

Kainic Acid 유발 마우스 간질모델에서 Minocycline에 의한 Caspase 의존성 세포고사 억제

신하영 · 조양제 · 조경주 · 김현우 · 김현정 · 김경환 · 이병인 · 허 경

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 뇌연구소

Minocycline Inhibits Caspase-Dependent Cell Death Pathway and is Neuroprotective against Hippocampal Damage after Kainic Acid-Induced Seizure in Mice

Ha Young Shin, M.D., Yang-Je Cho, M.D., Kyoung-Joo Cho, Hyun-Woo Kim, Hyun-Jung Kim, Gyung Whan Kim, M.D., Ph.D., Byung In Lee, M.D. and Kyoung Heo, M.D.

Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine, Brain Research Institute, Seoul, Korea

Purpose: Despite current acceptance of its neuroprotective property, whether the minocycline affords neuroprotection or how it protects neurons against seizures in the animal model of epilepsy is not clear. This prompts us to investigate whether minocycline is neuroprotective against kainic acid (KA)-induced seizure in mice through inhibition of caspase-dependent mitochondrial apoptotic pathways.

Methods: Adult male ICR mice were subjected to seizures by intrahippocampal KA injection with treatment of vehicle or minocycline. For cell death analysis, histological analysis using cresyl-violet staining, TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL), and histone-associated DNA fragmentation analysis were performed. Evaluation of cytochrome *c*, cleaved caspase-3, and caspase-3 activity were also performed.

Results: Hippocampal neuronal death was evident by cresyl vio-

let staining, TUNEL, and cell death assay in vehicle-treated mice after KA injection; however, there was significant reduction of cell death in the minocycline-treated group. Significant decrease of both cytosolic translocation of cytochrome *c* and subsequent activation of caspase-3 after treatment of minocycline were demonstrated by Western blot analysis, immunohistochemical staining, and caspase-3 activity assay.

Conclusion: This study suggests that minocycline may be neuroprotective against hippocampal damage after KA-induced seizure through inhibition of caspase-dependent cell death pathways. (J Korean Epilep Soc 2006;10(1):3-10)

KEY WORDS: Minocycline · Seizure · Apoptosis · Caspase · Cytochrome *c*.

서론

Minocycline은 tetracycline계 항생제의 일종으로 류마치스 관절염이나, 여드름 등의 치료제로서 임상적 안전성이 확립된 제제이다.¹ 또한 minocycline은 경구 투여

가 가능하고, 생체 이용률(bioavailability)이 높은 특성이 있으며, 특히 작은 분자량(495 kDa)과 높은 지질친화성으로 인해 뇌혈관장벽을 효과적으로 통과한다는 장점이 있다.²

최근, Yrjanheikki 등³에 의해 백서 전대뇌허혈 모델에서 minocycline이 신경보호(neuroprotective) 효과가 있음이 보고된 이후, 뇌경색,^{3,4} Huntington's disease,^{5,6} 근위축성축삭경화증,⁷ 다발성 경화증⁸ 및 파킨슨병⁹과 같은 여러 실험 동물 모델에서 minocycline의 신경보호효과가 보고되었다. 아직까지 minocycline의 신경보호기전은 명확하진 않으나, 소교세포(microglia)의 활성화 억제를 통한 염증반응 억제, matrix metalloproteinase의 억

Received 2 May 2006

Accepted 30 May 2006

Corresponding author: Kyoung Heo, M.D., Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine, 134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

E-Mail: Kheo@yumc.yonsei.ac.kr

This work was supported by Yonsei University Research Fund of 2005 (6-2005-0093).

제, 미토콘드리아에서의 cytochrome *c* 유리 억제와 caspase-1, caspase-3 등의 활성 억제를 통한 caspase 의존성 세포고사 경로 억제 등이 그 기전으로 제시된 바 있다.^{1,3,5,7}

이렇듯 여러 신경계 질환의 동물 모델에서 minocycline의 신경보호효과가 입증되었지만, 간질 동물모델에서의 minocycline의 세포보호효과에 대해서는 아직 연구가 이루어지지 않은 상태이다. 따라서 본 실험에서는 측두엽 간질 모델의 하나인 kainic acid (KA)유발 마우스 간질모델^{10,11}에서 minocycline이 신경세포 사멸을 감소시킬 수 있는지를 알아보고, 그 기전으로 minocycline이 caspase 의존성 세포고사 경로를 억제하는지를 살펴보고자 하였다.

방 법

실험동물

모든 실험동물들은 연세대학교 의과대학 동물 실험 윤리위원회의 지침에 따라 사용되었다. 수컷 ICR (Institute of Cancer Research) 마우스(3개월, 체중 35~40 g, Samtako, 경기도, 대한민국)를 이용하였다. 한 우리(cage) 당 5마리로 사육하였고, 실내온도는 $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며, 12시간 간격으로 낮과 밤의 주기를 두었다. 물과 먹이는 자유롭게 접근하도록 하였다.

