원 저

대한신경과학회지 17(6):861~868, 1999 ISSN 1225-7044

Trimethyltin으로 유발된 해마 신경세포 사멸의 기전

충북대학교 의과대학 신경과학교실, 성모자애병원 소아과*

한 설 희 정 승 연*

Trimethyltin-Induced Hippocampal Neurodegeneration is Possibly Mediated by Induction of Apoptosis

Seol-Heui Han, M.D., Seung-Yun Chung, M.D.*

Department of Neurology, Chungbuk National University Hospital,
*Department of Pediatrics, Our Lady of Mercy Hospital**

Background : Trimethyltin (TMT) is a neurotoxicant which produces a distinct pattern of neuronal cell death in the hippocampus following systemic administration of a single dose. However, the mechanism of selective neuronal death remains unclear. We performed this study to elucidate the underlying mechanism of TMT-induced hippocampal neuronal death. **Methods** : The effects of trimethyltin (8.0mg/kg, i.p., single dose) on the hippocampal neurons were investigated in terms of changes in the neurobehavioral status, histologic, and electronmicroscopc findings. **Results** : Behaviorally, TMT treatment caused stereotypic limbic system dysfunction, i.e. tremors, spontaneous seizures, vocalization, hyperactivity, hyperexcitability, intraspecific aggression as described previously. Morphologically, TMT produced prominent neurodegeneration in the dentate gyrus. Widespread, strong glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity, which was suggestive of reactive astrogliosis, was noted throughout the hippocampal subfields. Many degenerating neurons were TUNEL positive. Electron microscopic findings revealed characteristic features of apoptosis in the dentate granule cells. NADPH-diaphorase positive cells were spared after TMT exposure. **Conclusions** : It is suggested that TMT-induced hippocampal degeneration might be a useful in vivo model for the study of learning and memory, neuronal-glial interactions, and selective neuronal apoptosis.
J Korean Neurol Assoc 17(6):861~868, 1999

Key Words : Trimethyltin (TMT), Selective neurodegeneration, Hippocampus, Dentate granule cells, Apoptosis

서 론

유기주석 화합물 (organotin compound) 의 일종인 trimethyltin (TMT) 은 농업용 또는 산업용으로 많이 이용되는 주석화합물 조제과정 중 생성되는 중간 화합물로서 중추신경계에 강력한 독성을 나타낸다.[1] TMT에 중독된 실험동물은 특징적으로 진전, 자발성간질, 미부훼손 (tail mutilation), 소리내기 (vocalization), 자극과민성 (irritability), 반응성항진 (hyperreactivity), 동종간의 과도한 공격성 (intraspecific aggression) 등 변연계 손상을 시사하는 이상 신경행동을 나타내는데 신경병리학적으로는 해마 치상회 (dentate gyrus) 의 과립세포 및 아몬각의 추체세포, 신피질, 편도핵 등 특정부위의 신경세포에 선택적 손상이 관찰된다. 이러한 신경세포의 퇴행성변화는 실험동물의 종, 투여된 TMT의 농도, 양 등에 따라 손상 범위와 정도가 다르게 나타난다.[2,3] TMT에 의해 유발되는 해마 신경세포 손상의 기전에 대하여 아직 확실히 밝혀진 사실은 없으나 설치류에서 관찰되는 비가역적 해마의 손상이 치매를 유발하는 알쯔하이머병과 유사점을 공유하고 있기 때문에 최근에는 TMT에 손상된 설치류를 기억장애의 모델로 많이 사용하고 있다.[4,5] TMT에 의해 유발되는 선택적 신경세포사멸의 기전에 대하여서는 신경세포에 대한 직접적인 독성작용에 의한다는 in vitro 실험결과[6]와 교세포항상성의 변화 (perturbation of glial homeostasis) 에 의한 간접 손상에 의한 것이라는 주장[7,8] 등 아직 일치된 견해는 없다. 또한 지금까지의 연구에 의하면 해마 신경세포의 변성은 수초 내 부종 (intramyelinic edema) 에 의한 것이 아니고 주로 세포괴사에 의한 것으로 알려져 있다.[9,10] 그러나 단 1회 TMT를 투여한 동물에서 수일 내지 수주간에 걸쳐 지속적인 신경

Manuscript received July 16, 1999.
Accepted in final form August 20, 1999.
* Address for correspondence
Seol-Heui Han, M.D.
Department of Neurology,
Chungbuk National University Hospital
Gaeshin-dong 62, Heungduk-ku, Cheongju,
Chungbuk, 361-711, Korea
Tel : +82-431-269-6372, Fax : +82-431-276-8923
E-mail : shhan@med.chungbuk.ac.kr
* 본 연구는 Esai Korea 및 아주대학교 뇌질환연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의한 것입니다.

행동학적 이상의 변화가 관찰되는 것으로 미루어 단순한 신경세포 괴사 이외 지연성 신경세포 손상이 관여하며 이 때 아포토시스와 같은 기전이 관여할 것이라는 가정을 할 수 있다. 본 연구에서는 TMT 중독에 의한 선택적 신경세포사멸에 대한 기전을 체계적으로 규명하기 위하여 Sprague-Dawley계 백서에 TMT 중독을 유발한 다음 1) 신경행동학적 관찰, 2) 조직화학 검사와 면역조직화학기법을 이용하여 손상된 부위의 형태학적 관찰을 시행하였으며, 3) TUNEL staining 및 전자현미경 기법을 이용하여 신경세포 사멸의 기전에 아포토시스가 관여하는 가를 조사하였다.

대상 및 방법

1. 사용된 시약

실험에 이용된 시약은 다음과 같다.

Trimethyltin hydroxide (Alpha Products, Danvers, MA, U.S.A.); proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany); The polyclonal antibody to glial fibrillary acidic protein (GFAP, Dako Corp. Carpinteria, CA, U.S.A.); biotinylated anti-mouse secondary IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A); 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A.); lectin (Banderiraea simplicifolia BS-4, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A.); Vectastain Elite immunohistochemistry kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.); "In Situ Cell Death Detection Kit, POD" (Boehringer Manheim, Germany). 그 밖에 사용된 모든 화학물질은 reagent grade이었다.

