

## 흰쥐 측뇌실 내 PCPA 투여가 5-HT와 Ach량의 변동에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 약리학교실

배 영 숙

### = Abstract =

Effects on 5-HT and Ach in the Rat Brain by the I.C.V Injection of PCPA

Young Sook Pae

*Department of Pharmacology, College of Medicine, Ewha Womans University*

PCPA is a drug which depletes serotonin by inhibiting tryptophan hydroxylase activity.

Recent evidence indicates that the ascending cholinergic projection from the basal forebrain and ascending serotonergic projections from the brain stem exert a powerful control over the generalized electrical activity of the hippocampus formation and neocortex. Cross & Deakin (1985) reported that destruction of ascending cholinergic neurons by injection of ibotenic acid into the basal forebrain results in a significant reduction in 5-HT<sub>1</sub> receptor in the denervated cortex.

Maura & Raiteri(1986) observed that the release of (<sup>3</sup>H) Ach was concentration dependently inhibited by exogenous 5-HT in rat hippocampus.

So, we were interested in investigating whether PCPA which depletes the serotonin also affects the cholinergic system. The brain(cortex area 3, 4, 17 and hippocampus) were exised on the 3day and the 7day after single injection of PCPA 3mg/10 $\mu$ l into the cerebroventricle(Lateral ventricle AP+8.2mm ; L, 1.5mm ; DV+1.2mm).

5-HT and 5-HIAA contents were measured by HPLC-ECD and acetylcholine was measured by GC.

The results are

1) 5-HT & 5-HIAA contents in the cortex & hippocampus were decreased gradually after PCPA injection but not significant.

2) Ach contents in the cortex & hippocampus were decreased significantly on the 3rd day & 7th day after PCPA injection.

3) We observed that the cerebral cortex has small amount of vesicles or no vesicles and coated vesicles in the axon terminals by electren microscope.

So, these results suggest that PCPA treatment results in significant changes of cholinergic system in the brain.

---

\*이 연구는 1991년도 이화여자대학교 교수연구기금 연구비에 의해 이루어졌음

## 서 론

근래 우울증의 병태생리에 대한 중추신경계의 serotonin(5-HT) 장애는 신경생화학적 측면에서 활발히 연구되고 있다. 우울증의 증상발현이 aminergic system이나 serotonin system에 연관된 수용체의 변화 혹은 병변에 기인하기 보다는 이들 두 신경전달 물질계가 연관이 된다는 serotonin/norepinephrine link 가설을 제시하기도 한다.

Alzheimer type dementia(이하 ATD)는 노인성 치매 질환 중 가장 흔한 형으로서 임상소견으로 기억상실증, 실어증과 더불어 정서장애로 우울증, 초조증, 공격성이 나타난다.

근래에 ATD환자에서 serotonin성 신경세포들의 변형이 basal forebrain의 choline성 신경세포와 locus ceruleus의 noradrenaline성 신경세포들의 변형과 함께음을 관찰한 바 있다.

Davies와 Moloney<sup>1)</sup> 그리고 Perry등<sup>2)</sup>은 ATD환자의 대뇌에서 choline성 신경활동의 지표인 choline acetyltransferase(ChAT)가 상당히 감소됨을 발견하고 대뇌 ChAT 활성의 소실이 인식결핍과 상당히 밀접한 관계를 가지며 이는 병리학적 소견과도 일치함을 보고한 바 있다. 또 choline성 신경외에도 다른 신경전달물질과도 상관관계가 있으며 특히 ATD 초기에 serotonin성 신경과 밀접한 관련이 있다는 것이 많이 보고되고 있다<sup>3)4)</sup>. 신경병리학적인 연구에서 ATD환자의 dorsal raphe nucleus의 커다란 신경세포들에 neurofibrillary tangle이 형성된다고 보고하였고<sup>5)6)7)</sup>, 인간의 기억기능은 choline 효능 신경계가 특이적 역할을 하며 특히 시냅스 후막 수용체의 감수성이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

parachlorophenylalanine(이하 PCPA)은 tryptophan hydroxylase를 억압하여 serotonin합성을 저해하는 물질로 동물에 투여시 심한 불면증, 교상증가, 공격성의 감소, 생활동 증가를 보고하고 있다<sup>8)9)</sup>.

Maura와 Raiteri<sup>10)</sup>는 흰쥐 해마 신경말단에서의 Ach 유리가 외인성 serotonin 투여로 인하여 억제됨을 보고한 바 있으며 serotonin이 choline성 신경에 영향을 미침을 시사한 바 있다.

그리하여 본 실험에서는 serotonin 생합성 억제 물질인 PCPA를 투여하여 이의 유리를 감소시킴으로서 내인성으로 choline성 신경에 어떤 영향을 미치는가를 관찰하고자 하였다.

## 실험동물 및 방법

실험동물은 1주일 이상 실험실환경에 적응시킨 200g 내외의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley계)를 사용하였다. 대조군 및 실험군은 guide cannula를 통해 생리식염수 및 PCPA를 측뇌실내(intracerebroventricle)로 주사하였다. 흰쥐에 secobarbital sodium 30 mg/kg을 복강내로 주사한뒤 stereotaxic technique에 의해 guide cannula를(Lateral ventricle AP,+8.2 mm; L, 1.5mm; DV, 1.2mm) 오른쪽 측실 내에 삽입시켰다. 여기에 hamilton syringe를 사용하여 30G cannula로 PCPA 3mg/kg를 아주 천천히(1ul/min) 주사하였다. 이렇게 PCPA를 측뇌실내로 주사한 흰쥐를 3일, 7일에 단두하여 뇌를 적출하였다. 대조군은 측뇌실내에 10ul의 생리식염수를 주사한 후 3일, 7일에 단두하여 뇌를 적출하였다.

