

## 일시적 대뇌허혈에 의한 gerbil 해마의 피라밋층에 조직학적 변화

양제훈 · 고필옥 ·곽수동<sup>1\*</sup>

경상대학교 수의과대학

<sup>1</sup>경상대학교 수의과대학 동물의학연구소

(2001년 11월 28일 게재승인)

## Histological changes on pyramidal layer of hippocampus following transient cerebral ischemia in gerbils

Je-hoon Yang, Phil-ok Koh, Soo-dong Kwak<sup>1\*</sup>

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

<sup>1</sup>Institute of Animal Medicine College of Veterinary Medicine Gyeongsang National University

(Accepted November 28, 2001)

**Abstract :** Cardiac arrest, hypoxia, shock or seizure has been known to induce cerebral ischemia. This study was designed to investigate the effect of ischemia on hippocampal pyramidal layer induced by transient bilateral occlusion of the common carotid arteries. Mature Mongolian gerbils were sacrificed at days 2, 4, and 7 after carotid occlusion for 10 minutes. Sham-operated gerbils of control group were subjected to the same protocol except for carotid occlusion. During operation for ischemia, body temperature was maintained  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  in all gerbils. Paraffin-embedded brain tissue blocks were cut into coronal slices and stained with H-E stain or immunostain by TUNEL method.

Neurons with the oval and prominent nucleus and without the eosinophilic cytoplasm in the subfield of hippocampal pyramidal layer were calculated as to be viable neurons.

Their chromatins were condensed or clumped. Their nuclei appeared multiangular or irregularly shrunk. The width of the pyramidal layer was reduced due to the loss of nuclei.

At day 2 after reperfusion, some neurons in the CA1 subfield were slightly eosinophilic. But most neurons in the CA2 subfield were strongly eosinophilic. At day 4 day, most neurons in the CA1 subfield were severely damaged and at day 7 day, only a few survived neurons were observed.

Survived neurons per longitudinal 1mm sector in the CA1, CA2, CA3, and CA4 subfields of pyramidal layer were investigated.

At day 2, the mean numbers of pyramidal neurons in CA1, CA2, CA3, and CA4 subfields were 104.5/mm (54.3%), 51.0/mm (33.8%), 105.5/mm (85.6%), and 124.3/mm (93.5%) compared to the nonischemic control group, respectively.

At day 4, the mean numbers of pyramidal neurons in CA1, CA2, CA3, and CA4 subfields were 3.2/mm (1.7%), 51.5/mm (34.2%), 95.3/mm (77.4%), and 112.5/mm (84.6%), respectively.

At day 7, the mean numbers of pyramidal neurons in CA1, CA2, CA3, and CA4 subfields were 0.8/mm (0.4%), 5.7/mm (3.8%), 9.8/mm (8.0%), and 5.0/mm (3.7%), respectively.

The mean numbers of apoptotic positive neurons in the CA1 subfield at day 2, 4, and 7 after reperfusion were 67.8/mm, 153.2/mm and 123.7/mm, respectively.

\*Corresponding author : Dr. Soo-dong Kwak, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

These results suggest that the transient cerebral ischemia cause severe damages in most neurons at day 7 and that the prominent apoptotic positive neurons in hippocampal pyramidal layer are the delayed neuronal death induced by ischemia.

**Key words :** ischemia, hippocampus, neuron, gerbil, apoptosis

## 서 론

대뇌의 혈액순환이 차단되어 뇌허혈이 일어나면 대뇌경색(cerebral infarction)이 발생하게 된다<sup>1</sup>. 허혈은 경련<sup>2</sup>, 산소증<sup>3</sup>, 심장정지<sup>4</sup>, 쇼크<sup>5</sup> 및 분만지연된 신생아<sup>6</sup> 등의 상황에서 일시적 대뇌허혈로 급성 또는 지연성의 저산소성 뇌세포의 손상이 유발된다.

최근 이러한 뇌혈관질환의 병태생리를 밝히고 치료제를 개발하기 위한 많은 연구가 진행되고 있고 또 이를 위한 적절한 동물 모델의 확립이 요구되고 있다. Gerbil (Mongolian gerbil)은 흔히 쓰이는 랫드에 비해서 뇌기저부의 윌리스고리(circle of Willis) 부위의 경부문합이 발달하지 않아 척추동맥의 결찰이나 혈압저하 등의 복잡한 시술 없이 양측 총목동맥의 결찰만으로 대뇌허혈을 일으킬 수 있는 장점을 가지고 있어 일시적 대뇌허혈 모델로 많이 이용되고 있는데<sup>7,8</sup>, Ginsberg *et al*<sup>9</sup>과 Abe *et al*<sup>10</sup> 등은 양측 총목동맥의 결찰만으로 전뇌부분의 혈류가 거의 0까지 떨어짐을 확인한 바 있다.