Kainic acid 유발 간질모델과 minocycline 투여

실험 동물들을 2.5% isoflurane과 질소와 산소 혼합기체(70%/30%)로 마취시켰다. 수술 도중 가열 받침(heating pad)과 가열 전등(heating lamp)으로 정상 체온을 유지시켰다. 동물의 머리를 정위 장치(stereotaxic frame)에 고정시킨 후, 두피의 정중선을 절개하여 두개골을 노출시킨 다음, bregma의 위치를 확인하였다. 우측 해마 위치(anteroposterior (AP)=-2.0 mm; mediolateral (ML)=1.7 mm; dorsoventral (DV)=-1.8 mm)에 32 gauge Hamilton syringe (Hamilton, Reno, NV, USA)를 사용하여 KA ($0.5 \mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ in 0.9% saline; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 micropump를 통해 10분에 걸쳐 투여하였다. 주사 바늘 제거 후 나타날 수 있는 KA의 역류를 막기 위하여 KA 투여 후 주사 바늘을 10분간 더 그 자리에 위치시켰다.

생리식염수에 용해시킨 minocycline hydrochloride (45 mg/kg; Sigma)는 KA 처치 12시간 전에 복강 내로 주사하였고, KA 처치 30분 후에 minocycline (90 mg/kg)을 다시 주사하였다.³ Vehicle 처리군은 KA 처

치 후, minocycline과 같은 양(volume)의 0.9% saline을 같은 시간대에 복강 내로 주사하였다. 정상 대조군은 KA나 vehicle을 처리하지 않은 마우스를 대상으로 하였다.

KA 처치 후 1시간 동안 plexiglass chamber에서 마우스의 행동을 관찰하여 KA를 처치한 모든 마우스에서 발작(seizure)이 나타나는 것을 확인하였고, 발작지속시간을 일정하게 유지하기 위해 KA 처치 60분 뒤에 diazepam (2.5 ml/kg; Roche, Paris, France)을 복강 내로 주사하여 발작을 정지 시켰다. Racine stage 5이상의 지속적인 전신 발작을 보인 마우스만을 실험에 포함시켰다.

조직절편을 이용한 분석

절편제작

Urethane을 이용하여 실험동물을 희생시킨 뒤 10 U/ml heparin이 든 0.9% saline과 3.7% formaldehyde를 차례로 심장을 통하여 관류시키고, 뇌를 적출하여 3.7% formaldehyde에 고정하였으며, 그 후 30% sucrose에 저장하였다. 잘게 부순 드라이 아이스 속에서 뇌 조직을 급냉시키고, 동결 절편기(microtome cryostat)를 이용하여 $20 \mu\text{m}$ 두께로 관상절편을 만든 후, 슬라이드에 올렸다.

Cresyl violet 염색

제작된 절편을 2~3시간 이상 건조 시킨 후, 자일렌에 3분간 2회 담가두었다. 그 뒤 100%, 90%, 70% 에탄올에 차례대로 1분 30초씩 담근 후 증류수에 3분간 2회 함수과정을 거쳤다. 함수과정을 마친 절편을 cresyl violet (Sigma) 염색 액에 8분간 담가두었고, 이 후 탈수와 정으로 증류수와 70%, 90%, 100% 에탄올에 순서대로 넣었다가 자일렌으로 세척 하였다. 커버글라스를 덮고 퍼마운트로 봉입한 후, 광학 현미경으로 관찰하였다.

반정량적(semi-quantitative) 분석을 위해 대조군(KA-untreated), vehicle 투여군 및 minocycline 투여군 각각의 마우스 배측 해마에서 $300 \mu\text{m}$ 간격의 연속된 4개의 절편을 이용하였으며, CA1과 CA3 부위에서 형태학적으로 손상 받은 신경세포 수를 세어 이를 비교하였다.¹²

DNA 분절(fragmentation) 현상 검출

DNA 분절현상을 확인하기 위하여, TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 염색을 시행하였다. 위에 기술한 방법으로 준비한 조직 절편을 37°C 의 어두운 방에서 1시간 동안 TUNEL reaction mixture (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)

50 μ l와 반응시켰다. 이 절편을 조심스럽게 세척을 한 뒤, 핵 대조 염색을 위해 실온에서 20분간 propidium iodide (PI; Sigma) 0.5 g/ml와 반응시켰다. 절편을 세척한 후 Vectashield mounting medium (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 봉입하였고, LSM 510 confocal laser scanning microscopy (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)을 이용하여 관찰하였다.

