

백서 대뇌 피질 절편에서 허혈에 의한 [³H]Hydroxytryptamine의 유리 기전에 관한 연구

전북대학교 의과대학 신경과학교실 · 약리학교실*

송대원 · 김영현 · 김기원*

Mechanisms of Release of [³H]Hydroxytryptamine Evoked by Hypoxia and Hypoglycemia in Rat Cerebral Cortex Slices

Dae Won Song, M.D., · Young Hyun Kim, M.D., · Kee Won Kim, M.D.*

Department of Neurology, Pharmacology*, Chonbuk National University Medical School,
Chonju, Chonbuk, Republic of Korea

—Abstract—

Pathophysiology of brain ischemia is characterized by a complex cascade of hemodynamic, electrophysiological and biochemical processes. It has been generally accepted that glutamate mediates the ischemic brain damage, excitotoxicity, and induce neurotransmitter release from various brain tissues in ischemic milieu. In present study, the mechanisms for ischemia-induced [³H]5-hydroxytryptamine(5-HT) from cerebral cortex slices of the rat was examined. Ischemia, deprivation of oxygen and glucose from Mg²⁺-free artificial cerebrospinal fluid, induced significant release of [³H]5-HT(7.2±0.6 % of total tissue content) from the tissues. This ischemia-induced release of [³H]5-HT from the slices was significantly attenuated by TTX(1 μM), Mg²⁺(1.2 mM), MK-801(10 μM), ketamine(10 μM),

NMDA receptor antagonists, DNQX(30 μM), a kainate/AMPA receptor antagonist, or carbetapentane(30 μM), an inhibitor of glutamate release. Fluoxetine, a selective blocker for 5-HT transporter, inhibited the ischemia-induced release of [³H]5-HT. Omission of Ca²⁺ from incubation media potentiated ischemia-evoked [³H]5-HT release and the inhibitory effect of blockers for transporter. Dantrolene (30 μM) and ryanodine(100 nM), inhibitors of intracellular Ca²⁺ release, flunarizine(5 μM) and -conotoxinGVIA (100 nM), inhibitors of N-type Ca²⁺ channels, significantly attenuated the ischemia-induced release of [³H]5-HT, but verapamil(5 μM), an inhibitor of L-type Ca²⁺ channels, did not. Fluoxetine(100 nM), a relatively selective 5-HT transporter blocker, significantly

* 교신저자 : 송 대 원
전북대학교 의과대학 신경과학교실

* 본 논문은 과학기술처 1996년도 Biotech 2000 연구 사업에 의해 지원되었음.

inhibited the ischemia-induced release of [3 H]5-HT.

These results suggest that glutamate is involved in ischemia-evoked [3 H]5-HT release, and this release is achieved by Ca^{2+} -dependent exocytosis and reversal of transporters, and can be modulated by various neu-

ronal mechanisms.

Key Words: Rat Cerebral Cortex Slices, Ischemia, [3 H]5-hydroxytryptamine (5-HT), Release

서 론

뇌 허혈은 뇌 조직 혈류량의 감소로 인해 세포에 산소와 포도당의 공급이 원활치 못함으로써 세포내 ATP의 고갈을 유발하고, 이에 따라 Na^+ - K^+ pump, Ca^{2+} -ATPase 등 억제됨으로써 세포내 Ca^{2+} 와 Na^+ 농도를 증가시키고, 반면 세포의 K^+ 농도를 증가시켜 세포의 탈분극을 일으키게 된다. 이 탈분극은 glutamate성 신경세포에서 glutamate의 급격한 유리를 일으켜 흥분 독성(excitotoxicity)을 유발하게 된다(Choi와 Rothman, 1990). 유리된 glutamate는 다시 연결 후 신경에 존재하는 4 가지 glutamate 수용체(NMDA-, kainate-, AMPA-, metabotropic-수용체, Mognahan 등, 1989)에 작용하여 연결 후 신경세포내 Ca^{2+} 와 Na^+ 농도 증가에 따른 탈 분극을 일으켜 그 신경세포가 함유하고 있는 신경 전도 물질을 유리시키고, 한편 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 PKC, PKA, phospholipases, calcium-activated neutral peptidase 또는 DNase 등을 활성화하여 이로 인해 세포막의 손상, DNA의 손상, prostaglandins의 유리에 따른 oxygen free radicals의 증가가 일어나고, mitochondria 내 Ca^{2+} 과부하로 인해 oxidative phosphorylation이 억제되어 ATP고갈이 심화되어 결국 세포의 죽음이 초래되는 것으로 생각되고 있다(Hara 등, 1993).