2. 실험동물

주령 8주의 SPF급 Sprague-Dawley 계 백서를 대한실험동물(주)에서 구입하여 2주간 실험실 조건에 적응시켰다. 실내 온도 21±2 ℃, 습도 50±5 %로 유지시키며 실험 당일까지 마우스사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군 백서 (n=4, each group) 는 무작위로 선택하여 TMT (8.0 mg/kg, body weight) 를 복강내 1회 주입하였다. 대조군 백서 (n=4) 는 동일 용량의 생리 식염수를 복강내 주입하였다. 예비 실험에서 TMT 중독된 백서가 서로에게 과도한 공격성을 나타내는 것이 확인되어 모든 실험동물은 cage당 2마리씩 사육하며 행동관찰을 시행하였다.

모든 실험과정은 충북대학교병원 실험동물 관리지침에 따랐다.

3. 조직의 준비 및 형태학적 관찰

1) 뇌조직의 준비

TMT 투여 후 행동이상을 관찰하였으며 제 2일, 4일, 7일 후에 실험군과 대조군을 sodium pentothal (100 mg/kg, i.p.; Abbot Laboratories) 로 깊이 마취시킨 다음 경심관류 고정 (transcardial perfusion) 하였다. 구체적으로, 냉장 보관된 생리식염수를 먼저 2 ml/kg로 1분간 관류시킨 다음 4 % paraformaldehyde in 0.1 M PBS, 3~4 ml/kg로 관류시켰다. 관류 후 2시간 동안 냉장 보관한 다음 뇌조직에 손상이 가지 않도록 조심스럽게 분리하였다. 분리된 뇌를 midsagittal plane에 따라 양분하여 동일한 고정액에 액침시켜 4 ℃에서 밤새 후고정 (post-fixation) 하였다. 조직의 동결보호 (cryoprotection) 를 위하여 고정된 조직을 15 %, 20 %, 25 %의 sucrose 용액에 차례로 침적시켰다. 조직은 cryotome을 이용하여 5~10 μm 두께로 동결 절편을 얻어 poly-L-lysine (Sigma) coated microscope slide에 mounting 하거나 vibratome series 1,000을 이용하여 25~35 μm 절편을 얻어 free floating technique을 사용하였다. 고정된 조직의 일부는 여러 농도의 ethanol을 이용하여 탈수 시켜 파라핀 포매한 다음 6~8 μm 두께의 연속절편을 얻고 매 10번째 절편마다 anatomical orientation 및 신경세포손상의 정도를 평가하기 위해 hematoxyllin and eosin 염색과 cresyl violet 염색을 시행하였다.

2) NADPH diaphorase histochemistry and Immunohistochemistry

① NADPH-diaphorase histochemistry : NADPH-diaphorase histochemical stain과 nitric oxide synthase (NOS) 면역조직화학 기법은 nitric oxide (NO) 를 국소화 (localization) 하는데 아주 유용한 방법이다. 그런데 NOS를 함유하고 있는 신경세포는 각종 퇴행성질환이나 신경독성에 저항성을 나타내는 것으로 알려있다. TMT에 의해 유발된 해마 신경세포 사멸에 NOS 함유세포가 어떠한 변화를 나타내는지 관찰하기 위하여 NADPH-diaphorase histochemistry를 시행하였다. 35 μm 두께의 절편을 free floating technique을 사용하여 염색하였다. 실온에서 10 % methanol/ 3 % H_2O_2 solution에 5분간 전처치한 조직 절편을 NADPH, Tritron X-100, NBT mixed solution에 넣어 aluminum foil로 wrapping하여 광선을 차단한 다음 37 ℃ 수조에서 1시간 내지 2시간 동안 배양하였다. 짙은 청색으로 변색된 것을 확인한 후 발색반응을 종결시켰다. 0.1 M PBS로 수 차례 세척한 다음 poly-L-lysine coated slide에 mounting하였다. 빛이 차단된 상태에서 밤새 공기건조 시킨 다음 Xylene jar에 3분씩 3회 침적하여 cover slip 후 광학현미경으로 관찰하였다.

② GFAP immunohistochemistry : vibratome cut 된 40 μm 절편을 methanol-H_2O_2 용액에 전처치한 다음 1차 항체인 GFAP polyclonal Ab (1:250) 와 실온에서 60분 반응시킨 후 4 ℃에 overnight 방치하였다. 수 차례 0.1 M PBS로 세척한 후 이차 항체인 biotinylated anti-mouse secondary IgG (Vector Laboratories, CA) 와 반응시킨 후 Vectastain Elite avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) Kit로 처리한 다음 실온에서 DAB 용액에 20~30분 가량 발색반응 시켰다. 발색반

응이 종료된 절편을 poly-l-lysine coated slide에 mounting하여 현미경하에서 관찰하였다.

3) Silver impregnation methods

인지질 세포막이 잘 유지되어 있는 정상 신경세포와 세포막이 손상되어 퇴행성 변화를 나타내는 신경세포를 구분할 수 있는 도은 염색은 Scallet의 방법을 원용하였다.[11] 약술하면 4 % paraformaldehyde에 고정된 뇌조직을 Vibratome series-1,000을 이용하여 40 ㎛ 두께의 절편을 얻었다. free-floating section을 2차 증류수로 세척한 다음 100 ml 0.75 % silver nitrate, 2.5 ml 0.5 % cupuric nitrate, 4 ml pyridine 용액에 5분간 전처치하였다. 이어서 9 % sodium hydroxide, 16 % (w/v) ammonium nitrate, 50 % (w/v) silver nitrate impregnating solution에 10분간 작용시킨 다음 수 차례 세척 후 1.2 % ammonium nitrate가 함유되어 있는 현상액으로 발색시켜 gelatin coated slide에 마운팅하였다. 현상액은 6 ml 37 % formaldehyde, 40 ml 95 % ethanol, 280 ml dd water에 0.2 g anhydrous citric acid를 용해한 다음 pH를 5.8~6.1로 조절하여 dd water를 첨가하여 최종 용적이 400 ml이 되게 조제하였다.