면역조직화학 염색(Immunohistochemical staining)

Cytochrome *c*에 대한 면역조직화학검사를 위해 준비한 조직절편을 PBS로 세척을 하고 일차 항체로 반응시켰다. Cytochrome *c*에 대한 일차 항체로는 rabbit anti-cytochrome *c* polyclonal antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였다. 절편을 일차 항체로 4°C에서 8시간 정도 반응 시킨 후, 이차 항체인 FITC-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)를 실온에서 1시간 동안 반응시켜 면역조직화학검사를 시행하였다. PI를 이용해서 핵 대조 염색 후, confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss)을 이용하여 관찰하였다.

Western blot analysis

KA 주입 후 1시간, 4시간, 그리고 24시간 뒤에 실험동물을 희생시키고 뇌 조직을 적출하였다. 곧바로 KA를 주입한 쪽의 해마를 적출하여 잘게 부순 드라이 아이스로 급냉시키고 -80°C에 보관하였다. 각 조직을 4°C에서 lysis buffer (50 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, pH 7.8)로 균질화(homogenize)하였다. 이 시료를 미토콘드리아 분획, 세포질 분획, 세포핵 분획으로 나누기 위하여 원심분리를 하였다. 시료를 4°C, 750 g에서 10분간 원심분리한 후, 이 pellet을 핵 분획으로 사용하였다. 이 후, 다시 상층액을 모아서 4°C, 10,000 g에서 20분간 원심분리한 후, 여기서 얻어진 pellet을 미토콘드리아 분획으로 이용하였다. 다시 남겨진 상층액을 100,000 g로 60분간 원심분리를 하였고 그 상층액을 세포질 분획으로 사용하였다.

Cytochrome *c*의 세포질 내 전위(cytosolic translocation)를 확인하기 위해 미토콘드리아 분획과 세포질 분획에서 cytochrome *c*에 대한 Western blot을 시행하였으며, cleaved caspase-3의 발현 정도를 확인하기 위해서 전세포 분획(whole cell fraction)을 사용하여 Western blot을 시행하였다. 동량의 단백질을 같은 부피의 2X sample buffer (125 mM Tris/HCl, 2% SDS, 10% gly-

cerin, 1 mM DDT, and 0.002% bromphenol blue, pH 6.9)에 넣고 5분간 가열하였다. SDS-polyacrylamide gels (7.5%)에서 전기영동 한 후, PVDF 막(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)으로 옮겼다. 이 PVDF 막을 0.1% Tween 20이 포함된 TBS (50 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 7.3)로 세척하고 5% skim milk로 4°C에서 8시간 이상 blocking 하였다. 일차 항체로 rabbit anti-cytochrome *c* polyclonal antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology)와 rabbit anti-cleaved caspase-3 polyclonal antibody (1:500; Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA)를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 반응을 시켰다. 이 후, 5차례 0.1% Tween 20이 포함된 TBS (50 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 7.3)로 세척하고 horseradish peroxidase (1:5000 in TBS plus 5% milk)가 결합된 이차 항체로 실온에서 60분간 반응시킨 후 ECL plus kit (Amersham International, Buckinghamshire, England)으로 감광시켜 확인하였다. LAS-1000 plus (Fuji Film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 이미지를 얻었고, TINA 2.0 (Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

Caspase inhibitor 처리

Pan-caspase inhibitor인 N-benzyloxycarbonyl-val-ala-aspartic acid-fluoromethyl ketone (z-VAD.fmk; Sigma) 2 μ l를 Hamilton syringe (Hamilton)를 사용하여 뇌실(AP=0.2 mm; ML=1.0 mm; DV=-3.1 mm)에 KA처치 30분 후에 주입하였다. 대조군은 같은 양의 0.25% DMSO가 포함된 PBS를 주입하였다.

Caspase-3 활성 측정

Caspase-3의 활성을 측정하기 위해서, 활성화된 caspase-3에 의해 기질의 N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (DEVD-AFC) 절단부위를 특이적으로 인식하여 ELISA방법으로 생물학적 발광을 내는 Caspase-3 activity assay kit, fluorometric (Calbiochem, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. 세포질 표본은 Western blot 분석방법대로 준비하였다. 세포질 표본의 단백질을 정량하여, 같은 양의 시료에 kit와 함께 제공된 assay buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 4 mM dithiothreitol) 및 caspase-3 substrate conjugate을 넣고 37°C에서 60분 동안 반응시킨 후 형광(excitation/emission: 400/505 nm)을 측정하였다.

Cell death assay

DNA 분절정량을 위해 세포질내의 histone-associated DNA 분절을 감지하는 cell death detection^{PLUS} kit (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)을 이용하였으며,¹³ Saito 등¹⁴이 기술하였던 방법을 약간 변경하여 시행하였다. KA를 주입하고 24시간 후에 KA를 주입한 쪽의 해마를 적출하여 4°C에서 조직의 7배 부피의 용해 완충액(lysis buffer; 50 mM KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, pH 7.8)으로 균질화(homogenize) 시켰고, 4°C, 750 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이 상층액을 10,000 g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 4°C, 100,000 g에서 60분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 얻어진 상층액을 세포질 분획으로 사용하였다. 단백질을 정량 한 뒤 같은 양의 시료를 이용하여 cell death detection^{PLUS} kit (Roche Diagnostics)에서 제공된 방법에 따라 ELISA를 시행하였다.

