

Kainic Acid에 의한 백서의 변연운동발작

고신대학교 의학부 신경과학 교실

김광수 · 임권일 · 유경무

Limbic Motor Seizures induced by Kainic Acid in Rats

Kwang Soo Kim, Kwon Il Lim, Kyung Mu Yoo

Department of Neurology, Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

= Abstract =

Kainic acid(KA), a powerful excitatory analogue, induces limbic motor seizures and damages the hippocampus and limbic regions in rats. This study was undertaken to observe the behavioral pattern induced by systemic administration of KA in rats.

Twenty-three adult male Sprague-Dawley rats experienced convulsions by a single intraperitoneal injection of variable convulsive doses(20, 30, and 40mg/Kg) of KA respectively. The behavioral patterns were monitored for 3 hours after administration of KA.

Most of the rats exhibited limbic motor epileptic activity. Severe limbic convulsion and status epilepticus progressively increased with the increasing doses of KA, but the time sequence in the onset of behavioral stages induced by administration of variable doses of KA was not significantly different.]

Key Words : Kainic acid, Limbic motor seizure.

서 론

Kainic acid(KA)는 흥분성 아미노산인 glutamate와 화학적으로 유사하며 glutamate 수용체의 촉진제로서 작용한다^{12,16)}. 충분한 KA를 전신적으로 투여하면 KA의 흥분성 효과에 의하여 경련발작을 일으킬 수 있다¹⁹⁾. KA는 동물실험에서 측두엽간질과 유사

한 경련발작을 일으키며, 측두엽간질에서 나타나는 근심측두엽경화증과 유사한 병변을 초래한다고 한다^{1, 13)}. 그러므로 KA 유발경련의 동물모형은 측두엽간질의 연구에 널리 이용되고 있다.

본 연구는 측두엽간질의 동물모형으로 알려져 있는 KA유발발작의 양상 및 KA용량에 따른 행동 및 발작반응의 차이를 알아보

로써 측두엽간질의 연구에 도움을 얻기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

실험동물은 국립화학연구소에서 분양받은 체중 200-350gm의 Sprague-Dawley종 수컷 백서 23마리로서 이들은 polyethylene-carbonyl cage에 수용하여 동일한 조건으로 사육되었다.

2. 실험 방법

1) 실험동물의 처치

실험백서 23마리는 KA(Sigma Chemical Co., USA)를 0.9% 생리식염수에 녹여 50mg/ml의 농도로 만든 다음 이들 중 7마리는 20mg/kg을, 8마리는 30mg/kg을, 그리고 나머지 8마리는 40mg/kg을 각각 복강내에 일회 주사하였다.

2) 행동 및 발작양상의 관찰

KA 주사후 3시간동안 행동양상을 관찰 기록하여 Lothman과 Collins(1981)¹¹⁾의 방법을 다소 수정하여 다음과 같이 5 단계로 분류하였다. 제 1 단계는 사지를 웅크리고 가만히 있으면서 응시하는 동작을 보이고, 제 2 단계는 전신을 불규칙하고 급격하게 떠는 wet dog shake를 보이며, 제 3 단계는 얼굴, 목, 머리, 상체 등에 경한 간대성 발작을 보이거나 짧은 근간대성 연축을 보이며, 제 4 단계는 머리와 상체에 강한 간대성 발작 또는 근간대성 연축으로 곧추서기와 발작과 함께 넘어진 후 전신성 간대성 발작을 보이거나 전신성 긴장성 간대성 발작을 보인다. 제 5 단계는 간질중첩증을 보이는 단계로 하였다.

실험백서들은 발작단계에 따라 행동 및 발작양상을 관찰하였으며, KA의 용량을 달리한 각 실험백서에서 단계별 이행빈도 및 이행시작시간 등을 서로 비교하였다.

