

생쥐 Pilocarpine 모델에서 중첩경련으로 유발한 해마신경세포 사멸과 이끼섬유발아에 대한 MMP-9의 역할*

주민경^{1,2} · 조양제¹ · 조경주¹ · 이두재¹ · 김현우¹ · 김현정¹ · 김경환¹ · 허 경¹ · 이병인¹
연세대학교 의과대학 신경과학교실, 뇌 연구소,¹ 한림대학교 의과대학 신경과학교실²

The Role of MMP-9 on the Hippocampal Neuronal Cell Death and Mossy Fiber Sprouting due to Pilocarpine-Induced Status Epilepticus in Mice

Min Kyung Chu, M.D.^{1,2}, Yang-Je Cho, M.D.¹, Kyoung-Joo Cho¹,
Doo Jae Lee, Ph.D.¹, Hyun-Woo Kim¹, Hyun-Jung Kim¹,
Gyung Whan Kim, M.D., Ph.D.¹, Kyoung Heo, M.D.¹ and Byung In Lee, M.D.¹

Department of Neurology and Brain Research Institute,¹ Yonsei University College of Medicine, Seoul,
Department of Neurology,² Hallym Univeristy College of Medicine, Anyang, Korea

Purpose : Matrix metalloproteinases (MMPs) have been known to participate in various pathologic situations by modulating extra-cellular matrix. Although MMP-9 upregulation has been reported in some experimental seizure models, the exact role of MMP-9 in hippocampal cell death during epileptogenesis and subsequent mossy fiber sprouting (MFS) is not clear. Here, we investigated the role of MMP-9 on hippocampal cell death and MFS after pilocarpine-induced status epilepticus (SE) in mice, using highly specific hydroxamic MMP-9 inhibitor.

Methods : SE was induced by intraperitoneal pilocarpine administration in adult male C57BL/6 mice. MMP-9 specific inhibitor was administered intracerebroventrically 3 h after pilocarpine-induced SE. Expression and activation of MMP-9 were assessed by zymography and Western blot analysis. TdT-mediated UTP-biotin nick end labeling (TUNEL) and caspase-3 activity assay were also performed. MFS was investigated using Timm staining.

Results : Increased expression and activation of MMP-9 after

pilocarpine-induced SE were observed in zymography and Western blot analysis. MMP-9 specific inhibitor decreased MMP-9 activity in *in situ* zymography and hippocampal cell death in cresyl violet staining. DNA fragmentation and caspase-3 activity were also attenuated by MMP-9 specific inhibitor. Four months after pilocarpine-induced SE, MFS was evident in vehicle-treated mice; in contrast, MFS was barely observed in MMP-9 specific inhibitor-treated mice.

Conclusions : This study suggests MMP-9 is associated with hippocampal cell death and MFS after pilocarpine-induced SE. Furthermore, the findings that MMP-9 specific inhibitor ameliorates cell death and MFS offers the possibility of MMP-9 specific hydroxamic inhibitor as novel therapeutic strategy to reduce hippocampal damage and epileptogenesis. (J Korean Epilep Soc 2005;9(2):119-128)

KEY WORDS : Seizures · Gelatinase B · Apoptosis · Mossy fiber, hippocampal · Anthranilic hydroxamic acid.

서 론

간질은 가장 흔한 만성 후천성 뇌질환의 하나로 약 40%

의 환자는 약물에 잘 반응하지 않는 난치성 간질이다.¹ 간질 발생은 외상, 뇌경색, 열성 경련, 저산소증, 간질중첩증(status epilepticus ; SE), 중추신경계 감염 등 초기 유발 뇌손상(initial precipitating insult)에 의한 뇌신경

Received 15 November 2005

Accepted 18 December 2005

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

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

본 연구는 보건복지부 보건과학기술 연구개발사업 단독기초연구지원 연구개발과제 (02-PJ1-PG3-21301-0019)의 연구비의 지원으로 이루어졌음.

세포사멸이 선행하는 것으로 알려져 있으며, 이 후 수 년에서 십여 년에 이르는 잠복기, 즉 간질병소생성(epileptogenesis) 과정을 거쳐 자발 발작(spontaneous seizure)이 일어나고 만성 간질, 더 나아가 난치성 간질로 진행된다.¹ 이끼섬유발아(mossy fiber sprouting; MFS)와 같은 뇌신경회로의 재구성은 여러 실험적 간질모델이나 사람 측두엽간질에서 발견되며, 간질병소생성기에 일어나는 일련의 뇌신경세포의 복잡한 변화, 즉 뇌신경세포사멸, 신경전달물질과정의 이상, 이상신경세포생성(neurogenesis), 교세포 증식 및 항상성(homeostasis) 변화 등과 같은 간질병소생성과정에 있어 매우 중요한 기전의 하나로 인식되고 있다.¹ 이러한 간질병소생성과정을 차단하는 것은 간질 발생뿐 아니라 난치성 간질로의 진행을 막아주는 역할을 할 것으로 기대되나, 현재 사용중인 약제 중에서 그러한 효능을 가진 약제는 아직 없는 실정이다.

Matrix metalloproteinase(MMP)는 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)을 분해하는 단백 분해 효소로 정상상태에서는 발생(embryogenesis), 변태(metamorphosis), 조직 흡수 및 개형(tissue resorption and remodeling), 상처 재생과 같은 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.² 하지만, 악성 종양 전이나 만성 염증질환, 폐 섬유화증, 동맥경화증과 같은 병적인 상태에서도 MMP가 비정상적으로 발현이 증가되며, 중요한 병태생리적 역할을 하는 것으로 보고 되고 있다.² MMP 중 MMP-2와 MMP-9은 뇌의 기저막을 구성하는 주요 세포 기질인 type IV collagen이나 laminin을 주로 파괴하기 때문에 여러 중추 신경계 질환의 발생기전에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.² 여러 신경학적 질환들에서도 MMP가 비정상적으로 증가되는 것으로 보고되어 있는데, 생쥐³나 백서,⁴ 영장류⁵를 이용한 실험적인 뇌 경색이나, 뇌경색 환자들에서^{6,7} MMP-2와 MMP-9의 발현이 증가할 뿐 아니라, 근위축성축삭경화증,⁸ 알츠하이머병,⁹ 다발성경화증⁶ 및 헌팅턴병 모델¹⁰에서도 증가 함이 보고되었다.