통계학적 분석

통계 자료들은 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였다. 두 군간의 통계 비교는 unpaired t-test (StatView, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)로 시행하였으며, p<0.05를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

조직학적 분석을 통한 KA에 의한 발작 후 신경세포 사멸과 minocycline의 효과

Vehicle를 투여한 군에서는, KA 처치 24시간 후 cresyl violet 염색에서 해마세포 사멸이 뚜렷이 관찰되었

다(Figure 1A). 하지만, minocycline을 투여한 마우스 해마에서는 이 같은 신경세포 손상 소견이 vehicle 투여군에 비해 상대적으로 감소함이 관찰되었다. 또한 정량적 분석을 통해, minocycline 투여군에서는 vehicle 투여군에 비해 의미있게 많은 CA1과 CA3 pyramidal 세포들이 생존함을 관찰할 수 있었다(percentage of surviving cells against control: minocycline-CA1, 32.47±4.56; vehicle-CA1, 2.87±0.64*; minocycline-CA3, 44.80±2.13; vehicle-CA3, 11.99±2.01**; t-test, *p<0.001, **p<0.01) (Figure 1B).

KA에 의한 발작 후 cytochrome c의 세포질내 전위와 minocycline의 효과

KA 처치 후 1시간과 4시간째에 cytochrome c의 세포질 내 전이를 관찰하였다. Western blot 분석에서, KA를 처치하지 않은 정상 대조군에서는 세포질 분획에서는 11 kDa의 cytochrome c 항체반응이 거의 나타나지 않았고, 미토콘드리아 분획에서만 cytochrome c 항체반응이 강하게 일어났다. KA유발 발작 후 vehicle를 투여한 군에서는, 세포질 분획에서도 강한 cytochrome c 항체반응이 관찰되어 cytochrome c의 세포질 내 전이를 확인할 수 있었다. 하지만, minocycline을 투여한 군에서는 세포질 분획의 cytochrome c의 항체반응은 vehicle를 투여한 군에 비하여 의미있게 감소하였다(Optical density (OD): control, 1.37±0.13; vehicle-treated 1 h, 20.11±2.02; vehicle-treated 4 h, 23.77±1.72; minocycline-treated 1 h, 14.33±1.54*; minocycline-treated 4 h, 16.32±0.70**; t-test, *p<0.01, **p<0.001) (Figure 2A).

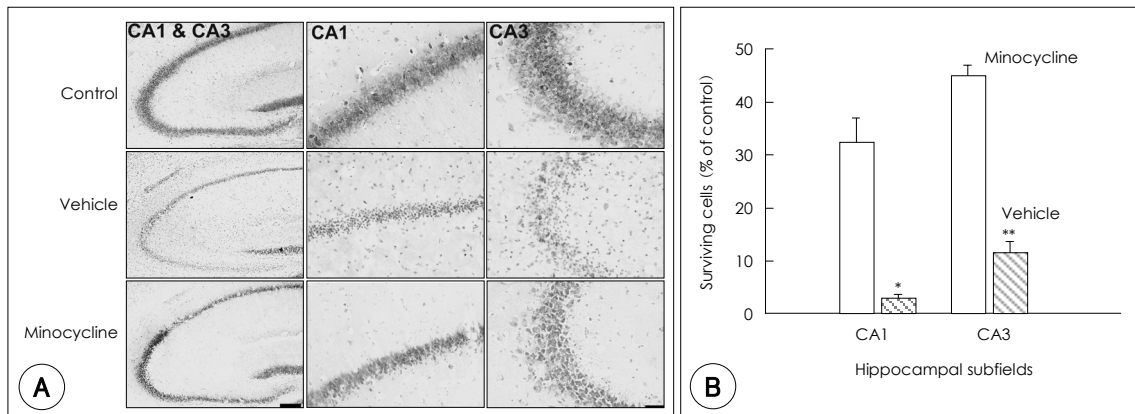


Figure 1. Histological analysis of mice hippocampus at 24 h after KA treatment. A: In normal control, there was no apparent hippocampal cell death. Profound neuronal loss and nuclear fragmentation were noted in the CA1 and CA3 subfield in the vehicle-treated mice at 24 h after kainic acid injection. Neuronal cell death in the same subfields was prominently reduced by minocycline treatment. Bar=100 μm in left panel and 50 μm in middle and right panel. B: Surviving cells in both CA1 and CA3 were significantly increased in minocycline-treated mice at 24 h after KA treatment, compared to vehicle-treated mice.