결 과

1. KA에 의한 행동 및 발작반응

모든 백서들은 다양한 행동 및 발작반응을 보였으며 실험 각 동물마다 차이는 있었으나 대부분에서 변연운동발작(limbic motor seizure)이 관찰되었다. 사지를 웅크리고 가만히 있으면서 응시하는 동작은 전례에서, 그리고 wet dog shake는 23례 중 22례(95.7%)에서 관찰되었으며, 머리와 상체의 근간대성 연축은 23례 중 14례(60.9%)에서 관찰되었다. 이러한 행동양상은 비교적 높은 발생을 보이는 행동반응이었다. 그외 행동반응으로는 실조보행(30.4%), 고개를 까다이는 동작(26.1%), 앞발을 떠는 동작(21.7%) 등이 있었다. 그리고 곧추서기 및 넘어지기는 23례 중 10례(43.5%), 전신성 긴장성 간대성 발작은 12례(52.2%), 간질중첩증은 9례(39.1%)에서 관찰되었다. KA용량에 따른 행동반응의 비교에서 실조보행, 원을 그리면서 빙빙 도는 동작, 곧추서기 및 넘어지기, 전신성 긴장성 간대성 발작, 및 간질중첩증 등의 행동반응은 KA의 용량이 많을수록 높은 발생빈도를 보였다(Table 1).

2. 발작단계별 이행빈도

발작단계별 이행빈도는 제 1 단계는 전례에서 관찰되었으며, 제 2 단계 발작인 wet dog shake는 30mg/kg의 KA를 투여한 백서들 중 1례를 제외한 22례(95.7%)에서 관찰되었고, 제 3 단계 발작은 20mg/kg의 KA를 투여한 백서에서는 85.7%에서,

Table 1. Behavioral patterns induced by systemic administration of kainic acid

Behavioral pattern	No. of cases(%)			
	20mg/kg(n=7)	30mg/kg(n=8)	40mg/kg(n=8)	Total(n=23)
<u>Stage I</u>				
Motionless & staring	7(100)	8(100)	8(100)	23(100)
<u>Stage II</u>				
Wet dog shake	7(100)	7(87.5)	8(100)	22(95.7)
<u>Stage III</u>				
Facial clonus	1(14.3)	1(12.5)	1(12.5)	3(13.0)
Forepaws tremor	1(14.3)	1(12.5)	3(37.5)	5(21.7)
Head nodding	2(28.6)	2(25)	2(25)	6(26.1)
Myoclonic jerks	5(71.4)	4(50)	5(62.5)	14(60.9)
<u>Stage IV</u>				
Ataxic gait	1(14.3)	3(37.5)	3(37.5)	7(30.4)
Circling	1(14.3)	1(12.5)	2(25)	4(17.4)
Rearing & falling	1(14.3)	4(50)	5(62.5)	10(43.5)
Tonic-clonic seizure	3(42.9)	4(50)	5(62.5)	12(52.2)
<u>Stage V</u>				
Status epilepticus	1(14.3)	3(37.5)	5(62.5)	9(39.1)

30mg/kg 및 40mg/kg를 투여한 백서에서는 각각 62.5%에서 관찰되었다. 제 4 단계 발작은 20, 30, 및 40mg/kg의 KA를 투여한 백서들에서 각각 42.9%, 50%, 및 62.5%에서 관찰되었으며, 제 5 단계 발작인 간질중첩증은 20, 30, 및 40mg/kg용

량의 KA를 투여한 백서들에서 각각 14.3%, 37.5%, 및 62.5%의 발생을 보였다. KA 용량에 따른 단계별 경련발작의 이행빈도는 제 1, 2 및 3 단계에서는 차이가 없었으나, 제 4 및 5 단계 발작은 KA의 용량이 높을수록 단계별 이행빈도가 점차 증가하는 경향을 보였다(Table 2).

Table 2. Frequency of behavioral stage induced by systemic administration of kainic acid

Stage*	No. of cases(%)			
	20mg/kg(n=7)	30mg/kg(n=8)	40mg/kg(n=8)	Total(n=23)
I	7(100)	8(100)	8(100)	23(100)
II	7(100)	7(87.5)	8(100)	22(95.7)
III	6(85.7)	5(62.5)	5(62.5)	16(69.6)
IV	3(42.9)	4(50)	5(62.5)	12(52.2)
V	1(14.3)	3(37.5)	5(62.5)	9(39.1)

* I : motionless & staring, II : wet dog shake, III : mild limbic seizure, IV : severe limbic seizure, V : status epilepticus.