뇌 허혈에 따른 뇌 손상 유발 기전에 있어 여러 신경 전도 물질들이 관여됨이 보고되어 있다. 즉, Zervas 등(1974)은 실험적 허혈뇌에서 dopamine(DA) 함량이 감소되며, Welch 등(1977)은 catecholamine과 5-hydroxytryptamine(5-HT) 등의 농도가 변동된다고 하였고, Adachi 등(1991)은 중대 뇌동맥의 폐쇄시 histamine과 monoamine의 대사가 변동된다 하여 catecholamine이 뇌 허혈의 병

인에 관계됨을 시사하였다. 한편 허혈성 뇌 손상에 대해서 뇌내 여러 종류의 신경 전도 물질들이 서로 다른 영향을 미침이 알려져 있다. 즉, 6-hydroxy-dopamine으로 nigrostriatal DA성 신경을 파괴하거나(Globus 등, 1987; Lindvall 등, 1985), -methyl-para-tyrosine(Weinberger 등, 1985) 전 처리했을 때 선조체의 허혈 손상이 억제됨이 관찰되어 DA이 허혈 손상을 악화시키는 것으로 알려져 있으며, Busto 등(1985)은 norepinephrine(NE)이 허혈성 뇌 손상의 회복을 촉진한다 하였고, Blomqvist 등(1985)은 locus coeruleus의 NE성 신경 파괴에 의해 허혈손상이 심화됨을 관찰하여 NE이 허혈에 대한 보호 효과를 갖는다 하였다. 뇌 허혈시 5-HT의 역할에 대해서 Welch 등(1973)은 5-HT가 뇌 손상을 더욱 악화시킨다 하였으나, Bode-Gruel 등(1990)은 그 보호 효과가 있다고 주장하였다. 그런데 허혈에 의한 5-HT유리는 생체내 실험(Kondoh 등, 1994; Damsma 등, 1990; Sarna 등, 1990; Decombe 등, 1993; Richards 등, 1993)과 synaptosome 표본(Santos 등, 1996)에서 보고 된 바 있으나 그 유리 기전에 관해서는 보고되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 허혈에 특히 민감하게 손상 받는 대뇌 피질(Brierley, 1976; Pulsinelli, 1982; Ginsberg, 1985)에서 이 부위에 고밀도로 존재하는(Steinbusch와 Mulder, 1984) 5-HT유리에 관한 허혈의 영향과 그 기전을 규명하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

실험 동물로는 용성 백서(Sprague-Dawley, 200-300 g)를 사용하였다.

백서를 단두하여 뇌를 적출한 다음, 대뇌 피질을 분리하여 조직절편기(McIlwain)를 사용하여 두께

250 m로 중형으로 절단하여 절편을 제작하였다. 절편은 95 % O_2 와 5 % CO_2 로 포화시킨 인공뇌척수액(ACSF) (124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM $MgCl_2$, 26 mM $NaHCO_3$, 12.5 mM KH_2PO_4 , 3 mM $CaCl_2$, 10 mM glucose) 20 ml에 옮겨 plastic transfer pipet으로 진탕하여 2회 세척하였다. 세척한 절편을 37 °에서 15분간 15 nM의 $[H]5$ -hydroxytryptamine (10-20 Ci/mmol), 존재하에 20 ml ACSF에서 배양하였다. 배양된 절편을 ACSF로 3회 세척하였다. 이어 절편 용액(400 l, 조직 15-20 mg)을 nylon mesh를 장치한 24 well tissue culture plate에 옮겨 2 ml의 ACSF 용액(washing plate)에 옮겨 5분간 방치한 다음, glucose와 $MgCl_2$ 를 제한 2 ml의 ACSF 용액(resting plate)에서 5분간 방치하여 기저유리량을 구하고, 다시 절편을 95 % N_2 + 5 % CO_2 로 포화시킨 ACSF 2 ml(stimulating plate)에 옮겨 5분간 방치(방치 후 산소분압: 30~40 mmHg)하여 $[H]5$ -HT유리를 측정하였다. 이후 조직 절편을 0.2 N HCl용액에 옮겨서 45분간 처리하여 조직내 $[H]5$ -HT를 추출하였다.

시험할 약물은 길항제의 경우 washing, resting 및 stimulating plate에 두어하였고, 작용제의 경우 resting 그리고 stimulating plate에 두어하였다.

방사능의 측정은 각 well에서 500 ml를 취하여 4 ml vial에 담고, 여기에 2 ml의 counting cocktail을 첨가하여 β -counter로 측정하였다.

허혈 자극에 의한 신경 전도 물질 유리는 허혈 자극에 의해 유리된 신경 전도 물질의 양에서 기저유리량을 제하고 이를 총 절편내 신경 전도 물질량으로 나누어 그 백분율로 표시하였다. 시험할 약물은 각 실험에서 4회 반복 측정하고, 각 실험은 최소 3회 실시하였다.

얻어진 실험 성적은 ANOVA를 사용하여 유의성을 검정하였다.

실험 성적

I. 시험관내 허혈 자극에 의한 $[H]5$ -HT 유리 효과

백서 대뇌 피질에서 용액내 포도당과 Mg^{2+} 를 제한 상태에서 5 분간의 허혈 자극에 의해 대뇌 피질 절

편내 총 $[H]5$ -HT의 약 6.5 %에 달하는 유의한 유리를 보였으며, 이러한 허혈 자극에 의한 $[H]5$ -HT의 유리는 영양액내 1.2 mM $MgCl_2$ 또는 10 mM의 glucose첨가에 의해 완전히 억제되었다(Fig. 1).