실험동물은 대조군과 실험군으로 나누고 대조군은 생리식염수를 측뇌실내로 실험군은 PCPA를 측뇌실내로 투여하였다. 동물수는 대조군 50마리, 총 150마리를 사용하였으며 이중 다수가 죽거나 주사 실패로 정량 사용된 대조군은 25마리, PCPA군이 경우, 3일군은 31마리, 7일군은 25마리였다.

### 1. Acetylcholine 정량법

1) Cortex와 Hippocampus적출-대조군과 실험군의 흰쥐를 단두 후 두개골을 제거하였다. 적출한 뇌를 얼음위에서 해부하여 Vogt와 Miller<sup>11)</sup> 방법에 의거하여 interaural point에서 전방 2.0mm-5.0mm 사이를 잘라낸 뇌절편에서 cortex area 3, 4, 17을 떼어내고 hippocampus를 떼어내었다. 이를 acetylcholine 측정기에 사용하였다.

2) Acetylcholine의 추출-Ach 추출은 Maruyama등<sup>12)</sup>의 방법을 기초로 하였다. 즉 15% 1N-formic acid/aceton 4ml와 내부표준 물질 0.3mM butylcholine iodide 50ul 및 각 실험 재료를 넣고 냉각시키면서 20초간 균질화 시켜 얼음속에서 30분간 방치한 후, 0°C에서 17,000g로 20분간 원심분리한 상등액을 취하여 같은 양의 ether로 2회 세척하였다.

ether층은 버리고 질소기류 중에서 잔액을 증발건조시켰다. 잔사에서 acetonitril 100ul, propionyl chloride 300ul를 넣고 60°C에서 40분간 방치하여 choline를 propionyl choline으로 ester화 시켰다. 질소기류중에서 용매를 휘발시킨후 증류수 400ml를 넣어 용해시키고 potassium peroxide 20ul(KI 2g과 I<sub>2</sub> 1.8g을 증류수 10ul에 녹인용액)을 넣어 혼화시켜 10분간 얼음속에 방치하여 4급 암모늄염을 침전시킨 후, 10,000g로 5분간 원심분리하여 얻은 침전을 Ach의 측정용 시료로 사용하였다.

3) Acetylcholine의 정량-원심분리하여 얻은 침전물을 chromatography용 acetonitril 50ul에 용해시킨 후 Amberlite IRA 400 10mg을 넣어 파잉의 iodide를 제거하였다. 추출액 2ul를 pyrolyzer의 platinum ribbon에 넣고 interface temp ; 150°C, lamp ; 20°C/msec, pyrolysis interval ; 500msec, final temp ; 400°C에서 열분해시켰다. 열분해에 의하여 dealkylation된 것을 gas chromatography에 도입하여 Ach을 정량하였다. 분석조건은 3mm×2m glass column에 10% cabowax 20M+5% KOH(80-100 mesh. Chromosorb WAW)를 충전한 것을 사용하였으며 flame ionization detector attenuation ; 8×10<sup>-11</sup> ANPS/MVV, colum temp ; 95°C, helium carrier gas ; He, flow rate 30ml/min, injection port & detector temp ; 200°C에서 측정하였다. Ach의 표준 검량곡선은 내부 표준물질 butyl-choline 0.3mM 50 ul에 대하여 Ach 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mM을 각각 50 ml에 넣고 검체와 동일 처리하여 얻은 chromatogram에서 내부표준물질과 면적비에 의해 구한 값으로 최소자승법에 의하여 직선방정식을 얻은후, 이에 따라 검액에서의 Ach농도를 구하여 Ach nM/g tissue로 표시하였다.

## 2. Serotonin 및 5-HIAA정량법

적출된 뇌를 얼음위에서 해부하여 Glowinski 및 Iversen<sup>13)</sup>의 방법을 약간 변형하여 피질 및 해마의 뇌조직을 채취하였다. 채취된 부위별 뇌조직을 biogenic amine 측정을 위하여 Wagner등<sup>14)</sup>의 방법을 변형시켜 처리하였는데 조직무게 mg당 20ml 이상의 0.1M perchloric acid(0.25% disodium EDTA 함유)를 가하여 균질화(homogenization)한후 12, 500g에서 15분간 원심분리(effendorf centrifuge 54 14, Brinkman, USA)하여 그 상층액을 채취하였다.

조직시료는 nitrocellulose membrane filter(pore size : 1.22mm, Bioanalytical system Inc. USA)로 여과하고 여과액중 10ul를 High Performance Liquid Chlomatography(HPLC) system에 주입하여 5-hydroxytryptamine(5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)의 함량을 측정하였다. HPLC system에서 분리된 각각의 물질들은 Electrochemical detector (EC detector)로 검출하였고 각 물질의 peak 면적을 계산하였다.

사용한 분석기기 및 분석조건은 다음과 같다.

HPLC 분석기 : HPLC(waters Associates, Models 441, USA).

Colum : Biophase ODS 5mm(250 5mm)(Bioanalytical Systems Inc. USA).