3. 발작단계별 시작시간

KA 유발발작의 단계별 시작시간은 제 1 단계는 투여후 1-2분이내에 나타났으며, 제 2 단계는 29.0 ± 12.5 분, 제 3 단계는 46.5 ± 14.5 분, 제 4 단계는 83.2 ± 22.3 분, 그리고 제 5 단계는 114.2 ± 22.8 분 후에 관찰되었다. 다소 차이는 있었으나 KA의 용량에 따른 각 단계별 시작시간은 비슷하였다 (Table 3).

위축 및 파괴 등을 관찰하였다. KA의 신경독성 작용의 기전은 정확히 알려져 있지 않으나 신경세포의 수상돌기에 있는 KA수용체의 활성화 및 glutamate 등의 흥분성 수용체의 자극에 의한 탈분극이 신경세포내 칼슘이온의 농도를 증가시키고 이로 인하여 칼슘의존성 단백질분해효소가 자극되며 탈분극과 함께 신경세포 에너지의 과소비가 일어나서 결국에는 세포사를 초래하는 것으로 추정하고 있다⁶⁾.

Table 3. Time sequence in the onset of behavioral stage induced by systemic administration of kainic acid

Stage	Onset time(min)			
	20mg/kg	30mg/kg	40mg/kg	Total
II	25.3 ± 5.8 (20-39)	27.7 ± 8.5 (14-38)	33.4 ± 17.4 (20-70)	29.0 ± 12.5 (14-70)
III	45.8 ± 19.4 (34-89)	48.0 ± 8.6 (40-60)	46.4 ± 9.6 (42-65)	46.5 ± 14.5 (34-89)
IV	92.3 ± 12.3 (78-108)	76.8 ± 2.4 (74-80)	82.8 ± 31.8 (45-138)	83.2 ± 22.3 (45-138)
V	121	106.0 ± 8.6 (96-117)	117.8 ± 28.9 (68-145)	114.2 ± 22.8 (68-145)

Values are given as mean $\pm$ SD(range)

고 찰

KA는 glutamate의 유사체로서 포유동물의 중추신경계 신경세포에 대하여 강력한 흥분성 및 신경독성 효과를 가지고 있다^{6, 16, 18)}. Olney 등(1974)¹⁶⁾은 미숙한 마우스에 KA를 비경구적으로 투여한 후 궁상신경세포(arcuate neuron)의 세포체 및 수상돌기에서 괴사성 변화를 관찰하였으며, Coyle 등(1978)⁷⁾은 백서의 미상핵(caudate nucleus) 내에 KA를 정위주입 후 세포질내 Nissel체의 소실과 수상돌기 및 핵주위질의

KA수용체는 백서의 대뇌 대부분 부위에서 발견되지만 전뇌가 친화성이 높은 부위로 알려져 있다¹⁰⁾. KA를 전신성 투여시 전뇌의 신경교세포의 팽화 및 신경세포의 광범위한 소실과 후엽피질(olfactory cortex), 편도체(amygdaloid), 해마(hippocampus), 시상, 및 신피질 등에서 신경세포의 현저한 소실이 일어난다²⁾. 해마에서 KA수용체는 CA3 및 CA4에 많이 존재하고 있으며⁵⁾, KA에 의한 해마병변은 CA3의 추체신경세포가 가장 손상을 잘 받으며 그 다음이 CA4 및 CA1의 순으로 손상을 잘 받으나

CA2의 추체신경세포와 치상회의 과립세포는 비교적 손상을 받지 않았다고 한다^{2, 15)}. KA에 의한 백서 해마신경세포의 소실은 인간의 측두엽간질에서 관찰되는 변연계 병변과 유사하며¹⁵⁾, 경련을 악화시키는 약물인 morphine을 같이 투여하면 변연계 손상이 심해지고 아편수용체 길항제인 naloxone을 같이 투여하면 변연계 손상이 감소하였으며⁸⁾, 그리고 경련발작의 전파를 차단하는 병소가 있거나¹⁴⁾, 항경련제인 diazepam을 투여시^{2, 3)} 변연계 손상이 감소되었다는 실험 결과는 KA에 의한 해마신경세포의 소실이 KA의 직접적인 신경독성 작용에 의한 것이 아니라 지속적인 경련발작의 결과 초래되었다는 것을 시사한다.