본 연구에서 허혈 자극에 의한 신경 전도 물질의 유리에 axonal firing과정이 수반되는지 확인하기 위하여 전압의 존재성 Na^+ 통로를 억제하는 tetrodotoxin(TTX) (Singer, 1974)의 영향을 검토하였던 바 허혈에 의한 $[H]5$ -HT의 유리는 TTX 처리에 의해 소실되었다(Fig. 1).

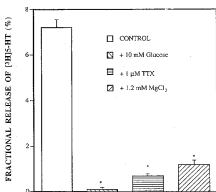


Fig. 1. Influences of glucose, tetrodotoxin(TTX) and $MgCl_2$ on the ischemia-evoked release of $[H]5$ -HT in rat hippocampal slices. Ischemia was induced by 5 min of hypoxia in the absence of $MgCl_2$.

* : Significantly different from the control value($p < 0.05$).

II. 허혈 자극에 의한 $[H]5$ -HT 유리에 대한 Glutamate성 신경 작용 약물의 영향

허혈에 의한 뇌 손상에는 acidic amino acid인 glutamate(Glu)가 주된 역할을 하며, Glu 수용체 가운데 NMDA수용체가 주로 이를 매개하는 잘 알려져있다(Choi and Rothman, 1990). 따라서 본 연구에서는 허혈 자극에 의한 신경 전도 물질의 유

리가 Glu에 의한 것인지를 알아보고, 이 효과를 매개하는 수용체의 형을 알기 위하여 NMDA 수용체의 생리적 길항제인 Mg^{2+} (Mayer 등, 1984), 비경쟁적 길항제인 MK-801 (Wong 등, 1986) 과 ketamine (Anis 등, 1983), non-NMDA 수용체 길항제인 DNQX (Fletcher 등, 1988), 그리고 Glu 유리 억제제인 carbetapentane (Annels 등, 1991)의 영향을 검토하였다.

백서 대뇌 피질 절편에서 허혈 자극에 의한 $[^3H]$ 5-HT의 유리는 Mg^{2+} , MK-801, ketamine, DNQX 또는 carbetapentane 등의 처리에 의해 현저히 억제되었던 바 이는 본 실험에서 $[^3H]$ 5-HT의 유리가 허혈 자극에 의해 유리된 Glu에 의하며 그 작용이 NMDA 또는 quisqualate/kinate 수용체를 통하여 유발됨을 시사한다 (Fig. 2).

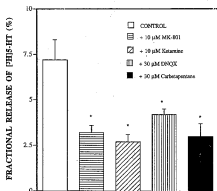


Fig. 2. Influences of blockers of NMDA receptors, and inhibitor glutamate release on the ischemia-evoked release of $[^3H]$ 5-HT in rat hippocampal slices. Other legends are the same as Fig. 1.

IV. 허혈 자극에 의한 $[^3H]$ 5-HT 유리에 대한 Glycine의 영향

Glycine은 NMDA수용체의 positive allosteric modulator로 작용하여 NMDA의 효과를 강화시킨다고 보고되어 있다 (Johnson 과 Ascher, 1987). 따라서 본 실험에서 허혈시 $[^3H]$ 5-HT의 유리에

NMDA 수용체가 관여하는 것으로 사료되어 허혈에 의한 $[^3H]$ 5-HT의 유리에 대한 glycine의 영향과 glycine-sensitive site의 길항제로 보고된 DQX (Yoneda와 Ogita, 1989)의 영향을 검토하였다. 허혈에 의한 $[^3H]$ 5-HT의 유리는 영양액내 glycine 10 mM의 존재시 유의하게 증가되었으며, 30 mM DQX 처리에 의해 유의하게 억제되었다. 한편 glycine에 의한 $[^3H]$ 5-HT 유리 증대 효과는 DQX 전 처리에 의해 억제되었다 (Fig. 3).

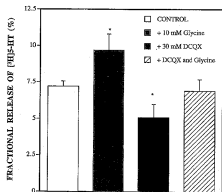


Fig. 3. Influences of glycine and DQX, a glycine-sensitive NMDA site blocker, on the ischemia-evoked release of $[^3H]$ 5-HT in rat hippocampal slices. Other legends are the same as Fig. 1.

V. 허혈 자극에 의한 $[^3H]$ 5-HT 유리에 대한 전압 의존성 Ca^{2+} -channel 봉쇄제와 세포내 Ca^{2+} 유리 억제제의 영향

각종 자극에 의한 신경 전도 물질의 유리 및 허혈에 의한 뇌 손상에 있어서 세포내 Ca^{2+} 은 극히 중요한 역할을 하고 있음이 잘 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 허혈 자극에 의한 신경 전도 물질 유리에 대한 voltage-sensitive Ca^{2+} channel 억제제인 verapamil, flunarizine (L-type) 과 ω -conotoxin GVIA (N-type) 그리고 세포내 Ca^{2+} 유리를 억제하는 dantrolene (Frandsen과 Achousboe, 1992) 과 ryanodine의 영향을 검토하였다.