Cytochrome *c*에 대한 면역조직화학염색을 KA 처치 후 4시간째에 시행하였다. KA를 처치하지 않은 정상 대조군에 비하여, KA유발 발작 후 vehicle을 투여한 군에서 해마 신경세포질 내에 cytochrome *c*에 대한 면역반응(green color)이 뚜렷이 증가되었다. 이에 비해, minocycline을 처치한 군은 세포질 내 cytochrome *c*에 대한 면역반응이 vehicle을 처치한 군에 비하여 감소됨을 관찰할 수 있었다(Figure 2B).

KA에 의한 발작 후 caspase 의존성 세포고사와 minocycline의 효과

KA를 처치하지 않은 정상 대조군의 해마에서는 TUNEL 양성 세포들이 관찰되지 않았다. KA유발 발작 후 vehicle을 투여한 군에서는 많은 TUNEL 양성 세포들이 관찰되었으며, CA1, CA3 부근에서 많이 관찰되었다. 하지만, minocycline을 투여한 군에서는 이러한 TUNEL 양성 세포가 vehicle 투여군에 비해 의미있게 감소하였다 (TUNEL-positive cells: vehicle-CA1, 3538±265.89/

mm²; minocycline-CA1, 1586±460.54/mm²; vehicle-CA3, 2542±140.87/mm²; minocycline-CA3, 1708±161.39/mm²; t-test, *p<0.01, **p<0.001) (Figure 3A).

KA 처치 후 4시간, 24시간째에 cleaved caspase-3에 대한 Western blot 분석을 시행하였으며, 17 kDa과 19 kDa에 해당하는 부분에서 cleaved caspase-3에 대한 면역반응이 두 개의 띠로 관찰되었다. KA를 처치하지 않은 정상 대조군에 비해, KA유발 발작 후 vehicle을 투여한 군에서는 cleaved caspase-3의 발현양이 뚜렷이 증가함을 알 수 있었다. 이에 반해 minocycline을 투여한 군에서는 vehicle 투여군에 비해 cleaved caspase-3의 발현이 유의하게 감소됨을 관찰하였다(OD: control, 7.64±0.43; vehicle-treated, 4 h, 57.48±3.16; 24 h, 85.39±4.98; minocycline-treated, 4 h, 34.91±3.98*; 24 h, 56.54±4.16**; t-test, *p<0.01, **p<0.001) (Figure 3B).

KA유발 발작 후 24시간째에서 KA처치 후 vehicle을 투여한 군, KA처치 후 caspase 억제제인 z-VAD.fmk을 투여한 군, 그리고 KA처치 후 minocycline을 투여한