KA의 전신성 투여에 의한 경련발작은 KA의 용량 및 투여방법에 따라 다소간 차이는 있으나 투여후 1-2시간 동안 일련의 경련성 행동변화를 보인다¹³⁾. 처음 관찰되는 행동변화는 KA투여 약 5분후에 나타나는 웅크린 채 응시하는 동작으로 20-30분간 지속한다. 다음 단계는 전신을 불규칙적으로 급격하게 떠는 wet dog shake로 KA투여 30-40분후에 나타나며, 다음 단계는 KA투여 60-90분후에 나타나는 반복적인 변연운동발작으로 고개를 까닥이고, 코를 쿵쿵거리며, 얼굴을 실룩이고, 눈을 깜짝이고, 머리와 상체에 근간대성 연축이 나타나고, 곧추서기와 발작과 함께 넘어지기 등의 행동변화를 보인다. 이러한 경련발작은 점차 양상이 복합적으로 나타나고 발작 기간도 연장된다. 그 다음은 간질중첩증으로 KA투여 1-2시간 후에 나타난다^{1,4,11,19)}. 본 연구에서도 실험 각 동물마다 다소 차이는 있었으나 대부분 백서에서 wet dog shake 및 변연운동발작 등 일련의 경련발작을 관찰할 수 있었다. Lothman과 Collins(1981)¹¹⁾는 KA 용량을 0.3-12mg/kg으로 다르게 하여 쥐의 정맥내 투여후 행동양상을 관찰한 결과 용량에 따라 단계별 경련발작이 나타나는 역치에는 차이가 있었

으나 시작시간은 비슷하였다고 하였다. 이는 본 연구에서 KA의 용량이 높을 수록 변연운동발작 및 간질중첩증의 발생이 많았으나 단계별 발작이 나타나는 시작시간은 용량에 따라 차이가 없었던 것과 유사하다.

Le Gal La Salle(1988)⁹⁾는 KA를 복강내에 투여한 후 관찰되는 행동 및 발작반응과 변연계의 손상부위와의 상관관계를 알아보기 위하여 행동양상에 따른 c-fos단백의 면역반응성을 알아본 결과 wet dog shake가 나타나는 시기에 치상회 및 내비피질에서 면역반응성이 관찰되었고, 변연운동발작이 나타나는 시기에는 일차후각피질(primary olfactory cortex), 이상피질(pyramiform cortex), 내비피질 및 치상회 과립세포층에서 강한 면역반응성을 보였으며, 경련발작이 점차 더 심해지는 KA주사 2-4시간 후에는 CA1, CA3, CA4 추체세포층 및 변연계 다른 부위에서도 양성 면역반응성을 보였다고 한다. 그리고 Popovici 등(1990)¹⁷⁾은 변연운동발작이 나타나는 시기에 치상회에서 c-fos단백의 면역반응성이 처음으로 증가하기 시작하여 지속적인 발작이 나타나는 KA투여 3-6시간 후에는 변연계 다른 부위에서도 면역반응성이 증가하였다고 한다. 이는 경한 발작에서는 치상회, CA1 및 CA3영역이 침범되고 경련발작의 강도가 점차 심해지면서 CA4영역 및 해마 다른 부위도 침범된다는 것을 시사한다.

본 연구에서 전신성으로 투여한 KA는 변연운동발작의 특징적인 행동 및 발작반응을 보였으며, KA의 용량을 증가할수록 심한 변연운동발작, 전신성 긴장성 간대성 발작 및 간질중첩증 등이 초래되었다. 그러므로 측두엽간질의 동물모형을 얻기 위해서는 20mg/kg의 용량이 적절하며, 전신성 간질 및 간질중첩증의 동물모형을 얻기 위해서는 40mg/kg의 고용량을 필요로 할 것으로 생각되었다.

