

모래쥐 대뇌의 일과성 허혈로 인한 뇌유도 신경영양성 인자(Brain-derived Neurotrophic Factor)의 유전자 발현 변화

고려대학교 의과대학 신경파학교실

박민규 · 고성범 · 박건우 · 이대희

The Expression of Brain-derived Neurotrophic Factor mRNA in Transient Cerebral Ischemic Model of Gerbil Mouse

Min Kyu Park, M.D., Ph.D., Seung Beom Koh, M.D., Ph.D.,
Kun Woo Park, M.D., Ph.D., Dae Hie Lee, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, College of Medicine, Korea University

Background : Brain-derived neurotrophic factors(BDNF) is critically involved in development and maintenance of the central and peripheral nervous system and the expression of its mRNA increases after various insults such as ischemia. If one takes the protective role of BDNF into consideration, it would be important to understand the mechanism of induction in BDNF mRNA. Although previous reports suggested the relationship between activation of N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor and induction of BDNF mRNA following ischemic insult, the mechanism is not clearly understood. **Methods :** In this experiment, in situ hybridization was used to study expression of mRNA for c-fos, heat shock protein 72, and brain-derived neurotrophic factor in the gerbil brain after 15 minutes of forebrain ischemia as well as with MK801 pretreatment before ischemia. **Results :** Transient ischemic insult caused the induction of c-fos and heat shock protein 72 mRNA expression which partially blocked by MK801 within 24 hours after reperfusion. From 30 minutes to 4 hours after the reperfusion, the level of brain-derived neurotrophic factor mRNA was increased in the granule cells of the dentate gyrus. In addition, the increase of BDNF mRNA was not influenced by NMDA receptor antagonist, MK801. **Conclusions :** The expression of BDNF mRNA after acute ischemia could be induced not by NMDA receptor related intracellular calcium change, but by some other factors which requires further effort to be solved. Finally, if the changes of mRNA expression lead to alterations in the relative availability of BDNF, this might influence functional outcome and necrosis following ischemia.

J Kor Neurol Ass 6(5):689~696, 1998

Key Words : Brain-derived neurotrophic factor, Ischemia, In situ hybridization, MK801

서 론

일과성 허혈발작은 허혈성 뇌혈관 질환의 하나로 최근 우리나라에서도 증가 추세에 있다. 일과성 뇌허혈은 일시적인 대뇌 혈류 공급 감소로 인하여 대뇌 산소 및 포도당이 감소하고 에너지의 부족 상태를 가져와 결국 뇌조직의 항상

성을 파괴시킨다. 이후 다시 뇌혈류의 공급이 시작되더라도 뇌조직의 괴사 현상 때문에 일과성 대뇌 허혈은 심각한 뇌 손상을 초래할 수도 있다. 특히 이러한 일과성 허혈 이후에 일어나는 뇌손상의 기전을 이해하고 세포 수준의 변화를 알기 위하여 여러 학자들이 세포사망에 관한 기전이나 신경보호 기능에 관한 연구들을 수없이 진행시켜 왔으나 아직도 충분한 설명을 제시하지 못하고 있다.

일과성 전뇌허혈(transient forebrain ischemia)에 의한 에너지 부족상태는 대부분 대뇌 유전자들의 발현과 전사(transcription)를 감소시키지만, 이와적으로 heat shock protein 72(이하 hsp)와 같은 스트레스 단백질, c-fos, c-jun, jun B, 및 zif 268과 같은 조기유전자, p53, 및 bcl-2와 같은 프로그램성 세포 사멸에 관여하는 유전자, GFAP(glial fibrillary acidic protein)와 같은

Manuscript received March 16, 1998.

Accepted in final form June 26, 1998.

* Address for correspondence

Dae-Hie Lee, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, College of Medicine,
Korea University, 126-1 Anam-dong 5Ga,
Sungbuk-Ku, Seoul, Korea
Tel : +82-2-920-5353 Fax : +82-2-923-2472
E-mail : daehlee@nuri.net

교세포 표식자, 혹은 TGF- β (transforming growth factor- β)나 TNF- α (tumor necrosis factor- α)와 같은 cytokine 등을 포함하는 유전자들의 발현은 오히려 증가한다고 알려져 있다.¹ 이들 중 특히 *c-fos*와 *hsp*는 일과성 뇌허혈 이후 24시간 이내에 예외없이 유전자 발현과 전사가 증가되어, 여러 뇌허혈, 뇌경색 및 저산소 뇌증 동물모델에서 뇌세포 손상의 표식자로 사용되어 왔다.²⁴