간질과 MMP의 연관관계에 대한 연구는 아직 많지 않은데, 실험적으로 백서 또는 백서 기관형적해마배양(organotypic hippocampal culture)에서 kainic acid(KA) 또는 bicuculline을 투여하여 경련을 유발했을 때 MMP-9의 활성도가 증가된다고 보고 되고 있으며,¹¹⁻¹³ MMP-9 활성화가 조직손상에 선행하고, 비선택적 MMP 억제제를 투여했을 때 기관형적해마배양에서 신경세포 사멸이 감소한다는 결과¹³는 MMP-9이 간질병소생성과정에서 초기 뇌손상과 연관 있음을 시사하고, 손상된 백서 내후각

피질(entorhinal cortex)에서 MMP-9을 차단했을 때 plasticity가 억제된다는 연구¹⁴와 편도 내 KA 주입으로 간질발작을 유도한 생쥐에서 MMP 활성인자를 knock out시켰을 때 MFS가 억제된다는 보고¹⁵는 MMP-9이 또한 MFS 생성에 중요한 역할을 할 것이라는 가정을 가능하게 한다.

따라서 본 연구에서는 측두엽 간질의 한 모델인 생쥐 pilocarpine 유발 중첩경련 모델^{16,17}에서 MMP-9의 발현 및 활성도 증가여부를 재확인하고, 간질발생과정인 해마신경세포사멸과 MFS 생성에 관련된 MMP-9의 역할을 규명하고자 하였다. 특히 이번 연구에서는 과거 비선택적 MMP 억제제가 이를 이용한 여러 임상시험에서 부작용과 낮은 효능으로 실패하였음¹⁸을 감안하여 MMP-9에 특이적인 anthranilic hydroxamic inhibitor¹⁹를 사용하였다.

대상과 방법

Pilocarpine 유발 간질모델

모든 동물들은 연세대학교 의과대학 동물 실험 윤리위원회에 따라 실험에 사용되었다. 생후 2개월 된, 체중 20~25 g의 웅성 C57BL/6 생쥐를 사용하였으며, 한 우리(cage) 당 5마리로 사육되었고, 실내온도는 22±0.5°C로 유지되었으며, 12시간 간격으로 낮과 밤의 주기를 두었다. 물과 먹이는 자유롭게 접근하도록 하였다. Pilocarpine투여에 의한 말초 콜린성 부작용을 억제하기 위해 methyl scopolamine(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A)을 1 mg/kg으로 마우스 복강 내에 투여한 후, 30분이 지나 pilocarpine(Sigma) (dissolved in 0.9% saline, 330 mg/kg) 또는 0.9% saline을 대조군으로 복강 내 투여하여 발작을 유발하였다.^{16,17} 일부 생쥐에서는 선택적 MMP-9 억제제인 anthranilic hydroxamic inhibitor(C₂₇H₃₃N₃O₅S, Calbiochem, Darmstadt, Germany)¹⁹를 pilocarpine 투여 3시간 후에 뇌실 내 주입하였다. 실험 동물들을 2% isoflurane과 질소와 산소 혼합 기체(70%/30%)로 마취시킨 후, stereotaxic frame에 고정시키고 우측 측뇌실 위치(0.2 mm posterior, 1.0 mm lateral, and 3.1 mm deep to the bregma)에 Hamilton syringe를 이용하여 MMP-9 억제제(5 mg/ml in DMSO, 2 µl, at a rate of 0.2 µl/min)를 10분에 걸쳐 투여했으며, 이 후 MMP-9 억제제의 역류를 막기 위하여 syringe를 10분간 더 그 자리에 위치시켰다. 대조군으로 DMSO를 동일한 방법으로 투여하였다. Pilocarpine을 투여한 생쥐는 plexiglass

chamber에서 발작행동을 pilocarpine 투여 후 6시간 까지 관찰하였으며, 간질의 강도 평가는 Racine scale을 따랐다.²⁰ Pilocarpine을 투여한 모든 생쥐에서 간질 발작이 나타났으며, Racine grade 4 이상의 지속적 간질발작을 보이는 중첩경련 생쥐만을 이번 실험에 포함시켰다.

MMP 분리

우레탄(Sigma)을 복강 내 주사하여 마취한 상태에서 10 U/ml의 heparin이 섞인 0.9% saline를 심장을 통해 관류시키고 즉시 뇌를 적출한 후, 양 측 해마를 cold plate에서 신속히 분리하여 -80°C 에 보관하였다. Western blot analysis와 zymography를 위한 MMP 분리는 이전에 보고된 방법^{3,10,11}들을 일부 변형하여 사용하였다. 해마조직을 $400\ \mu\text{l}$ 의 working buffer(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.02% NaN_3 , 0.05% BRIJ-35, and 1% Triton X-100, pH 7.6)에서 균질화 한 후 4°C 에서 20분간 9,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상층액을 취하여 $50\ \mu\text{l}$ 의 gelatin Sepharose 4B(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)와 $200\ \mu\text{l}$ working buffer 혼합액에서 4°C 에서 60분간 반응시켰다. 이 후 2차례 7,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후, pellet을 $70\ \mu\text{l}$ elution buffer(10% DMSO plus working buffer)에서 30분간 반응시킨 후 상층액을 취하여 실험에 사용하였다.

Gelatin zymography

MMP-2와 MMP-9의 활성과 발현을 관찰하기 위한 gelatin zymography는 이전에 보고된 방법에 따라 시행하였다.^{3,5,10} 앞에서 기술된 대로 분리된 MMP를 똑같은 양을 취하여 sample buffer(80 mM Tris-HCl, 4% SDS, 10% glycerol, and 0.01% bromphenol blue, pH 6.8)와 섞은 후, 0.5% gelatin이 함유된 8% SDS-polyacrylamide 겔을 사용하여 전기영동 하였다. 전기영동 후 150 ml의 2.5% Triton X-100 용액으로 15분씩 3차례 세척하였으며, 세척이 끝난 겔은 250 ml의 incubation buffer(50 mmol/L Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , 0.02% NaN_3 , and $1\ \mu\text{M}$ ZnCl_2 , pH 7.5)에 넣고 37°C 에서 72시간 동안 반응시켰다. 이 후, 겔을 아세트산, 메탄올 및 증류수가 1 : 3 : 6의 비율로 구성된 0.1% amido black 용액에 1시간 동안 염색하였으며 염색이 끝난 후에는 amido black을 제외한 같은 용액을 수 차례 바꾸어 주면서 탈색하였다. Human recombinant MMP-2와 MMP-9(Chemicon, Temecula, CA, USA)을 standard control로 사용하였다.

Western blot analysis

MMP-9의 Western blot analysis을 위한 생쥐 대뇌 샘플은 MMP 분리법에서 기술된 대로 준비하였다. 동일 양의 샘플을 8% SDS-polyacrylamide 겔에서 전기영동한 후, polyvinylidene fluoride(PVDF) 막(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)에 옮기고 0.1% Tween 20을 포함한 TBS(50 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 7.3)로 2차례 세척한 후, 5% skim milk로 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. PVDF막을 상온에서 mouse anti-MMP-9 monoclonal 항체(1 : 1000, Chemicon)와 1시간 동안 반응시킨 다음, 2차 항체로 HRP-conjugated sheep anti-mouse IgG(1 : 5000, Amersham Biosciences)를 1시간 동안 반응시킨 후, ECL plus chemiluminescent kit(Amersham Biosciences)로 발색하여 관찰하였다.