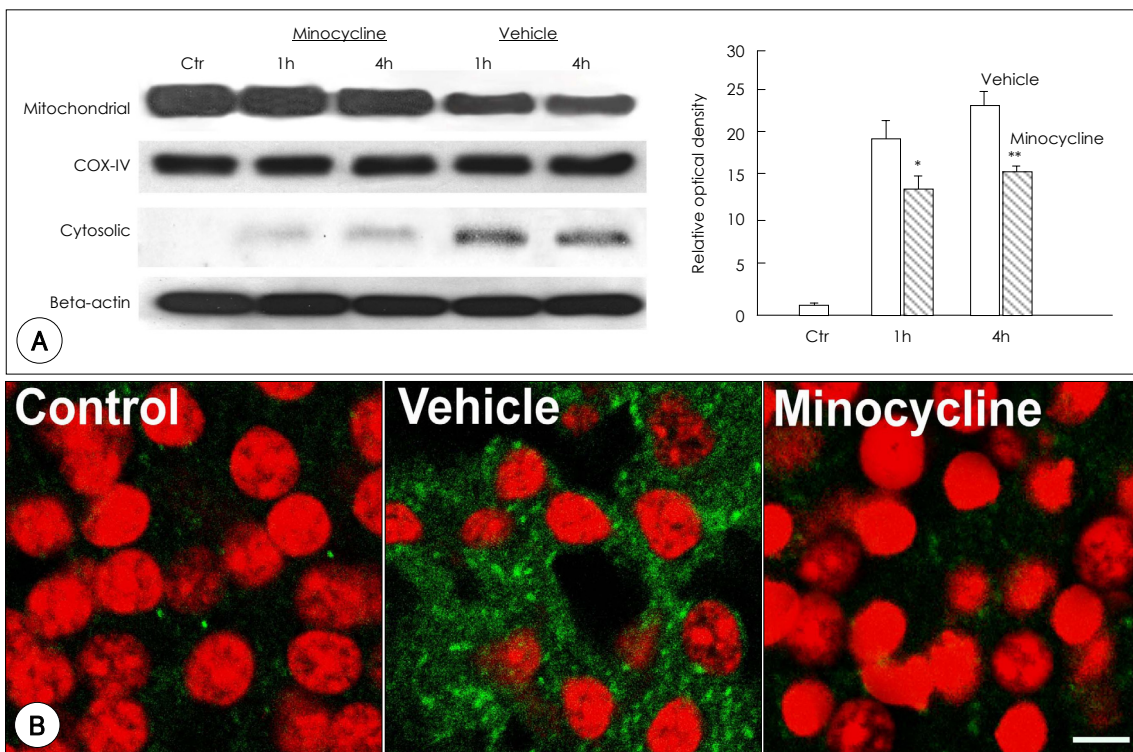


Figure 2. Reduction of cytosolic release of cytochrome *c* by minocycline. A: In western blot analysis, the amount of cytosolic cytochrome *c* was significantly reduced in minocycline-treated mice at 1 h and 4 h after KA injection, compared to the vehicle-treated mice. B: In immunohistochemistry of cytochrome *c* (green color), the increased immunoreactivity of cytosolic cytochrome *c* of vehicle-treated mice was evident at 4 h after KA injection, compared to control. In contrast, minocycline-treated mice showed reduction of cytochrome *c* immunoreactivity in cytosol, compared to vehicle-treated mice. Bar=50 μm. Ctr, control; COX, cytochrome oxidase. COX-IV and beta-actin; internal controls of each mitochondrial and cytosolic subfractions. Samples are from five independent studies.