중추신경계 뿐만 아니라 말초신경계의 발생, 증식, 생존 및 성숙에 관여하는 신경영양성인자에는 신경성장인자(nerve growth factor, 이하 NGF), 뇌유도신경영양성인자(brain-derived neurotrophic factor, 이하 BDNF), 및 뉴로트로핀-3(neurotrophin-3, 이하 NT-3) 등이 있다. NGF와 BDNF는 NT-3와 함께 일과성 뇌허혈 이후 mRNA 발현의 변화를 보이며,^{1,6} 여러 원인의 대뇌 빈혈성 변화에 보호작용을 한다고 알려져 있다.⁷⁻⁹ 특히 흰쥐에서 뇌허혈 후 뇌혈류가 재관류되면 BDNF의 유전자는 24시간 이내에 발현이 증가하는데, 이러한 발현 증가의 기전은 충분히 밝혀져 있지 않다. 일부 학자들은 뇌허혈에 기인되는 glutamate의 분비 증가, N-methyl-D-aspartate(이하 NMDA) 수용체의 활성화 및 신경세포내 칼슘이온의 항상성 파괴가 BDNF 유전자 발현을 증가시킨다고 주장하였고,¹⁰⁻¹² Croll et al.¹³과 Nawa et al.¹⁴은 신경펩타이드의 증가 또는 칼슘결합 단백질 mRNA의 발현 증가가 BDNF 유전자 발현을 유도한다고 주장하고 있다.

뇌허혈시 일어나는 glutamate 분비증가와 이에따른 지연성 뇌손상으로 부터 뇌조직을 보호하는 NMDA 수용체 길항제에 관한 여러 연구가 진행되어 왔으며, 이중 비경쟁적 길항제인 MK801의 NMDA 수용체의 차단효과 및 세포 보호기능은 여러 논문에서 입증되어 왔다.¹⁵⁻¹⁷ 이에 이번 연구에서 해부학적으로 추골동맥과 내경동맥간의 문합(anastomosis)이 없어¹⁸ 일과성 허혈 발작 유도가 60%까지 가능한 모래쥐^{19,20}를 실험대상으로 총경동맥 혈류를 일시적으로 차단하여 편측 뇌에 일과성 전뇌허혈을 유도하고 여러 시간대별로 재관류 시켜 *c-fos*, *hsp* 및 BDNF의 유전자 발현을 관찰하여 현재까지 보고된 결과와 비교하고자 하였으며, 뇌허혈에 의한 NMDA 수용체 활성화가 이들 유전자의 발현변화와 관계있는지 확인하기 위해 MK801를 전치치하는 실험도 병행하였다.

대상 및 방법

1) 실험대상

실험대상은 60-80gm 내외의 동일한 조건에서 사육된 모래쥐(Mongolian gerbil)를 사용하였다. 실험대상은 크게 두군으로 실험군과 약물처치군으로 나누었으며 이들을 다시 각각 두군으로 세분하여 실험대조군, 허혈군, 생리식염수 전치치군 및 MK801 전치치군 등 네개 군으로 구분하였다. 실험군은 전경부를 절개한 후 총경동맥을 노출한 시키고 동맥을 견인하지 않은 실험대조군 30마리와 일과적으로 일측 총경동맥을 견인하여 15분간 혈류를 차단한 후 재관류시킨 허혈군 30마리로 구성하였다. 한편 약물처치군

은 생리식염수로 전치치한 후 같은 방법으로 뇌허혈을 유도한 생리식염수 전치치군 30마리와 MK801을 생리식염수와 같은 방법으로 전치치하여 동일한 조건을 만든 MK801 전치치군 30마리를 준비하여, 총 120마리를 네군으로 나누어 실험 대상으로 하였다. 이들 실험대상은 각군별로 처치 후 15분, 30분, 90분, 4시간, 6시간 및 24시간 동안 재관류시킨 후에 각 군에서 시간별로 5마리씩 뇌를 적출하여 *c-fos*, *hsp*, BDNF mRNA를 해마를 포함하는 수평절편에서 in situ hybridization으로 관찰하였다.