4) TUNEL staining

아포프토시스의 형태학적 특징인 fragmented DNA의 존재를 확인하기 위하여 in situ DNA fragmentation detection이 가능한 TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique을 사용하였다. Horseradish peroxidase의 사용으로 sensitivity가 개선된 "In Situ Cell Death Detection Kit, POD"를 이용하였다. 파라핀 슬라이드를 60 ℃ oven에 20분 가열한 다음 표준 방법으로 파라핀을 제거하고 함수 (rehydration) 시켰다. 조직 표본을 proteinase K (20 ug/ml in 10 mM Tris/Hcl, pH 8.0) 로 30분간 37 ℃에서 배양하였다 수 차례 PBS로 세척한 후 endogenous peroxidase 활성을 억제하기 위하여 0.3 % H_2O_2-methanol 용액으로 37 ℃ 배양기에 30분간 처리하였다. 이후 TdT, reaction buffer 등 TUNEL reaction mixture를 조직에 작용시켜 37 ℃ 배양기에 60분간 방치하였다. PBS로 3회 세척한 다음 Converter-POD 처리하여 37 ℃ 배양기에 30분간 반응시켰다. 반응 종결 후 DAB-substrate 용액으로 12분 정도 발색시키고 graded alcohol 및 Xylene에 차례로 침적시켜 coverslip하였다. Frozen section된 thymus를 positive control로 사용하고 negative control은 TdT enzyme 대신 증류수를 사용하여 동일한 조건하에서 염색하였다. 모든 반응 시 조직의 건조를 방지하기 위하여 특수 제작된 humidified chamber를 사용하였다.

5) 전자현미경 관찰

전자현미경 관찰을 위하여 절개된 조직 중 일부를 2.5 % paraformaldehyde-glutaraldehyde (4 ℃, phosphate buffer, pH7.2) 로 하룻밤 후고정하였다. 이후 0.1 M PB 용액으로 30분씩 3회 세척하고 1 % Osmium tetroxide 용액에서 다시 1시간 고정하고 0.1 M PB 용액으로 15분씩 3회 세척한 다음 ethanol 농도 상승순으로 탈수하였다. 탈수를 마친 조직은 propylene oxide 용액에 각 20분씩 3회 침투시켰다. 이후 여러 농도의 Epon: propylene oxide 혼합용액 (Polyscience) 에 각각 1시간 (1:2), 2시간 (1:1), 12시간 (2:1) 침적시킨 다음 마지막으로 순수 Epon을 2시간동안 침투시킨 다음 60 ℃에서 3일간 중합반응시켰다. 1 ㎛의 준초박절편을 제작하여 toluidine blue (1 % borax) 로 hot plate (60 ℃) 상에서 2분간 염색한 다음 광학현미경으로 관찰하였다. 중심관찰부위를 결정한 후 50 nm 내지 60 nm의 초박절편을 만들어 copper grid에 부착시킨 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경 (Hitachi H-7100, Tokyo, Japan) 으로 80 kV에서 관찰하였다.

결 과

1. 신경행동학적 관찰

TMT 투여 후 12시간에 이르러 대부분 전신성 진전을 나타냈으며 2일 후부터 과흥분상태, 자극과민성 등이 나타나기 시작했다. 제 4일째 공격성이 가장 두드러지게 나타났으며 조그만 자극에도 예민한 반응을 나타내고 자발성 전신성 발작도 관찰되었다. 같은 cage 안에 있는 다른 동물을 물어뜯는 등 공격성을 나타냈으나 다른 연구에서 관찰되었던 자기 자신의 미부훼손은 나타나지 않았다.

2. TMT-induced histopathology in the hippocampus

H & E 염색에서 특이한 소견이 관찰되었다. 이전에 이루어진 연구에 의하면 선택적 해마 손상에 가장 취약한 세포는 CA3, CA4의 원추세포이고 주로 세포괴사에 의한 탈락이었다. 그러나 본 연구에서는 TMT 투여 후 2일, 4일, 7일 각 시점에서 동일하게 원추세포 보다는 치상회의 과립신경세포 손상이 현저하게 관찰되었는데 세포질이 호산성으로 수축되며 핵의 크로마틴이 농축되어 뭉쳐지고, 많은 수에서 핵이 수축되어 여러 개로 갈라져서 광학 현미경 수준에서도 아포토시스를 시사하는 소견이 뚜렷이 나타났다 (Fig. 1A,B,C). 이러한 소견들은 신경세포의 퇴행변성에 민감도가 높은 것으로 알려진 도은염색기법 (silver impregnation staing) 에 의해 더욱 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig. 2B). 교세포, 특히 성상교세포의 반응을 관찰하기 위하여 GFAP 면역화학염색을 시행하였는데 GFAP 면역활성이 강하게 양성으로 발현된 성상교세포들의 증식이 뚜렷이 관찰되었다 (Fig. 1D~I). 그러나 GFAP mRNA의 정량적 분석은 시행하지 않아 각 시점의 상대적 활동도는 비교할 수 없었다. nitric oxide 합성효소 (nitric oxide synthase, NOS) 를 함유하고 있는 신경세포의 변화를 관찰하기 위하여 NADPH-diaphorase 조직화학검사를 시행하였는데 NOS 함유세포의 형태나 염색도가 잘