In situ zymography

MMP 활성도를 생쥐 해마 내에서 국재화(localization)하고, 이에 대한 선택적 MMP-9 억제제의 효과를 분석하기 위해 *in situ* zymography를 시행하였으며, 이전 보고의 방법에 따랐다.^{13,21} 생쥐 대뇌를 적출한 후, powdered dry ice를 이용해 즉시 냉동시켰으며, cryostat을 사용해 $20\ \mu\text{m}$ 두께의 관상절편을 만들어 슬라이드에 올렸다. Fluorescein isothiocyanate(FITC)가 결합된 DQ gelatin(Enzchek Gelatinase/Collagenase assay kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)을 포함한 reaction buffer(50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.2 mM sodium azide, pH 7.6)를 슬라이드에 적정량 가한 후, 37°C 의 암실에서 12시간 동안 반응시켰다. 활성화된 MMP가 DQ gelatin을 분해하면, 억제되었던(quenched) FITC가 형광을 내게 되므로, FITC의 형광 강도는 MMP의 활성과 비례한다. 반응시킨 절편은 4% paraformaldehyde로 고정된 후, Vectashield(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 봉입하고 형광현미경(BX51, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용해 관찰하였다.

조직학적 검사를 위한 대뇌절편 준비

복강 내 우레탄 주사로 마취한 생쥐를 peristaltic pump로 10 U/ml의 heparin이 섞인 0.9% saline과 3.7% formaldehyde를 순차적으로 transcardiac perfusion한 후, 대뇌를 적출하고 12시간 동안 3.7% formaldehyde로 고정하였다. 24시간 동안 30% sucrose 용액에 담근 후 powd-

ered dry ice와 optimum cutting temperature(OCT ; Tissue-Tek, Sakura Finetek Inc, Torrance, CA, USA) 용액을 이용하여 냉동시켰으며 -80°C 에서 보관하였다. 이후 cryostat을 사용해 $20\ \mu\text{m}$ coronal section을 하여 사용하였다. 조직학적 검사를 위해서 cresyl violet 염색을 시행하였고 통계적 계수를 위해 반 정량적(semi-quantitative) 방법을 사용하였는데,¹⁷ 각각의 생쥐에서 우측과 좌측 모두에서 3개의 각기 다른 section을 선택한 후 정상적 핵과 핵소체 모양을 갖춘 세포를 계수하였다. 정상 control 군의 평균값을 100%로 한 후, 각각의 실험조건 표본에서 계수한 세포 수를 비교하여 percentage로 나타내었다.

DNA 분절현상 검출을 위한 형광염색

조직절편은 앞에서 기술된 대로 준비되었으며, DNA 분절현상 검출법은 이전에 기술된 방법에 따랐다.^{10,22,23} 각각의 절편은 $50\ \mu\text{l}$ 의 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated uridine 5'-triphosphate-biotin nick end labeling(TUNEL) 반응혼합액(Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)을 가한 후, 37°C 의 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 다시 핵 대조염색을 위해 $0.5\ \text{g/ml}$ 의 propidium iodide(PI ; Sigma)을 가하여 37°C 의 암실에서 20분간 반응시켰다. Vectashield로 봉입한 후, confocal laser scanning microscope(Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)으로 관찰하였다.

Caspase-3 활성화 측정

Caspase-3 활성화 측정법은 이전에 기술된 방법을 따랐으며,²⁴ 조직샘플은 MMP분리법에서와 같이 해마를 적출한 후, 세포질 분획만을 따로 분리하여 사용하였다. 동일양($20\ \mu\text{g}$)의 단백질을 시판되는 caspase-3 활성화 측정키트(Calbiochem)를 이용해 ELISA를 시행하였다.

Timm's staining for detection of MFS

MFS를 관찰하기 위한 Timm's 염색은 이전에 보고된 방법을 약간 변형하여 사용하였다.^{16,17,25} 우레탄 마취를 시행한 생쥐에서 먼저 heparinized saline으로 transcardiac perfusion 한 후, distilled water에 0.6% sodium sulfide와 0.6% sodium phosphate가 섞인 용액으로 다시 perfusion하였고, 마지막으로 3.7% formaldehyde용액을 perfusion 하였다. 12시간 동안 3.7% formaldehyde로 후고정을 하였고 20% sucrose 용액에 24시간 동안 담궈두었다. Cryostat으로 $30\ \mu\text{m}$ 두께 관상절편을

만들어 슬라이드에 올리고 30% gum arabic(Sigma)과 1.68% hydroquinone(Sigma), 그리고 citrate solution (2.35% sodium citrate, 2.55% citric acid monohydrate)(Sigma)이 들어있는 200 ml용액에 silver nitrate(17%, 1.5 ml)를 첨가한 후, 26°C 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. 탈수 후 cresyl violet 대조염색을 시행하여 관찰하였으며, Tauck과 Nadler의 기준²⁶에 따라 평가하였다. 해마 dentate gyrus(DG)의 inner molecular layer와 granular cell layer에서 관찰하였으며, Timm 염색이 관찰되지 않거나 granular cell layer에서 미약하게 관찰되는 경우를 score 0, granular cell layer에서만 부분적으로 흩어져(patch) 관찰될 때 score 1, 연속적이지 않거나 또는 연속적이더라도 염색강도가 score 1과 score 3의 중간 수준일 때는 score 2, 마지막으로 짙고, 연속적인 띠 모양으로 inner molecular layer에 관찰되는 경우를 score 2로 정의하였다.

