

박사학위논문

흰쥐 뇌에서 속후각결질 손상 후 해마로
투사하는 콜린성 및 도파민성 신경로의
변화에 관한 연구

110.339



제주대학교 대학원
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

생물학과

고 미 희

2000년 12월

흰쥐 뇌에서 속후각겉질 손상 후 해마로 투사하는 콜린성 및 도파민성 신경로의 변화에 관한 연구






지도교수 오 문 유

고 미 희

이 논문을 이학박사학위 논문으로 제출함

2000년 10월

고미희의 이학 박사학위 논문을 인준함

| | | |
|-------|-------|--|
| 심사위원장 | 이 봉 희 |  |
| 위 원 | 오 문 유 |  |
| 위 원 | 김 원 태 |  |
| 위 원 | 김 경 진 |  |
| 위 원 | 이 영 재 |  |

제주대학교 대학원

2000년 12월

Changes of the Cholinergic or Dopaminergic
Innervation to the Hippocampus after Entorhinal
Cortex Lesion in Rat

Mi Hee Ko

(Supervised by Prof. Moon You Oh)



JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2000. 12

Abstract

The Bartha strain of pseudorabies virus (PRV) is one of several viruses frequently used for transsynaptic tracing, and has been widely employed for analysis of multisynaptic circuitry following injection into peripheral organs and brain of rats. The role of the hippocampus was involved in learning and memory functions and the entorhinal cortex plays a crucial role as a gateway connecting the neocortex and hippocampal formation. Entorhinal cortex lesions have been employed in numerous studies seeking to neurochemically characterize the processes governing the sprouting of new fibers in denervated hippocampal regions as the Alzheimer's disease model. The first purpose of this study was to identify the hippocampus pathway, the cholinergic or dopaminergic pathway in the normal rat brain after PRV injection into the hippocampus. The second purpose was to investigate the morphological changes of the hippocampal cholinergic or dopaminergic innervations by using the PRV injection into the hippocampus after entorhinal cortex lesions. Experimental procedures were carried out with adult male and female Sprague-Dawley rats weighing 250-350g. In the normal or ECL rats, $3\mu\text{l}$ of PRV were injected into hippocampus, using a $10\mu\text{l}$ hamilton syringe ($0.05\mu\text{l}/\text{min}$) with the stereotaxic instrument. Stereotaxic instrument coordinates for the entorhinal cortex lesion were placed 10° outward from the bregma: AP (anteroposterior) 8.3mm, ML (medial line) 4.8mm, and DV (dorsoventral) 4mm

and 6mm from the dura matter, ML 4.3mm, DV 5mm from the dura matter, and AP 8.8mm, ML 3.65mm, DV 5mm from the dura matter. Electrolytic lesions were made by passing a 1mA cathodic current through a 26-gauge stainless-steel electrode for 45 seconds. After the PRV infected rats were perfused with 4% paraformaldehyde-lysine-periodate and the brains were removed. PRV-positive neurons were identified by immunohistochemistry employing rabbit anti-PRV as a primary antibody. Double immunofluorescent staining after ECL were employed for visualization of both the PRV and the choline acetyltransferase, and the PRV and tyrosine hydroxylase as neurotransmitter enzymes and definitive markers for cholinergic, and dopaminergic neurons. All tissues were evaluated by light, fluorescent microscope, and confocal laser scanning microscope. The hippocampal pathway, the cholinergic or dopaminergic pathway were identified in the normal rats. The double labelled neurons (ChAT and PRV, TH and PRV) were distributed at several different nuclei from the brainstem to the entorhinal cortex of the cerebrum. The morphological changes were be observed in the hippocampal cholinergic or dopaminergic innervation after entorhinal cortex lesions. These data suggested that the hippocampal cholinergic and dopaminergic innervation showed morphological changes throughout the whole brain areas after ECL.

Key words: hippocampus, pathway, PRV (pseudorabies viruses), ECL (entorhinal cortex lesion), cholinergic, dopaminergic

목 차

| | |
|---|-----|
| Abstract ----- | i |
| 목차 ----- | iii |
| List of Figures ----- | v |
| List of Tables ----- | vii |
| | |
| I. 서론 ----- | 1 |
| 1. 연구배경 ----- | 1 |
| 2. 연구목적 ----- | 6 |
| | |
| II. 재료 및 방법 ----- | 7 |
| 1. 실험동물 ----- | 7 |
| 2. 실험동물의 마취 ----- | 7 |
| 3. Pseudorabies virus (PRV)의 해마 내의 주입 ----- | 7 |
| 4. 뇌조직 절편 준비 ----- | 8 |
| 5. 속후각결질의 손상 ----- | 8 |
| 6. Acetylcholinesterase (AChE)의 조직화학염색 ----- | 9 |
| 7. Cresyl violet 염색 ----- | 10 |
| 8. PRV의 면역조직화학염색 ----- | 10 |
| 9. PRV와 choline acetyltransferase의 이중면역염색 ----- | 11 |
| 10. PRV와 tyrosine hydroxylase의 이중면역염색 ----- | 12 |