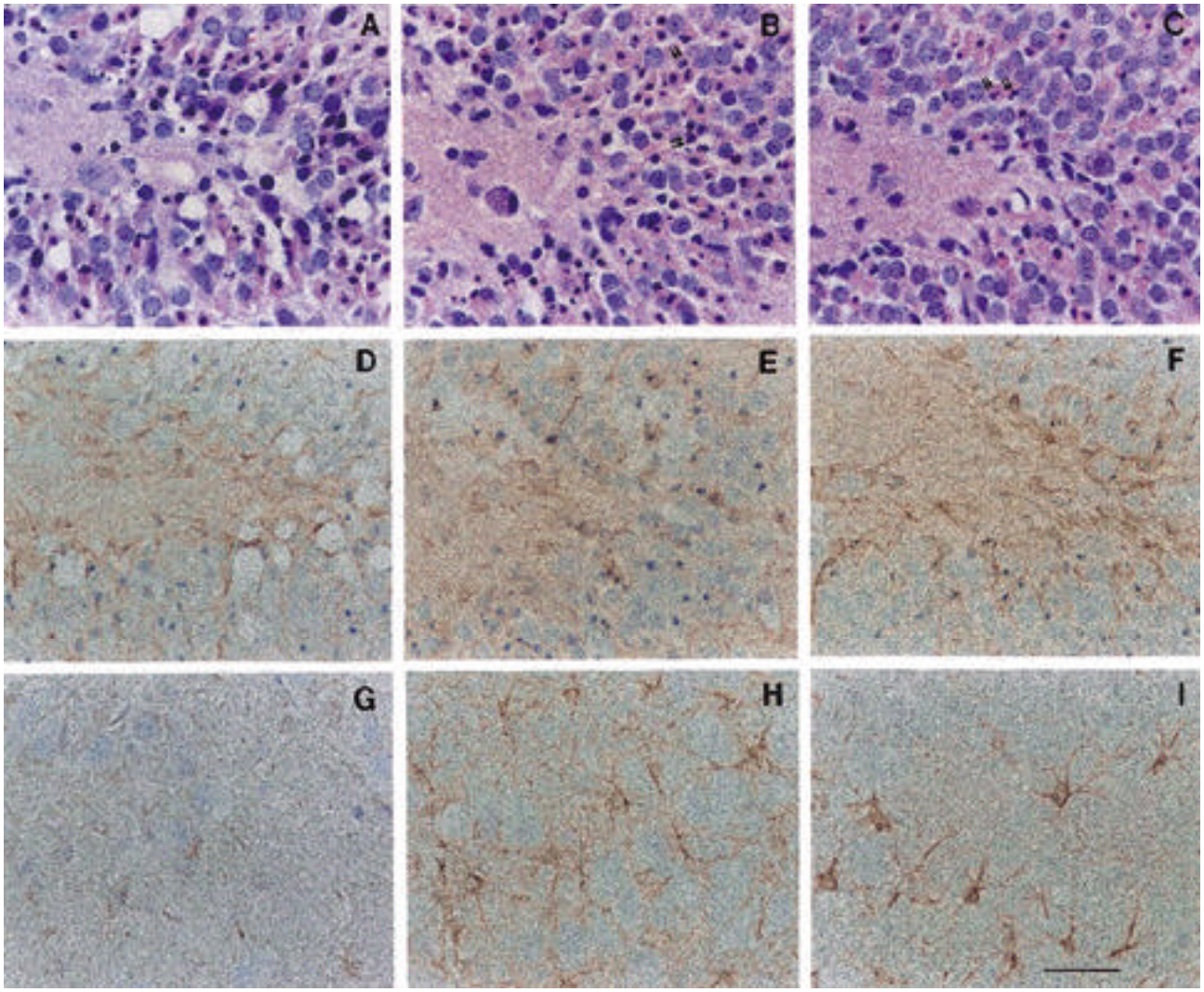

Figure 1. Photomicrographs of H & E stained (A-C) and GFAP immunostained sections of the hippocampus 2 (A, D, G), 4 (B, E, H), and 7 (C, F, I) days after TMT intoxication. Numerous degenerating neurons are evident in the dentate granule cells. Double arrows indicate segmented nuclei with eosinophilic cytoplasm, which are suggestive of apoptosis (A, C). Note the difference in immunoreactivity between day 2 (D, G) and day 7 (F, I). Reactive hypertrophied astrocytes with apparently stronger GFAP immunoreactivity are seen at day 7 (I). Original magnification, ×400 (bar=32 μm).

유지되어 있어서 이 세포들이 TMT 독성에 대하여 저항성을 나타내고 있음을 시사하였다 (Fig. 2C).

3. 아포토시스의 관찰

지금까지 알려진 TMT 중독에 의한 신경세포 괴사 이외에 선택적 신경세포 손상의 기전을 밝히기 위해 TUNEL 염색 및 전자현미경기법을 이용하였다. TUNEL 염색에서 치상회 과립세포의 TUNEL 양성세포가 뚜렷이 관찰되어 (Fig. 2B) 아포토시스의 존재를 시사하였으며 전자현미경 관찰에서 apoptotic body가 발견되어 치상회 과립세포의 아포토시스가 확인되었다 (Fig. 3).

고 찰

잘 알려진 신경독성물질인 trimethyltin (TMT) 은 주석화합물 조제과정 중 생성되는 중간 화합물인데 사람이 TMT 증기에 폭로되면 심한 TMT 뇌증을 유발한다. 이 때 나타나는 임상양상은 복잡부분발작, 기억장애, 인지기능 저하, 감정실조 등으로서 피폭된지 4년이 지나서도 지속되었다.[1] TMT를 쥐에 경구 투여하였을 때 LD50이 12.6 mg/kg이며 중독의 징후로 진전, 과흥분상태, 과격한 행동, 체중감소, 경련발작 등을 나타낸다.[2,3,9,10,12]

TMT에 의해 유발되는 해마 신경세포 손상의 기전은 아직 잘 규명되지 않고 있으나 설치류에서 관찰되는 비가역적 해마의 손상이 치매를 유발하는 알쯔하이머병과 유사한 점이 있기 때문에 최근에는 TMT를 투여하여 만성적으로 해마를 손상시켜 기억장애, 행동학적 연구 및 해마의 해부학적 연구 모델로 사용하고 있다.[4,5] 본 실험에서 TMT 투여 12시간 후부터 실험동물들은 진전을 나타내기 시작했는데 24시간에 이르러서는 모든 실험군에서 전신성 진전이 관찰되었다. 다른 연구에서 보고되었던 자연발생적 발작, 과흥분상태, 과도한 공격성 등도 TMT 투여 2일 후부터 나타나 4일 후에 최고도에 도달하였다. Ishida 등[5]의 연구