실험동물과 사람에서 일시적인 대뇌허혈 후 재관류로 인한 신경세포의 손상은 다른 부위에 비해 해마의 CA1 부위 피라밋신경세포에서 선택적으로 발생한다<sup>4,11,12</sup>. 그러나 이러한 신경세포의 손상은 허혈 손상 후 바로 일어나는 것이 아니며 생리학 및 생화학적 분석에서 짧은 시간동안 대뇌허혈 후 해마 CA1 부위 피라밋신경세포는 24시간 경과까지는 정상 상태를 유지한 이후에 일어나는 것으로 알려져 있다. 또한 Kirino *et al*<sup>11</sup>은 gerbil에서 지속적으로 뇌혈류를 차단할 경우 결순환이 없으므로 전뇌(forebrain)가 급성 뇌경색에 빠지게 되고 높은 치사율을 보이게 되나, 5-10분 정도의 일시적인 허혈은 급성 뇌경색을 초래하지 않고 3-4일 경과 후에 해마 CA1 부위의 신경세포를 선택적으로 손상시킨다고 하였으며, Petito *et al*<sup>8</sup>은 gerbil에서 일시적 대뇌허혈 후 CA1 부위 피라밋신경세포가 2-4일 후에 변성된다고 하였으며 이러한 일정 기간이 경과 후 신경세포의 사망을 지연성 신경세포사라 하였다.

그러나 이러한 보고들은 주로 허혈에 의한 지연성 신경세포사가 가장 광범위하게 일어나는 재관류 3-4일에 해마 CA1 부위에 국한되어 있으며, 허혈 후 신경세포의 손상이 시작될 것으로 예상되는 2일과 손상이 가장 많이 진행될 것으로 생각되는 7일 등 시간 경과별로 해마의 모든 부위

에서 조사된 바는 없다.

최근에는 세포사의 또 다른 형태인 apoptosis와 관련하여 많은 연구가 이루어지고 있는데, Heron *et al*<sup>13</sup>과 MacManus *et al*<sup>14</sup>은 랫드에서, Okamoto *et al*<sup>15</sup>은 gerbil에서 일시적 대뇌 허혈 후 해마 CA1 부위의 지연성 신경세포사가 apoptosis에 의한다고 하였으나, Desphande *et al*<sup>16</sup>과 Iwai *et al*<sup>17</sup>은 apoptosis와는 관련이 없다고 하였다. 그리고 허혈 후 시간 경과에 따른 apoptosis 양성반응 세포의 발현 양상 또한 상이하게 보고되고 있는데, Hara *et al*<sup>18</sup>은 랫드에서 허혈 후 3일에 관찰되기 시작하여 7일에 종료된다고 하였으나, Daniel *et al*<sup>19</sup>은 gerbil에서 3일에 관찰되어 4일에 최고치에 도달한다고 하였고, Tseng *et al*<sup>20</sup>은 개에서 8시간째에 최고치에 도달하여 72시간째에는 양성반응이 나타나지 않는다고 하여 보고자에 따라 차이가 많다.

본 연구에서는 gerbil에서 일시적 대뇌허혈이 신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10분간 양측 총목동맥을 결찰하여 허혈을 유도한 후 재관류 시간 경과에 따른 해마의 각 부위에서의 신경세포 손상의 차이를 조사하고, 또한 신경세포의 apoptosis에 대해 면역조직화학적으로 조사한 바를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

아산생명과학연구소 실험동물 사육실 일반실 (conventional room)에서 사육한 Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)을 사용하였는데, 10-12 주령 (체중 70-90 g)을 암수 구별 없이 4개 군으로 나누어 각 실험군 당 5마리를 사용하였다. 실험군은 10분간 허혈하고 재관류한 후 시간 경과에 따라 재관류 2일군, 4일군, 7일군 그리고 대조군으로 분류하였다.

사육 및 실험 기간 동안의 사육실 환경은 온도  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 5\%$ 를 유지하였고, 방사선 처리된 사료와 멸균된 식수를 자유로이 섭취하도록 하였고, 깔짚과 케이지는 1주 2회 고압멸균하여 교환하였다.

### 2. 대뇌허혈 유도

수술 24시간 전부터 절식시킨 gerbil을 ketamine 50 mg/kg을 근육내 투여하여 마취하고 고정시킨 후 경부의 수술 부위를 소독하였다. 뇌세포의 허혈성 병변에 영향을 미칠 수

있는 체온의 보정을 위하여 마취 직후부터 수술 후 깨어날 때까지 30분 이상 온도계를 직장내에 삽입하고 가열판과 백열등을 이용하여 심부 체온을  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 일정하게 유지하였다. 원하는 범위의 체온에 도달하였을 때 정중선을 따라 수직으로 1.5cm 정도 피부를 절개한 후 경부 근육을 조심스럽게 바리하고 기도 옆으로 주행하는 양측 총목동맥을 주위 조직과 미주신경으로부터 조심스럽게 노출시킨 후 동맥류용 클립 (atraumatic arterial clip)을 이용하여 동시에 10분간 결찰하여 일시적 대뇌허혈 유도하고 클립을 제거한 후 수술현미경하에서 총목동맥의 재관류로 인한 혈관 박동이 일어남을 확인 후 원상복원 수술을 하여 주어진 기간동안 사육하며 경과시켰다 (Fig 1).

### 3. 조직의 고정 및 절편 제작

일시적 대뇌허혈 후 gerbil을 10분 허혈후 재관류 2일, 4일, 7일째에 단두기를 이용하여 희생시킨 후 두개골을 제거하고 뇌를 꺼내어 뇌주형 (brain matrix, ASI Instruments, Warren Inc.)을 이용하여 시신경교차를 중심으로 3mm 두께로 관상 절단하였으며, 이들 조직절편에서 해마부위를 육안으로 확인 후 4% 중성 formalin에서 24시간 전고정시킨 후, 10% 중성 formalin에 24시간 이상 후고정 하였다. 이후 통상적인 조직처리과정을 거쳐  $4.5\mu\text{m}$ 의 두께로 연속절편 표본을 제작하고 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다.