| | | |
|--------------------------|-------|----|
| Ⅲ. 결과 | ----- | 13 |
| 1. 정상 흰쥐에서 해마로 투사하는 신경로 | ----- | 13 |
| 1.1. 해마의 중추신경로 | ----- | 13 |
| 1.2. 해마의 콜린성 신경로 | ----- | 13 |
| 1.3. 해마의 도파민성 신경로 | ----- | 14 |
| 2. 속후각결질 손상 후에 해마의 중추신경로 | ----- | 15 |
| 2.1. 해마로 투사하는 중추신경로 | ----- | 15 |
| 2.2. 해마로 투사하는 콜린성 중추신경로 | ----- | 16 |
| 2.3. 해마로 투사하는 도파민성 중추신경로 | ----- | 17 |
| Ⅳ. 고찰 | ----- | 61 |
| Ⅴ. 요약 | ----- | 65 |
| Ⅵ. 참고문헌 | ----- | 67 |
| 감사의 글 | | |



List of Figures

- Figure 1. Photomicrograph of the hippocampus after cresyl violet staining. The pseudorabies virus was injected into the dentate gyrus of hippocampus.
- Figure 2. Cresyl violet stained coronal section of rat brain with cathodic electrolytic lesion of entorhinal cortex.
- Figure 3. Histochemical staining for acetylcholinesterase in sections of the hippocampus after entorhinal cortex lesion.
- Figure 4. The central nervous system (CNS) hippocampal innervating nuclei labeled with pseudorabies virus (PRV) in the normal rat brain.
- Figure 5. The CNS hippocampal cholinergic nuclei labeled with choline acetyltransferase and pseudorabies virus (ChAT/PRV) double immunoflorescent staining in the normal rat brain.
- Figure 6. The CNS hippocampal dopaminergic nuclei labeled with tyrosine hydroxylase and PRV (TH/PRV) double immunoflorescent staining in the normal rat brain.

Figure 7. The CNS hippocampal innervating nuclei labeled with PRV at 10 days after ECL.

Figure 8. The CNS hippocampal innervating nuclei labeled with PRV at 30 days after ECL.

Figure 9. The CNS hippocampal cholinergic nuclei labeled with choline acetyltransferase and pseudorabies virus (ChAT/PRV) double immunoflorescent staining at 10 days after ECL.

Figure 10. The CNS hippocampal cholinergic nuclei labeled with choline acetyltransferase and pseudorabies virus (ChAT/PRV) double immunoflorescent staining at 30 days after ECL.

Figure 11. The CNS hippocampal dopaminergic nuclei labeled with tyrosine hydroxylase and PRV (TH/PRV) double immunoflorescent staining at 10 days after ECL.

Figure 12. The CNS hippocampal dopaminergic nuclei labeled with tyrosine hydroxylase and PRV (TH/PRV) double immunoflorescent staining at 30 days after ECL.

List of Tables

Table 1. The distributions of PRV labeled cells in the brain after injection into the hippocampus of the normal and ECL rats

Table 2. The changes of ChAT/PRV double labeled cells in the nucleus of the normal and ECL rats after PRV injection into the hippocampus

Table 3. The changes of TH/PRV double labeled cells in the nucleus of the normal and ECL rats after PRV injection into the hippocampus



Table 4. Comparative analysis of relative ratios of ChAT/PRV double labeled cells in the normal and ECL rats

Table 5. Comparative analysis of relative ratios of TH/PRV double labeled cells in the normal ECL rats

I. 서 론

1. 연구배경

다양한 환경 속에서 많은 정보와 지식을 얻는 과정을 학습이라 할 수 있으며, 저장하거나 축적하는 형태를 기억이라 한다. 학습이 기억으로 전이되는 과정에서 일정한 단계가 있으며 기억은 항상 변하고 있다. 외부 정보는 뇌로 들어가 몇 분 또는 몇 시간 기억하는 일종의 단기기억 (short-term memory) 과 똑같은 정보가 몇 차례의 학습을 통해 입력이 되어야 장기기억 (long-term memory)으로 변환될 수 있다 (Polster 등, 1991). 이처럼 인간과 많은 동물실험에서 기억은 단기기억과 장기기억으로 다른 형태를 가지고 있다 (Squire, 1992). 측두엽에 있는 해마는 서술기억의 형성에 중요한 역할을 하고 있으며, 해마의 신경회로에서 시냅스의 가소성 (plasticity)을 관찰할 수 있다. 해마는 무소각 (Ammon's horn)과 치아이랑 (dentate gyrus)의 두 부분으로 구성되어 있으며, 해마구성체의 구심성섬유는 주로 속후각겉질 (entorhinal cortex)에서 유래하고 관통로 (perforant pathway)를 따라 지각 (subiculum)을 횡단하여 치아이랑의 과립신경세포 (granular neuron)와 연결을 이룬다. 과립신경세포의 축삭은 이끼섬유경로 (mossy fiber pathway)를 타고 CA3에 있는 피라밋세포로 투사되며 이는 Schaffer 병립경로 (Schaffer collateral pathway)를 타고 CA1까지 연결된다. CA1에 있는 신경세포는 해마의 주요 원심경로인 지각 (subiculum)으로 투사된다. 지각에서 다시 속후각겉질로 연결되어 해마 내재회로 (internal hippocampal circuits)를 형성한다 (Paxinos, 1995). 기억기능에 참여하는 내측두엽내의 중요한 구조는 해마와