Mobile Phase : 5-HT, 5-HIAA 측정 : 6.5% acetonitrile, 93.5% 0.15M monochloroacetic acid buffer(0.34mM sodium octuyl sulfonate와 2mM disodium EDTA함유)를 pH 2.8로 맞추고 유입속도는 1.2 ml/min으로 하였다.

Detecror : LC 4B/17 Electrochemical detector with TL-5 glassy carbon working electrode(Bioanalytical System Inc. USA).

Applied Potential : 800mV vs Ag/AgCl

Controller Sensitivity : 1 nA/V

측정된 각 물질의 수치는 평균±표준오차로 표시하였으며 실험군과 대조군의 통계학적 분석은 Student's t-test로 검정하여 P값이 0.05 이하인 경우에 유의성 있는 것으로 판정하였다. 본 실험에 사용된 HPLC 시약 및 약물은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.

### 1) 투사 전자현미경적 방법

실험동물은 대조군, PCPA 주사후 3일군 및 7일군에서 각각 5마리씩 사용하였고 각 동물은 sodium secobarbital로 마취시킨 다음 흉곽을 열고 좌심실을 통하여 2.5% glutaraldehyde 1%-paraformaldehyde 혼합고정액으로 관류고정하고 2시간 후 흰쥐의 두 개골을 제거하고 뇌를 적출한 다음 동일 고정액에 하루 동안 담구어 두었다. 완전하게 고정된 뇌로부터 흰쥐 뇌<sup>15)</sup>를 참고하여 일정부위의 피층을 직경 1.5mm의 금속판으로 절취하였다. 절취한 피층조직은 4% sucrose로 씻은 다음 1% osmium tetroxide로 2시간 동안 후 고정하고 탈수과정을 거친

다음 Epon 812에 포매하였다. 수지에 포매된 조직은 1 $\mu$ m 두께의 절편을 만들어 0.5% toluidine blue로 염색한 다음 광학현미경으로 피층조직을 확인하였다. 확인된 조직은 다시 50nm정도 두께의 절편으로 만들고 이를 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. 표본을 관찰할 때에는 주로 신경그물부위를 선택하여 일정한 배율(20,000 $\times$ )로 사진촬영하였다.

### 실험성적

#### 1. 측뇌실 내 PCPA 투여후 흰쥐 대뇌와 해마에서 5-HT 및 5-HIAA량 변동

##### 1) 대뇌피질

(1) 5-HT 량 변동 : 대조군의 경우 5-HT량은 192.11 $\pm$ 19.89(ng/g)였으며 PCPA투여후 3일군에서는 175.36 $\pm$ 18.19(ng/g)으로 약간 감소하였으나 통계

적으로는 의의가 없다. PCPA투여후 7일 군에서는 188.54 $\pm$ 13.83(ng/g)으로 3일군에 비하여 오히려 약간 증가하는 경향을 보였다(Table 1, Fig. 1A)

(2) 5-HIAA량 변동 : 대조군의 5-HIAA량은 151.98 $\pm$ 10.04(ng/g)이었으며 PCPA투여후 3일 군에서는 142.82 $\pm$ 9.88(ng/g), PCPA투여후 7일군에서는 128.59 $\pm$ 7.25(ng/g)으로 점차 감소하는 경향을 보였다(Table 1, Fig. 1A).

##### 2) 해 마

(1) 5-HT량 변동 : 대조군의 5-HT량은 299.41 $\pm$ 26.54(ng/g)이었으며 PCPA투여후 3일 군에서는 276.01 $\pm$ 21.90(ng/g) PCPA투여후 7일 군에서는 241.29 $\pm$ 26.03(ng/g)으로 점차 감소하는 경향을 보였다(Table 1, Fig. 1B).

(2) 5-HIAA량 변동 : 대조군의 5-HIAA는 281.50 $\pm$ 30.91(ng/g)이었으며 PCPA투여후 3일 군에서는 264.01 $\pm$ 9.50(ng/g), PCPA투여후 7일 군에서는 223.

Table 1. The effect of PCPA I.C.V injection on the contents of 5-HT & 5-HIAA in the cortex and hippocampus of rat brain

|         | Cortex                |                       | Hippo                 |                       |
|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|         | 5HT                   | 5-HIAA                | 5HT                   | 5-HIAA                |
| Control | 192.11 $\pm$ 19.89(7) | 151.99 $\pm$ 10.04(7) | 299.41 $\pm$ 26.54(7) | 281.50 $\pm$ 30.91(7) |
| 3 days  | 175.36 $\pm$ 18.19(7) | 142.82 $\pm$ 9.88(7)  | 276.01 $\pm$ 21.90(7) | 264.01 $\pm$ 9.50(7)  |
| 7 days  | 188.54 $\pm$ 13.83(7) | 128.59 $\pm$ 7.25(7)  | 241.29 $\pm$ 26.03(7) | 223.44 $\pm$ 14.01(7) |