### 4. 신경 손상 평가

수당 5-6장의 표본을 임의로 선택하고 Amaral 등<sup>21</sup>과 Stummer 등<sup>22</sup>의 기준에 따라 광학현미경하에서 해마를 관찰하여 피라밋층을 CA1 부위부터 CA4 부위까지 구분한 후, 200배 배율에서 격자를 이용하여 장축에 따라 1mm 거리 영역을 측정하고 이 부위에 정상형태의 피라밋신경세포 (pyramidal neurons)의 수를 조사하였다. CA1 부위는 치아이랑 (dentate gyrus) 윗가지의 측단 부위를 기준으로 하였고, CA2 부위는 신경띠 (neuronal band) 궁융부 (convexity) 외측에 인접한 부위로, CA3 부위는 치아이랑의 윗가지 측단 부위와 신경띠 궁융부 외측 사이 부분으로, CA4 부위는 치아이랑 가지 사이에 위치한 부위로 각각 정하였다<sup>21,22</sup>. 정상형태의 신경세포는 Eke 등<sup>23</sup>과 Stummer 등<sup>22</sup>의 방법에 따라 구분하였다.

### 5. In situ end labeling을 이용한 신경세포의 apoptosis 관찰

Apoptosis가 진행된 세포를 확인하기 위해서 ApopTag in situ apoptosis detection kit-peroxidase (Oncor, U.S.A.)를 사용하였다. 절편된 조직을 탈파라핀 과정을 거친 후 0.1M PBS

로 5분씩 2회 세척하고 조직내의 peroxidase를 제거하기 위하여 0.001%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 10분간 반응시켰다. 그 후 equilibration buffer에 10분간 반응시키고 digoxigenin-dUTP와 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)를  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 0.1M PBS로 5분씩 2회 세척하고 antidigoxigenin-peroxidase를 실온에서 30분간 반응시킨 후 diaminobenzidine (DAB)으로 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하였다.

## 결 과

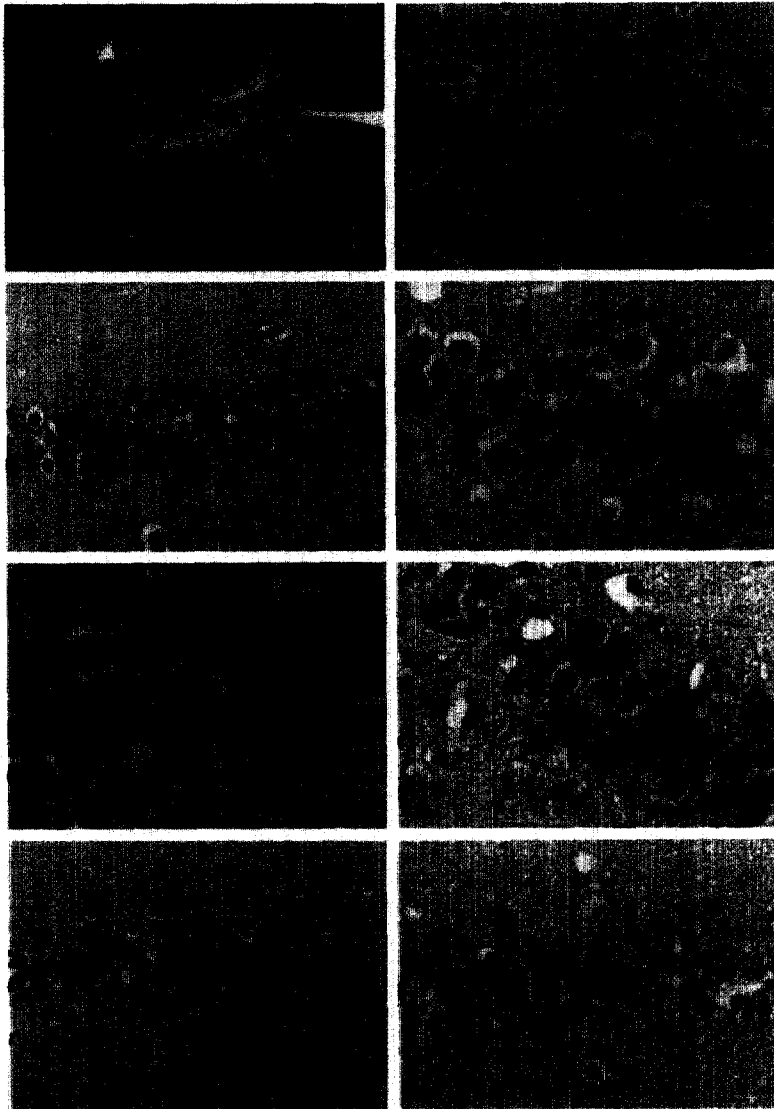
### 대조군

허혈한 실험군의 기준을 설정하기 위하여 먼저 대조군의 H-E 염색 조직표본에서 해마의 조직학적 소견을 조사한 바, 피라밋층의 신경세포들은 핵과 신경세포체가 원형이고, 핵소체가 뚜렷하며, 핵염색질은 산재된 상염색질 (euchromatin) 상태였고, 경계가 명확한 4-6층으로 균일하게 배열하고 있었다 (Fig 2). 실험동물 수당 5-6장의 표본을 대상으로 하여 해마의 피라밋층 각 부위별 장축 1mm 길이에 대하여 정상형태의 신경세포의 갯수를 조사한 바, 평균수는 CA1 부위는 192.5/mm, CA2 부위는 150.8/mm, CA3 부위는 123.2/mm 그리고, CA4 부위는 133.0/mm였다.

