VC, Sanes DH: Deafferentation weakens excitatory synapses in the developing central auditory system. *Eur J Neurosci* 9(11) : 2340-2347, 1997.
- Kotak VC, Korada S, Schwartz IR, Sanes DH: A developmental shift from GABAergic to glycinergic transmission in the central auditory system. *J Neurosci* 18(12) : 4646-4655, 1998.
- Lee JW, Lee EJ, Hong SH, Chung WH, Lee HT, Lee TW, Lee JR, Kim HT, Suh JG, Kim TY, Ryoo ZY: Circling mouse; possible animal model for deafness. *Comp Med* 51(6) : 550-554, 2001.
- Liang Y, Wang A, Probst FJ, Arhya IN, Barber TD, Chen KS, Deshmukh D, Dolan DF, Hinnant JT, Carter LE, Jain PK, Lalwani AK, Li XC, Lupski JR, Moeljopawiro S, Morell R, Negrini C, Wilcox ER, Winata S, Camper SA, Friedman TB: Genetic mapping refines DFNB3 to 17p11.2, suggests multiple alleles of DFNB3, and supports homology to the mouse model shaker-2. *Am J Hum Genet* 62(4) : 904-915, 1998.
- McDonald JW, Johnston MV: Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Rev* 15(1) : 41-70, 1990.
- Moore DR: Trophic influences of excitatory and inhibitory synapses on neurons in the auditory brain stem. *Neuroreport* 3(3) : 269-272, 1992.
- Nakagawa H, Sato K, Shiraiishi Y, Kuriyama H, Altschuler RA: NMDAR1 isoforms in the rat superior olivary complex and changes after unilateral cochlear ablation. *Brain Res Mol Brain Res* 77(2) : 246-257, 2000.
- Nakanishi S, Masu M, Bessho Y, Nakajima Y, Hayashi Y, Shigemoto R: Molecular diversity of glutamate receptors and their physiological functions. *EXS* 71 : 71-80, 1994.
- Noben-Trauth K, Zheng QY, Johnson KR, Nishina PM: A deafnesssusceptibility locus that interacts with deaf waddler (dfw). *Genomics* 15;44(3) : 266-272, 1997.
- Rao H, Jean A, Kessler JP: Postnatal ontogeny of glutamate receptors in the rat nucleus tractus solitarii and ventrolateral medulla. *J Auton Nerv Syst* 14;65(1) : 25-32, 1997.
- Ritter LM, Unis AS, Meador-Woodruff JH: Ontogeny of ionotropic glutamatereceptor expression in human fetal brain. *Brain Res Dev Brain Res* 127(2) : 123-133, 2001.
- Sanes DH, Friauf E: Development and influence of inhibition in the lateral superior olivary nucleus. *Hear Res* 147(1-2) : 46-58, 2000.
- Sato K, Nakagawa H, Kuriyama H, Altschuler RA: Differential distribution of N-methyl-D-aspartate receptor-2 subunit messenger RNA in the rat superior olivary complex. *Neuroscience* 89(3) : 839-853, 1999.
- Scheetz AJ, Constantine-Paton M: Modulation of NMDA receptor function; implications for vertebrate neural development. *FASEB J* 8(10) : 745-752, 1994.
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY: Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368(6467) : 144-147, 1994.
- Suneja SK, Potashner SJ, Benson CG: Plastic changes in glycine and GABA release and uptake in adult brain stem auditory nuclei after unilateral mm dle ear ossicle removglycinecochlear ablation. *Exp Neurol* 151(2) : 273-288, 1998.
- Thompson AM, Schofield BR: Afferent projections of the superior olivarycomplex. *Microsc Res Tech* 15;51(4) : 330-354, 2000.

< 국문초록 >

글루타메이트 수용체는 신경연접의 발달에서 신경연접과 정제 등에 중요한 역할을 한다. 포유류 청각뇌줄기의 가쪽위올리브핵-안쪽마름섬유체핵 신경연접에서의 흥분성 신경전달물질의 전달은 글루타메이트와 같은 많은 흥분성 신경전달물질의 전달을 조절하므로 발생학적 연구에 매우 유용한 모델이다. 귀먹음은 흥분성 회로 또는 억제성 회로의 신경연접에서 신경전달물질들의 변화뿐 아니라 형태학적 변화도 초래하게 된다. 이런 이유로 선천적으로 태어나면서 달팽이 기관이 퇴화되는 선회생쥐는 귀먹음의 병태생리를 연구하는데 가장 좋은 동물모델이다. 그러나, 선회생쥐에서 이런 NMDA 수용체 각각의 아형들이 발달에 따라 어떻게 나타나는지에 관해서는 거의 알려진 사실이 없다. 따라서, 본 연구에서는 선천적으로 속귀에 돌연변이를 가진 선회생쥐를 이용하여 면역조직화학염색법으로 생후 7일과 16일의 쥐를 정상쥐와 비교해서 글루타메이트성의 흥분성 신호가 전달되는 청각뇌줄기의 가쪽위올리브핵(LSO)에서 N-메틸-D-아스파르트산염(NMDA) 수용체의 아형인 NR1, NR2A, NR2B의 분포를 각각 조사하였다. 생후 7일째 선회생쥐의 NR1에 대한 면역반응성의 세기는 정상군에서 128.67 ± 8.87 로 나타났고 이형접합체에서는 111.06 ± 8.04 , 동형접합체에서는 108.09 ± 5.94 로 나타났다. 그리고 생후 16일째 선회생쥐에서는 정상군에서 43.83 ± 10.49 , 이형접합체에서는 40 ± 13.88 , 동형접합체에서는 55.96 ± 17.35 로 나타났다. 생후 7일째 선회생쥐의 NR2A에 대한 면역반응성의 세기는 정상군에서 97.97 ± 9.71 , 이형접합체에서 102.87 ± 9.30 , 동형접합체에서 106.85 ± 5.79 로 나타났다. 생후 16일 선회생쥐의 가쪽위올리브핵에서의 NR2A에 대한 면역반응성 세기는 정상군에서 47.4 ± 20.6 , 이형접합체에서 43.9 ± 17.5 , 동형접합체에서 49.2 ± 20.1 로 나타났다. 생후 7일의 선회생쥐의 NR2B의 면역반응성 세기는 정상군에서 109.04 ± 6.77 , 이형접합체에서 106.43 ± 10.24 , 동형접합체에서 105.98 ± 4.10 로 나타났다. 생후 16일째 선회생쥐의 NR2B의 면역반응성의 세기는 정상군에서 101.47 ± 11.50 , 이형접합체에서 91.47 ± 14.81 , 동형접합체에서 93.93 ± 15.71 로 나타났다. 이 결과들은 생후 7일과 16일의 선회생쥐의 가쪽위올리브핵에서 NMDA 수용체의 면역반응성의 변화를 나타낸 것으로 인간 귀먹음의 주요한 병태생리를 파악하는 데 기본적인 자료를 제시할 수 있을 것이다.