통계처리

데이터들은 mean \pm SD로 표현하였다. 여러 집단간의 통계학적 비교는 ANOVA(with Fischer's post-hoc test)를 사용하였고, 두 집단간의 차이는 t-test를 통해 실시되었으며(StatView ; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), $p<0.05$ 를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

Pilocarpine 유발 중첩경련 후, 해마에서 MMP-9의 발현 증가 및 활성화

MMP-2와 MMP-9의 발현 및 활성화 정도를 알아보기 위해 pilocarpine 유발 중첩경련 후 1일, 3일, 7일 그리고 14일 후에 생쥐 해마를 적출한 후, gelatin zymography를 시행하여 관찰하였다(Figure 1A). 정상 대조군에서 비 활성화(latent) 상태인 pro MMP-2와 pro MMP-9은 각각 분자량 $\sim 94\ \text{kDa}$ 과 $\sim 70\ \text{kDa}$ 위치에서 관찰되었다[Optical density (OD) : pro MMP-2, 2.057 ± 0.47 ; pro MMP-9, 1.5 ± 0.35]. Pilocarpine 유발 중첩경련 후 1일째에 pro MMP-9의 활성화는 정상 대조군에 비해 의미 있게 증가하였으며 3일째에 가장 높았다. 7일째에는 pro MMP-9의 활성화가 감소되었고 14일째에는 정상 대조군의 수준으로 감소하였다(OD : 1일, $7.23 \pm 1.02^*$; 3일, $10.67 \pm 1.27^*$; 7일, 3.42 ± 0.92 ; 14일, 1.56 ± 0.54 ; ANOVA, $*p<0.001$). 분자량 $\sim 88\ \text{kDa}$ 의 활성화 MMP-9(active MMP-9)은 정상 대조군에서는

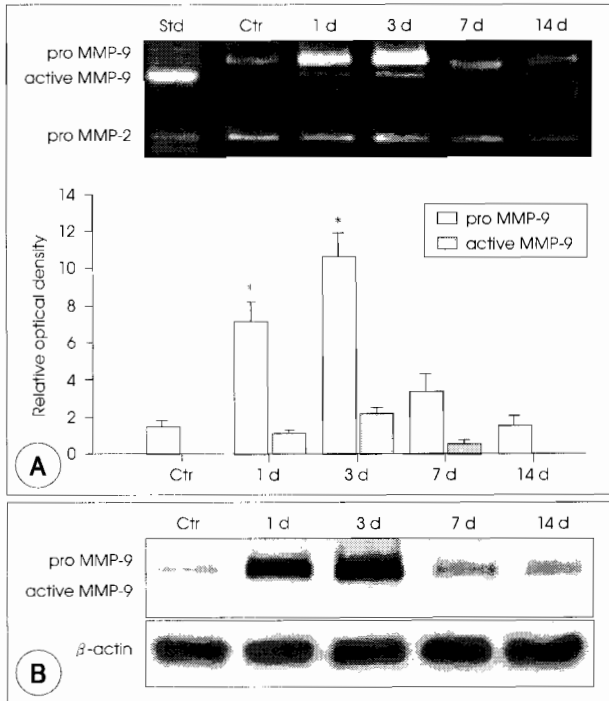


Figure 1. Upregulation of MMP-9 protein and its enzymatic activation after pilocarpine-induced seizure. A : Gelatin zymography of mice hippocampal tissue obtained at various time points after pilocarpine treatment. Std, standard control; Ctr, normal control. B : MMP-9 Western blot analysis of mice hippocampal protein extracts at different time points after pilocarpine treatment. Samples in A and B were from 5 independent studies.

관찰되지 않았으나, pilocarpine 유발 중첩경련 1일 후에 관찰되기 시작하였으며, 3일째에 가장 뚜렷하였고, 7일째에는 감소하여 14일째에는 관찰되지 않았다(OD : 1일, 1.13 ± 0.10 ; 3일, 2.21 ± 0.33 ; 7일, 0.64 ± 0.06). 이에 반해서, pro MMP-2의 발현은 pilocarpine 유발 중첩경련 이후에도 정상 대조군에 비해 의미 있는 변화가 관찰되지 않았고(OD : 1일, 2.36 ± 0.42 ; 3일, 3.02 ± 0.63 ; 7일, 2.11 ± 0.19 ; 14일, 1.04 ± 0.10) (Figure 1A), active MMP-2도 관찰되지 않았다.

MMP-9의 발현양을 알아보기 위한 Western blot analysis에서 MMP-9 면역반응은 정상 대조군에서 미약하게 관찰되었다(Figure 1B). MMP-9 면역반응은 pilocarpine 유발 중첩경련 후 1일째에 정상 대조군에 비해 의미 있게 증가함이 관찰되었으며, 3일째에 가장 증가하는 것으로 나타났다. 7일째와 14일째에는 MMP-9 발현 증가가 감소하여, 정상 대조군과 비슷한 정도의 면역반응을 나타내었다(OD : control, 1.71 ± 0.24 ; 1일, $6.83 \pm 0.93^*$; 3일, $9.22 \pm 1.22^*$; 7일, 2.66 ± 0.17 ; 14일, 2.29 ± 0.20 ; ANOVA, $*p < 0.001$) (Figure 1B).

해마 내 MMP 활성화도 국제화 및 이에 대한 선택적 MMP-9 억제제 투여의 효과

해마 내 소 구역(subfield)에 따른 MMP 활성도를 국제화하고, 선택적 MMP-9 억제제 투여에 의한 MMP 활성억제효과를 알아보기 위해 pilocarpine 유발 중첩경련 후 3일째에 *in situ* zymography를 시행하였다(Figure 2A). 활성화된 여러 MMP 들에 의해 gelatin이 분해되면, 억제되었던 FITC가 녹색 형광을 방출하므로, 녹색형광의 강도는 MMP 활성도와 비례하게 된다. 정상 대조군에서는 CA1과 CA3, 그리고 DG에서 미약한 녹색형광이 발광됨을 관찰할 수 있었다(Figure 2A, upper row). 이에 비해서 pilocarpine 유발 중첩경련 후 vehicle을 투여한 군에서는 강한 녹색형광이 CA1과 CA3, 그리고 DG 모두에서 관찰되었으며(Figure 2A, middle row), 선택적 MMP-9 억제제를 투여한 군에서는 vehicle 투여군에 비해 녹색형광의 정도가 CA1과 CA3, 그리고 DG 모두에서 감소하였다(Figure 2A, lower row).

중첩경련으로 인한 해마 세포사멸 및 이에 대한 선택적 MMP-9 억제제 투여의 효과

Pilocarpine 유발 중첩경련 후 일어나는 해마 세포사멸 및 조직 손상을 알아보기 위해, 중첩경련 후 3일째에 대뇌를 적출하고 cresyl violet 염색을 시행하였다(Figure 2B). 정상 대조군에서는 CA1, CA3, 그리고 DG 모두에서 특별한 이상 소견이 관찰되지 않았다(Figure 2B, upper row). 이에 반해 pilocarpine 유발 중첩경련 후 vehicle을 투여한 군에서는 조직학적 손상이 일어났는데, CA3에는 다수의 pyramidal 세포가 소실되었고 CA1은 pyramidal 세포소실과 함께 농축 핵(pyknotic nuclei)이 많이 관찰되었으며, DG는 비교적 세포소실이 적었으나 일부 세포에서 핵질농축(chromatin condensation)이 관찰되었다(Figure 2B, middle row). 하지만 pilocarpine 유발 중첩경련 후 선택적 MMP-9 억제제를 투여한 군에서는 vehicle 투여군에 비해 해마 세포소실이 현저히 감소하는 것을 관찰 할 수 있었으며(Figure 2B, lower row), 반 정량적 계수를 통해 이를 확인할 수 있었다(percentage of survived cells against control : MMP-9 inhibitor-CA1, 86.72 ± 11.06 ; vehicle-CA1, $18.91 \pm 2.24^*$; MMP-9 inhibitor-CA3, 62.48 ± 9.13 ; vehicle-CA3, $6.19 \pm 1.03^*$; MMP-9 inhibitor-DG, 90.56 ± 14.03 ; vehicle-DG, $54.25 \pm 7.63^*$; unpaired *t*-test, $*p < 0.001$).