주변의 속후각결질, 측후각뇌결질, 해마옆이랑결질이다. 이처럼 해마는 학습과 기억을 담당하는 구심성과 원심성뉴런이 밀집된 뇌의 중요한 부분이다.

중추신경계의 biogenic 아민류 (acetylcholine, dopamine, norepinephrine, epinephrine, serotonin, histamine), 아미노산류 (GABA, glycine, glutamate), 펩타이드류 (opioid, substance P) 등의 많은 신경전달물질이 존재한다. 특히 콜린성 뉴런과 도파민성 뉴런의 변화는 인지기능의 저하, 노화 등의 퇴행성 신경질환의 중요한 열쇠가 된다.

Alzheimer's disease (AD)는 1907년 독일의 신경과학자인 Alois Alzheimer에 의해서 51세 여성환자에서 처음 발견되었다 (Terry 등, 1996). AD는 언어, 기억, 다른 형태의 인지기능이 점차적으로 감소되는 퇴행성신경질환이다. AD의 신경세포학적 변화는 β -amyloid ($A\beta_{1-42}$)를 포함한 신경반 (senile plaques, SPs), 과인산화된 tau-단백질 등의 축적으로 신경섬유다발 (neurofibrillary tangles, NFTs) 등을 형성하며, 해마와 속후각결질 부위에 신경핵의 위축, 신경세포의 수적 감소가 일어난다 (Ball, 1978; Whitehouse 등, 1982; Hyman 등, 1984; Masters 등, 1985; Price 등, 1991; Selkoe, 1991). AD는 진행성의 퇴행성질환으로서 중추신경계의 고등 기능을 저하시키고 인지기능 혼란을 초래하며 (Morris & Kopelman, 1986), 초기에 단기 기억 손실이 현저하게 나타난다 (Freedman & Oscar-Berman, 1986).

AD에서 콜린성 (cholinergic), 세레토닌성 (serotonergic), 노르아드날린성 (noradrenergic), 도파민성 (dopaminergic), GABAergic, somatostatinergic 신경세포가 감소되어 그 변화가 보고되었다. 특히, 콜린성 신경세포와 도파민성 신경세포에서 대뇌새결질 (cerebral neocortex)과 해마 (hippocampus), 관자결질 (temporal cortex), 조가비핵 (putamen), 흑색질 (substantia nigra)과 배쪽덮개영역 (ventral tegmental area)에서 세포가 손실되거나 현저하게 감

소된다 (Bartus 등, 1982; Reinikainen 등, 1990). 콜린성 신경계는 심장, 혈관, 분비선, 내장기관, 골격근, 평활근, 뇌 등의 말초신경계와 중추신경계에서 조절기능으로서 중요하다. 말초신경계의 전달물질로서 많은 연구가 이루어졌으며, 뇌중추신경계에서는 고도의 정신, 운동, 감각, 수면, 학습 및 기억기능 등의 다양한 기능을 하고 있다 (Tsai, 2000). 아세틸콜린의 합성은 콜린아세틸전이효소 (choline acetyltransferase, ChAT)에 의해 아세틸 CoA (acetyl-CoA)와 콜린 (choline)으로부터 단일 단계에서 합성되며, ChAT는 콜린성 신경세포의 표지효소로서 중요하다. 기저뇌핵 (Nucleus basalis)은 뇌에서 ChAT를 합성하는 중요한 부위이며 새겔질 (neocortex)과 해마 (hippocampus)로 투사된다. 흰쥐 뇌 내의 콜린성 신경세포의 신경해부학적 위치와 세포학적 양상은 생합성효소, ChAT의 면역세포화학적 방법에 의해 줄무늬체 (striatum), 큰세포기저체 (magnocellular basal nucleus), 다리줄무늬체 (pontine tegmentum), 운동뇌신경핵 (cranial nerve motor nuclei)의 4개의 주요그룹에서 표지가 된다 (Whitehouse 등, 1981; Armstrong 등, 1983; Coyle 등, 1983).