2) 실험방법

① 실험동물의 처리

실험동물은 수술 24시간 이전부터 물을 제외한 음식을 시키고 마취제로 Nembutal(pentobarbital sodium, 60mg/kg)을 복강내 주사한 후 마취여부를 확인하고 온도에 소식자를 두피하에 삽입하여 가열판을 이용하여 체온을 수술 시작부터 마취가 깨 때까지 체온을 35°C $\pm$ 1°C로 유지하였다. 복외위에서 목을 신전시켜 전경부를 노출시켜 정중부 절개선을 기한 다음 피하조직을 박리하고 수술 현미경 하에서 과속 흉쇄유돌근(sternocleidomastoid muscle)을 견인하여 견갑협근군(omohyoid muscle) 외측에 있는 총경동맥을 노출시킨 후 주변 구조물을 박리하였다. 6.5gm 무게의 추에 연결한 6.0 촉진사를 이용하여 총경동맥을 견인하여 15분간 혈류흐름을 차단시킨후 다시 재관류시켜 편측 일과성 전뇌허혈을 유도하였다. 실험대조군으로 동일 무게의 모래쥐에 sham operation한 시행하고 총경동맥을 견인하지 않은 모래쥐를 기준으로 선정 비교하였다. 한편 MK801(Research Biochemical International)을 뇌허혈 유발작 10분전에 복강내로 1mg/kg 씩 0.3cc 용량을 주사하여 MK801로 전치치한 군과 이와 동일한 조건으로 MK801 대신 같은 양의 생리식염수를 복강내에 주사하여 생리식염수 전치치군을 만들었다. 뇌허혈을 유도한 모든 실험대상에서 마취가 깨나면 편측 앞발과 다리에 전마비가 있는지 확인하였다.

② In situ hybridization

재관류를 시행한 후 15분, 30분, 90분, 4시간, 6시간 및 24시간에 나누어 희생한 실험 동물의 뇌를 적출하여 isopentane(dry ice로 미리 -70°C로 냉각)에 10초간 담겨 얼린 후 cryocut microtome을 이용해 12 μ m 해마절편을 얇아서 젤라틴을 입힌 슬라이드에 붙였다. 이 절편들을 고형액(4% paraformaldehyde in 1xPBS; phosphate buffered saline)에 10분간 고정된 후 PBS로 두차례 행군 다음 acetylation용액(0.25% acetic anhydride in 0.1M triethanolamine-HCl, pH 8.0)에 10분간 처리한 후 2xSSC(0.15M sodium chloride, 0.015M sodium citrate)로 두차례 행구고 염수 및 탈지 과정을 거쳐 공기중에서 말린 후 냉동고에 보관하였다. *c-fos*, *hsp*, BDNF의 유전자의 염기 서열(Table 1)에 특이한 비상보적(antisense)인 oligonucleotide를 DNA합성기(Applied Biosystems DNA

Table 1. Sequences of oligodeoxynucleotide probes.

Name	Probe sequences
<i>c-fos</i> ²¹	5' GGG ATA AAG TTG GCA CTA GAG ACG GAC GAG TCT GCG CAA AAG TCC TGT GTT 3'
<i>hsp72</i> ²²	5' CGA TCT CCT TCA TCT TGG TCA GCA CCA TGG 3'
BDNF ²³	5' AGT TCC AGT GCC TTT TGT TCA TGC CCC TGC AGC CTT CCT TCG TGT AAC CC 3'

synthesizer)로 제작하고 정제하여 terminal deoxy-nucleotidyl transferase (TdT)와 [³²S]dATP을 이용하여 3' 말단지법으로 표지하였다.

표지된 probe가 함유된 hybridization 용액(50% formaldehyde, 10% dextran sulfate, 0.7% polyvinyl pyrrolidin, 0.7% bovine serum albumin, 0.15M/ml yeast t-RNA, 0.33M/ml denatured salmon sperm DNA, 20M dithiothreitol)을 각 슬라이드당 60μl씩(1×10⁶cpm) 점적하고, coverglass로 덮은 후 37-40°C에서 16-24시간 반응(hybridization)시켰다. 반응이 끝나면 1×SSC로 30초간 헹군 다음 40°C에서 2×SSC와 50% formaldehyde에 15분씩 내뿜 수 세한 후 상온에서 1×SSC로 30초 헹군 다음 40°C에서 2×SSC/50% formaldehyde에 15분씩 내뿜 수 세한 후 상온에서 1×SSC로 30분씩 두 번 수세하고 증류수와 70% ethanol로 한번 헹군 다음 공기 중에서 말리고 이슬라이드들을 β-max hyperfilm에 일정한량의 동위원소가 함유된 기준(radioactivity standard) 슬라이드와 함께 2주간 노출시켜 현상하여 분석하였다.

결 과

1) 실험군

① 실험대조군

Sham operation만을 시행하고, 총경동맥의 혈류를 차단하지 않은 실험대조군에서 *c-fos*, *hsp*, BDNF의 유전자 발현은 처치 후 15분, 30분, 90분, 4시간, 6시간 및 24시간에서 모두 주로 치아이랑(dentate gyrus)과 대뇌피질 및 소뇌에서 거의 수준으로 미약한 발현을 보였다(Fig. 1).