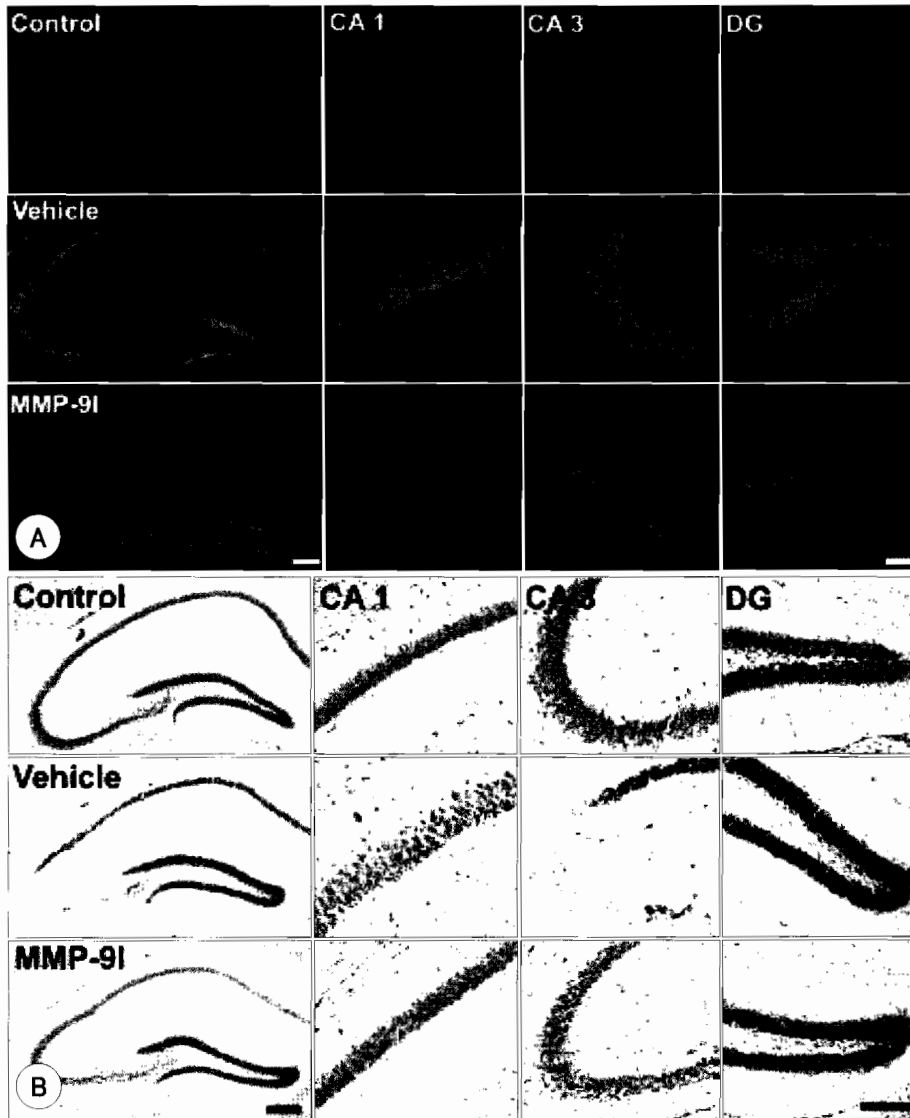


Figure 2. Reduction of MMP activity and mice hippocampal degeneration after pilocarpine-induced seizure by treatment of selective MMP-9 inhibitor. A : Comparison of net proteolytic activity in hippocampal subfields by *in situ* zymography among normal control, vehicle-, and selective MMP-9 inhibitor-treated groups at 3 days after pilocarpine treatment. MMP-9i, MMP-9 inhibitor ; Bar=100 μ m in left panel and 50 μ m in the other panels. B : Comparison of cresyl violet staining in hippocampal subfields among normal control, vehicle-, and selective MMP-9 inhibitor-treated group at 3 days after pilocarpine treatment. Bar=100 μ m in left panel and 50 μ m in the other panels.

선택적 MMP-9 억제제 투여로 인한 DNA 분절현상 및 caspase-3 활성 감소

Pilocarpine 유발 중첩경련으로 인한 생쥐 해마세포의 DNA 분절현상 여부를 알아보기 위해, 중첩경련 후 3일째에 TUNEL 염색을 시행하였다(Figure 3A). TUNEL 반응에 양성인 세포들은 confocal microscope상에서 녹색형광을 띄게 되고, 핵 대조 염색으로 시행한 PI는 붉은색 형광을 띄게 되며, 이 둘을 결합한(merged) 영상에서 TUNEL과 PI 모두에 양성인 세포는 노란 형광을 나타내게 된다. 정상 대조군에서는 CA1과 CA3 모두 PI 양성세포가 많이 관찰되나, TUNEL 양성세포는 관찰되지 않았다(Figure 3A, left panel). 이와 대조적으로 pilocarpine 유발 중첩경련 후 vehicle을 투여한 군에서는 정상 대조군에 비해 CA1과 CA3 모두에서 많은 수의 TUNEL

양성세포가 관찰되었으며 이와 더불어 PI 양성세포가 많이 소실되었다(Figure 3A, middle panel). 하지만 선택적 MMP-9 억제제를 투여한 생쥐 군에서는 vehicle 투여군에 비해 CA1과 CA3 모두 TUNEL 양성을 보이는 세포가 의미 있게 감소함을 관찰할 수 있었다(TUNEL-positive cells/mm² : control, 0 ; vehicle-CA1, 1132 \pm 103.24 ; MMP-9 inhibitor-CA1, 124.40 \pm 32.89* ; vehicle-CA3, 1084.32 \pm 96.53 ; MMP-9 inhibitor-CA3, 96.40 \pm 23.16* ; unpaired *t*-test, **p*<0.001) (Figure 3A, right panel and B).