중추신경계통과 자율신경계통에서 도파민 (dopamine), 노르에피네프린 (norepinephrine), 에피네프린 (epinephrine)을 함유한 신경세포를 통칭하여 카테콜라민성 신경세포 (catecholaminergic neurons)라 한다. 이 물질들은 티로신 (tyrosine)에서 출발하여 차례로 L-도파 (L-Dopa), 도파민, 노르에피네프린 및 에피네프린으로 전환되는데 이런 기질들은 초기 전환단계에서 tyrosine에서 몇 개의 다른 효소들에 의해 다단계의 합성과정을 거친다. 특히 L-도파로 전환시키는 효소가 티로신 가수분해효소 (tyrosine hydroxylase, TH)이며 이는 도파민성 신경세포의 표지효소로 사용된다. 도파민성 신경계는 포유동물에서 많은 인지기능, 감정, 정서, 운동조절기능 (Salamone, 1992;

Balthazart 등, 1997), 학습과 기억 (McDougall 등, 1987) 등에 중요한 역할을 한다.

속후각겉질 (entorhinal cortex)은 편도체 (amygdala) 표면에 있으며, 측해마이랑 (parahippocampal gyrus)의 앞쪽에 위치하는데 (Van Hoesen 등, 1991), 속후각겉질의 손상은 쥐와 사람에서 역방향 기억손상을 시킨다 (Gutierrez-Figueroa 등, 1997). 속후각겉질 손상은 해마부위의 절단된 신경섬유에서 새로운 섬유들의 재생을 연구하는데 응용되며, 치아이랑 (dentate gyrus)의 분자층의 바깥쪽 (outer molecular layer, OML) 2/3 정도에서 80~90%의 시냅스들이 손상되며, 1/3은 크게 영향을 받지 않는다 (Matthews 등, 1976a, 1976b). 정상흰쥐에서 전기적 자극을 통한 속후각겉질 손상 (entorhinal cortex lesion, ECL) 시기에는 해마 치아이랑의 바깥분자층에서 acetylcholinesterase (AChE) 활성이 증가됨이 보고되었다 (Geddes 등, 1985; Henderson 등, 1998). 쥐에서의 ECL 모델은 AD 환자에서 보이는 콜린성 신경세포들의 sprouting이 일어난다는 점에서 치매 동물모델로서 응용되어왔다 (Bartus 등, 1982; Whitehouse 등, 1982; Hyman 등, 1984; Geddes 등, 1985).

중추신경계통 내의 신경로를 밝히는 연구에 가장 보편적으로 쓰이는 추적자로는 형광물질이나 방사선동위원소에 표지된 단백질 또는 horseradish peroxidase (HRP) 효소 등이 쓰여지고 있다 (Moore 와 Lenn, 1972; Fryscak 등, 1984; Altschuler 등, 1989, 1991). 추적자는 이동하는 성질에 따라 세포체에서 축삭쪽으로 이동하는 phaseolus vulgaris leukoagglutinin (PHA-L), biotin dextran amine (BDA), wheat-germ agglutinin (WGA)과 같은 정방향 이동추적자 (anterograde tracer)와 축삭에서 세포체 방향으로 이동하는 fluoro ruby (FR), fluoro gold (FG), cholera toxin subunit b (CTb), tetanus

toxin (TTx), HRP, fluorescein isothiocyanate (FITC), tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)와 같은 역방향 이동추적자 (retrograde tracer) 및 양방향 이동추적자 (antero- and retrograde tracer)로 구분된다 (Moore 와 Lenn, 1972; Fryszak 등, 1984; Heimer 와 Zaborszky, 1989; Lee 등, 1992; Delfs 등, 1998). 그러나 이들은 신경추적자로서 한계점을 가지고 있는데 중추신경이나 말초신경을 통과할 때 상위신경부분으로 이동할수록 그 농도가 희석되며 신경축삭을 통해 상위신경세포로 이동하는 과정 중 연접을 건너가지 못하거나 건너가지만 극히 제한적이다. 근간에 사용되기 시작한 신경친화성 바이러스인 pseudorabies 바이러스는 종래에 사용된 신경추적자들의 한계점을 보완할 수 있다 (Lee 등, 1992). 즉 바이러스는 양방향 이동추적자이지만 축삭을 따라 이동하면서 바이러스가 증식되어 그 수가 증가될 뿐 아니라 연접을 쉽게 통과할 수 있다 (Card 등, 1990, 1993). 그리고 사람에서는 감염이 되지 않아 손쉽게 이용되며, PHA-L, WGA, FITC, TRITC 등을 이용한 다중염색을 통하여 신경전달물질의 변화와 신경로 추적에 널리 사용되고 있다 (Jansen 등, 1998; Farkas 등, 1998; Deng과 Rogers, 1999). Pseudorabies 바이러스는 DNA를 갖는 Alpha Herpesviridae의 한 종류이며, 최근 10년간 여러 개의 시냅스를 통과할 수 있는 특징과 신경친화성 바이러스로서 사용도가 증가하고 있다 (Card, 1998). Pseudorabies 바이러스는 심장, 말초근육, 위, 지라, 신장, 꼬리, 미주신경, 좌골신경, 소뇌겉질, 시상, 편도체 등의 말초신경계통과 중추신경계통에서 신경로를 구축하는데 신경추적자로서 많이 이용되고 있다 (Rotto-Perceland, 1992; Jasmin, 1995; Doggweiler 등, 1998; Chen 등, 1999; Kim 등, 2000).