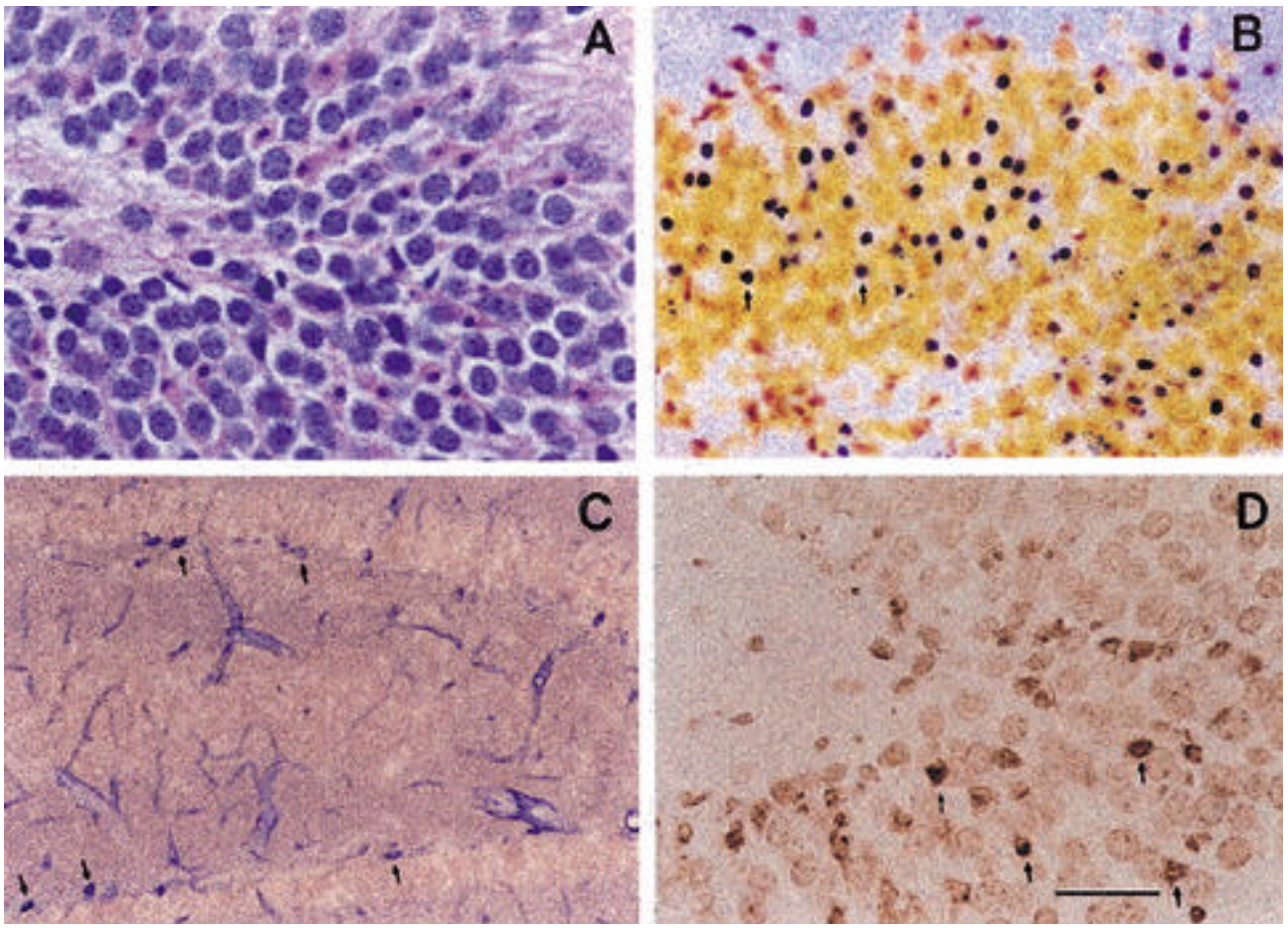

Figure 2. Photomicrographs of hippocampal sections stained with H & E (A), silver impregnation (B), NADPH-diaphorase (C), and TUNEL (D) methods 7 days after TMT treatment. Degenerating neurons are scattered in H & E stained section (A) which are more evident with degeneration-specific silver impregnation staining (arrow heads in B). NOS containing neurons (arrows in C) are spared after TMT intoxication. Some of the degenerating neurons are positively stained with TUNEL methods (arrows in D). Magnification, A, B, D, ×400, C, ×100 (bar=40 μm).

에 의하면 TMT 경구투여 (9 mg/kg), 제 4일째부터 해마의 CA3 및 CA4 추체세포의 진행성탈락이 관찰되었고. 신경생리학적으로는 pentylenetetrazol로 유발된 간질취약성 (seizure susceptibility) 이 TMT 투여 4일째에 가장 심하게 나타났다.[5] 본 연구에서 관찰된 공격성과 같은 행동이상의 변화는 Ishida 등의 연구에서 나타난 간질취약성의 변화와 유사하였다. 그러나 본 연구에서는 미부훼손 등 심한 자기 공격성은 관찰되지 않았으며 관찰 기간이 길지 않아 정확한 체중의 변화를 측정할 수 는 없었으나 TMT 투여 1주일 후 희생시킨 실험군 중 90 % (9/10)에서 체중이 감소하는 경향을 보였다. 이러한 체중감소는 지속적인 운동항진의 결과인지 TMT독성에 의해 나타나는 식욕감소에 의한 것인지 알 수 없었다.