백서 대뇌 피질에서 허혈 자극에 의한 $[^3H]5-HT$ 의 유리는 verapamil($5\mu M$)에 의하여는 영향받지 않았고, flunarizine($5\mu M$)과 ω -conotoxinGVIA($0.1\mu M$)에 의해서 현저히 억제되었다(Fig. 4). 그리고 100 nM ryanodine과 30 μM dantrolene에 의해서는 유의한 감소를 보였다(Fig. 4).

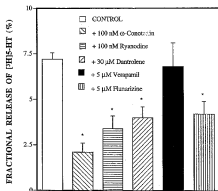


Fig. 4. Influences of calcium channel blockers and inhibitors of intracellular calcium release on the ischemia-evoked release of $[^3H]5-HT$ in rat hippocampal slices. Other legends are the same as Fig. 1.

VII. 허혈 자극에 의한 $[^3H]5-HT$ 유리에 대한 배양액내 칼슘의 제거와 Amine Transporter Blocker의 영향

신경 말단에서 신경 전도 물질의 유리에 있어서 두 가지 서로 다른 기전 즉, Ca^{2+} -의존형과 Ca^{2+} -비의존형이 있으며, 허혈시에는 세포내 이온 대사의 불균형으로 인해 Ca^{2+} 비의존형 유리가 일어남이 잘 알려져있기에(McMahon과 Nicholls, 1991) 본 실험에서는 시험관내 허혈 자극에 의한 $[^3H]5-HT$ 의 유리에 대한 fluoxetine의 영향을 검토하였다. 허혈 자극에 의한 대뇌 피질에서 $[^3H]5-HT$ 의 유리는 5-HT transport를 효과적으로 억제하는 fluoxetine($1\mu M$)에 의해 현저히 억제되었다(Fig. 5). 한편 영양액내 칼슘의 제거시 허혈에 의한 $[^3H]5-HT$ 의

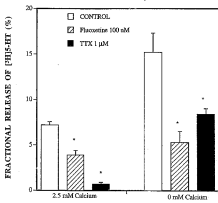


Fig. 5. Influences of removal of calcium, TTX and fluoxetine on the ischemia-evoked release of $[^3H]5-HT$ in rat hippocampal slices. Other legends are the same as Fig. 1. *: Significantly different from corresponding control value($p < 0.05$).

유리는 더욱 강화되었으며, fluoxetine의 억제 효과 역시 증대되었다.

고 안

본 연구에서 시험관내 허혈 자극은 백서 대뇌 피질 절편에서 유의한 $[^3H]5-HT$ 의 유리를 유발하였으며, 이러한 허혈의 효과는 Glutamate 유리 억제제, NMDA- 또는 non-NMDA수용체 길항제에 의해 억제되었다.

뇌 허혈에 의한 신경 전도 물질 유리의 연구에 있어서 생체내 실험 또는 시험관내 실험이 행해지고 있는 바 시험관내 실험은 몇 가지 장점을 가지고 있다. 즉, 이온, 가스 그리고 온도 등을 쉽게 조절할 수 있고, 뇌혈관 장벽이 없으므로 약물이 직접 세포 외액에 접근할 수 있으며, 생체내 실험에 필요한 마취제를 사용하지 않아도 되는 점이다. 그러나 이러한 장점에도 불구하고 현재 대부분의 연구는 생체내 실험을 통해서 이루어지고 있다. Kondoh 등(1994), Damsma 등(1990), Sarna 등(1990), Decombe 등(1993)과 Richards 등(1993)은 생

체내 투석(In vivo microdialysis)을 이용한 실험에서 경동맥결찰 또는 심장박자에 의해 유발시킨 일시적인 뇌 허혈 상태에서 5-HT의 유리를 보고하였으나, 현재까지 실험관내 실험으로 증명된 바는 없다. 본 연구에서 백서 대뇌 피질 절편으로부터 허혈 자극에 의한 $[^3H]5-HT$ 의 유리는 TTX, Mg^{2+} , MK-801, ketamine, DNQX 또는 carbapentane 등의 처리에 의해 현저히 억제되었다. TTX(Singer, 1974)는 voltage-dependent Na^+ channel을 억제하는 약물로써 본 연구에서 TTX가 허혈에 의한 $[^3H]5-HT$ 의 유리를 억제한 성적은 허혈의 $[^3H]5-HT$ 유리 효과에 voltage-dependent Na^+ channel의 활성화가 수반됨을 의미하는 것이다. 그리고 허혈 자극에 의한 $[^3H]5-HT$ 의 유리가 NMDA 수용체의 생리적 길항제인 Mg^{2+} (Mayer 등, 1984), 비경쟁적 길항제인 MK-801(Wong 등, 1986)과 ketamine(Anis 등, 1983), non-NMDA 수용체 길항제인 DNQX(Fletcher 등, 1988), 그리고 Glu 유리 억제제인 carbapentane(Annels 등, 1991)에 의하여 억제된 성적을 종합하면, 본 실험에서 허혈자극에 의해 glu성 신경의 depolarization이 선행되어 이 신경에서 glu가 유리되고, 유리된 glu는 5-HT성 신경세포에 존재하는 NMDA- 그리고 non-NMDA 수용체에 작용하여 $[^3H]5-HT$ 의 유리를 일으킴을 시사한다.