### 재관류 2일군

재관류 2일군은 H-E 염색에서 해마부위는 신경세포 세포질과 축삭돌기가 호산성화하였고 이로 인하여 축삭들을 방사층 (stratum radiatum)에서도 확인할 수 있었다. 핵염색질의 분절화 (fragmentation), 군집화 (clumping), 또는 농축 (pyknosis), 핵의 다각화 및 불규칙한 변형 그리고 핵의 소실 등 신경세포의 손상으로 인하여 피라밋층의 수가 감소하였고 (Fig 3-10), 농축된 핵과 세포주위의 공간이 형성되었다. 이러한 소견은 CA1 부위 중에서 subiculum-CA1 부위에서는 다수 관찰되었으나 lateral CA1 부위에서는 나타나지 않았고, CA2 부위에서는 다른 군에서보다 특이적으로 세포질이 호산성화된 신경세포들이 다수 관찰되었으며, 세포질 내 호산성 붕입체로 인해 핵의 주변화된 예가 있었다. CA3, CA4 부위는 변화된 신경세포의 수가 아주 적었다.

해마의 각 부위별 피라밋층 장축 1mm에서 대조군의 신경세포수에 대한 정상형태의 신경세포수에 비율을 조사한 바, 그림표1에서와 같이 CA1 부위는 대조군의 신경세포수의 54.3% (104.5/mm), CA2 부위는 33.8% (51.0/mm), CA3 부위는 85.6% (105/mm) 그리고 CA4 부위는 93.5% (124.3/mm)로 나타나 2일째의 신경세포의 손상은 주로 subiculum-CA1 부위와 CA2 부위에서 일어나고 있었다 (Fig 3-5).



- Fig 1. Photograph of the surgical operation of bilateral common carotid arteries occlusion of gerbil.
- Fig 2. CA1 subfield of hippocampus in gerbil of control group was composed of four to five layers of neurons, nearly all of neurons have round nuclei and prominent nucleoli. H-E stain, X 200.
- Fig 3. CA1 subfield of hippocampus in gerbil at 2 days after recirculation. Many pyramidal neurons are darkly stained, very irregular and shrunken in shape and some pyramidal neurons were unchanged normal shapes. H-E stain, X 200
- Fig 4. Higher magnification of fig 3. H-E stain, X 400.
- Fig 5. CA2 subfield of hippocampus in gerbil at 2 days after recirculation Neurons with specific eosinophilic cytoplasm and condensed nuclei were presented in CA2 subfield. H-E stain, X 400.
- Fig 6. CA2 subfield of hippocampus in gerbil at 4 days after recirculation. Eosinophilic neurons were decreased but their nuclei were condensed. H-E stain, X 400.
- Fig 7. CA1 subfield of hippocampus in gerbil at 4 days after recirculation. Many neurons have intensely dark, very irregular shrunken nuclei and some areas are seen as empty vacuoles by disappearance of perikarya of neurons. H-E stain, X 200.
- Fig 8. Higher magnification of fig 6. H-E stain, X 400.

**재관류 4일군**

재관류 2일군보다 신경세포의 손상이 더욱 진행되어 피라미트층은 매우 협소화하였고, 신경세포의 손상은 subiculum-CA1 부위뿐만 아니라 lateral CA1 부위에서도 광범위하게 나타났으며, 재관류 2일군의 subiculum-CA1 부위의 강한 호산성 염색성 신경세포들은 더 많이 파괴되고 소실되었다.

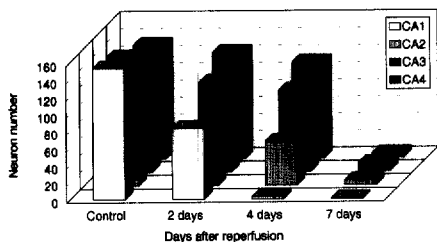
CA2 부위에서는 신경세포들이 재관류 2일군보다 핵의 변성이 더 진행되어 삼각형 내지 다각형으로 변형되어 짙게 염색되었고, 세포질의 호산성 염색농도는 저하되었다. CA3와 CA4 부위는 일부 신경세포들에서만 변형된 소견을 보였다 (Fig 6-8).

대조군에 대한 정상형태의 신경세포수의 대한 비율 그래프 1과 같이 CA1 부위는 1.7% (3.2/mm), CA2 부위는 34.2% (51.5/mm), CA3 부위는 77.4% (95.3/mm), CA4 부위는 84.6% (112.5/mm)로 나타나 재관류 2일군보다 더 감소되었고 부위별로는 CA1, CA2, CA3, CA4 부위 순으로 신경세포 소실의 비율이 많아 해마의 지연성 신경세포사는 4일째는 CA1과 CA2 부위에서 일어남을 나타내고 있다.

**재관류 7일군**

대부분의 신경세포가 소실되고 일부 잔존한 신경세포는 hematoxylin에 짙게 염색되었으며, 삼각형이나 다각형으로 변형되고 위축된 소견을 보였다.