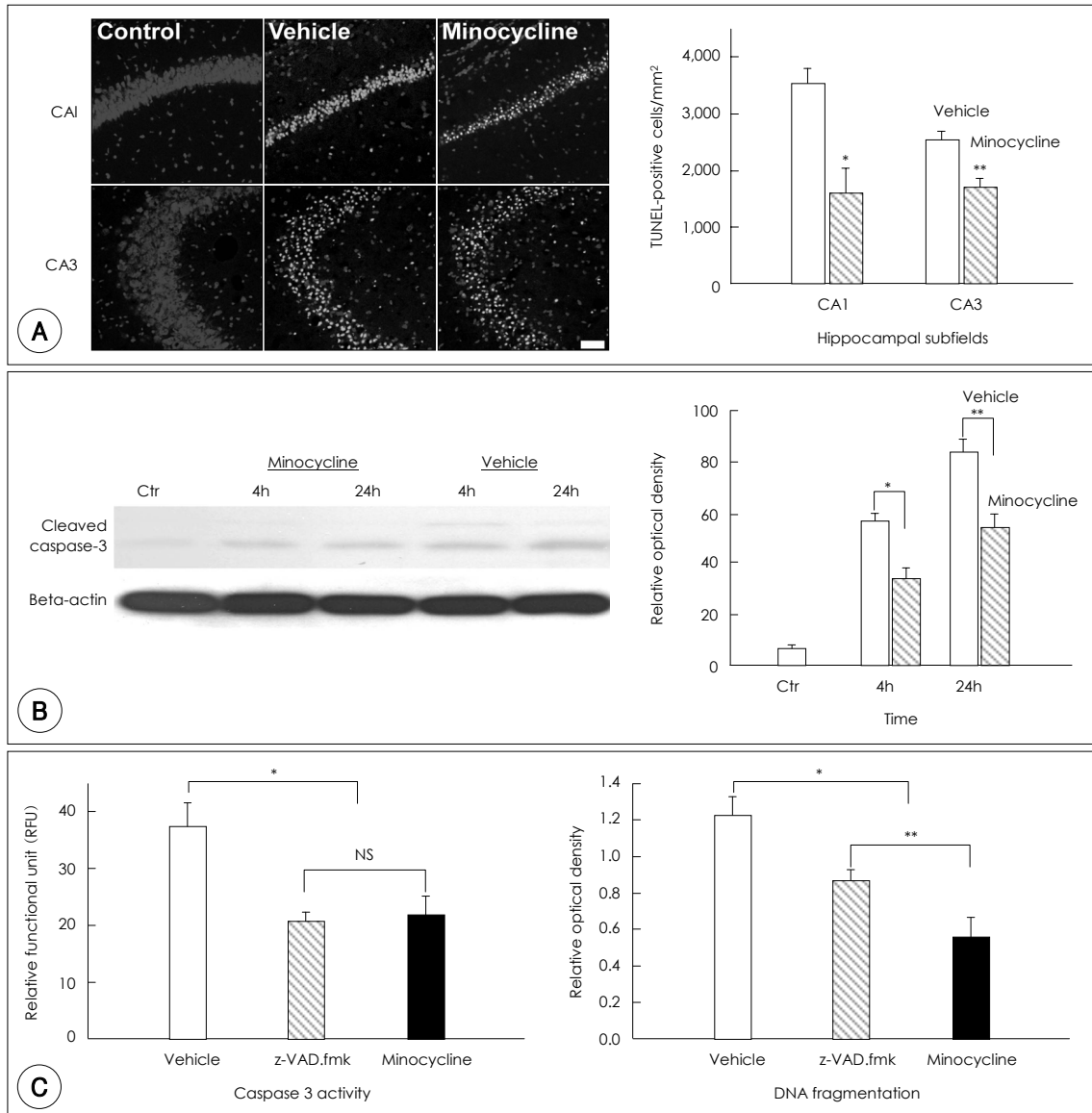


Figure 3. Reduction of caspase-dependent apoptotic cell death by minocycline after KA-induced seizure. A: Immunofluorescent TUNEL staining and its semi-quantitative analysis showed that TUNEL-positive cells in both CA1 and CA3 were notably reduced in minocycline-treated mice after KA injection, compared to the vehicle-treated mice. Bar=50 μ m. B: In Western blot analysis, the amount of cleaved caspase-3 was significantly reduced in minocycline-treated mice, compared to vehicle-treated mice. Samples are from five independent studies. Ctr, control. C: Comparison of caspase-3 activity and histone-associated DNA fragmentation assay among the normal control, z-VAD.fmk- and minocycline-treated mice at 24 h after KA injection. Samples are from five independent studies.

군에서 caspase-3 activity assay를 시행하였는데, vehicle 투여군에 비해 z-VAD.fmk 투여군과 minocycline 투여군에서 caspase-3 활성도가 의미있게 감소하였다(OD: control, 22.76 ± 5.66 ; vehicle, 57.27 ± 6.99 ; z-VAD.fmk, $37.59 \pm 1.69^*$; minocycline, $41.65 \pm 3.34^*$; t-test, $*p < 0.001$). 하지만 z-VAD.fmk 투여군과 minocycline 투여군 사이에는 caspase-3 활성도의 차이가 없었다($p = 0.96$) (Figure 3C).

역시 위와 같은 조건에서, cell death detection kit을 이용하여 histone-associated DNA 분절을 비교하였는데, vehicle 투여군에 비해 z-VAD.fmk 투여군과 minocycline 투여군에서 DNA 분절이 의미있게 감소하였다(OD: control, 0.18 ± 0.02 ; vehicle, 1.23 ± 0.10 ; z-VAD.fmk, 0.87 ± 0.06 ; minocycline, 0.56 ± 0.11 ; t-test, $*p < 0.001$). 하지만, z-VAD.fmk 투여군과 minocycline 투여군에서 caspase-3 활성의 차이가 없었음에도 불구하고, mino-

cycline 투여군에서 z-VAD.fmk 투여군에 비해 DNA 분절 양이 통계적으로 의미있게 감소하였다(**p<0.01) (Figure 3C).

고 찰

저자들은 이번 실험을 통해, KA에 의해 유발된 경련발작으로 인한 세포 사멸에서 minocycline이 신경보호 효과를 지니고 있음을 보여주었으며, 이러한 minocycline의 신경보호 효과 기전의 하나로 caspase 의존성 세포고사억제가 중요한 역할을 한다는 것을 제시하였다.

본 실험의 결과를 요약하면 다음과 같다. 첫째, minocycline투여로 인해 KA 유발 발작 후 나타나는 해마세포 사멸과 DNA 분절이 감소하였다(Figure 1 and 3A). 둘째, minocycline의 투여로 인해 caspase 의존성 세포고사 기전인 cytochrome c의 세포질 내 전위와(Figure 2), caspase-3 활성도가 감소함을 확인하였다(Figure 3B and C).

병적인 KA의 증가는 흥분성 신경세포 독성(excitotoxic injury)을 유발하는 것으로 잘 알려져 있으며, 또한 KA 투여에 의한 경련 발작으로 인해, 해마 등 변연계 신경 손상 및 세포고사가 유발되는 것으로 잘 알려져 있다.^{10,11,15-18} 본 실험에서도 KA 처치로 유발된 경련 발작 후, 조직학적으로 해마손상이 뚜렷이 관찰되었으며(Figure 1), TUNEL 염색, 그리고 histone-associated DNA 분절 정량을 통해 KA 투여에 의한 경련 발작으로 인해서 세포고사가 유발됨을 확인 할 수 있었다(Figure 3A and C).

또한 본 실험결과는 minocycline의 투여가 KA에 의한 경련 발작 후 발생하는 해마세포사멸을 감소시킴을 보여주고 있는데(Figure 1, 3A and 3C), 이는 일차 신경배양(primary neuronal culture)이나 백서 선조체에 NMDA를 투여하여, 흥분성 세포 독성에 대한 minocycline의 신경세포보호 효과를 보여준 기존 실험들의 결과와 잘 부합한다.^{19,20} 또한, 이러한 결과는 다른 여러 뇌질환 동물 모델에서 나타난 minocycline의 신경세포 보호효과와도 잘 부합하여 본 실험결과를 뒷받침하고 있다.^{5,9,21-23}

저자들은 또한 이번 실험을 통해 KA에 의한 경련 발작 후 나타나는 뇌신경 손상에 대한 minocycline의 신경세포보호기전의 하나로, minocycline이 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome c 유리화 그에 따른 caspase-3 활성화를 억제함을 밝혔다(Figure 2, 3B and 3C). 이러한 결과들 역시 minocycline이 caspase 의존성 세포고사를 억제함으로써, 신경보호 효과를 나타냄을 보여준 이

전 실험들의 결과^{5-7,24-26}와 잘 부합하여 우리의 결과를 뒷받침한다.