2. 연구목적

뇌기저핵 (basal forebrain)에서 새겔질 (neocortex)과 해마 (hippocampus)로 투사되는 콜린성 뉴론들은 학습, 기억 등의 인지기능에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 파킨슨병 (Parkinson's Disease, PD)과 알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD)에서도 노화와 관련하여 도파민성 뉴론이 증가되는 경향을 보인다 (Terry 등, 1996). PRV를 중추신경계에 직접 주입하여 소뇌겔질 (cerebellar cortex), 시상 (thalamus), 편도체 (amygdala), 청색반점 (locus coeruleus) 등의 신경로는 많이 연구되었으나 (Kaufman 등, 1996; Jasmin 등, 1997; Chen 등, 1999) 해마의 신경로에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

본 실험에서는 학습과 기억에 중요한 역할을 하는 해마로 투사되는 신경로를 확인하여 콜린성 및 도파민성 신경로를 구축함으로써 학습과 기억에 관련된 신경로를 파악할 것으로 기대된다. 따라서 정상흰쥐에서 PRV를 해마에 주입시킨 뒤 해마로 투사하는 중추신경로를 조사하고 이들 신경로 중 콜린성 (cholinergic)과 도파민성 (dopaminergic) 신경로를 구축하고자 하였다. 또 AD의 모델인 속후각겔질 손상 (entorhinal cortex lesion, ECL) 후 PRV를 해마부위에 주입하여 해마로 투사하는 신경로의 변화를 조사하고, 콜린성 신경로와 도파민성 신경로의 변화를 구축하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

체중 250-350g의 성숙한 Sprague-Dawley계 흰쥐 30마리를 암수 구별 없이 온도 ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), 습도 (50%), 낮과 밤 주기 (12:12 시간)가 일정하게 유지되는 동물사육장에서 물과 사료를 공급하였다.

2. 실험동물의 마취

실험동물의 마취는 ketamine hydrochloride (60mg/kg, Youhan corp.)와 xylazine (6mg/kg, Bayer corp.)을 복강내 주사하였으며, 실험동물이 안정된 후 실험에 사용하였다.

3. Pseudorabies virus (PRV)의 해마 내의 주입

Pseudorabies virus (PRV, Gyeongsang Univ.)는 Bartha strain (Ba)은 porcine kidney fibroblast (PK15-cell)에 자란 것으로 사용시 plaque forming unit는 평균 1×10^8 pfu/ml이고 냉동 (-70°C) 보관하며 주사 직전에 녹여 신선한 것을 사용하였다.

뇌정위수술기구 (Stereotaxic instrument)에 쥐 머리를 고정시킨 후 Swanson (1998)의 rat map (No. 31)에 따라 해마로 PRV를 주입하였다. PRV의 해마 내 주입위치는 정상 흰쥐 (n=3)와 속후각겉질손상 10일 (n=3)

및 30일 (n=3) 후에 bregma를 기준으로 위로 3.7mm (AP-3.7mm), 정중선을 기준으로 하여 옆으로 2.2mm (ML-2.2mm), 그리고 dura matter에서 아래로 3.2mm (DV-3.2mm)이며, 치아이랑 (dentate gyrus)을 목표지점으로 하였다. Electronical injector를 이용하여 0.05 μ l/min 유속으로 PRV 3 μ l (1×10^8 pfu/ml)을 주입하였다. PRV의 사용은 철저하게 외부와 통제를 시킨 상태에서 주입하고 96시간의 생존기간을 두었다.

4. 뇌조직 절편 준비

정상 흰쥐와 ECL 후에 PRV를 주입하여 약 96시간의 생존기간을 두고 방법 2에서와 같이 동일한 방법으로 마취를 실시하였으며, 심장을 통하여 관류 고정하였다. 관류고정은 생리식염수에 heparine (1000IU/1000ml)을 섞은 용액을 1.5ml/min의 유속으로 약 30분간, 4% paraformaldehyde-lysine-periodate를 30분간 관류고정하였다. 관류고정이 끝난 후 뇌를 적출, 동일 고정액에 4 $^{\circ}$ C에서 4시간 후고정, 0.1M phosphate buffer (PB; pH, 7.4)로 1시간 동안 세척하고 20% phosphate buffered sucrose 용액에 24~48시간 동안 담가 보관하였다. 전뇌는 동결절편기를 이용하여 30 μ m 두께의 6-well plate에 관상연속절편으로 절단하였으며 4 $^{\circ}$ C에 보관하여 사용하였다. 모든 염색은 조직 절편을 free floating method로 실시하였다.