Pilocarpine 유발 중첩경련 후 1일째와 3일째에 caspase-3 활성도를 측정하였는데, 선택적 MMP-9 억제제를 투여한 군에서 vehicle을 투여한 생쥐군에 비해 의미 있게 caspase-3 활성도가 감소함을 알 수 있었다

(OD : control, 85.90 ± 10.45 ; 1 day-vehicle, 945.37 ± 102.47 ; 1 day-MMP-9 inhibitor, $589.23 \pm 101.29^*$; 3 days-vehicle, 1509.14 ± 158.39 ; 3 days-MMP-9 inhibitor, $747.62 \pm 99.36^*$; unpaired *t*-test, $*p < 0.001$) (Figure 3C).

선택적 MMP-9 억제제 투여 후 MFS 생성의 변화

간질병소 생성과정에서 중요 기전의 하나로 생각되는 MFS 생성에 미치는 MMP-9의 영향을 알아보기 위해 Timm's staining을 시행하였다(Figure 4). Zinc를 함유하는 이끼섬유는 Timm's staining 상에서 암갈색을 나타내며, DG granular cell과 CA pyramidal cell layer는

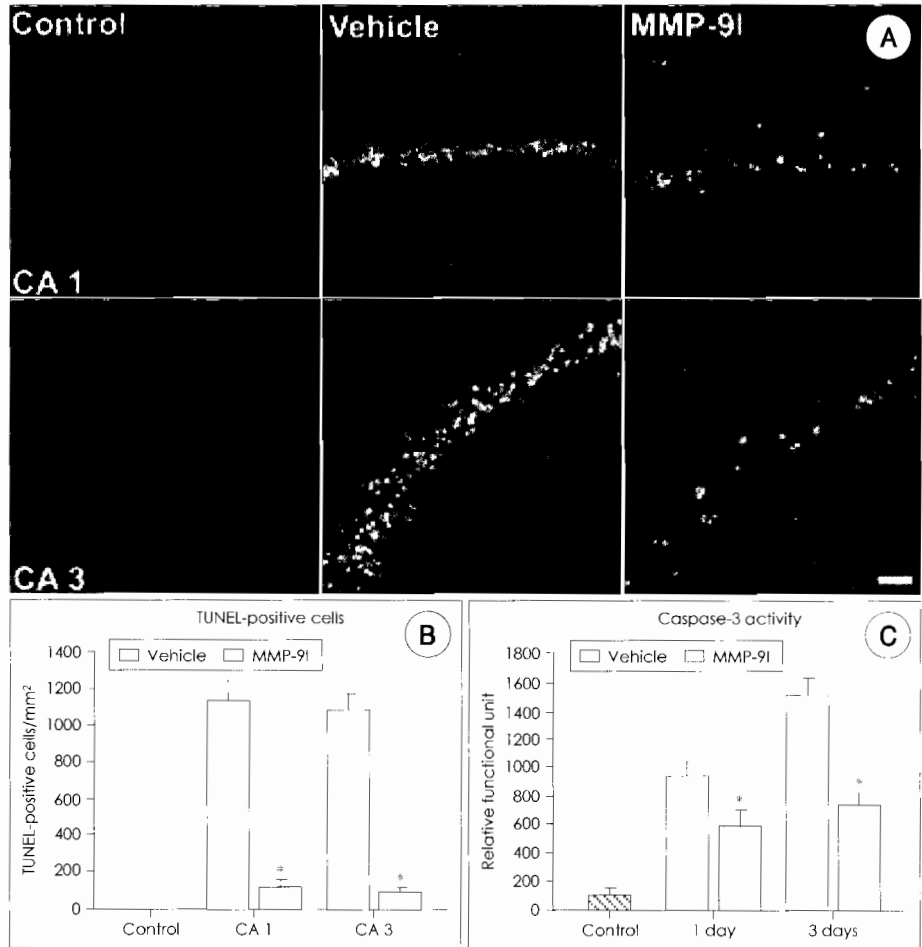


Figure 3. Reduction of DNA fragmentation and caspase-3 activity after pilocarpine-induced seizure by treatment of selective MMP-9 inhibitor. A : Comparison of TUNEL staining in hippocampal subfield CA1 and CA3 among normal control, vehicle-, and selective MMP-9 inhibitor-treated group at 3 days after pilocarpine treatment ; Nuclear PI counterstaining (red), TUNEL staining (green); MMP-9i, MMP-9 inhibitor ; Bar=50 μ m. B : Semi-quantitative analysis of TUNEL-positive cells in mice hippocampal subfields between vehicle- and selective MMP-9 inhibitor-treated groups. C : Comparison of the relative functional activity of caspase-3 between vehicle- and selective MMP-9 inhibitor-treated group after pilocarpine treatment.

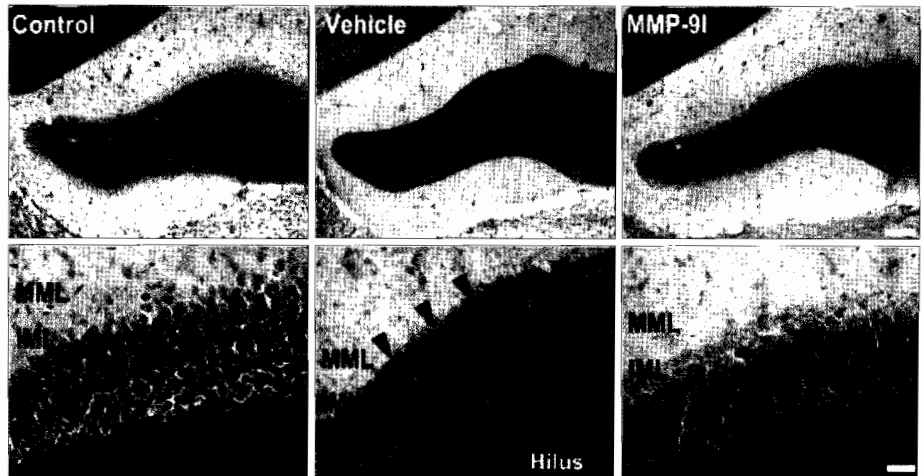


Figure 4. Reduction of mossy fiber sprouting by selective MMP-9 inhibitor, visualized by Timm staining in coronal sections of the mice hippocampus at 16 weeks after pilocarpine-induced seizure. Note the strong silver deposits at the inner molecular layer (black arrow heads) and granular cell layer of the vehicle-treated mice. MMP-9i, MMP-9 inhibitor ; MML, middle molecular layer ; IML, inner molecular layer ; GL, granular cell layer ; Bar=100 μ m in upper panel and 50 μ m in lower panel.

cresyl violet 대조 염색을 시행하여 보라색을 띄게 된다. Pilocarpine 유발 중첩경련 후 16주째에 정상 대조군에서는 granular cell layer나 inner molecular layer 모두에서 MFS가 관찰되지 않았다(Figure 4, left panel). Pilocarpine 유발 중첩경련 후 vehicle을 투여한 군에서는 granular cell layer와 inner molecular layer 전 층에 걸쳐 이끼섬유가 짙게 염색됨을 관찰 할 수 있었다(Figure 4, middle panel). 이에 반해서 선택적 MMP-9 억제제를 투여한 군에서는 MFS이 약하게 관찰되어 vehicle을 투여한 군에 비해 감소함을 알 수 있었다(Figure 4, right panel). Tauck과 Nadler의 기준에 따른 score를 비교하였을 때, vehicle을 투여한 군에 비해 선택적 MMP-9 억제제를 투여한 군에서 의미있게 score가 감소하였다 (Score : vehicle, 3.0 ; MMP-9 inhibitor, $1.2 \pm 0.45^*$; unpaired *t*-test, **p*<0.05).