한편 본 연구에서 허혈 자극에 의한 $[^3H]5-HT$ 의 유리는 verapamil에 의해서는 영향받지 않았고, flunarizine과 w-conotoxinGVIA에 의해서 현저히 억제되었다. 그리고 ryanodine과 dantrolene에 의해서 유의하게 감소되었다.

허혈에 의한 세포내 유리 Ca^{2+} 농도의 증가는 허혈 손상의 주요한 요인으로 밝혀지고 있다(Siesjo, 1992). 일반적으로 신경세포에서 신경 전도 물질의 유리는 고칼륨, veratrine 또는 전기자극 등 탈 분극 자극에 의한 세포의 Ca^{2+} 의 유입에 따른 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가에 의해 유발되는 Ca^{2+} 의존형 exocytoses와 세포의 Ca^{2+} 농도에 무관하게 유리되는 Ca^{2+} 비의존형 유리가 있음이 알려져 있다. 신경조직에서 탈 분극에 의한 Ca^{2+} 의 유입은 평활근 또는 심근과는 달리 L, N, 그리고 P의 적어도 3 types의 Ca^{2+} channels을 통해 이루어지고 있음이 보고되어 있다(Tsien 등, 1991; Miller, 1992). 최근 Ooboshi

등(1992와 1993)은 백서 선조제에서 허혈의 dopamine 유리 효과가 -conotoxinGVIA와 isradipine에 의해 억제됨을 관찰하여 허혈시 DA성 신경의 탈 분극에 의한 Ca^{2+} 의 세포내 유입이 N-type 또는 L-type의 Ca^{2+} channels이 관여한다 하였다. 본 연구에서 L-type Ca^{2+} channel 억제제로 알려진 verapamil과 flunarizine은 허혈에 의한 $[^3H]5-HT$ 유리에 대해 서로 다른 영향을 보였다. Flunarizine은 조직 선택성과 Na^+ channel에 대한 효과에 있어서 verapamil과 차이가 있음이 보고(Nayler, 1988) 되어 있는 바, 본 실험에서 허혈에 의한 $[^3H]5-HT$ 유리가 verapamil에 의해서는 영향받지 않았으나 flunarizine에 의해서는 유의하게 억제된 성적은 아마도 이러한 차이에 기인할 것으로 추측된다. 그리고 N-type Ca^{2+} channel 억제제인 -conotoxinGVIA에 의해 허혈에 의한 $[^3H]5-HT$ 유리가 억제된 점은 dopamine의 경우와 같이 허혈시 유발되는 N-type Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+} 의 유입에 따른 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가가 $[^3H]5-HT$ 의 유리에 관여됨을 시사한다. 그런데, 세포내 Ca^{2+} 유리를 억제하는 dantrolene(Frandsen과 Achousboe, 1992)과 ryanodine은 허혈 자극에 의한 $[^3H]5-HT$ 의 유리를 유의하게 억제시켰다. 허혈시에 synaptosome 또는 절편 표본에서 glutamate의 유리는 주로 Ca^{2+} 비의존형에 의한다는 보고(Minc-Golomb 등, 1988; Pin과 Bockaert, 1989; Bernath와 Zigmond, 1990; McMahon 등, 1989)와 대뇌 피질 배양 표본에서 glu의 세포 독성이 세포의 Ca^{2+} 농도와 무관하며, dantrolene에 의해 억제된다 한 Frandsen과 Achousboe(1992)의 보고를 감안 할 때, 허혈에 의한 $[^3H]5-HT$ 의 유리에 동원되는 Ca^{2+} 이 세포의 뿐만 아니라 세포내 저장소에서의 유리를 통하여 이루어짐을 시사한다.

본 연구에서 허혈 자극에 의한 대뇌 피질에서 $[^3H]5-HT$ 의 유리는 fluoxetine(100 nM)에 의해 현저히 억제되었고, 영양액내 칼슘의 제거시 허혈의 $[^3H]5-HT$ 의 유리 효과는 더욱 강화되었으며, fluoxetine의 억제 효과 역시 증대되었다.