5. 속후각겉질의 손상 (Entorhinal Cortex Lesion, ECL)

흰쥐를 방법 2에서와 같이 안정되게 마취한 후 뇌정위수술기구를 이용하여, ear bar를 양쪽 귀에 고정한 다음 Paxinos와 Watson (1998)과 Swanson

(1998)의 brain map을 참고로 하여 bregma와 lambda의 위치를 수평으로 고정하였다. 손상 위치는 Poirier와 Nichols (1991)의 방법에 의해 외측으로부터 10° 각도를 준 후 bregma를 기준으로 위로 8.3mm (AP-8.3mm), 정중선을 기준하여 옆으로 4.8mm (ML-4.8mm), dura matter에서 6mm (DV 6mm)과 4mm (DV 4mm), 다시 정중선에서 옆으로 4.3mm (ML-4.3mm), dura matter에서 5mm (DV 5mm), 그리고 bregma를 기준으로 위로 8.8mm (AP-8.8mm), 정중선을 기준으로 옆으로 3.65mm (ML-3.65mm), dura matter에서 5mm (DV 5mm) 각각 네 곳에 우측 속후각결질을 파괴하였다. 속후각결질 손상은 1mA, 45초 동안 diameter가 0.5mm인 unipolar stainless steel electrode를 이용하여 cathodic direct current (DC)로 전기적 자극을 주었다. Sham은 위와 동일한 방법으로 실시하였으며 전기적 자극이 없는 것이다.

6. Acetylcholinesterase (AChE)의 조직화학염색

실험동물은 위에서와 동일한 방법으로 ECL을 만든 후 10일, 30일 생존기간 경과 후 Tago등 (1986)의 방법을 약간 변형하여 염색을 실시하였다. 조직을 0.1M PB (pH 7.4)로 10분간 세 번 세척 한 후 stock solution을 만들었다. Stock solution의 조성은 50mM NaAc, 4mM CuSO₄, 16mM Glycine, pH 5.0로서 이 때 pH 조정은 1N HCl를 사용하였다. 세척이 끝난 후 실온상태에서 shaker를 이용하여 반응액 (116mg, acetylthiocholine iodide; 3mg, ethopropazine/100ml stock sol.)을 넣어 overnight시켰다. 반응이 끝난 후 조직을 증류수로 1분간 세 번을 세척한 후 발색액 (1% NaS · 9H₂O, pH 7.5 adjusted with acetic acid)으로 10분간 반응시킨 후 증류수로 2분간 두 번 세척하고 0.1M PB로 10분간 2회 세척하고 조직절편을 gelatin coated slide

위에 올려 실온에서 air-dry시켰다. Alcohol과 xylene으로 탈수와 투명화 과정을 거친 후 polymount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하여 사진촬영하였다.

7. Cresyl violet 염색

해마로 PRV의 주입 위치와 속후각결질 손상부위를 확인하기 위해서 cresyl violet 염색을 Paxinos 와 Watson (1998)의 방법을 변형하여 실시하였다. 30 μ m로 잘린 뇌조직을 gelatin coating된 슬라이드 글라스에 mounting하여 xylene I, II, alcohol 100% I, II, 95%, 70%로 차례대로 각 5분씩 거친 다음 0.5% cresyl violet (pH 3.9)으로 15분간 염색하였다. 흐르는 물로 세척하고, 염색정도를 관찰하고 alcohol 70%, 95%, 100% I, II, xylene I, II 과정을 5분씩 거친 후 polymount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰한 후 사진 촬영하였다.

8. PRV의 면역조직화학염색

조직절편을 0.1M PB (pH 7.4)로 10분간 2번 실온에서 세척한 후 1:10,000으로 희석한 1차 항체 rabbit anti-PRV에 overnight을 시켜 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 이 때 희석액은 0.1M PB (pH 7.4)에 1% normal goat serum과 0.3% Triton X-100이 섞여 있는 것을 사용하였다. 그 후 조직절편은 실온에서 0.1M PB로 10분간 2회 세척하였으며, Hsu 등 (1981)의 방법을 약간 변형하여 2차 항체인 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector)를 1:200으로 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켰다. 2차 항체반응이 끝난 후 0.1M PB로 조직을

세척하고 peroxidase가 표지된 ABC (Vector) 용액으로 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 다음으로 0.1M PB로 10분간 2번 세척하고 0.03~0.04% 3-3' diaminobenzidine을 0.1M PB에 녹인 후 5분간 반응시키고 0.003% H₂O₂를 첨가하여 착색반응을 시행하였다. 그 후 0.1M PB로 10분간 2회 세척하고 조직절편을 gelatin coated slide 위에 올려 실온에서 air-dry시켰다. Alcohol과 xylene으로 탈수와 투명화 과정을 거친 후 polymount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하여 사진 촬영을 실시하였다.