이전의 연구결과들과는 달리 저자들의 조직학적 검사에서는 치상회의 신경세포 손상이 가장 두드러지게 나타났다. Whittington 등[13]의 연구에 의하면 TMT 투여 3일 후부터 CA3a,b 추체세포층 밑의 stratum lucidum에 변성된 신경세포 종단부 띠 (band of degenerating terminals) 가 먼저 관찰되며 수일간의 간격을 두고 추체신경세포 괴사가 나타나며 치상회의 과립세포 소실의 정도는 9일에서 14일 사이에 완화되며 신경섬유 및 신경종단부 퇴행변화는 복측 해마보다 배측 해마에서 더욱 현저히 관찰되었다. 그들의 연구 결과에 의하면 이러한 병리적 변화는 3개월 이상 지속되었다.[13] 그러나 저자들의 연구에서는 아몬각의 추체신경세포 손상은 아주 미약하였으며 반면에 치상회 과립세포의 손상이 현저하게 관찰되었다 (Fig. 1). 백서에 TMT 10 mg/kg 1회 투여하거나 주당 4 mg/kg을 연속 4주까지 투여한 후 70일 동안 생존시켜 시행한 연구에 의하면, TMT는 triethyltin과는 다르게 백질의 부종을 유발하지 않는 대신 해마, 이상피질 (pyriform cortex), 편도핵, 신피질 양측에 대칭성의 신경세포 변성을 야기한다. 이러한 변화는 TMT 투여 2일째부터 나타났으며 중독징후는 점차 소실되어 70일 후에는 외견상 신경행동학적 기능이 정상으로 회복되었으나 해마 및 이상피질에서 심한 신경세포 소실이 관찰되었다.[9] 마우스를 이용한 TMT의 급성중독의 조직병리학적 변화는 Chang 등[14]에 의하여 상세히 기술되었는데 TMT 3.0 mg/kg를 복강내 주입하면 12시간 이내에 심한 전신진전을 보이며 투여 48시간 후의 신경병리소견은 과립세포의 괴사, 이상피질의 산발적인 신경세포 소실, 편도핵 및 뇌간 신경세포 변성 등이 관찰된다. 그러나

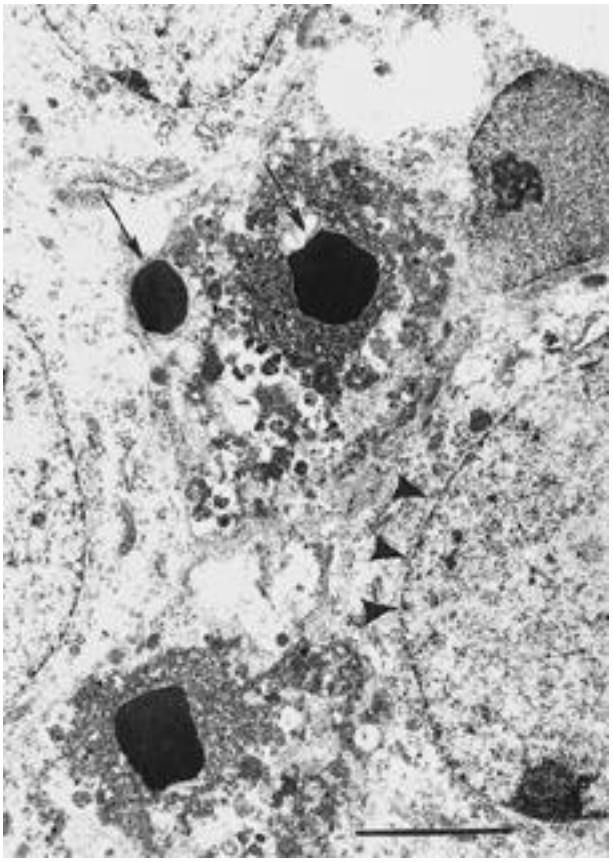

Figure 3. Electromicrograph of degenerating granule cells. Apoptotic bodies are seen in shrunken cytoplasm (arrows). Compare the intact nuclear membrane of normal cells (arrow heads). Bar=4 μm.

광범위한 과립세포 괴사에도 불구하고 추체세포는 형질내세망 (endoplasmic reticulum) 의 확장과 공포화 (vacuolation) 정도만 관찰되었다.[14] 이들 두 연구 결과와 비교해보면 백서를 사용한 저자들의 연구는 오히려 마우스를 이용한 Chang 등[14]의 연구 결과와 더 유사하였다. 그러나 Chang 등[14]의 병리 소견은 과립 신경세포의 광범위한 괴사가 특징이었던 반면 저자들의 실험에서는 아포토시스를 시사하는 여러 가지 소견을 관찰할 수 있었다. 비록 아포토시스에 특이적인 것은 아니지만 DNA 분절화를 나타내주는 TUNEL 염색이 양성으로 나타났고 이와 같은 소견은 전자현미경 검사에서 apoptotic body가 확인되어 아포토시스가 TMT에 의한 신경세포 사멸에 관여하고 있음을 시사해주고 있다. 특정부위의 신경세포에만 선택적 취약성을 나타내는 TMT의 분자생물학적 기전은 아직 밝혀지지 않고 있는데 저자들은 아포토시스에 의한 신경세포 사멸의 가능성을 본 연구의 결과를 통하여 제기하는 바이다. TMT는 단 1회의 피폭에도 설치류나 사람에게 있어 신경세포에 선택적인 손상을 유발한다. ***Coupling subtractive hybridization with molecular cloning techniques***을 이용한 연구에서 TMT에 민감한 세포로부터 2.9-kB의 cDNA가 분리되었는데 이것에 의해 88개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드가 예견되어 이를 ' stannin '이라고 명명하였다. Stannin에 대한 항체를 이용한 면역세포검사에서 해마와 entorhinal cortex의 TMT에 민감한 신경세포들은 in situ hybridization에 의해 확인된 부위에 강력한 stannin 면역활성을 나타내었다. 따라서 stannin이 TMT에 선택적 취약성을 나타내는 신경세포에 존재함으로써 유기주석 화합물의 선택적 독성을 유발하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다.[15] 또한 최근에 이루어진 in vitro 연구에 의하면 TMT는 취약한 신경세포에 stannin에 의해 매개되는 apoptosis를 유발할 수 있다는 가능성을 제시하고 있어[6] 본 연구에서 얻어진 결과를 뒷받침해주고 있다. 그러나 TMT 독성을 나타내는데 stannin expression은 필요하지만 충분한 조건은 아니라는 의견도 제시된 바 있다.[16] 본 연구자들이 해마 치상회 선택적 신경세포 사멸 기전에 아포토시스가 관여할 것이라는 가능성을 제기하였지만 어떤 기전으로 아포토시스가 유발되는 가에 대한 의문점은 여전히 남는다.

