

호모시스테인에 의한 환쥐의 발작 및 행동변화

김광수 · 허소영

고신대학교 의과대학 신경과학교실

Seizures and Behavioral Changes Induced by Homocysteine in Rats

Kwangsoo Kim · So-Young Huh

Department of Neurology, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background: Homocysteine is epileptogenic and can induce seizures in immature and adult animals. Homocysteine and its derivatives are structurally similar to glutamate and express a direct excitatory effect on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. The aim of this study is to characterize the convulsant effect of homocysteine after intraperitoneal administration of homocysteine in rats.

Methods: Twenty-four Sprague-Dawley male rats weighing 120-145 g were treated with single intraperitoneal injection of D,L-homocysteine (11 mmol/kg). The animals were observed for 90 min after injection. The incidence, latencies, pattern of motor seizures, and behavioral phenomena were noted. Seizure severity was determined by a rating scale with grades defined as: 1-head nodding, lower jaw twitching; 2-myoclonic body jerks, bilateral forelimb clonus with full rearing; 3-progression to generalized clonic convulsion followed by tonic extension of fore- and hind limbs and tail; 4-prolonged tonic-clonic convulsion lasting over 10 seconds.

Results: All rats sat motionless for some minutes after the injection of homocysteine, and then washing, sniffing, shuffling, and chewing appeared. The seizure episodes of grade 1 were appeared in 91.7%, grade 2 in 87.5%, grade 3 in 37.5%, and grade 4 in 8.3%. The latencies of grade 1, 2, and 3 seizure episodes were 15.3 ± 9.6 min, 30.9 ± 13.3 min, and 58.9 ± 14.8 min respectively. The seizure episodes of grade 4 were appeared 28 min and 64 min after homocysteine injection in 2 rats.

Conclusion: These results show that homocysteine administration elicits seizures and behavioral responses, and suggests a possible animal model for studying epilepsy.

Key words : Behavioral changes, Homocysteine, Rat, Seizures

서론

호모시스테인은 methionine 대사과정 동안 만들어지는 아미노산이다. 호모시스테인의 거의 반은 엽산, 비타민 B2, 비타민 B12 등이 보조인자로 작용하는 재메틸화 과정을 거쳐 methionine으로 되며, 나머지 반은 비타민 B6 의존성 효소인 cystathionine beta synthase에 의하여 황전환 과정을 통하여 시스테인의 합성에 이용된다. 호모시스테인의 대사에 필요한 엽산, 비타민 B12, 비타민 B6 등과 같은 비타민의 섭취결핍과

cystathionine beta synthase의 결핍은 고호모시스테인혈증을 초래한다. 호모시스테인은 혈관의 평활근세포의 성장을 촉진하여 동맥경화증을 유도하고 신경독작용을 가지고 있다. 호모시스테인은 뇌졸중, 알츠하이머병, 간질, 우울증, 외상후스트레스증후군 등 여러 신경정신과적 질환들에서 증가되어 있다.¹⁻⁵⁾ 호모시스테인은 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 자극, 반응성 산소종(reactive oxygen species)의 과생산, 세포자멸사 등의 기전을 통하여 흥분성독성 신경세포의 죽음을 초래한다.^{6,7)}

고용량의 호모시스테인은 동물실험에서 발작을 유발한다.^{3,8)} 호모시스테인과 호모시스테인의 대사물질은 구조적으로 glutamate와 유사하며, 주로 NMDA 수용체

교신저자 : 김 광 수
주소 : 602-702 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 신경과학교실
TEL : 051-990-6274 FAX : 051-990-3077
E-mail : nekim@ns.kosinmed.or.kr

에 대한 흥분성 영향에 의하여 발작이 초래된다.⁹⁾ Kubova 등⁶⁾은 호모시스테인에 의한 주된 간질발작 현상은 간대성 경련이 주로 나타나는 경미한 간대성 발작(minimal clonic seizure), 몸을 등글게 하고 구르는 전만경련성 굴곡발작(emprosthotonic flexion seizure), 전신성 강직성-간대성 발작(generalized tonic-clonic seizure) 등이라고 하였다. Stanojlovic 등⁸⁾은 성인 Wistar 쥐에서 고호모시스테인혈증이 반복성 비유발성 간대성-강직성 경련과 결여발작과 유사한 발작이 특징적으로 나타나는 전신성 발작을 일으킨다고 하였다.