대조군에 대한 정상형태의 신경세포수의 비율은 graph 1과 같이 CA1 부위는 0.4% (0.8/mm), CA2 부위는 3.8% (5.7/mm), CA3 부위는 8.0% (9.8/mm) 그리고 CA4 부위는 3.7% (5.0/mm)로 나타나 해마의 모든 부위에서 신경세포의 수가 현저히 감소되었고 부위별로는 CA1, CA4, CA2, CA3 부위 순으로 손상이 많았다 (Fig 9, 10).

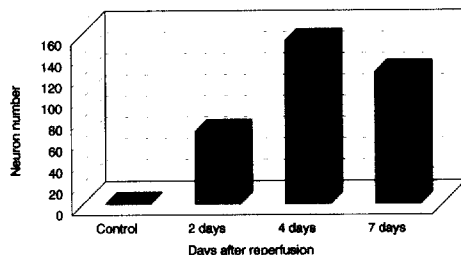


Graph 1. Changes of the viable neuron per axial 1mm length of pyramidal layer number in the hippocampus following 10 minutes ischemia.

\* CA : cornu Ammonis

허혈에 의한 신경세포사에 대해 apoptosis와의 관계를 조사하기 위하여 해마 부위 피라미트층에서 신경세포의 손상이 가장 많고 가장 빠르게 진행되는 CA1 부위에 TUNEL 방법을 이용하여 apoptosis 양성반응세포의 수를 조사한 바 대조군에서는 양성반응세포가 관찰되지 않았고, graph 2와 같이

허혈을 실시한 재관류 4일군은 153.0/mm, 재관류 7일군은 123.7/mm로 H-E 염색표본의 생존한 신경세포수보다 월등히 많아 세포사가 일어났거나 진행중인 신경세포는 apoptosis 양성반응을 나타냄을 알 수 있었다 (Fig 11-16).



Graph 2. Changes of the apoptotic positive neuron number per axial 1mm length of pyramidal layer in the hippocampal CA1 subfield after 10 minutes ischemia

**고 찰**

본 실험에서 Mongolian gerbil을 이용한 것은 뇌바다동맥과 총목동맥 사이의 결순환이 매우 빈약하여 총목동맥 결찰시 허혈이 쉽게 유발되며 양측 앞쪽대뇌동맥이 주행하면서 하나의 뇌량주위동맥으로 합쳐짐으로써 양측 전뇌 사이에서도 측부혈류가 거의 발생하지 않는다는 점과<sup>7,8</sup>, Ginsberg et al<sup>9</sup>과 Abe et al<sup>10</sup>이 양측 총목동맥 결찰시 전뇌부의 뇌혈류가 거의 차단되어 매우 안정된 뇌허혈 실험동물임을 보고한 바를 참고하였다.

허혈에 의한 신경세포의 죽음은 허혈이 있는 뒤에 바로 일어나는 것이 아니고 며칠 경과 후에 일어나고, 이러한 지연성 신경세포사가 해마 CA1 부위에서 선택적으로 발생하는 기전에 대하여 아직 명확히 밝혀진 바는 없으나, 허혈 후 주어진 자극에 대한 예민성 증가에 의한 신경세포의 과활동(hyperactivity), 칼슘을 매개로 하는 글루탐산 흥분독성(excitotoxicity), 미토콘드리아 손상과 단백질 합성의 장애, 유리산소기에 의한 손상, 에너지 대사와 뇌 혈액순환 이상 등이 관여할 것으로 여겨지고 있다<sup>24</sup>. 이와 함께 최근 들어 barbiturate<sup>11</sup>, 칼슘통로 차단제<sup>19,25</sup>, N-methyl-D-aspartate 수용체 길항제<sup>26</sup>, K-opioid 길항제<sup>27</sup>, CA1 부위에 대한 구심신경차단술<sup>28</sup>, 지질 과산화의 억제<sup>27</sup>와 저체온<sup>29,32</sup> 등이 모두 CA1 부위의 피라미트신경세포 손상을 감소시켰다고 보고가 있다. 본 실험에서도 해마를 중심으로 CA1 부위에서 신경세포의 변화가 가장 많았다.

허혈 후 재관류 시간에 따른 신경세포의 손상에 대하여 Kirino et al<sup>30</sup>과 Abe et al<sup>10</sup>은 gerbil에서 5-10분 정도의 일시적인 허혈 자극을 가한 후 즉시 재관류 시키면 24시간까지는 CA1 부위 신경세포는 정상이지만 3-4일 경과 후 해마 CA1 부위에서 선택적인 신경세포의 손상이 일어난다고 하