② 허혈군

모래리에서 일과성 허혈 후 *c-fos* 유전자는 재관류 15분 후 병변측 치아이랑에서 발현증가를 시작으로 30분과 90분 사이에서 병변측 치아이랑, 선조체, 시상, 대뇌피질 및 해마에서 발현증가를 보였으며, 4시간이 경과하면서 병변측 치아이랑에서만 미약한 발현증가를 보였다(Fig. 1). *Hsp* 유전자는 허혈 후 재관류 15분부터 병변측 치아이랑에서 발현을 하였고, 30분과 4시간 사이에는 치아이랑, 선조체, 시상, 대뇌피질 및 해마에서 발현이 증가하였으며 재관류 4시간 후에 발현이 가장 강하였다(Fig. 1). BDNF의 mRNA는 90분부터 4시간 동안 재관류된 후 병변측 치아

이랑에 국소적으로 증가되었다(Fig. 1).

2) 약물 처치군

① 생리식염수 전처치군

허혈 10분전 복강내로 MK801과 같은양(0.3cc)을 주입하고 허혈군과 같은 방법으로 허혈 후 재관류시킨 생리식염수 전처치군에서는 *c-fos* 및 *hsp* mRNA와 BDNF의 mRNA의 발현이 허혈전만 유도하고 어떤 처치도 하지않은 허혈군과 동일하였다(Fig. 2).

② MK801 전처치군

MK801을 허혈 유도 전에 복강내로 주사한 MK801 전처치군은 MK801을 전처치하지 않은 허혈군과 생리식염수 전처치군 등과 비교할 때 *c-fos*와 *hsp* mRNA는 발현증가가 미약하였다(Fig. 2). *c-fos* mRNA는 재관류 30분이 경과하면서, *hsp* mRNA는 허혈 후 15분과 30분 사이에서 병변측 치아이랑에서만 약한 발현을 보였다. BDNF의 mRNA는 허혈군이나 생리식염수로 전처치한 군과 발현 차이없이 재관류 90분과 4시간 사이에 병변측 치아이랑에서 유전자 발현증가를 보였다(Fig. 2).

고 찰

선진국과 마찬가지로 최근 우리나라에서도 점차 의식주의 변화, 특히 식생활의 변화와 더불어 허혈관계 질환들이 증가하는 경향이 있으며, 과거보다 뇌경색을 포함하는 허혈성 질환들이 더욱 많아지는 경향이 나타나고 있다. 허혈관계 질환에 대한 원인 및 발생기전에 관한 연구들에서 여러 가설들이 제시되어 왔지만 아직도 충분한 설명은 이루어지지 않고 있으며, 여러 학자들에 의해서 허혈 이후 세포사망에 관한 기전 및 신경세포의 보호기능에 관한 연구들이 진행되고 있다.

사람에서 일어나는 임상적인 허혈상태와 유사한 전신성 허혈 및 초점성 허혈 모델 등 여러가지 동물실험의 모델들이 제시 되어왔다.²⁴ 이들 중에서 특히 세포사망 및 신경보호 기능에 관해서 관심을 끄는 모델은 일과성 불완전 전허혈(transient incomplete global ischemia)이다. 이번 연구에서는 임상적으로 일과성 허혈발작과 유사한 허혈상태를 만들기 위해 Suzuki et al²⁵의 뇌동맥을 결건하여 허혈류를 차단하는 일과성 전허혈 실험모델을 채택하였다. 실험방법에 있어서 허혈 후 뇌손상의 표지자인 *c-fos*와 *hsp*의 mRNA의 발현을 조사하기 위해 *in situ* hybridization 조직화학을 이용하였고, Curran et al²⁶의 주장에 의거하여 허혈 후 여러 실험군을 사이의 유전자 발현 정도를 비교하는데 병리적 소견이 없이도 정량화가 가능하였다. 실험동물의 총경동맥의 혈류를 차단하지 않은 실험대조군에서는 유전자가 거의수준으로 분포하는 대뇌 피질, 치아이랑, 및 소뇌에서만 미약한 발현을 보였고, 혈류를 차단한 허혈군에서는 병변측 치아이랑을 포함한 여러부위에서 발현이 증가하였다. 이와같은 결과는 동일방법인 *in situ* hybridization으로 조사한 Li et al,²⁴ Wessel et al²⁷과 Kinouchi et al²⁸의 연구결과와 발현시간 및 위치 상 발