이번 연구의 목적은 흰쥐의 복강 내에 호모시스테인을 투여한 후 호모시스테인에 의한 행동변화와 경련의 양상을 관찰하고 간질의 동물모델로 유용한지 평가하고자 하였다.

연구대상과 방법

연구대상

생후 28일 된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 24마리를 대상으로 하였다. 이들의 몸무게는 120-145 g이었다. 실험대상 흰쥐들은 22℃의 일정한 온도로 유지되는 방에서 먹이와 물을 자유롭게 먹을 수 있는 우리(cage)에 5 혹은 6마리씩 나누어 키웠다.

방법

D,L-호모시스테인은 2-amino-4-sulfanylbutoanoic acid로 분자식은 $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ 이다(Fig. 1). D,L-호모시스테인(Sigma-Alorich Co., St. Louis, USA)을 0.9% 생리식염수에 녹여서 11 mmol/kg 용량을 쥐의 복강 내에 1회 주사하였다. 호모시스테인을 쥐의 복강 내에 주사한 후 90분간 행동변화와 발작의 양상을 관찰하고 기록하였다.

운동발작의 발생과 발작의 심한 정도는 Stanojlovic 등⁸⁾이 보고한 평가척도에 따라 1-4 단계로 나누어 알아보았다. 1단계는 고개를 까닥거리고 아래턱을 실룩거리리는 동작이 나타나는 단계, 2단계는 뒷발로 선채 몸통에 간대성 근경련양수축(myoclonic jerk)과 양측 앞발에 간대성 경련이 나타나는 단계, 3단계는 전신성 간대성 경련으로 진행하면서 이어서 앞발, 뒷발, 꼬리에 강직성 신전(tonic extension)이 나타나는 단계, 4단계는 10초 이상 지속하는 심한 전신성 강직성-간대성 발작이 나타나거나 5분 이상 동안 간대성 경련이 자주 반복해서 나타나는 단계 등으

로 정하였다. 호모시스테인을 주사한 후 각 단계별로 발작이 나타날 때까지 잠복시간을 기록하였다.



Fig. 1. Chemical structure of homocysteine. Homocysteine is an amino acid with the formula $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$.

결 과

호모시스테인을 복강 내에 주사한 후 모든 흰쥐들이 수 분 동안 움직이지 않고 가만히 웅크려 앉아있는 동작을 보였다. 그 다음에는 세수하는 동작, 냄새를 맡는 동작, 발을 끌며 걷는 동작, 씹는 동작 등이 순서 없이 나타났다.

각 단계별 발작의 발생은 1단계 발작은 22마리(91.7%), 2단계 발작은 21마리(87.5%), 3단계 발작은 9마리(37.5%), 4단계 발작은 2마리(8.3%)에서 있었다(Fig. 2).

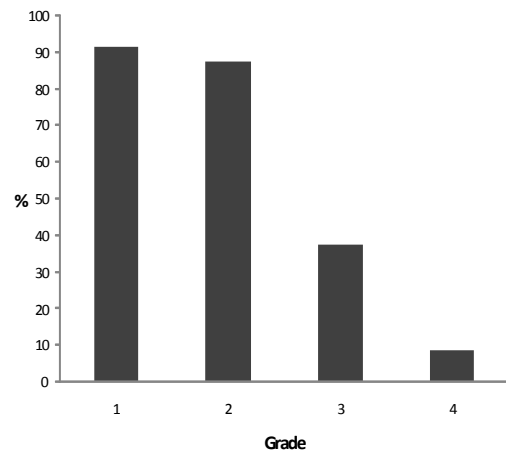


Fig. 2. The prevalence rate of the grade of homocysteine-induced seizures. Seizure severity is determined by a rating scale with grades defined as: 1-head nodding, lower jaw twitching; 2-myoclonic body jerks, bilateral forelimb clonus with full rearing; 3-progression to generalized clonic convulsion followed by tonic extension of fore- and hind limbs and tail; 4-prolonged tonic-clonic convulsion lasting over 10 seconds.

각 단계별 발작이 나타날 때까지 잠복시간은 1단계 발작은 15.3 ± 9.6 분, 2단계 발작은 30.9 ± 13.3 분, 3단계 발작은 58.9 ± 14.8 분 등이었다(Fig. 3). 그리고 4단계 발작은 2마리에서만 관찰되었는데 각각 28분과 64분이었다.