Ca^{2+} 의존형 exocytoses는 ATP가 필수적이며, voltage-sensitive Ca^{2+} channel 억제제 또는 세포외 Ca^{2+} 를 제거시 유리가 소실되나, Ca^{2+} 비의존형 유리는 대개의 경우 Ca^{2+} 의존형 exocytoses와 겹치

서 나타나며 세포내 ATP가 고갈된 상태에서는 세포막 내외의 Na⁺의 농도구배가 없어지므로 더욱 저명하게 나타남이 보고되어 있다 (McMahon과 Nicholls, 1991). 허혈상태하 Ca²⁺ 비의존형 신경전도 물질의 유리는 심근 (Schomig 등, 1988; Carlsson 등, 1987)과 췌관 표본 (Russ 등, 1991)에서 관찰되었고, bovine adrenal chromaffin cell (Dry 등, 1991)에서도 보고된 바 있다. Catecholamines의 Ca²⁺ 비의존형 신경전도 물질의 유리는 주로 amine transporter의 억제에 의하여 보고되어 있으며 (Paton, 1973; Raiteri 등, 1978; Parker와 Cubbedu, 1986; Hurd와 Ungerstedt, 1989), Gustafson 등 (1991)은 허혈에 의한 5-HT 유리가 desmethylinipramine에 의해 억제됨을 관찰하여 허혈시에 5-HT의 유리에 transporter의 억제에 의한 부분이 있음을 시사하였다. 본 실험의 결과는 이를 보다 명확히 증명하는 것이며, 영양액내 칼슘의 제거시 허혈의 [H]5-HT의 유리 효과에 대한 fluoxetine의 억제 효과가 증대된 점은 이 경우 [H]5-HT의 유리 증가가 transporter의 작용이 강화되어 초래됨을 시사한다.

본 연구에서 얻어진 성적을 종합하면, 허혈에 의한 [H]5-HT의 유리는 허혈에 의한 glu의 유리에 따른 NMDA- 또는 non-NMDA 수용체의 활성화에 의하며, 그 기전은 Ca²⁺ 의존형과 Ca²⁺ 비의존형 유리가 공존하며, Ca²⁺ 의존형의 경우 동원되는 칼슘은 세포외액으로부터 유입과 세포내 저장소로부터 유리에 의해 이루어짐을 시사한다.

결론

대뇌 허혈시 뇌내 monoamines의 대사가 변동되며, 이 monoamines에 의해 대뇌 손상의 정도가 영향을 받음이 보고되어 있으나, 허혈시 5-hydroxytryptamine (5-HT)의 유리 기전에 관해서는 자세히 알려진 바 없다. 본 연구는 백서 대뇌 피질에서 실험관내 허혈을 유발하여 이에 따른 [H]5-HT의 유리와 그 기전을 약리학적으로 규명한 것이다.

백서 대뇌 피질에서 용액내 포도당과 Mg²⁺을 제한 상태에서 5 분간의 허혈 자극에 의해 조직내 총 [H]5-HT의 약 6.5±0.6 %의 유리를 보였으며, 이러한 허혈 자극에 의한 [H]5-HT의 유리는 영양

액내 MgCl₂, glucose첨가 또는 TTX치리에 의해 완전히 억제되었으며, MK-801, ketamine, DNQX또는 carbetapentane 등의 처리에 의해 현저히 억제되었다.

허혈에 의한 [H]5-HT의 유리는 영양액내 glycine 존재시 유의하게 증가되었으며, DCQX 처리에 의해 유의하게 억제되었다. 한편 glycine에 의한 [H]5-HT 유리증대 효과는 DCQX전처리에 의해 억제되었다.

허혈에 의한 [H]5-HT의 유리는 verapamil에 의하여는 영향받지 않았고, flunarizine과 conotoxinGVIA에 의해서 현저히 억제되었으며, ryanodine과 dantrolene에 의해서는 유의한 감소를 보였다.

대뇌 피질에서 [H]5-HT의 유리는 5-HT transport억제제인 fluoxetine에 의해 현저히 억제되었다. 한편 영양액내 칼슘의 제거시 허혈에 의한 [H]5-HT의 유리는 더욱 강화되었으며, fluoxetine의 억제 효과 역시 증대되었다.

이상의 실험 성적은 백서 대뇌 피질에서 허혈에 의한 [H]5-HT의 유리는 glutamate의 유리에 따른 NMDA- 또는 non-NMDA 수용체 활성화에 의하며, 그 기전은 Ca²⁺ 의존형과 Ca²⁺ 비의존형 유리가 공존하며, Ca²⁺ 의존형의 경우 동원되는 칼슘은 세포외액으로부터 유입과 세포내 저장소로부터 유리에 의해 이루어짐을 시사한다.