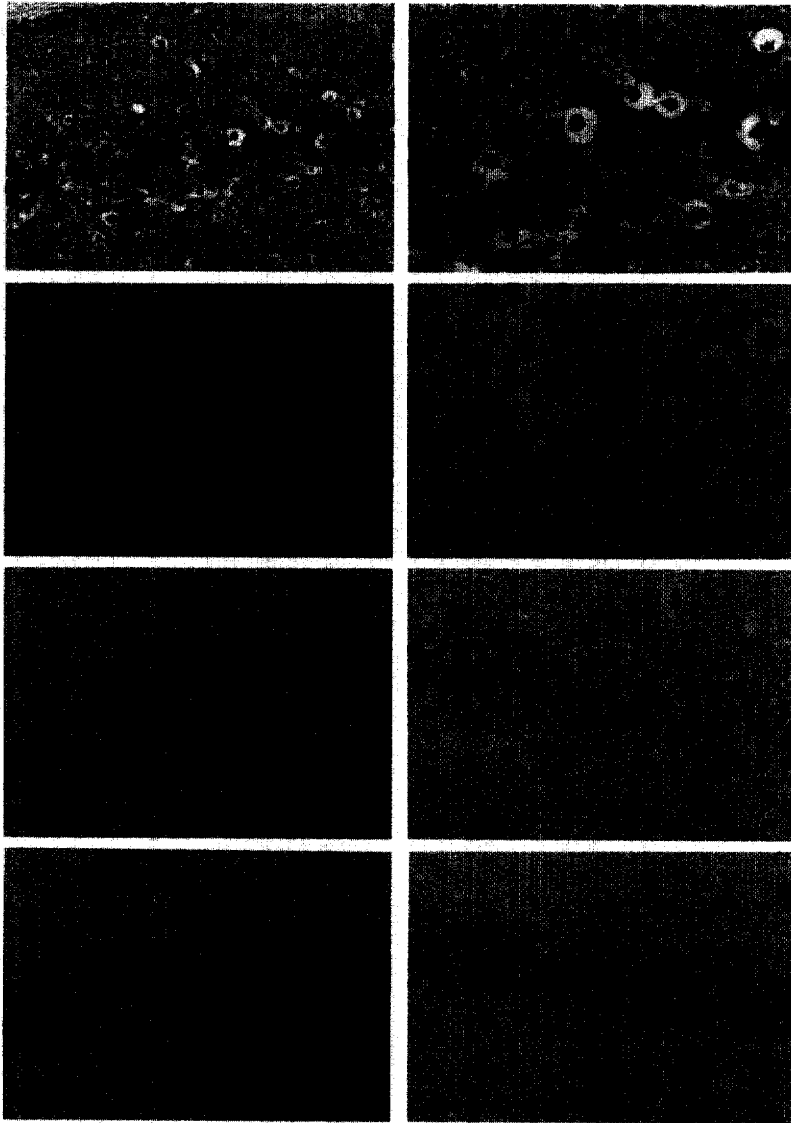


Fig 9. CA1 subfield of hippocampus in gerbil at 7 days after recirculation. Most pyramidal neurons seen condensed and atrophied. H-E stain, X 200.

Fig 10. Higher magnification of fig 9. H-E stain, X 400.

Fig 11. Some apoptotic positive neurons are seen in CA1 subfield of hippocampus in gerbil at 2 days after recirculation. TUNEL method, X 200.

Fig 12. Higher magnification of fig 11. TUNEL method, X 400.

Fig 13. Apoptotic positive neurons in CA1 subfield of hippocampus in gerbil at 4 days after recirculation are seen. TUNEL method, X 200.

Fig 14. Higher magnification of fig 13. TUNEL method, X 400.

Fig 15. Apoptotic positive neurons in CA1 subfield of hippocampus in gerbil at 7 days after recirculation are clearly seen. TUNEL method, X 200.

Fig 16. Higher magnification of fig 15. TUNEL method, X 400.

였으며, Bonnekon *et al*<sup>12</sup>은 3주 뒤에는 단지 약 5%의 신경세포만 생존한다고 하였다. 또한 Petito *et al*<sup>4</sup>은 사람에서는 일시적 대뇌허혈 후 2-4일 이내에 해마 CA1 부위 신경세포가 퇴행한다고 하였다.

본 실험에서도 10분 허혈 후 재관류 2일군의 subiculum-CA1 부위에서 신경세포의 초기 변성으로써 세포질과 축삭돌기의 호산성화, 핵염색질의 분절화, 군집화, 또는 농축, 핵의 다각화 및 불규칙한 변형 그리고 핵의 소실 등으로 인한 피라밋층이 협소화 등이 관찰되었다. 이러한 신경세포의 손상은 재관류 4일군에서는 더욱 진행되어 subiculum-CA1 부위뿐만 아니라 lateral CA1 부위에서도 광범위하게 나타났는데 정상적인 세포들은 거의 관찰할 수 없었고 피라밋신경층은 매우 협소화되었다. 재관류 7일군에서는 재관류 4일군에서와 같이 CA1 부위의 거의 모든 신경세포가 광범위하게 변성, 소실되어 피라밋층의 신경세포 수가 현저히 감소하였다.

CA2 부위는 재관류 2일군에서는 대부분의 신경세포들이 특이적으로 강한 호산성 세포질의 염색성을 나타내었다. 이러한 소견은 세포질 구성성분의 특성인 것으로 생각되었다. 재관류 4일군에서는 이 세포들의 호산성 염색 농도는 저하되는 반면에 핵의 변성이 심하여 삼각형 내지 다각형으로 변형되어 짙게 염색되었다.

CA3, CA4 부위의 신경세포들은 재관류 4일군에서 일부 변성된 소견을 보였으며, 재관류 7일군에서는 대부분의 신경세포가 해마특실린에 짙게 염색되었으며, 삼각형이나 다각형으로 변형되고 위축된 소견을 보였다.