쥐를 이용한 연구에 의하면 TMT에 의해 유발된 신경세포괴사는 치상회의 microglia를 활성화시키고 해마 전 영역에 걸쳐 성상교세포의 광범위한 반응을 유도하며 pro-inflammatory cytokine의 mRNA발현을 증가시킨다.[7,17,18] 즉, TMT는 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 의 농도를 증가시키고 성상교세포 수상돌기의 수를 증가시키며,[19] microglia의 활성도를 증가시켜[7] 교세포를 활성화한다. 또한 세포독성을 나타내지 않는 저농도의 TMT (10-9 to 10-8 M) 를 투여하면 microglia의 수가 유의하게 증가하는데 이는 신경세포 퇴행에 선행하여 microglia가 반응을 나타내는 것을 의미한다. 따라서 microglia의 반응 정도를 뇌의 독성 손상에 대한 예민한 지표로 사용할 수 있다.[8] TMT 중독에 의해 해마가 부분적으로 구심로차단 (deafferentiation) 되면 신경세포 구성인자의 가성형재구성 (plastic rearrangement) 이 유발되는데 성상교세포에서 분비되는 NGF에 의한 보호작용이 그 기전인 것으로 알려져 있다.[20] 따라서 microglia와 pro-inflammatory cytokine이 TMT 독성에 의한 해마의 신경세포 퇴행의 진행양상에 매우 중요한 역할을 하며 이들이 아포토시스를 유발하는 데 관여할 수 있을 것이다. 아포토시스를 유발할 수 있는 다른 한가지 가능성은 산화성 스트레스인데 superoxide anion, hydrogen peroxide, 그리고 hydroxyl radical과 같은 반응성 산화물 (reactive oxygen species, ROS) 이 과산화손상 (peroxidative damage) 의 원인으로 잘 알려져 있다. 마우스에 TMT 3 mg/kg를 복강내 주입하면 48시간 후에 해마와 전두엽 등 TMT 독성에 민감한 부위에 ROS 생성율이 증가된다. 이 때 ROS에 의한 연쇄 반응이 발생되고 따라서 TMT 신경독성에 의한 아포토시스 유발 신호전달 체계에 산화성 손상이 단초를 제공할 가능성이 있다.[21] 그밖에 다른 가능성으로는 아밀로이드 단백에 의한 손상을 생각할 수 있는데 TMT 중독에 의하여 백서 해마의 아밀로이드 단백전구물질 (amyloid precursor protein, APP) mRNA 발현이 증가된다.[22] 이렇게 생성된 아밀로이드단백은 분해되어 아밀로이드베타단백 (βamyloid, Aβ 이 축

적되는데 Aβ는 신경세포에 독성을 나타내며 아포토시스를 유발한다.[23-25] 마지막으로 TMT는 뇌의 흥분성신경전달물질에 의해 매개되는 간질유발제 (convulsant) 와 유사한 선택적 해마 손상을 일으키는데 마우스 복강내로 TMT를 3 mg/kg 투여하면 24시간 후 해마의 glutamate 농도가 변화한다. 또한 부분적으로 탈분극된 해마 절편에 TMT (10 microM) 를 처치하면 세포 외 칼슘 농도에 의존하는 내인성 glutamate가 분비된다. 이런 소견들은 TMT가 endogenous excitotransmitter system을 활성화시켜 TMT 피폭에 의한 신경세포 손상에 중요한 역할을 하고 있음을 시사해준다.[26]

그런데 해마 치상회의 과립세포와 아몬각의 NADPH-d 염색에 양성반응을 보인 NOS 함유 세포들은 그 모양과 염색도가 잘 유지되어 TMT 독성에 강한 저항성을 나타내고 있음이 확인되었다. 이러한 소견은 산재되어있는 중간신경원 세포 (interneuron) 와 CA1 원추세포들은 TMT 중독 실험에서 살아 남았다는 Ikeda 등[27]의 연구 결과와 일치하였다.

이와 같은 다양한 기전의 TMT 독성에 의한 신경세포 사멸의 기전을 좀더 깊이 이해하려면 각 단계에서 추정되는 원인 인자를 차단하는 연구 즉, 1) 단백질 합성 억제제 사용과 같은 아포토시스의 억제기전, 2) 비스테로이드성 소염제를 이용한 염증반응의 억제와 교세포 증식, 염증성 사이토카인과의 관계 규명, 3) 항 산화제 투여에 의한 산화성 손상의 방지, 4) NMDA 길항제와 같은 흥분성 신경독성물질의 억제 등 다양한 전략을 이용한 추시 연구가 필요할 것이다.