REFERENCES

- Adachi N, Oishi R and Saeki K (1991) : Changes in the metabolism of histamine and monoamines after occlusion of the middle cerebral artery in rats. *J Neurochem* 57: 61-66.
- Anis NA, Berry SC, Burton NR and Lodge D (1983) : The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol* 79:565-575.
- Annels SJ, Ellis Y and Davies JA (1991) : Non-opioid antitussive inhibit endogenous gluta-

- mate release from rabbit hippocampal slices. *Brain Res* 564:341-343.
- Babbedge RC, Bland-Ward SL, Hart SL and Moore PK(1993) : Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitric indazole and related substituted indazoles. *Br J Pharmacol* 110:225-228.
- Blomqvist P, Lindvall O and Wieloch T(1985) : Lesions of the locus coeruleus system aggravate ischemic damage in the rat brain. *Neurosci Lett* 58:353-358.
- Bode-Greuel KM, Klich J, Horvath E, Glaser T and Traber J(1990) : Effects of 5-hydroxytryptamine_{1A}-receptor agonists on hippocampal damage after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil. *Stroke* 21(suppl IV):IV 164-166.
- Brierley JB(1976) : Cerebral hypoxia. In Blackwood W, Corsellis J.A.N. (eds): *Greenfield's Neuropathology*, ed 3. London: Edward Arnold, pp. 43-85.
- Busto R, Harik SI, Yoshida S, Scheinberg P and Ginsberg MD(1985) : Cerebral norepinephrine depletion enhances recovery after brain ischemia. *Ann Neurol* 18: 329-336.
- Carlsson L, Graefe KH and Trendelenburg U (1987) : Early intraneuronal mobilization and deamination of noradrenaline during global ischemia in the isolated perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol* 336:508-518.
- Cazeville C, Muller A, Meynier F, Bonne C (1993) : Superoxide and nitric oxide cooperation in hypoxia/reoxygenation induced neuron injury. *Free Radical Biol Med* 14:389-395.
- Choi DW and Rothman SM(1990) : The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci* 13:171-182.
- Craig CG and White TD(1992) : Low-level N-methyl-D-aspartate receptor activation provides a purinergic inhibitory threshold against further N-methyl-D-aspartate mediated neurotransmission in the cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 260(3):1278-1284.
- Damsma G, Boisvert DP, Mudrick LA, Wenkstern D and Fibiger HC(1990) : Effects of transient forebrain ischemia and pargyline on extracellular concentrations of dopamine, serotonin, and their metabolites in the rat striatum as determined by in vivo microdialysis. *J Neurochem* 54:801-808.
- Davies J, Francis AA, Jones AW and Watkins JC(1981) : 2-amino-5-phosphonovalerate (2APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. *Neurosci Lett* 21:77-81.
- Decombe R, Bentu Ferrer, Allain H, and Van den Driessche J(1993) : Alteration of aminergic neurotransmitter release after two consecutive transient global ischemias: An in vivo microdialysis study in rat. *Neurological Res* 15:192-197.
- Dry KL, Phillips JH and Dart AM(1991) : Catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells during anoxia or metabolic inhibition. *Circulation Research* 69: 466-474.
- Fletcher EJ, Martin D, Aram JA, Lodge D and Honore T(1988) : Quinoxalinediones selectively block quisqualate and kainate receptors and synaptic events in rat neocortex and hippocampus and frog spinal cord in vitro. *Br J Pharmacol* 95: 585-597.
- Frandsen A and Achousboe A(1992) : Mobilization of dantrolene-sensitive intracellular calcium pools is involved in the cytotoxicity induced by quisqualate and N-methyl-D-aspartate but not by 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl) propionate and kainate in cultured cerebral cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2590-2594.
- Ginsberg MD, Graham DI and Busto R(1985) : Regional glucose utilization and blood flow