체온이 해마의 신경세포 손상에 미치는 영향에 대하여 Ginsberg *et al*<sup>9</sup>은 20분간의 대뇌허혈에서 해마 CA1 부위의 신경세포가 36°C에서는 100% 손상되는데 비해 34°C에서는 20%, 30-33°C에서는 0% 영향받았다고 하였다. 10분간의 허혈을 가한 Kim *et al*<sup>31</sup>의 보고에 의하면 신경세포 감소율이 38.5°C에서는 98%, 36.5°C에서는 89%로 나타난 데 비해 34.5°C에서는 5%에 불과한 것으로 나타났다. 본 실험에서도 체온을 37±0.5°C로 유지한 결과 CA1 부위의 신경세포의 감소율이 재관류 4일군에서는 98.3%, 재관류 7일군에서는 99.6%로 나타나 Kim *et al*<sup>31</sup>의 결과와 유사하였다.

해마 CA1 부위에서 허혈에 대한 신경세포수의 조사에 대하여는 대조군과 10분 허혈 후 7일 재관류의 경우 Busto *et al*<sup>29</sup>이 각각 131.5/mm와 3/mm으로, Clifton *et al*<sup>32</sup>은 254.4/mm와 16/mm으로, Kitagawa *et al*<sup>33</sup>은 193.6/mm과 12.9/mm로, Chum *et al*<sup>34</sup>은 각각 250.2/mm와 28.4/mm로 보고한 바 있다. 본 실험에서 대조군은 192.5/mm였고, 재관류 7일군은 0.8/mm로 생존율은 0.4%로 위의 보고들 보다 낮았다.

Hara *et al*<sup>18</sup>은 흰쥐에서 apoptosis 양성반응이 허혈 후 3일에 관찰되기 시작하여 7일에 완료된다고 하였고, Daniel *et*

*al*<sup>19</sup>은 gerbil에서 3일에 관찰되어 4일에 최고치에 도달하였다고 하였으며, Iwai *et al*<sup>17</sup>은 gerbil에서 2일에 apoptosis 양성반응이 보였고 4일에는 CA1 전 부위에서 양성반응을 보인 세포가 광범위하게 나타났다고 하였다. 본 연구에서 손상이 가장 많은 CA1 부위에서 재관류 시간 경과에 따른 apoptosis 양성반응 신경세포수를 조사한 바 대조군에서는 apoptosis 양성반응을 보인 신경세포가 관찰되지 않았으나, 재관류 2일군, 4일군, 7일군에서 각각 67.8/mm, 153.0/mm, 123.7/mm로 나타났다. 이러한 결과는 apoptosis에 대한 다른 연구자들의 정량적인 자료를 찾아보기 어려워 비교할 수는 없었으나, Tseng *et al*<sup>20</sup>이 개에서 허혈 후 8시간에 최고치에 도달하여 72시간에는 양성반응이 나타나지 않는다는 보고와는 상이하였다.

## 결론

일시적 대뇌허혈이 신경세포의 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 gerbil의 양측 총목동맥의 혈류를 10분간 차단하여 뇌허혈을 유도하고 재관류한 후 2일, 4일, 7일간 경과시킨 군 및 대조군 등의 4개군으로 구분하여 뇌의 해마 부위의 신경세포의 손상의 차이를 조직학적 및 면역조직화학적 방법으로 조사한 바 다음과 같은 결과를 관찰하였다.

1. 조직학적으로는 모든 허혈군의 해마부위에서 수중, 신경세포의 세포질과 축삭돌기의 호산성화, 신경세포핵의 농축, 염색질의 군집화, 핵형태의 다각화 및 불규칙한 변형, 핵의 소실, 신경세포사로 인한 피라밋층의 협소화 등의 소견이 관찰되었고, 신경세포 세포질의 호산성 변화 소견은 재관류 2일군의 CA2 부위에서 가장 특징적으로 나타났다.
2. 허혈후 시간 경과에 따라 해마의 조직표본에서 신경세포의 손상을 조사하기 위하여 피라밋층의 CA1, CA2, CA3, CA4 각 부위의 장축 1 mm당 잔존한 정상형태의 신경세포의 평균수를 조사하고 대조군과 비교한 바 재관류 2일군에서는 대조군에 비하여 각각 54.3% (104.5/mm), 33.8% (51.0/mm), 85.6% (105/mm), 93.5% (124.3/mm)였고, 부위별로는 CA2, CA1, CA3, CA4 순으로 손상이 많아 CA2 부위가 가장 빠르게 신경세포가 손상되었다.
3. 재관류 4일군에서는 대조군에 비하여 각각 1.7% (3.2/mm), 34.2% (51.5/mm), 77.4% (95.3/mm), 84.6% (112.5/mm)였고, 부위별로는 CA1, CA2, CA3, CA4 순으로 손상이 많아 CA1 부위가 가장 많은 손상을 받았다.
4. 재관류 7일군에서는 대조군에 비하여 0.4% (0.8/mm), 3.8% (5.7/mm), 8.0% (9.8/mm), 3.7% (5.0/mm)로 해마의 모든 부위에서 신경세포의 수가 현저히 감소되었고, 부

위별로는 CA1, CA4, CA2, CA3 순으로 손상이 많았다.

5. 신경세포의 손상이 가장 많은 해마 CA1 부위에서 apoptosis가 일어나고 있는 신경세포수를 조사하기 위하여 TUNEL법에 의한 면역염색을 실시한 결과, 재관류 2일군은 67.8/mm, 재관류 4일군은 153.0/mm, 재관류 7일군은 123.7/mm였고 대조군에서는 관찰되지 않았다. 이러한 소견은 신경세포사는 지연성으로 주로 apoptosis에 의한 것임을 알 수 있었다.