9. PRV와 choline acetyltransferase (ChAT)의 이중면역염색

실험동물은 위와 동일한 방법으로 해마 내에 PRV를 주입한 후 정상 흰쥐와 ECL를 준 조직절편을 PRV와 choline acetyltransferase (ChAT)로 이중염색을 실시하였다. 1차 항체인 rabbit anti-PRV, 1:200, goat anti-choline acetyltransferase (ChAT, Chemicon), 1:20으로 0.1M PB에 1% normal donkey serum, 0.3% Triton X-100에 희석하여 37℃에서 12~24시간 동안 incubation하여 반응시켰다. 0.1M PB로 10분간 2번 세척하고, 2차 항체는 rhodamine (TRITC, Jackson Immunoresearch Lab.) conjugated affinipure donkey-goat IgG (H+L)과 fluorescein (FITC, Jackson Immunoresearch Lab.) conjugated affinipure donkey anti-rabbit IgG (H+L)를 각각 1:50되게 희석한 후 37℃에서 2시간 반응시켰다. 그 후 0.1M PB로 10분간 2번 세척한 후 gelatin coated slide 위에 올려 4℃에서 12시간 건조시킨 후 glycerine과 0.1M PB를 29:1로 섞인 용액으로 mounting하여 confocal laser scanning microscope 하에서 사진 촬영하였다.

10. PRV와 tyrosine hydroxylase (TH)의 이중면역염색

실험동물은 위와 동일한 방법으로 해마 내에 PRV를 주입한 후 정상 흰쥐와 ECL를 준 조직절편을 PRV와 tyrosine hydroxylase (TH)로 이중염색을 실시하였다. 1차 항체는 Rabbit anti-PRV, 1:200, mouse anti-tyrosine hydroxylase (TH, Chemicon)를 1:200으로 0.1M PB에 1% normal donkey serum, 0.3% Triton X-100에 희석하여 37°C에서 12~24시간 동안 incubation하여 반응시켰다. 0.1M PB로 10분간 2번 세척하고, 2차 항체는 1:50으로 희석한 rhodamine (TRITC, Jackson Immunoresearch Lab.) conjugated affinipure donkey-mouse IgG (H+L)과 fluorescein (FITC, Jackson Immunoresearch Lab.) conjugated affinipure donkey anti-rabbit IgG (H+L)가 1:50되게 희석한 후 37°C에서 2시간 반응시켰다. 그 후 0.1M PB로 10분간 2번 세척한 후 gelatin coated slide 위에 올려 4°C에서 12시간 건조시킨 후 glycerine과 0.1M PB를 29:1로 섞인 용액으로 mounting하여 confocal laser scanning microscope 하에서 사진 촬영하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 정상 흰쥐에서 해마로 투사하는 신경로

1.1. 해마의 중추신경로

정상 흰쥐의 해마에 뇌정위수술기구를 이용하여 pseudorabies 바이러스를 주입한 후 위치는 cresyl violet 염색을 통하여 확인하였다 (Figure 1). 주입 위치를 확인한 후 면역조직화학 염색을 통한 조사결과 배쪽뒤판핵 (A10, ventral tegmental area), 줄무늬침상핵 (bed nuclei stria terminalis, BST), 등쪽솔기핵 (dorsal nucleus raphe, DR), 속후각영역 (entorhinal area, ENT), 외측유두핵 (lateral mammillary nucleus, LM), 중심안쪽무릎핵 (medial geniculate, medial part, MGm), 배쪽안쪽무릎핵 (medial geniculate, ventral part, MGv), 중간격막핵 (medial septal, MS), 뇌궁아래기관 (subfornical organ, SFO), 상측중심솔기핵 (superior central nucleus raphe, medial part, CSm), 시상 (thalamus, TH) 등 뇌의 특정핵에서 양성반응이 나타났으며, 핵 종류에 따라 양성반응은 차이를 보였다 (Figure 4, Table 1).

1.2. 해마의 콜린성 신경로

정상 흰쥐의 해마에 바이러스를 주입한 뒤 뇌조직을 ChAT와 pseudorabies 바이러스에 대한 이중형광염색을 시행한 결과 무과립섬겉질 (agranular insular cortex, AId), 중심편도핵 (central amygdala, CeA), 창백

핵 (globus pallidus, lateral segment, GPI), 외측시상하부구역 (lateral hypothalamic area, LHA), 외등측피개핵 (laterodorsal tegmental nucleus, LDT), 내측격막핵 (medial septal nucleus, MS), 중간뇌망상핵 (mesencephalic reticular nucleus, MRN), 수도관주위회색질 (periaqueductal gray, PAG), 무명질 (substantia innominata, SI)에서 이중염색된 세포가 관찰되었으며 신경핵의 종류에 따라 이중양성반응 정도의 차이를 보였다 (Figure 5, Table 2). PRV와 ChAT에 대한 이중형광 염색을 통하여 이중양성반응 비율에서 전체 세포 중 가장 많은 비율을 차지한 핵은 창백핵 (globus pallidus, lateral segment, GPI)이 54%로 관찰되었다 (Table 4).