Numbers in parentheses denote the number of animals

Values are means $\pm$ SE expressed as ng/g tissue

\*p<0.05 by unpaired Student's t-test

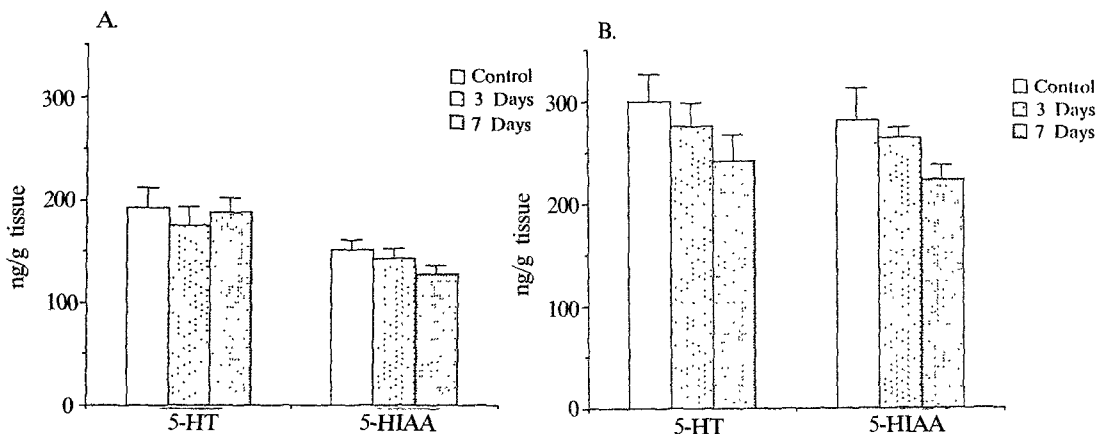


Fig. 1. The contents of 5-HT & 5-HIAA in the cortex(A) and the hippocampus(B) of the rat. After I.C.V. injection of PCPA(3mg/kg), the hippocampus & the cortex were dissected out and used for measurement of 5-HT & 5-HIAA contents. Vertical bars indicate S.E. of means.

\*p<0.05 compared to Control(by unpaired Student's t-test).

44±14.01(ng/g)로 점차 감소하는 경향이였다(Table 1, Fig. 1B).

## 2. 측뇌실내 PCPA 투여후 흰쥐 대뇌와 해마에서 Ach량 변동

뇌측실내로 PCPA를 투여한 후 3일, 7일에 대뇌 피질과 해마의 Ach량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

### 1) 대뇌피질의 Ach량

대조군에서 3.93±0.64nmole/g인 것이 PCPA투여 후 3일 군에서는 1.15±0.06nmole/g, PCPA투여 후 7일 군에서는 1.06±0.13nmole/g으로 3일군과 7일 군에서 거의 같은 값을 나타내며, 두군 모두 대조군에 비해 현저히 감소됨을 나타내었다(p<0.05) (Table 2, Fig. 2A).

### 2) 해마의 Ach량

대조군에서 3.19±0.19nmole/g인 것이 PCPA투여

후 3일 군에서는 1.905±0.27nmole/g, PCPA투여 후 7일 군에서는 1.95±0.22nmole/g으로 3일군과 7일 군에서 거의 같은 값을 나타내며, 두군 모두 대조군에 비해 현저히 감소됨을 나타내었다(p<0.05) (Table 2, Fig. 2B).

## 3. 전자현미경적 소견

대조군 흰쥐대뇌에서는 축삭-수상돌기 연결을 형성하는 축삭종말들은 다수의 연결소포를 갖는 것이 관찰되었으며, PCPA주사후 3일군에서는 축삭-수상돌기연접의 축삭종말에 연결소포가 적고 그 윤곽이 불분명한 것과, 연결소포가 없는 축삭종말이 축삭-수상돌기연접을 이루는 것이 관찰되었다. 또한 소수의 연결소포를 갖는 축삭종말에서는 Coated 소포를 관찰할 수 있었다(Picture 1, 2, 3, 4). PCPA주사후 7일군은 대조군에서와 유사하게 관찰되었다.

## 고찰

Coppen<sup>16)</sup>이 우울증의 병태생리에 대한 연구에서 중추신경계의 serotonin 장애가 원인이 된다는 보고 이래 신경생화학적 측면에서 serotonin 연구가 활발히 진행되고 있다.

최근 중추신경계에서 serotonin 신경전달 물질계의 장애가 우울증의 주요 병인이 된다는 설명은 serotonin 재흡수의 선택적 차단이나 신경말단에서

Table 2. The effect of PCPA I.C.V injection on the contents of Ach in the cortex & hippocampus of rat brain

|         | Cortex         | Hippo.         |
|---------|----------------|----------------|
| Control | 3.93±0.64(12)  | 3.19±0.19( 9)  |
| 3 days  | 1.15±0.06(21)* | 1.95±0.27(12)* |
| 7 days  | 1.06±0.13(14)* | 1.95±0.22( 9)* |