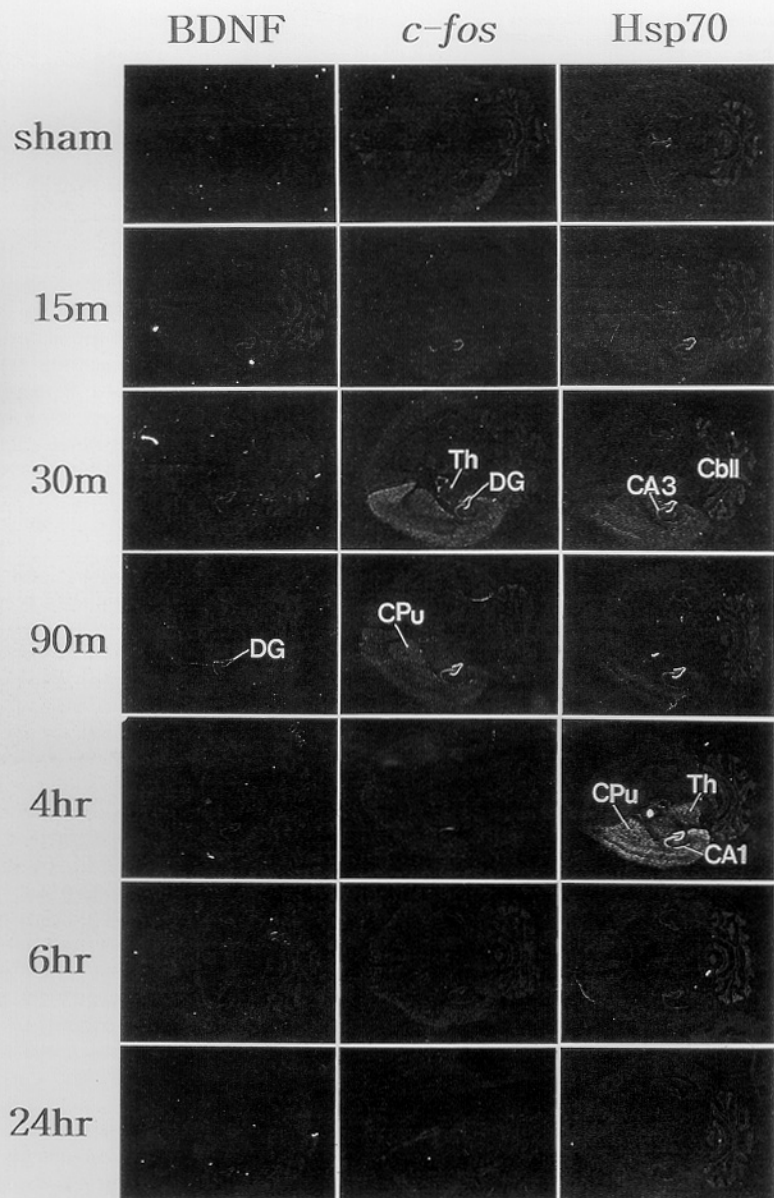


Figure 1. Effect of sham operation and transient cerebral ischemia on gene expression of *c-fos*, *hsp* and *BDNF* mRNA at different time interval(CA : Conus Ammonus, Cbl : Cerebellum, Cpu : Caudate nucleus and Putamen, DG : Dentate Gyrus, Th : Thalamus).

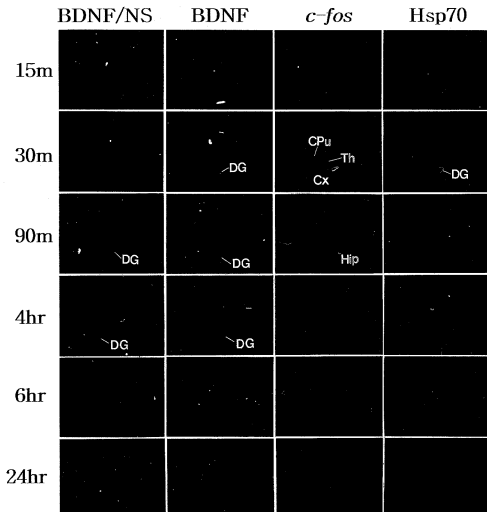


Figure 2. Effect of transient cerebral ischemia after pretreatment of normal saline and MK801 on change in gene expression of *c-fos*, *hsp*, and *BDNF* at different time interval.

현분포가 동일하였고, 실험동물에서 뇌허혈 유도방법이 적당하였다고 생각한다. 약물 처치군 중 생리 식염수를 주사한 군에서는 허혈군과 동일한 유전자 변화를 보였으나, MK801로 전처치한 군에서는 두 유전자 모두 발현이 허혈군과 생리식염수 전처치군보다 감소하였다. Collaco-Moraes et al¹⁴은 뇌허혈로 인한 에너지의 고갈 상태에서 활성화되는 glutamate와 NMDA 수용체에 의해 이들 유전자의 발현이 증가한다고 보고하였다. 일부에서 MK801의 독성효과가 대뇌 일부 즉 대사회전 후부(posterior cingulate gyrus), 뇌량 팽대부의 후부(retrosplenial cortex) 및 피질 신경원(cortical neuron)에서 *hsp* 유전자 발현을 유도한다고 지적하였으나,²⁷ MK801은 뇌허혈이나