## 참고 문헌

1. Siesjo BK. Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg*, 60 : 883-908, 1984.
2. Winn RH, Welsh JE, Rubio R, et al. Changes in brain adenosine during bicucullin-induced seizures in rats. Effects hypoxia and altered systemic blood pressure. *Circ Res*, 47 : 568-577, 1980.
3. Zetterstrom T, Vernet L, Ungerstedt U, et al. Purine levels the intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fiber. *Neurosci Lett*, 29 : 111-115, 1982.
4. Petit CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, et al. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology*, 37 : 1281-1286, 1987.
5. 이용석, 윤병우, 노재규. Gerbil의 일과성 전뇌허혈모델에서 lamotrigine에 의한 해마의 지연성 신경세포손상 감소효과. *대한신경과학회지*, 16(2) : 113-118, 1998.
6. Waytt JS, Edward AD, Azzopardi D et al. Magnetic resonance and near infrared spectroscopy for investigation of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Arch Dis Child*, 64 : 953-963, 1989.
7. Levy DE, Brierley JB. Communications between vertebrobasilar and carotid arterial circulations in the gerbil. *Exp Neurol*, 45 : 503-508, 1974.
8. Jorgensen MB, Diemer NH. Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat. Possible role of transmitter glutamate. *Acta Neurol Scand*, 66 : 536-546, 1982.
9. Ginsberg MD, Busto P. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, 20(12) : 1627-1639, 1989.
10. Abe K, Aoki M, Kawagoe J, et al. Ischemic delayed neuronal death-a mitochondrial hypothesis. *Stroke*, 26 : 1478-1489, 1995.
11. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*, 239 : 57-69, 1982.
12. Bonnekoh P, Barbier A, Oschlies U, et al. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus: morphological changes after 5-min ischemia and long survival times. *Acta Neuropathol*. 80 : 18-25, 1990.
13. Heron A, Pollard H, Dessi F, et al. Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observation in the rat brain. *J Neurochem*, 61 : 1973-1976, 1993.
14. MacManus JP, Buchan AM, Hill IE, et al. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett*, 164 : 89-92, 1993.
15. Okamoto M, Matsumoto M, Ohtsuki T, et al. Internucleosomal DNA cleavage involved in ischemia-induced neuronal death. *Biochem Biophys Res Commun*, 196 : 1356-1362, 1993.
16. Deshpande J, Bergstedt K, Linden T, et al. Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell death. *Exp. Brain Res*, 88 : 91-105, 1992.
17. Iwai T, Hara A, Niwa M, et al. Temporal profile of nuclear DNA fragmentation in situ in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 671 : 305-308, 1995.
18. Hara A, Yoshimi N, Mori H, et al. Hypothermic prevention of nuclear DNA fragmentation in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neurol Res*, 17 : 461-464, 1995.
19. Daniel MR, Jason D, John AK. Pretreatment with intraventricular aurointricarboxylic acid decreases infarct size by inhibiting apoptosis following transient global ischemia in gerbils. *Annals of Neurology*, 43 : 654-660, 1998.
20. Tseng E, Broke M, Lange M, et al. Neuronal nitric oxide synthesis inhibition reduces neuronal apoptosis after circulatory arrest. *Annals of Thoracic Surgery*, 64(6) : 1639-1647, 1997.
21. Amaral D, Witter M. The three dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31 : 571-591, 1989.
22. Stummer W, Weber K., Trammer B, et al. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke*, 25 : 1862-1869, 1994.
23. Eke A, Conger K, Anderson M, et al. Histologic assessment of neurons in rat model of cerebral ischemia. *Stroke*, 21 : 299-304, 1990.
24. Fujusawa A, Matsumoto M, Matsuyama T, et al. The effect of the calcium antagonist nimodipine on the gerbil model of experimental cerebral ischemia. *Stroke*, 17 : 748-752, 1986.
25. Grotta JC, Pettigrew LE, Rosenbaum DM. 1988. Studies on the efficacy and mechanism of action of calcium blocker after global cerebral ischemia. *Stroke*, 19 : 447-454, 1988.
26. Gill R, Foster AC, Woodruff GN. MK-801 is



- neuroprotective in gerbils when administered during the post ischemic period. *Neuroscience*, 25 : 847-855, 1988.
27. Hall ED, Pazara KE, Braughler JM. 21-Aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U74006F protects against cerebral ischemia in gerbils. *Stroke*, 19 : 997-1002, 1988.
  28. Kaplan TM, Lasner TM, Nadler JV, et al. Lesions of excitatory pathways reduce hippocampal cell death after transient forebrain ischemia in the gerbil. *Acta Neuropathol*, 73 : 189-194, 1989.
  29. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, et al. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 7 : 729-738, 1987.
  30. Kirino T, Sano K. Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol*, 62 : 209-218, 1984.
  31. Kim YJ, Rha JH, Kim BS. Effects of systemic temperature on hippocampal neuronal survival in transient global ischemia animal model. *J Korean Neurological Science*, 15 : 19-29, 1997.
  32. Clifton GL, Taft WC, Blair RE, et al. Conditions for pharmacologic evaluation in the gerbil model of forebrain ischemia. *Stroke*, 20 : 1545-1552, 1989.
  33. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res*, 528 : 21-24, 1990.
  34. Churn SB, Taft WC, Billingsley MS, et al. Temperature modulation of ischemic neuronal death and inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in gerbils. *Stroke*, 21 : 1715-1721, 1990.