Numbers in parentheses denote the number of animals

Values are means±SE expressed as n mole/g tissue

\*p<0.05 by unpaired Student's t-test

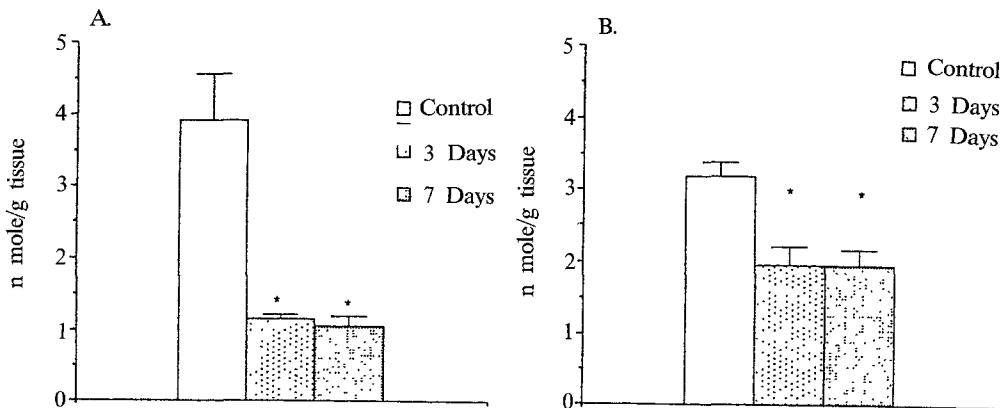
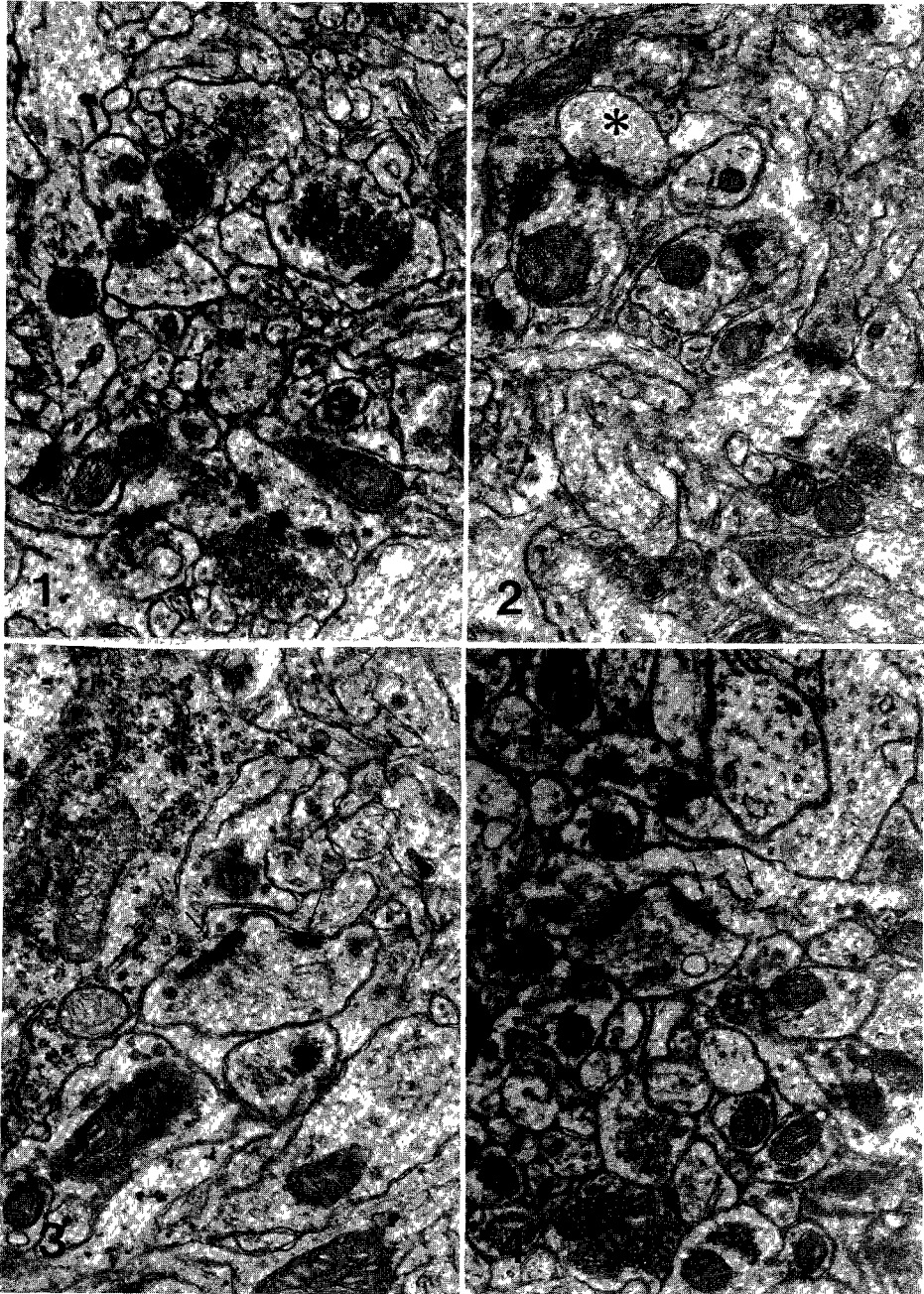


Fig. 2. The contents of acetylcholine in the cortex(A) and the hippocampus(B) of th rat. After I.C.V injection of PCPA(3mg/kg), the hippocampus & the cortex were dissected out and used for measurement of Ach contents. Vertical bars indicate S.E. of means.

\*p<0.05 compared to Control.(by unpaired Student' t t-test).



**Picture 1.** Cerebral cortex of normal rat. The axon terminals making the axo-dendritic synapses contains many synaptic vesicles.  $\times 28,000$ .

**Picture 2.** Cerebral cortex of rat on the 3 day after the administration of PCPA the axon terminal (astrisk) of an axon terminal (astrisk) of an axodendritic synapse contains small amount of vesicles and the contents of vesicles are not so dense.  $\times 28,000$ .

**Picture 3.** Cerebral cortex of rat on the 3 day after the administration of PCPA. An axon terminal without vesicles (arrow) makes the axo-dendritic synapse.  $\times 28,000$ .