고 찰

본 연구를 통해 저자들은 측두엽 간질모델로 널리 쓰이는 생쥐 pilocarpine 간질모델^{16,17}에서 중첩경련 이후 해마에서 증가된 MMP-9이 해마 세포사멸 및 MFS과 연관되며, MMP-9 선택적 억제제를 사용하여 해마 세포사멸 및 MFS를 감소시킴을 최초로 확인하였다. 결과를 요약하면, 첫째, MMP-9의 발현 및 활성은 pilocarpine 유발 SE 1일 후부터 증가하여 3일 후에 최대에 이르렀으나 MMP-2의 발현 및 활성은 별다른 변화를 보여주지 못했다(Figure 1). 둘째, SE 이후, MMP 활성은 해마 전 영역에 걸쳐 증가했으며, 이는 선택적 억제제를 통해 감소됨을 확인하였다(Figure 2A). 셋째, MMP-9을 선택적으로 억제함으로써 SE 후 발생하는 해마세포사멸을 감소시켰고(Figure 2B), DNA 분절현상과 caspase-3 활성도 감소하였다(Figure 3). 마지막으로, 선택적 MMP-9 억제제를 사용하여 간질병소생성의 주요기전인 MFS 생성을 억제함을 보여주었다(Figure 4).

이번 연구에서 중첩경련 후 1일째와 3일째에 생쥐 해마에서 MMP-9의 발현과 활성 모두 증가하고 이 후 감소되나, MMP-2의 발현과 활성은 변화되지 않았다(Figure 1). 이러한 결과는 KA를 이용한 이전 연구들¹¹⁻¹³과도 비교적 유사한데, Zhang 등의 연구에 따르면, 백서에 KA를 복강 내로 투여하여 유발한 간질모델에서는 해마 내 MMP-9의 활성이 간질 유발 12시간 후에 8배 증가하여 최고도에 달하고 24시간까지 증가하나 MMP-2의 발현은 3일째에만 2배 증가한다고 보고하였으며, 같은 연

구에서 GABA_A 길항제인 bicuculline을 투여하였을 때는 MMP-2 활성의 증가는 관찰되지 않고 MMP-9의 활성만이 관찰된다고 하였다.¹¹ 또 다른 연구에서는 백서 해마의 MMP-9 발현이 KA 간질 유발 6시간 후에 먼저 증가하고 이 후 24시간까지 MMP-9 활성이 증가하였으나, MMP-2의 변화는 관찰되지 않았다고 보고하였으며,¹² Jourquin 등은 *in situ* zymography를 이용하여 백서 해마 MMP 활성이 KA 간질 유발 8시간 후부터 증가한다고 보고하여¹³ 이번 연구결과와 부합된다. 특히 Szklarczyk 등은 reverse transcription(RT)-PCR과 *in situ* hybridization 기술을 사용하여, 정상 백서에서 MMP-2 mRNA는 MMP-9 mRNA에 비해 대뇌 전반에 걸쳐 발현하고 해마 내에서는 그 발현양이 적으며, 주로 astrocyte 및 일부 DG granule cell에 주로 발현한다고 보고하여,¹² 간질 발작 이 후 해마에서 MMP-2와 MMP-9의 발현 및 역할의 차이를 시사하고 있다.

또한 정상 생쥐에서 CA와 DG 등 해마 전 영역에서 약하게 관찰된 MMP 활성이 중첩경련에 의해 증가되었다(Figure 2A). 이러한 결과는 백서 KA 모델에서 CA1, CA3 및 DG 모두에서 MMP 활성이 증가 하였다는 이전 보고¹³와도 일치하고, 역시 백서 KA 모델에서 초기에 전 CA subfield와 DG에서 MMP 활성이 증가한다는 보고¹²와도 부합한다. 또한 비교적 세포사멸에 저항적이고 MFS과 같은 가소성에 중요한 역할을 하는 DG에서 MMP-9 활성이 증가한 점은 이 부위에서 MMP-9이 MFS, 즉 이상회로 생성에 중요한 역할을 할 것이라는 점을 제시하고, 이러한 가정은 MMP-9이 ECM을 분해하여 악성 세포전이나 상처치유과정과 같은 조직개조(remodeling) 과정에 중요한 효소인 점²과 백서 KA 모델에서 후기에 주로 DG에서 MMP-9 발현과 활성이 증가한다는 보고¹²에 의해 간접적으로 뒷받침된다. *In situ* zymography는 MMP 활성도를 시공간적(temporospatial)으로 측정할 수 있는 방법이나, 전반적인 MMP활성도만을 나타내고 특정 MMP의 활성을 쫓 수 없는 단점이 있다. 하지만 우리 실험에서 선택적 MMP-9 억제제를 썼을 때, *in situ* zymography상에서 MMP활성도가 뚜렷이 감소하는 점(Figure 2A)은 아마도 중첩경련 후 해마 내에서 증가된 MMP 활성도가 주로 MMP-9에 의한 것임을 시사한다.