kainic acid에 의한 해마 또는 대뇌피질의 뇌손상을 감소시켜 *hsp* 유전자의 발현도 감소시킨다.²⁸ Sharp et al²⁹은 MK801의 독성효과에 의한 대뇌 일부에서 *hsp* 유전자 발현증가 기전과 뇌손상 모델에서 NMDA 수용체를 길항하므로써 *hsp* 유전자 발현을 감소시키는 현상을 독립된 기전으로 보았다. 이번 연구의 MK801 전처치군에서도 NMDA 수용체 차단이 *c-fos* 및 *hsp* 유전자 발현을 감소시켜 이 두 유전자의 발현과 glutamate와의 연관성을 확인할 수 있었으며, 복강내로 투여한 MK801이 충분히 NMDA 수용체의 작용을 억제하였다고 생각된다.

실험관 연구에서 중뇌 흑질의 도파민성 신경세포, 팔린성 및 GABA성 신경세포들을 BDNF와 함께 배양하면 세

포논산이 감소하며, ^{30,33} 생체내 실험에서는 외상, ^{34,35} 변성적 변화, ³⁶ 저혈당 혼수, ³⁷ 또는 뇌허혈¹⁰⁻¹³ 등의 대뇌 스트레스에 대해 BDNF mRNA의 발현이 증가한다는 보고들이 있다. ^{13,25,38} 뇌허혈 이후 NMDA 수용체가 밀집해 있으며 뇌손상이 심한 해마의 CA1 부위에서는 BDNF mRNA의 발현이 비약한 반면, 뇌허혈에 비교적 손상이 적은 치아 이랑에서는 BDNF mRNA의 발현이 현저하였다. 이는 Ghosh et al³⁹과 Tsukara et al⁴⁰이 BDNF를 쥐의 뇌실에 직접 주사하여 일과성 허혈후 발생하는 해마부위의 뇌세포 손상을 감소시켰다는 보고와 부합되는 소견이라고 생각된다. 뇌허혈 이후에 발생하는 뇌조직 손상에 대한 BDNF의 보호작용에 많은 관심이 집중되면서 여러보고들이 발표되었다.^{4,8} 그러나 BDNF의 뇌허혈시 유전자 발현증가 기전 및 보호작용 기전에 대해서는 아직 논란이 많다.

뇌허혈 상태에서 흥분성 아미노산인 glutamate에 의한 신경세포외로의 칼슘의 농도증가가 지연성 뇌세포 손상을 초래한다.^{41,42} 이때 glutamate의 분비 증가 또는 이에따른 세포내 칼슘농도 변화가 BDNF의 유전자 발현을 증가시킨다는 주장이 있으며,⁴³⁻⁴⁵ 뇌허혈 후 glutamate의 증가에 의해 국소적으로 spreading depression 현상이 일어나며 이 현상에 의해 BDNF의 mRNA 발현이 유도된다는 주장도 있다.⁴⁶⁻⁴⁸ 또한 일부 학자들은 신경호르몬인자인 somatostatin 또는 neuropeptide Y의 농도증가 또는 칼슘과 결합하는 단백질인 calbindin과 parvalbumin의 mRNA의 발현증가가 뇌허혈 후 BDNF의 유전자 발현을 유도한다는 다른 기전을 제시하여 논란이 있다.^{10,13,14,40}

이런 연구에서 BDNF의 유전자는 실험대조군에서는 병변측과 병변 반대측에 차이가 없이 거의수준으로 발현하였고, 뇌허혈을 유도한 허혈군에서는, 병변측에서 모두 90분과 4시간의 재관류 이후 치아이랑에서 발현증가를 보였다. 이 결과는 다른 연구와 동일하였다.^{13,12} MK801 전처치군에서는 뇌허혈 유도 10분 전에 Shin et al⁴⁹의 실험과 동일한 방법으로 MK801을 복강내로 1mg/kg 용량을 주사하여 NMDA 수용체를 차단시켰다. 그 결과 병변측에서 역시 90분과 4시간의 재관류 후 치아이랑에서 발현증가를 보였고 이 효과는 허혈군 및 생리식염수 전처치군과 차이가 없었다. 따라서 이런 연구의 결과는 뇌허혈 이후 BDNF의 유전자 발현의 증가가 NMDA 수용체의 활성화와 이에따른 신경세포외의 칼슘증가로 BDNF의 유전자의 발현이 유도된다는 기존의 여러 연구들과는⁴³⁻⁴⁵ 다른 소견이었고, Linnvall et al¹⁰의 BDNF 허혈상태에서 발현이 증가하는 BDNF 유전자는 MK801에 영향을 받지 않는다는 연구결과와 일치하였다. 따라서 BDNF mRNA의 발현증가 기전에 대한 향후 연구가 필요하며, 이상의 결과에서 볼때 BDNF mRNA 발현은 NMDA 수용체 외에 어떤 다른 기전 혹은 다른 요소가 작용할 가능성을 시사한다.