TMT 8.0 mg/kg를 백서 복강내 주입하여 다음과 같은 결과를 얻었다. TMT 투여 후 2일째부터 특징적인 변연계 침범을 시사하는 임상양상 즉, 과흥분상태, 자극과민반응, 발작 등이 나타났으며 4일째에 이러한 증상들이 최고조에 달했다. 조직학적 검사상 해마에 선택적인 신경세포 퇴행변성이 유발되었는데 치상회의 과립세포에 가장 심한 변성이 나타났고 아몬각 추체 세포에는 미약한 변성이 관찰되었다. 이때 급성기에 관찰되는 신경세포 괴사 이외에 광범위한 반응성 교세포 증식과 지연성 신경세포 탈락 때 나타나는 전형적인 아포토시스의 소견이 관찰되었다. NOS를 함유하고 있는 NADPH-d 양성세포는 TMT 독성에 의해 손상을 받지 않았다. 따라서 TMT 중독 모델은 해마의 선택적 신경세포 사멸, 신경세포의 아포토시스 및 신경세포-교세포 간의 상호 관계를 연구하는 데 유용한 연구 모델로 사용될 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. Feldman RG, White RF, Eriator II. Trimethyltin encephalopathy. *Arch Neurol* 1993;50:1320-1324.
2. Rehul KR, Smallridge EA, Chang LW, McKenzie BA. Developmental effects of trimethyltin intoxication in the neonatal mouse. Light microscopic studies. *Neurotoxicology* 1983;4:19-28.
3. Perretta G, Righi FR, Gozzo S. Neuropathological and behavioral toxicology of trimethyltin exposure. *Ann Ist Super Sanita* 1993:29:167-74.
4. Earley B, Burke M, Leonard BE. Behavioural, biochemical and histological effects of trimethyltin (TMT) induced brain damage in the rat. *Neurochem Int.* 1992;21:351-366.
5. Ishida N, Akaike M, Tsutsumi S, Kanai H, Masui A, Sadamatsu M, Kuroda Y, Watanabe Y, McEwen BS, Kato N. Trimethyltin syndrome as a hippocampal degeneration model: temporal changes and neurochemical features of seizure susceptibility and learning impairment. *Neuroscience* 1997;81:1183-91.
6. Thompson TA, Lewis JM, Dejneka NS, Severs WB, Polavarapu R, Billingsley ML. Induction of apoptosis by organotin compounds in vitro: Neuronal protection with antisense oligonucleotides directed against stannin. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276:1201-1215.
7. McCann MJ, O'Callaghan JP, Martin PM, Bertram T, Streit WJ. Differential activation of microglia and astrocytesfollowing trimethyltin-induced neurodegeneration. *Neuroscience* 1996;72:273-281.
8. Monnet-Tschudi F, Zurich MG, Pithon E, van Melle G, Honegger P, Microglial responsiveness as a sensitive marker for trimethyltin (TMT) neurotoxicity. *Brain Res* 1995;690:8-14.
9. Bouldin TW, Goines ND, Bagnell CR, Krigman MR. Pathogenesis of trimethyltin neuronal toxicity. *Am J Pathol* 1981;104:237-249.
10. Brown AW, Aldridge WN, Street BW, Verschoyle RD. The behavioural and neuropathologic sequelae of intoxication by trimethyltin compounds in the rat. *Am J Pathol* 1979;97:59-81.
11. Scallet AC. Quantitative morphmetry for neurotoxicity assessment. In: *Neurotoxicology: approaches and methods.* Chang LW and Slikker W, Jr. (eds), London, Academic Press Inc., 1995;99-129.
12. Fortemps E, Amand G, Bomboir A, Lauwerys R, Laterre EC. Trimethyltin poisoning: report of two cases. *Int Arch Occup Environ Health* 1978;41:1-6.
13. Whittington DL, Woodruff ML, Baisden RH. The time-course of trimethyltin-induced fiber and terminal degeneration in hippocampus. *Neurotoxicol Teratol* 1989;11:21-33.
14. Chang LW, Tiemeyer TM, Wenger GR, McMillan DE. Neuropathology of mouse hippocampus in acute trimethyltin intoxication. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1982;4:2 149-156.
15. Toggas SM, Krady JK, Billingsley ML. Molecular neurotoxicology of trimethyltin: identification of stannin, a novel protein expressed in trimethyltin-sensitive cells. *Mol Pharmacol* 1992;42:1 44-56.
16. Dejneka NS, Patanow CM, Polavarapu R, Toggas SM, Krady JK, Billingsley ML. Localization and characterization of stannin: relationship to cellular sensitivity to

organotin compounds. *Neurochem Int* 1997;31:801-815.
17. Maier WE, Brown HW, Tilson HA, Luster MI, Harry GJ. Trimethyltin increases interleukin (IL)-1[alpha], IL-6, and tumor necrosis factor-[alpha] mRNA levels in rat hippocampus. *J Neuroimmunol* 1995;59:65-75.
18. Bruccoleri A, Brown H, Harry GJ. Cellular localization and temporal elevation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, and transforming growth factor-beta 1 mRNA in hippocampal injury response induced by trimethyltin. *J Neurochem* 1998;71:1577-1587.
19. Monnet-Tschudi, F, Zurich MG, Riederer BM, Honegger P. Effects of trimethyltin (TMT) on glial and neuronal cells in aggregatecultures. Dependence on the developmental stage. *Neurotoxicology* 1995;16:97-104.
20. Koczyk D, Skup M, Zaremba M, Oderfeld-Nowak B. Trimethyltin-induced plastic neuronal changes in rat hippocampus are accompanied by astrocytic trophic activity. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 1996;56:237-241.
21. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1992;13:637-648.
22. O'Connell AW, Strada O, Earley B, Leonard BE. Altered expression of amyloid protein precursor mRNA in the rat hippocampus following trimethyltin intoxication: an in situ hybridization study. *Neurochem Int* 1997;30:313-320.
23. Imaizumi K, Morihara T, Mori Y, Katayama T, Tsuda M, Furuyama T, Wanaka A, Takeda M, Tohyama M. The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein. *J Biol Chem* 1999;274:7975-81.
24. Marcon G, Giaccone G, Canciani B, Cajola L, Rossi G, De Gioia L, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini FA betaPP peptide carboxyl-terminal to Abeta is neurotoxic. *Am J Pathol* 1999;154:1001-1007.
25. Xu X, Yang D, Wyss-Coray T, Yan J, Gan L, Sun Y, Mucke L. Wild-type but not alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7547-7552.
26. Patel M, Ardelt BK, Yim GK, Isom GE. Interaction of trimethyltin with hippocampal glutamate. *Neurotoxicology* 1990;11:601-608.
27. Ikeda M, Kanai H, Akaike M, Tsutsumi S, Sadamatsu M, Masui A, Kato N. Nitric oxide synthase-containing neurons in the hippocampus are preserved in trimethyltin intoxication. *Brain Res* 1996;712:168-170.