**Picture 4.** Cerebral cortex of rat on the 3 day after the administration of PCPA. The coated vesicles (arrows) are seen in the axon terminal with a few vesicles.  $\times 28,000$ .

serotonin를 파괴하는 monoamine oxidase(MAO)의 기능을 억제하여 중추 신경계에서 serotonin 신경 전달 물질계의 기능을 항진시키는 약물들이 항우울제로 사용되고 있다는 점에서 찾아볼 수 있다. 그리하여 우울증의 신경생화학적 병인으로서 serotonin의 역할은 매우 중요하다<sup>17)</sup>.

근래 ATD환자에서 serotonin성 신경말단의 신경 전달물질이 많이 연구되며 ATD환자 다수에서 지속적으로 Serotonin이 감소되며 특히 temporal cortex에서 serotonin 재흡수 부위가 없어지며 temporal, parietal cortex와 해마에도 신경말단의 변화가 일어난다. 또 dorsal raphe nucleus의 신경세포에 neurofibrillary tangle이 보이고 raphe nucleus의 신경세포가 상실된 경우도 보고되고 있다<sup>18)</sup>. 이는 또한 raphe nucleus에 존재하는 serotonin성 신경세포들의 변형이 basal forbrain의 choline성 신경세포와 locus ceruleus의 noradrenaline성 신경세포들의 변형과 함께음을 관찰한 바 있다<sup>19)</sup>. Mann<sup>20)</sup>과 Mann등<sup>19)</sup>은 down syndrome환자에서 dorsal raphe nucleus의 병변보다 먼저 대뇌와 해마에서 senile plaque(노인성 반점)과 neurofibrillary tangle이 나타남을 관찰하였으며 Pearson등<sup>21)</sup>과 Perry등<sup>22)</sup>도 choline성 신경의 역행성 변성과 함께 noradrenaline성, adrenaline성 신경세포에도 역행성 변성음을 시사하였다. 또 이와 더불어 serotonin성 신경세포에는 일차적인 대뇌변화에 맞추어 역행성 변성을 보고하였다. 그러나 흥미있게도 PD(Parkinsons Disease)에서는 serotonin성 신경말단의 소실이 진행성 변성을 한다는 것이다<sup>23)</sup>.

Pfizer 연구진들이 p-chloropenylalanine(PCPA)가 tryptophan hydroxylase를 억압하는 물질로서 serotonin생합성을 억제에 사용한 이래 Goodwin<sup>24)</sup>이 reserpin이나 PCPA 투여로 대뇌 serotonin을 감소시켰을 때 우울증이 악화되었음을 보고한 바 있다. Maura와 Raiter<sup>10)</sup>는 해마에는 median raphe nucleus와 dorsal raphe nucleus에서 오는 serotonin성 신경말단이 같이 혼재하므로 시냅스전 위치에서 서로 상관관계를 가질 수 있음을 시사하고, 해마 신경세포의 억제성수용체로 serotonin 수용체가 Ach신경말단에 존재함을 보고하였다. Vizi등<sup>25)</sup>과 Gillet<sup>26)</sup>도 serotonin이 Ach의 유리를 억압할 수 있다고 시사하였다.

Robinson<sup>27)</sup>은 serotonin성 신경세포가 해마 cholin성 신경섬유에 긴장성 억압효과를 나타낸다고 보고하고, choline성 신경말단에 serotonin 수용체가 특별히 존재함을 알 수 있으며 이를 조절하는 세로토닌 수용체가 ketanserin이나 methysergide에 예민하게 반응하지 않으므로 5-HT<sub>2</sub> type이 아니고 5-HT<sub>1</sub>으로 분류하게 되었다. 즉 흰쥐 해마에서 Ach유리를 억압하는 serotonin 수용체는 5-HT<sub>1B</sub>로 생각된다. Quirion등<sup>28)</sup>은 흰쥐 대뇌에 존재하는 choline성 신경말단에 5-HT<sub>2</sub> 수용체가 존재함을 보고한 바 있다.

Ikeda등<sup>29)</sup>은 ATD에서 choline acetyltransferase 활성이 매우 떨어짐을 보고하였다.

Ratten과 Tejwani<sup>30)</sup>는 Ibotenic acid로 choline성 신경섬유를 파괴하여 opioid peptidergic system을 관찰한 결과 ChAT 뿐만 아니라 AchE와  $\beta$ -endorphine치가 모두 떨어지는 것을 볼 수 있었으나 Met-enkephaline치는 현저히 증가하는 것으로 나타났다.

흰쥐에 ibotenic acid를 basal forebrain으로 투여시 ascending cholinergic neuron이 파괴되고 denervated cortex에서 5-HT<sub>1</sub> 수용체가 현저히 감소됨을 보고한 바 있다. 그리하여 이 결과는 choline성 신경말단에 5-HT<sub>1</sub> 수용체가 존재한다고 볼 수 있다. In vitro 실험에서 5-HT<sub>1</sub> 수용체가 Ach유리를 조절할 수 있다는 것이 확인된 바 있다<sup>10)</sup>.