결론

신경세포에 광범위하게 분포하면서 병적상태에 반응하여 신경보호기능을 나타낸다고 하는 신경영양성인자들이 뇌허혈

상태에서 보이는 변화와 그 기전을 알아보고자 본 연구를 시행하였다. 모래귀에서 일과성 허혈을 유도하고 c-fos, hsp 및 신경영양성인자의 mRNA를 *in situ* hybridization 방법으로 관찰한 결과, c-fos 및 hsp의 유전자가 일과성 뇌허혈 후 24시간 이내에 병변측 대뇌에서 발현증가를 나타내었다. 이와같은 방식에 앞서 MK801로 전처치하여 NMDA 수용체를 차단하였때 c-fos와 hsp mRNA는 발현이 감소하였다. 한편 BDNF 유전자는 허혈군, 생리식염수 전처치군 및 MK801 전처치군에서 차이가 없이 병변측 치아이랑에서 발현이 증가되어 기존의 연구결과들과는 다른 소견을 나타내었다. 이는 NMDA 수용체 길항제 투여에 의한 BDNF mRNA 발현기전에 또 다른 요소가 작용하였음을 의미하는 결과라고 생각한다.

REFERENCES

- Weissner C, Hossman KA. *Clinical pharmacology of cerebral ischemia*. Ottawa Human press 1997;1033-1035.
- Onodera H, Kogure K, Ono Y, et al. Proto-oncogene c-fos is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 1989;98:101-114.
- Abe K, Tanzi RE, Kogure K. Induction of HSP 70 mRNA after transient ischemia in gerbil cerebral cortex. *Neurosci Lett* 1991;125:166-174.
- Collaco-Moraes Y, Aspey YBS, DeBellerroche JS, Harrison MJ. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to MK801. *Stroke* 1994;25:1855-1861.
- Merlio JP, Emfors P, Kokaia Z, et al. Increased production of the trkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron* 1993;10:151-164.
- Holzman DM, Killbridge J, Li Y, et al. TrkA expression in the CNS: evidence for the existence of several novel NGF-responsive CNS neurons. *J Neurosci* 1995;15:1567-1576.
- Enfors P, Wetmore, Olson L, Persson H. Identification of cells rat brain and peripheral tissue expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 1990;7:165-176.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor brain derived neurotrophic family. *Nature* 1990;344:339-341.
- Ebendal T. Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J Neurosci Res* 1992;32:461-470.
- Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, et al. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived factor and neurotrophin-3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:648-652.
- Comelli MC, Guidolin D, Seren MS, et al. Time course, localization and pharmacological modulation of immediate early inducible genes, brain-derived neurotrophic factor and trkB messenger RNAs in the rat brain following