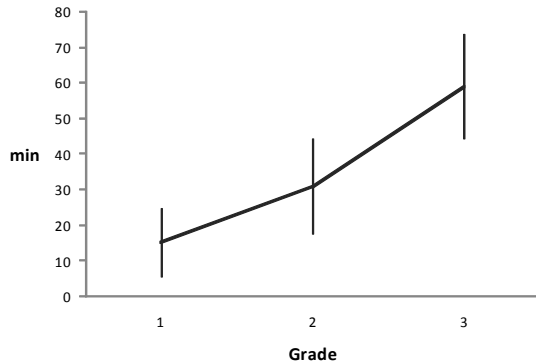


Fig. 3. The mean latency of the grade of homocysteine-induced seizures.

고찰

이번 연구에서 호모시스테인의 복강 내 투여는 흰쥐에서 특이한 행동변화와 발작을 일으키며, 발작은 관찰기간 동안 점차 더 심해지는 양상을 보였다.

호모시스테인과 그 대사물질은 뇌에 충분한 양이 축적하게 되면 발작을 유발할 수 있는 흥분성 대사물질로 간주되고 있다. 호모시스테인과 그 대사물 중 L-homocysteic acid는 강력한 NMDA 수용체의 촉진제로서 작용하며, D-homocysteic acid는 선택성이 덜하여 non-NMDA 수용체에 주로 작용한다.¹⁰⁾ 더욱이 D,L-homocysteic acid를 포함한 다양한 흥분성 아미노산은 Ca^{2+} 의 세포내 유입과 신경세포내로 칼슘의 이동을 촉발하는 대사영양성 glutamate 수용체를 활성화 시킨다.¹¹⁾ 호모시스테인은 직접적인 흥분성 작용을 가지고 있으며, 다른 내인성 흥분성 아미노산의 분비와 섭취를 증진시킨다.¹²⁾

호모시스테인에 의한 주된 간질발작유형은 3가지로 경미한 간대성 발작, 몸을 등글게 하고 구르는 전만경련성 굴곡발작, 전신성 강직성-간대성 발작 등이다.⁶⁾ 호모시스테인은 쥐의 발달단계에 따라 다른 발작형태를 보인다. 호모시스테인에 의하여 유발되는 기본적인 운동발작은 경미한 간대성 발작과 전신성 강직성-간대성 발작으로 이 발작유형은 모든 연령대에서 나타난다.⁶⁾ 경미한

발작은 어린 쥐에서는 대부분 20분까지 지속하는 간질중첩증 형태로 나타나지만 성인 쥐에서는 대단히 짧게 나타난다. 세번째 형태의 발작인 전만경련성 굴곡발작은 나이에 따라 차이가 있다. Kubova 등,⁶⁾은 굴곡발작이 7일과 12일 된 쥐에서는 잘 관찰되고, 15일과 18일 된 쥐에서는 예외적으로 나타나지만 25일 된 쥐와 성인 쥐에서는 나타나지 않는다고 하였다. Folbergrova 등¹³⁾은 12일된 쥐의 복강 내에 D,L-homocysteic acid를 주사한 후 대부분 쥐에서 뒷발에 강직성 신전과 함께 굴곡발작과 전신성 강직성-간대성 발작이 나타났다고 하였다. Stanojlovic 등⁸⁾은 2개월 된 성인 Wistar 수컷 쥐의 복강 내에 호모시스테인의 대사물질인 D,L-homocysteic thiolactone을 투여한 후 경련성 간질과 결여발작과 유사한 비경련성 간질의 2가지 형태의 발작이 관찰되었다고 하였다. 본 연구는 28일 된 쥐에서 호모시스테인을 투여한 후 대부분 쥐에서 경미한 간대성 발작이 관찰되었으며, 일부 쥐에서 앞발, 뒷발, 꼬리에 강직성 신전을 동반하는 전신성 간대성 경련이 나타났으나 전신성 강직성-간대성 발작으로 진행되는 경우는 드물었다. 본 연구에서는 전만경련성 굴곡발작은 관찰되지 않았는데 이는 본 연구의 실험대상 쥐들이 모두 28일 된 성인 쥐였기 때문으로 생각된다. 그리고 Stanojlovic 등⁸⁾이 보고한 결여발작과 유사한 비경련성 간질은 뇌파검사를 실시하지 않아서 관찰할 수 없었다. 향후 행동관찰과 함께 뇌파검사를 동시에 실시한다면 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이다. 발작이 나타나는 빈도와 심한 정도는 투여하는 호모시스테인의 용량과 관계가 있어서 투여하는 용량이 높을수록 발작이 자주 나타나고 심한 발작을 보인다.⁸⁾ 그리고 발작이 나타날 때까지 잠복시간도 경미한 간대성 발작과 전신성 강직성-간대성 발작 모두 투여하는 용량이 높을수록 잠복시간이 짧다.⁶⁾