요 약

측두엽간질의 모형인 Kainic acid(KA) 유 발발작 동물모형에서 발작양상을 관찰하였다. Sprague-Dawley종 수컷 백서 23마리를 실험대상으로 하였다. 이들 중 7마리는 20mg/kg 용량의 KA를 일회 복강내에 주사하여 발작을 유발하였으며, 8마리는 30mg/kg 용량의 KA를 투여하였고, 나머지 8마리는 40mg/kg 용량의 KA를 투여하였다. 각 실험백서들은 KA를 주사하고 나서 3시간동안 행동 및 발작반응을 관찰하여 KA 용량에 따른 행동반응, 단계별 이행빈도 및 단계별 시작시간 등을 서로 비교하였다.

대부분 백서에서 KA에 의한 변연운동발작을 관찰할 수 있었으며, KA의 용량이 높을 수록 전신성 간질 및 간질중첩증의 발생이 많았다. 그러나 KA용량에 따른 단계별 시작시간은 서로 비슷하였다.

그러므로 측두엽간질의 동물모형을 위해서는 20mg/kg 용량의 KA가 적절하며, 전신성 간질 및 간질중첩증의 동물모형을 얻기 위해서는 이 보다 많은 용량의 KA가 필요할 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Ben-Ari Y : Limbic seizures and brain damage produced by kainic acid : Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14 : 375-403, 1985
2. Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP, Meldrum BS : The role of epileptic activity in hippocampal and 'remote' cerebral lesions induced by kainic acid. *Brain Res* 191 : 79-97, 1980
3. Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP, Naquet R : Evidence suggesting secondary epileptogenic lesions after kainic acid : Pretreatment with diazepam reduces distant but not local brain damage. *Brain Res* 165 : 362-365, 1979
4. Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R : Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole : Metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 6 : 1361-1391, 1981
5. Cotman CW, Monaghan DT, Ottersen OP, Storm-Mathisen J : Anatomical organization of excitatory receptors and their pathways. *Trend Neurosci* 10 : 273-280, 1987
6. Coyle JT : Neurotoxic action of kainic acid. *J Neurochem* 41 : 1-11, 1983
7. Coyle JT, Molliver ME, Kuhar MJ : In situ injection of kainic acid : A new method for selectively lesioning neuronal cell bodies while sparing axons of passage. *J Comp Neurol* 180 : 301-324, 1978
8. Fuller TA, Olney JW : Effects of morphine and naloxone on kainic acid neurotoxicity. *Life Sci* 24 : 1793-1798, 1979
9. Le Gal La Salle G : Long-lasting and sequential increase of c-fos oncoprotein expression in kainic acid-induced status epilepticus. *Neurosci Lett* 88 : 127-130, 1988
10. London ED, Coyle JT : Specific

- binding of [³H]-kainic acid to receptor sites in rat brain. *Mol Pharmacol* 15 : 492-505, 1979
11. Lothman EW, Collins RC : Kainic acid induced limbic seizures : Metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Res* 218 : 299-318, 1981
12. McGeer EG, McGeer PL, Singh K : Kainate induced degeneration of neostriatal neurons : Dependency upon cortico-striatal tract. *Brain Res* 139 : 381-383, 1978
13. Nadler JV : Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci* 29 : 2031-2042, 1981
14. Nadler JV, Cuthbertson GJ : Kainic acid neurotoxicity towards hippocampal formation : Dependence on specific excitatory pathways. *Brain Res* 195 : 47-56, 1980
15. Nadler JV, Perry BW, Cotman CW : Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature(Lond)* 271 : 676-677, 1978
16. Olney JW, Rhee V, Ho OL : Kainic acid : a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res* 77 : 507-512, 1974
17. Popovici Th, Represa A, Crepel V, Barbin G, Beaudoin M, Ben-Ari Y : Effects of kainic acid-induced seizures and ischemia on c-fos-like proteins in rat brain. *Brain Res* 536 : 183-194, 1990
18. Shinozaki H, Konishi S : Actions of several antihelminthics and insecticides on rat cortical neurons. *Brain Res* 24 : 368-371, 1970
19. Sperk G, Lassmann H, Baran H, Kish SJ, Seitelberger F, Hornykiewicz O : Kainic acid induced seizures : Neurochemical and histochemical changes. *Neuroscience* 10 : 1301-1315, 1983