- photochemical stroke. *Neuroscience* 1993;55:473-490.
12. Takeda A, Onodera H, Sugimoto A, Kogure K, Orinata M, Shibahara S. Coordinated expression messenger RNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience* 1993;55:23-31.
13. Croll SD, Weigand SJ, Anderson KD, Lindsay RM, Nawa H. Regulation of neuropeptide in adult rat forebrain by the neurotrophins BDNF and NGF. *Eur J Neurosci* 1994;6:1343-1353.
14. Nawa H, Pelleimounter MA, Carbahian J. Intraventricular administration of BDNF increases neuropeptide expression in new born rat brain. *J Neurosci* 1994;14:3751-3765.
15. Kochhar A, Zivin JA, Lyden PD, Mazzarella V. Glutamate antagonist therapy reduces neurologic deficit produced by focal central nervous system ischemia. *Arch Neurol* 1988;45:148-155.
16. Fieschi C, Argentino C, Lenzi GL, et al. Clinical and instrumental evaluation of patients with ischemic stroke within the first six hours. *J Neurol Sci* 1989;91:311-319.
17. Landau WM. Au clair de lune: holy, wholly, holey logic. *Neurology (NY)* 1990;72:336A.
18. Harrison MJC, Brownbill D, Lewis PD, Russel RWR. Cerebral edema following carotid artery ligation in the gerbil. *Arch Neurol* 1973;28:389-391.
19. Kahn KJ, Lawrence EP, Franzarone GF. The use of dextran 40 in modifying the course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology* 1971;21:400-408.
20. Kahn KJ. The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology* 1972;22:510-515.
21. Garcia JH. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke* 1984;15:5-14.
22. Suzuki R, Yamaguchi T, Li CL, Klatzo I. The effects of 5-minutes ischemia in Mongolian gerbils: Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA1 sector of hippocampus. *Acta Neuropathol(Berl)* 1983;60:217-222.
23. Curran T, Yamaguchi T, Li CL, Klatzo I. The effects of 5-minutes ischemia in Mongolian gerbils: Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA1 sector of hippocampus. *Acta Neuropathol(Berl)* 1983;60:217-222.
24. Li Y, Chopp M, Garcia JH, et al. Distribution of the 72 kd heat shock protein as a function of transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1992;23:1292-1298.
25. Wessel TC, Joh TH, Volpe BT. In situ hybridization analysis of c-fos and c-jun expression in the rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res* 1991;567:231-240.
26. Kinouch H, Sharp FR, Hill MP, Kolstah J, Sagar SM, Chan PH. Induction of 70kDa heat shock protein and hsp mRNA following transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13:105-115.
27. Kurokawa A, Nishida DG, Park CK, McCulloch J. Effect of NMDA antagonists, MK-801 and CPP, upon local cerebral glucose use. *Brain Res* 1989;496:268-284.
28. Planas AM, Soriano MA, Ferrer I, Farre ER. Kainic acid-induced heat shock protein, mRNA and protein expression is inhibited by MK-801 in certain rat brain regions. *Eur J of Neurosci* 1995;7:293-304.
29. Sharp FR, Jasper P, Hall J, Noble L, Sagar SM. MK-801 and ketamine induce heat shock protein HSP72 in injured neurons in posterior cingulate and retrosplenial cortex. *Ann Neurol* 1991;30:801-809.
30. Hofer MM, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature* 1988;331:261-262.
31. Oppenheim RW, Qin-Wei Y, Prevatt D, Qiao Y. Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature* 1992;360:755-757.
32. Sendtner M, Holtman B, Kolbeck R, Thoenen H, Bard YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in new born rats after nerve section. *Nature* 1992;360:757-759.
33. Yan Q, Elliot J, Snider WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature* 1992;360:753-755.
34. Hughes P, Beilharz E, Gluckman P, Dragunow M. Brain-derived neurotrophic factor is induced as an immediate early gene following N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Neuroscience* 1993;57:319-328.
35. Mudo G, Persson H, Timmusk T, Funakishi H, Biondi M, Belluardo N. Increased expression of trkB and trkC messenger RNA in the rat forebrain after focal mechanical injury. *Neuroscience* 1993;57:901-912.
36. 박민규, 김 현, 이태희. 원위 편측 도파민성 신경계 소실 이 신경영양성 인자들의 유전자 발현에 미치는 영향. *대한신경과학회지* 1995;3:425-437.
37. Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* 1994;17:490-496.
38. Cheng B, Mattson MP. NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res* 1994;640:56-67.
39. Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 1994;263:1618-1623.
40. Tsukahara T, Yonekawa Y, Tanaka K, et al. The role for brain-derived neurotrophic factor in the transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurosurgery* 1994;2:323-331.
41. Benveniste JW, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of extracellular concentration of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984;43:1369-1374.
42. Shimada N, Graf R, Rosner G, Wakayama A, George CP, Heiss WD. Ischemic flow threshold for extracellular glutamate increase in cat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:603-606.
43. Zafra F, Hengeler B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D.

- Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 1990;9:3545-3550.
44. Memezawa H, Smith ML, Siesjo K. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1992;23:552-559.
45. Zafra F, Lindholm D, Castren E, Hartikka J, Thoenen H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J Neurosci* 1992;12:4793-4799.
46. Gorelova A, Koroleva AV, Amemori T, Pavlik V, Bures J. Ketamine blockade of cortical spreading depression in rats. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol* 1987;66:440-447.
47. Lauritzen M, Rice ME, Okada Y, Nicholson C. Quisqualate, kainate and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum. *Brain Res* 1988; 475:317-327.
48. Marranes R, Willems R, De Prins E, Wauquier A. Evidence for the role of N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res* 1988;457:226-249.
49. Shin K, Kim H, Choi S, Cho S, Chun Y, Chun B. Changes of glutamate and polyamine levels of hippocampal microdialysates in response to occlusion of both carotid arteries in mongolian gerbils. *Korean J of Pharmacology* 1994 ;30:273-289.
50. Ernfrös P, Ibanez CF, Ebendal T, Olson L, Persson H. Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor : Developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5454-5458.