최근 연구에 따르면, minocycline이 caspase 비의존성 경로 또한 억제함으로써 세포보호효과를 나타내는 것으로 보고되었다.⁶ 저자들은 pan-caspase 억제제인 z-VAD.fmk를 사용하여 정상 대조군, caspase 억제군, 그리고 minocycline 투여군에서의 caspase-3 활성도와 DNA 분절현상과의 관계를 조사하였다(Figure 3C). Caspase 억제군과 minocycline 투여군 모두 비슷한 정도의 caspase-3활성 억제를 보인 반면, 그러나 세포고사와 연관된 DNA 분절의 양은 minocycline투여군에서 caspase 억제군에 비해 의미있게 감소하였다(Figure 3C). 이는 minocycline이 caspase 의존성 경로만을 억제할 뿐만 아니라 다른 기전 즉, caspase 비의존성 경로의 억제를 통해 세포보호에 일정 부분 역할을 할 것이라는 가능성을 제시한다. 향후, minocycline의 caspase 비의존성 경로 억제에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결론적으로, 이번 연구를 통해 저자들은 KA에 의해 유발된 경련발작으로 인한 해마의 신경세포손상이 minocycline 투여에 의해 감소함을 나타내었다. Minocycline은 caspase 의존성 세포고사 경로를 억제하였으며, 이는 minocycline의 신경세포보호기전의 하나로 생각된다. 이러한 소견은 향후 간질발작에 의한 뇌신경세포 보호 및 간질발생의 억제치료에 있어 하나의 유망한 치료전략으로서의 minocycline의 가능성을 제시한다.

REFERENCES

1. Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol* 2004;3:744-51.
2. Macdonald H, Kelly RG, Allen ES, Noble JF, Kanegis LA. Pharmacokinetic studies on minocycline in man. *Clin Pharmacol Ther* 1973;14:852-61.
3. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15,769-74.
4. Arvin KL, Han BH, Du Y, Lin SZ, Paul SM, Holtzman DM. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* 2002;52:54-61.
5. Chen M, Ona VO, Li M, et al. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 2000;6:797-801.
6. Wang X, Zhu S, Drozda M, et al. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10483-7.
7. Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 2002;417:74-8.
8. Popovic N, Schubart A, Goetz BD, Zhang SC, Linington C, Duncan ID. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetra-

- cycline. *Ann Neurol* 2002;51:215-23.
9. Du Y, Ma Z, Lin S, *et al.* Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14,669-74.
 10. Bouillere V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1999;89:717-29.
 11. Suzuki F, Heinrich C, Boehrer A, *et al.* Glutamate receptor antagonists and benzodiazepine inhibit the progression of granule cell dispersion in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2005;46:193-202.
 12. Narasimhan P, Sugawara T, Liu J, Hayashi T, Noshita N, Chan PH. Overexpression of human copper/zinc-superoxide dismutase in transgenic animals attenuates the reduction of apurinic/apurimidinic endonuclease expression in neurons after in vitro ischemia and after transient global cerebral ischemia. *J Neurochem* 2005;93:351-8.
 13. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7162-6.
 14. Saito A, Hayashi T, Okuno S, Nishi T, Chan PH. Oxidative stress is associated with XIAP and Smac/DIABLO signaling pathways in mouse brains after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 2004;35:1443-8.
 15. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985;14:375-403.
 16. Suzuki F, Junier MP, Guilhem D, Sorensen JC, Onteniente B. Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 1995;64:665-74.
 17. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 2000;23:580-7.
 18. Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10,432-7.
 19. Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 2001;21:2580-8.
 20. Goni-Allo B, Ramos M, Jordan J, Aguirre N. In vivo studies on the protective role of minocycline against excitotoxicity caused by malonate or N-methyl-D-aspartate. *Exp Neurol* 2005;191:326-30.
 21. Yrjanheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13,496-500.
 22. He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res* 2001;909:187-93.
 23. Kriz J, Nguyen MD, Julien JP. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2002;10:268-78.
 24. Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, *et al.* Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:865-74.
 25. Teng YD, Choi H, Onario RC, *et al.* Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3071-6.
 26. Wang J, Wei Q, Wang CY, Hill WD, Hess DC, Dong Z. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *J Biol Chem* 2004;279:19,948-54.