선택적 MMP-9 억제제를 사용하여 중첩경련에 의한 해마세포사멸을 감소시키고, DNA 분절현상과 caspase-3 활성 또한 감소시키는 것(Figure 2B, 3)은 중첩경련 후 간질병소생성과정에서 MMP-9이 생쥐 해마세포사멸에 관여하며, 그 일부 기전으로 세포고사(apoptosis) 과정이

관여됨을 제시한다. Pilocarpine 유발 간질과 같은 실험적 간질 모델에서 해마세포사멸은 비교적 잘 알려진 사실이며,^{1,16,17} 이러한 간질모델의 해마세포사멸에 세포고사가 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되고 있다.²⁷⁻²⁹

MMP-9은 여러 뇌질환 모델에서 신경세포사멸에 관여하는 데,^{3,5,6,8-10} MMP 억제제를 사용하거나,^{10,12,13,30,31} MMP-9 knock-out 생쥐를 이용한 실험에서 신경세포사멸이 감소하고,³¹ 해마배양조직에 MMP-9을 가했을 때, 세포사멸이 증가한다는 보고¹³는 활성화된 MMP-9이 신경세포사멸을 유도하는 것을 시사한다. MMP-9이 세포사멸에 관여하는 기전은 아직 확실하지 않지만 뇌혈관 기저막을 손상시켜 뇌부종, 염증 및 뇌혈관장애를 일으킨다는 보고^{3-5,10}들이 있으며, 최근 연구들에 따르면 MMP-9의 단백질해에 의해 integrin³²이나 laminin³⁰과 같은 ECM-cell 상호작용이 소실됨으로써 caspase 의존성 세포고사를 유도하는 것으로 보고되고 있다.³²

이번 실험에서는 pilocarpine 유발 중첩경련 후, MFS가 생성되는 것을 확인하였고, 선택적 MMP-9 억제제를 사용하였을 때, 이러한 MFS 생성이 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다(Figure 4). MFS는 사람 측두엽 간질 뿐 아니라, 여러 실험적 간질모델에서 나타나며, 일부 논란이 있지만 자발간질발작을 설명하는 간질병소생성의 중요한 기전으로 받아들여지고 있다.¹ 이러한 현상은 MMP-9 억제제를 사용하였을 때, 손상된 편측 백서 내후각피질(entorhinal cortex)에서 반대측 내후각피질로의 sprouting이 억제된다는 보고¹¹와 유사하며, 편도 내 KA 주입으로 간질발작을 유도한 생쥐에서 MMP 활성화자인 tissue plasminogen activator를 knock out시키면 MFS가 억제된다는 보고¹⁵와도 유사하여 저자들의 결과를 간접적으로 뒷받침하고 있다.

결론적으로, 저자들은 생쥐 pilocarpine 모델에서 중첩경련에 의해 해마 내 MMP-9 발현 및 활성이 증가하며, 이러한 MMP-9의 발현 및 활성증가는 생쥐 해마세포의 손상과 MFS 생성에 밀접한 관련이 있음을 밝혔다. 또한 MMP-9 선택적인 억제제를 사용했을 때 간질발작 후 간질병소생성기간 초기에 해마세포의 사멸을 감소시키고, 또한 후기 변화인 MFS를 성공적으로 억제함을 밝혔다. 따라서 간질치료에 있어 선택적 MMP-9 억제제의 사용은 과거 임상시험에서 나타난 비선택적 MMP억제제의 부작용을 감소시킬 것으로 기대되며, 향후 간질발작에 의한 뇌신경세포 손상 예방 및 간질발생의 억제치료에 있어 유망한 치료전략으로서의 가능성을 제시하고 있다.

REFERENCES

- Pitkanen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol* 2002;1:173-81.
- Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997;91:439-42.
- Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:1020-8.
- Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:360-6.
- Heo JH, Lucero J, Abumiyi T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:624-33.
- Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997;23:406-15.
- Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, et al. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001;32:1759-66.
- Lim GP, Backstrom JR, Cullen MJ, Miller CA, Atkinson RD, Tokes ZA. Matrix metalloproteinases in the neocortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurochem* 1996;67:251-9.
- Deb S, Gottschall PE. Increased production of matrix metalloproteinases in enriched astrocyte and mixed hippocampal cultures treated with beta-amyloid peptides. *J Neurochem* 1996;66:1641-7.
- Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan PH. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J Neurosci* 2003;23:8733-42.
- Zhang JW, Deb S, Gottschall PE. Regional and differential expression of gelatinases in rat brain after systemic kainic acid or bicuculline administration. *Eur J Neurosci* 1998;10:3358-68.
- Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RD, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci* 2002;22:920-30.
- Jourquin J, Tremblay E, Decanis N, et al. Neuronal activity-dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP-9 neurotoxicity after kainate. *Eur J Neurosci* 2003;18:1507-17.
- Reeves TM, Prins ML, Zhu J, Povlishock JT, Phillips LL. Matrix metalloproteinase inhibition alters functional and structural correlates of deafferentation-induced sprouting in the dentate gyrus. *J Neurosci* 2003;23:10182-9.
- Wu YP, Siao CJ, Lu W, et al. The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. *J Cell Biol* 2000;148:1295-304.
- Shibley H, Smith BN. Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice. *Epilepsy Res* 2002;49:109-20.
- Cavalheiro EA, Santos NF, Priel MR. The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia* 1996;37:1015-9.
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002;295:2387-92.

19. Levin JI, Chen JM, Du MT, *et al.* The discovery of anthranilic acid-based MMP inhibitors. Part 3: incorporation of basic amines. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:2975-8.
20. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972;32:281-94.
21. Rivera S, Ogier C, Jourquin J, *et al.* Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci* 2002;15:19-32.
22. Kim GW, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Early decrease in dna repair proteins, Ku70 and Ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2001;32:1401-7.
23. Lee BI, Lee DJ, Cho KJ, Kim GW. Early nuclear translocation of endonuclease G and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett* 2005;386:23-7.
24. Saito A, Hayashi T, Okuno S, Ferrand-Drake M, Chan PH. Interaction between XIAP and Smac/DIABLO in the mouse brain after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:1010-9.
25. Huang LT, Yang SN, Liou CW, *et al.* Pentylentetrazol-induced recurrent seizures in rat pups: time course on spatial learning and long-term effects. *Epilepsia* 2002;43:567-73.
26. Tauck DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci* 1985;5:1016-22.
27. Weise J, Engelhorn T, Dorfler A, Aker S, Bahr M, Hufnagel A. Expression time course and spatial distribution of activated caspase-3 after experimental status epilepticus: contribution of delayed neuronal cell death to seizure-induced neuronal injury. *Neurobiol Dis* 2005;18:582-90.
28. Araki T, Simon RP, Taki W, Lan JQ, Henshall DC. Characterization of neuronal death induced by focally evoked limbic seizures in the C57BL/6 mouse. *J Neurosci Res* 2002;69:614-21.
29. Henshall DC, Bonislawski DP, Skradski SL, *et al.* Formation of the Apaf-1/cytochrome c complex precedes activation of caspase-9 during seizure-induced neuronal death. *Cell Death Differ* 2001;8:1169-81.
30. Gu Z, Cui J, Brown S, *et al.* A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 2005;25:6401-8.
31. Lee SR, Tsuji K, Lo EH. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci* 2004;24:671-8.
32. Lee SR, Lo EH. Induction of caspase-mediated cell death by matrix metalloproteinases in cerebral endothelial cells after hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:720-7.