우리가 실험한 결과에 의하면 PCPA를 적은 용량으로 한번만 대뇌측실내로 투여후 7일동안에 serotonin은 시간이 지남에 따라 조금씩 서서히 감소됨을 나타내었다. 이는 PCPA가 serotonin성 신경계에 작용하여 serotonin 합성을 서서히 억압하는 양상으로 생각된다. 또 serotonin이 조금씩 감소하는 반면 Ach량은 3일, 7일에 대뇌와 해마에서 현저히 감소함을 보여 serotonin 감소에 따른 민감한 반응을 보임을 알 수 있다. 특히 in vivo 실험에서 대뇌 및 해마에서의 serotonin 내인성 고갈이 Ach유리를 현저히 억압한다는 결과는 serotonin성 신경이 Ach유리 조절에 매우 중요한 역할을 한다는 점을 확인한 것으로 생각된다. 그러나 Maura와 Raiter<sup>10)</sup>가 in vitro실험에서 흰쥐 해마에서 serotonin 수용체가 Ach유리를 억압한다는 실험과는 상반된다. 또 흰쥐 해마 choline성 신경말단에 존재하는 serotonin 수용체가 5-HT<sub>1</sub> 수용체라는 것은 밝혀낸 바 있으므로

앞으로 *in vivo* 실험에서도 serotonin 수용체가 5-HT<sub>1</sub>인지 5-HT<sub>2</sub>인지는 더 연구해 볼 과제로 생각되며 특히 PCPA양을 조절해 보는 것도 재미있으리라 생각된다.

투사전자현미경 소견에서는 PCPA 투여후 3일군에서 대뇌 신경세포를 관찰한 결과 축삭 수상돌기 연결의 축삭종말에 연접소포가 적고 그 윤곽이 불분명한 것과 연접소포가 없는 축삭종말이 축삭수상돌기 연결을 이루는 것으로 관찰되었다. 또한 소수의 연접소포를 갖는 축삭종말에서는 coated 소포를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과 어떤 신경세포인지는 알 수 없으나 연접소포가 적어진 것은 축삭종말에서 어떤 신경전달 물질이 감소되었음을 증명하는 것이며 coated 소포란 신경전달 물질이 uptake되지 않음을 증명하는 것으로 신경전달 물질들이 신경말단에서 유리되어 없어진 후 재흡수되지 않음을 볼 수 있었다. 그러나 PCPA투여후 7일에서는 이러한 경우를 관찰하기 힘든 것으로 보아 시간이 지남에 따라 다시 재흡수과정이 일어나지 않나 생각되며 이는 신경 생화학적으로 serotonin 양을 측정 한 결과 대뇌에서 7일 후에 3일군에 비해 약간 증가하는 경향과 일치하는 것으로 보인다.

그리하여 본 연구에서는 2가지의 재미있는 결과를 얻었다고 볼 수 있다. 즉, 첫째, 내인성 serotonin의 감소가 Ach에 영향을 미친다는 것과 둘째, PCPA투여로 serotonin의 감소와 더불어 Ach의 감소를 나타낸 것은 PCPA만으로 치매와 우울증의 동물 모델을 얻을 수 있을 것으로 생각되며 이는 앞으로 더 연구해야 할 과제로 생각된다.

## 결 론

200g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 뇌측실내로 PCPA를 투여하여 투여후 3일, 7일에 뇌를 적출한 후 대뇌와 해마에서 serotonin와 Ach을 정량 측정 하였으며 전자 현미경 하에서 신경세포를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 뇌측실내 PCPA 투여후 흰쥐 대뇌의 serotonin량은 3일군에서 약간 감소하였으나 7일군에서는 덜 감소함을 나타내었다. 5-HIAA량은 3일, 7일에 점차 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 의미는 없었다.

2) 뇌측실내 PCPA투여후 흰쥐 해마의 5-HT 및 5-HIAA량은 3일군, 7일군에서 점차 감소하는 경향이었으나 통계학적 의미는 없었다.

3) 뇌측실내 PCPA투여후 대뇌 Ach량은 3일, 7일에 거의 같은 값을 나타내었으며, 이는 대조군에 비해 현저히 감소하였다.

4) 뇌측실내 PCPA투여후 해마 Ach량은 3일, 7일에 거의 같은 값을 나타내었으며, 두군 모두 대조군에 비해 현저히 감소하였다.

5) 전자현미경적 소견에서는 대조군이 축삭종말에서 다수의 연접소포를 갖는데 비해 PCPA 투여후 3일군에서는 축삭종말에 연접소포가 적고 윤곽이 불분명하며 혹은 연접소포가 없는 것이 관찰되었다. 또 coated 소포도 관찰되었다.

이상의 결과로 대뇌 및 해마에서 PCPA 투여로 serotonin 합성이 억압될 경우 choline성 신경세포가 매우 예민하게 영향을 받아 Ach량이 현저히 감소되며 이는 치매나 우울증의 발생과도 연관이 있으리라 생각되어 앞으로 더 연구해야 할 과제로 생각된다.

## References

- 1) Davies P and Maloney AJ : *Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. Lancet 1976 : ii : 1043*
- 2) Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bezzmann K, Gibson PH and Perry RH : *Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. Br Med J : 1978 : II : 1457-1459*
- 3) Breisch ST, Zemlan FP and Hoebel BG : *Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. Science 1976 : 192 : 382-384*
- 4) Cross AJ, Crow TJ, Johnson JA, Perry EK, Perry RH, Blessed G and Tomlinson BE : *Studies on neurotransmitter receptor systems in neocortex and hippocampus in senile dementia of Alzheimer type J Neurol Sci 1984 : 64 : 109-111*
- 5) Jirano A and Zimmerman HM : *Alzheimer's neurofibrillary tangles a topographical study. Arch Neurol 1962 : 7 : 227-242*
- 6) Ishi T : *Distribution of Alzheimer neurofibrillary*