측두엽간질의 동물모델로 흔히 이용되는 흥분성 아미노산인 kainic acid (KA)로 유발된 발작은 호모시스테인에 의한 발작과 비교하여 차이가 있다. Lim 등¹⁴⁾의 KA에 의한 동물실험에서도 간대성 발작과 전신성 강직성-간대성 발작이 모두 나타나지만 발작이 나타날 때까지 잠복시간이 호모시스테인에 의한 발작과 비교하여 2가지 발작유형 모두에서 더 길었다. 그러나 전신성 강직성-간대성 발작은 KA에 의한 경우가 본 연구의 호모시스테인에 의한 경우보다 더 흔하였다.

결 론

D,L-호모시스테인(11 mmol/kg)을 생후 28일 된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐의 복강 내에 투여한 후 다양한 행동변화와 간대성 발작 및 전신성 강직성-간대성 발작을 관찰할 수 있었다. 그러므로 신경흥분성 아미노산인 호모시스테인은 간질의 동물모델로 이용될 수 있을 것이다.

참고문헌

- 1) Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE : Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 49:31-62, 1998
- 2) Bottiglieri T, Laundry M, Crellin R, Toone BK, Carney MW, Reynolds EH : Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69:228-232, 2000
- 3) Diaz-Arrastia R : Homocysteine and neurologic disease. *Arch Neurol* 57:1422-1427, 2000
- 4) Ha SW, Kim KS : Relationship between serum levels of homocysteine and folate and seizure severity in patients with idiopathic epilepsy. *J Korean Epilep Soc* 12:22-26, 2008
- 5) Levine J, Timinsky I, Vishne T, Dwolatzky T, Roitman S, Kaplan Z, Kotler M, Sela BA, Spivak B : Elevated serum homocysteine levels in male patients with PTSD. *Depress Anxiety* 25:E154-E157, 2008
- 6) Kubova H, Folbergrova J, Mares P : Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis. *Epilepsia* 36:750-756, 1995
- 7) Suhara T, Fukuo K, Yasuda O, Tsubakimoto M, Takemura Y, Kawamoto H, Yokoi T, Mogi M, Kaimoto T, Ogihara T : Homocysteine enhances endothelial apoptosis via upregulation of Fas-mediated pathways. *Hypertension* 43:1208-1213, 2004
- 8) Stanojlovic O, Rasic-Markovic A, Hrnac D, Susic V, Macut D, Radosavljevic T, Djuric D : Two types of seizures in homocysteine thiolactone-treated adult rats, behavioral and electroencephalographic study. *Cell Mol Neurobiol* 29:329-339, 2009
- 9) Mares P, Folbergrova J, Langmeier M, Haugvicova R, Kubova H : Convulsant action of D,L-homocysteic acid and its stereoisomers in immature rats. *Epilepsia* 38:767-776, 1997
- 10) Turski WA : Homocysteic acid: convulsant action of stereoisomers in mice. *Brain Res* 479:371-373, 1989
- 11) Porter RHP, Roberts PJ : Glutamate metabotropic receptor activation in neonatal rat cerebral cortex by sulphur-containing excitatory amino acids. *Neurosci Lett* 154:78-80, 1993
- 12) Folbergrova J : Anticonvulsant action of both NMDA and non-NMDA receptor antagonists against seizures induced by homocysteine in immature rats. *Exp Neurol* 145:442-450, 1997
- 13) Folbergrova J, Haugvicova R, Mares P : Behavioral and metabolic changes in immature rats during seizures induced by homocysteic acid: the protective effect of NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Exp Neurol* 161:336-345, 2000
- 14) Lim KI, Kim KS, Lee JH, Kim MJ, Kim JK, Yoo BG : Elevated levels of proinflammatory cytokines Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- α in rats after kainic acid-induced seizures. *J Korean Epilep Soc* 10(1):18-23, 2006