- following graded forebrain ischemia in the rat: correlation with neuropathology. *Ann Neurol* 18:470-481.
- Globus MYT, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I and Ginsberg MD(1989) : Direct evidence for acute and massive norepinephrine release in the hippocampus during transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:892-896.
- Globus MYT, Ginsberg MD, Harik SI, Busto R and Dietrich WD(1987) : Role of dopamine in ischemic striatal injury. *Neurology* 37:1712-1719.
- Hara H, Sukamoto T and Kogure K(1993) : Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Prog Neurobiol* 40:645-670.
- Hurd YL and Ungerstedt U(1989) : Influence of a carrier transport process on in vivo release and metabolism of dopamine: Dependence of extracellular Na^+ . *Life Sci* 45:283-293.
- Ishida Y, Takagi K and Urakawa N(1984) : Tension maintenance, calcium content and energy production of the taenia of the guinea-pig caecum under hypoxia. *J Physiol(Lond.)* 347:149-159.
- Johnson JW and Ascher P(1987) : Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurones. *Nature* 325:529-531.
- Kondoh T, Korosue K, Lee SH, Heros RC and Low WC(1994) : Evaluation of monoaminergic neurotransmitters in the rat striatum during varied global cerebral ischemia. *Neurosurg* 35:278-286.
- Lindvall O, Auer RN and Siesjö BK(1986) : Selective lesions of mesostriatal dopamine neurones ameliorate hypoglycemic damage in the caudate-putamen. *Exp Brain Res* 63:382-386.
- Mayer ML, Westbrook GL and Guthrie PB (1984) : Voltage dependent block by Mg^{++} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature(London)* 309:261-263.
- McMahon HT, Barrie AP, Lowe M and Nicholles DG(1989) : Glutamate release from guinea-pig synaptosomes: Stimulation by reuptake-induced depolarization. *J Neurochem* 53:71-79.
- McMahon HT and Nicholls DG(1991) : The bioenergetics of neurotransmitter release. *Biochim Biophys Acta* 1059:243-264.
- Minc-Golomb D, Eimerl S, Levy Y and Scgramm M(1988) : Release of D-[3H]aspartate and [^{14}C]GABA in rat hippocampus slices: Effects of fatty acid-free bovine serum albumin and Ca^{++} withdrawal. *Brain Res* 457:205-211.
- Naylor WG(1988) : Chemistry of Calcium Antagonists. In *Calcium Antagonists*. Academic Press pp 45-68.
- Oobashi H, Sadoshima S, Ibayashi S, Yao H, Uchimura H and Fujishima M(1993) : Isradipine attenuates the ischemia-induced release of dopamine in the striatum of the rat. *Eur J Pharmacol* 233:165-168.
- Ooboshi H, Sadoshima S, Yao H, Nakahara T, Uchimura H and Fujishima M(1992) : Inhibition of ischemia-induced dopamine release by omega-conotoxin, a calcium channel blocker, in the striatum of spontaneously hypertensive rats: in vivo brain dialysis study. *J Neurochem* 58:298-303.
- Parker EM and Cubbedu LX(1986) : Effects of d-amphetamine and dopamine synthesis inhibitors on dopamine and acetylcholine neurotransmission in the striatum. I. Release in the absence of vesicular transmitter stores. *J Pharmacol Exp Ther* 237: 179-192.
- Paton DM(1973) : Mechanism of efflux of noradrenaline from adrenergic nerves in rabbit atria. *Br J Pharmacol* 49:614-627.
- Pin JP and Bockaert J(1989) : Two distinct mechanisms, differentially affected by exci-

- tatory amino acids, trigger GABA release from fetal mouse striatal neurones in primary culture. *J Neurosci* 9:648-656.
- Pulsinelli WA, Brierley JB and Plum F(1982) : Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11:491-498.
- Raiteri M, Cerrito F, Cervoni AM and Levi G (1978) : Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine. *J Pharmacol Exp Ther* 208:195-202.
- Richards DA, Obrenovitch TP, Symon L and Curzon G(1993) : Extracellular dopamine and serotonin in the rat striatum during transient ischaemia of different severities: A microdialysis study. *J Neurochem* 60:128-136.
- Russ H, Schomig E and Trendelenburg U(1991) : The energy requirements for the basal efflux of 3H-noradrenaline from sympathetically innervated organs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344:286-296.
- Sarna SP, Obrenovitch TP, Matsumoto T, Symon L and Curzon G(1990) : Effect of transient cerebral ischemia and cardiac arrest on brain extracellular dopamine and serotonin as determined by in vivo microdialysis. *J Neurochem* 55:937-940.
- Schomig A, Kurz T, Richardt G and Schomig E(1988) : Neuronal sodium homeostasis and axoplasmic amine concentration determine calcium-independent noradrenaline release in normoxic and ischemic rat heart. *Circ Res* 63:214-226.
- Siesjö BK(1992) : Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J of Neurosurg* 77:337-354.
- Singer SJ(1974) : The molecular organization of membranes. *Am Rev Biochem* 43:805-833.
- Cvejic V, Kumami K and Spatz M(1990) : Effect of cerebral ischemia on synaptosomal uptake and release of [3 H]-5-hydroxytryptamine in adult and young Mongolian gerbils. *Metabol Brain Dis* 5:1-6.
- Tsien RW, Ellinor PT and Horne WA(1991) : Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Trends in Pharmacol Sci* 12:349-354.
- Weinberger J, Nieves-Rosa J and Cohen G (1985) : Nerve terminal damage in cerebral ischemia: protective effect of alpha-methyl-para-tyrosine. *Stroke* 16:864-870.
- Welch KMA, Hashi K and Meyer JS(1973) : Cerebrovascular response to intracarotid injection of serotonin before and after middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 36:724-735.
- Welch KMA, Chabi E, Buckingham J, Bergerin B, Achar VS and Meyers JS(1977) : Catecholamines and 5-hydroxytryptamine levels in ischemic brain. *Stroke* 8:341-346.
- Wong EHF, Kemp JA, Priestly T, Knight AR and Woodruff GN(1986) : The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 83:7104-7108.
- Yoneda Y and Ogita K(1989) : Abolition of the NMDA-mediated responses by a specific glycine antagonist, 6,7-dichloroquinoxaline-2,3-dione(DCQX). *Biochem Biophys Res Commun* 164:841-849.
- Zervas N, Hori I, Negora M, Wurtzman R and Lavyne M(1974) : Reduction of brain dopamine following experimental cerebral ischemia. *Nature(London)* 247:283-284.