- . tangles in the brain stem and hypothalamus in senile dementia. *Acta Neuropathol* 1966 : 6 : 181-187
- 7) Curcio CA and Kemper T : Nucleus raphe dosalis in dementia of th Alzheimer type : neurofibrillary changes and neuronal packaging density. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984 : 359-368
  - 8) Koella WP, Feldstein A and Czicman JS : The effect of parachlorophenylalanine on the sleep of cats. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1968 : 25 : 481-490
  - 9) Karli P, Vergnes M and Didiergeorges F : Rat-mouse interspecific aggressive behavior and its manipulation by brain ablation and by brain stimulation. Eds by S. Garattini and EB Sigg *Aggressive Behavior (Proc. Int. Symp. on Biology of Aggressive Behavior, Milan, May 1968)*, Wiley, New York, 1969, 47-55
  - 10) Maura G and Raiteri M : Cholinergic terminals in rat hippocampus possess 5-HT<sub>1B</sub> receptors mediating inhibition of acetylcholine release. *Dur J Pharmacol* 1986 : 129 : 333-337
  - 11) Vogt BA and Miller MW : Cortical connections between rat cingulate cortex and visual, motor and postsubicular cortices. *J Com Neurol* 1983 : 216 : 192-210
  - 12) Maruyama Y, Kusaka M, Moris G, Horikawa A and Hasegawa Y : Simple method for the determination of choline and acetylcholine by pyrolysis gas chromatography. *J Chromatography* 1979 : 164 : 121
  - 13) Glowinski J and Iversen LL : Regional studies of catecholamine in the rat brain-I. *J Neurochem* 1966 : 13 : 655-668
  - 14) Wagner J, Vitalip, Palfreyman MG, Zraika M and Huot S : Simultaneous determination of 3, 4-dihydroxyphenylalanine, 5-homovanillic acid, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat cerebrospinal fluid and brain by high performance liquid chromatography with electro-chemical detection. *J Neurochem* 1982 : 38 : 1241-1254
  - 15) Paxinos G, Watson C : *The rat brain*. Academic Press, New York, 1982
  - 16) Coppen A : *The biochemistry of affective disorders*. *Br J Psychiatry* 1967 : 113 : 1237-1264
  - 17) 백인호 : 우울증과 serotonin. 대한정신약물학회지 1993 : 4(2) : 81-89
  - 18) Yamamoto T and Hirano A : Nucleus raphe dosalis in Alzheimers disease : neurofibrillary tangles and loss of large neurones. *Ann Neurol* : 1985 : 17 : 573-577
  - 19) Mann DMA, Yates PO and Narcyniuk B : Alzheimer's presenile dementia, senile dementia of the Alzheimer-type and Down syndrome in middle age from an age related continuum of pathological changes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1984 : 10 : 185-207
  - 20) Mann DMA 1985 : *The neuropathology of Alzheimers disease : a review with pathogenetic, acetiological and therapeutic considerations*. *Arch Aging Develop* 1985 : 31 : 213-255
  - 21) Pearson RCA, Sofroniew MV, Cuello AC, Powell TPS, Eckenstein F, Esiri MM and Wilcock GK : Persistence of cholinergic neurones in the basal nucleus in the brain with senile dementia of the Alzheimer type demonstrated by immunohistochemical staining for choline acetyltransferase. *Brain Res* 1983 : 289 : 370-374
  - 22) Perry RH, Candy JM, Perry EK, Irvine D, Blessed G, Fairbairn AFC and Tomlinson BE : Extensive loss of choline acetyltransferase activity is not reflected by neuronal loss in the nucleus of Maynert in Alzherimer's disease. *Neurosci Lett* : 1982 : 33 : 311-315
  - 23) Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubis B and Agid Y : Reducation of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res* 1983 : 275 : 321-328
  - 24) Goodwin FK, Ebert MH, Bunney WE : Mental effects of reserpine in man : a review. In : Shader RI. ed. *Psychiatric complications of Medical drugs*. New York NY : Raven Press 1972
  - 25) Vizi ES, Harsing LG and Zsilla G : Evidence of the modulatory role of serotonin in acetylcholine release from striatal interneuron. *Brain Res* 198 : 212 : 89
  - 26) Gillet G, Ammor S and Fillion G : Serotonin inhibits acetylcholine release from rat striatum slices : evidence for a presynaptic receptor mediated effect. *J Neurochem* 1985 : 45 : 1687
  - 27) Robinson SE : Effect of specific serotonergic lesions on cholinergic neurons in the hippocampus, cortex and striatum. *Life Sci* 1983 : 32 : 345
  - 28) Quirion R, Richard J and Dam TV : Evidence for

- the existence of serotonin type-2 receptors on cholinergic terminals in rat cortex. Brain Res 1985 : 333-345*
- 29) Ikeda M Dewar D and McCulloch J : *A correlative study of calcium channel antagonist binding and local neuropathological features in the hippocampus in Alalaheimer's disease. Brain Res 1992 : 589 : 313-319*
- 30) Rattan AK and Tejawani GA : *The neurotoxic actions ibotenic acid on cholinergic and opioid peptidergic systems in the central nervous systems of the rat. Brain Res 1992 : 571 : 298-305*
- 31) Cross AJ and Deakin JFW : *Cortical serotonin receptor subtypes after lesion of ascending cholinergic neurones. Neurosci Lett : 1985 : 60 : 261-265*