1.3. 해마의 도파민성 신경로

정상 흰쥐의 해마에 바이러스를 주입한 뒤 뇌조직을 tyrosine hydroxylase (TH)와 pseudorabies 바이러스에 대한 이중형광염색을 시행한 결과 배쪽뒤 판핵 (A10, ventral tegmental area), 다리사이핵 (interpeduncular nucleus, lateral subnucleus, IPNI), 청색반점 (locus coeruleus, LC), 외등측피개핵 (laterodorsal tegmental nucleus, LDT), 수도관주위회색질 (periaqueductal gray, PAG), 뒤시상하부핵 (posterior hypothalamic nucleus, PH), 흑색질 (substantia nigra, reticular part, SNr)에서 이중염색된 세포가 관찰되었으며 신경핵의 종류에 따라 이중양성반응 정도는 차이를 보였다 (Figure 6, Table 3). 특히 다리사이핵 (interpeduncular nucleus, lateral subnucleus, IPNI), 수도관주위회색질 (periaqueductal gray, PAG), 흑색질 (substantia nigra, reticular part, SNr)에서 강한 양성반응이 관찰되었다. PRV와 TH의 이중형광염색을 통해 이중양성반응 비율에서 다리사이핵 (interpeduncular nucleus, lateral subnucleus, IPNI)이 100%로서 가장 높게 조사되었다 (Table 5).

2. 속후각겉질 손상 후에 해마의 중추신경로

2.1. 해마로 투사하는 중추신경로

속후각겉질의 전기적 손상 부위는 cresyl violet으로 염색한 결과 그 위치를 확인하였으며 (Figure 2), 또한 ECL 모델의 가장 일반적인 변화인 해마의 치아이랑에 있어서 아세틸콜린분해효소 (acetylcholinesterase, AChE)의 진한 밴드가 조직화학염색으로 조사되었다 (Figure 3).

Entorhinal cortex lesion을 준 10일 후에 흰쥐의 해마에 pseudorabies 바이러스를 주입한 결과 뇌의 배쪽뒤관핵 (A10, ventral tegmental area), 줄무늬침상핵 (bed nuclei stria terminalis, BST), 등쪽솔기핵 (dorsal nucleus raphe, DR), 속후각영역 (entorhinal area, ENT), 꼭지핵 (fastigial nucleus, FN), 해마 (hippocampus, HP), 외측유두핵 (lateral mammillary nucleus, LM), 청색반점 (locus coeruleus, LC), 내측안쪽무릎핵 (medial geniculate complex, medial part, MGm), 안쪽무릎핵 (medial geniculate complex, ventral part, MGv), 내측격막핵 (medial septal nucleus, MS), 뇌궁아래기관 (subfornical organ, SFO), 위쪽중심솔기핵 (superior central nucleus raphe, medial part, CSm), 시상 (thalamus, TH) 등의 신경핵에서 양성반응이 관찰되었으며, 이때 신경핵의 종류에 따라 줄무늬침상핵 (bed nuclei stria terminalis, BST), 등쪽솔기핵 (dorsal nucleus raphe, DR), 속후각영역 (entorhinal area, ENT), 청색반점 (locus coeruleus, LC), 내측격막핵 (medial septal nucleus, MS)에서 강한 양성반응 정도가 다른 핵과 차이를 보였다 (Figure 7, Table 1). 또한 30일 후에 흰쥐의 해마에 pseudorabies 바이러스를 주입한 결과 뇌의 배쪽뒤관핵 (A10, ventral tegmental area), 줄무늬침상핵 (bed nuclei stria

terminalis, BST), 등쪽솔기핵 (dorsal nucleus raphe, DR), 속후각영역 (entorhinal area, ENT), 꼭지핵 (fastigial nucleus, FN), 해마 (hippocampus, HP), 외측유두핵 (lateral mammillary nucleus, LM), 청색반점 (locus coeruleus, LC), 내측안쪽무릎핵 (medial geniculate complex, medial part, MGm), 안쪽무릎핵 (medial geniculate complex, ventral part, MGv), 내측격막핵 (medial septal nucleus, MS), 뇌궁아래기관 (subfornical organ, SFO), 위쪽중심솔기핵 (superior central nucleus raphe, medial part, CSm) 등의 신경핵에서 양성반응이 관찰되었으며, 그 양성반응 정도는 신경핵의 종류에 따라 차이를 보였다 (Figure 8, Table. 1).

2.2. 해마로 투사하는 콜린성 신경로

속후각겉질의 손상을 준 10일 후 흰쥐의 해마에 바이러스를 주입한 뒤 뇌조직을 ChAT와 pseudorabies 바이러스에 대한 이중형광염색을 시행한 결과 창백핵 (globus pallidus, lateral segment, GPI), 외측시상하부구역 (lateral hypothalamic area, LHA), 외등측피개핵 (laterodorsal tegmental nucleus, LDT), 내측격막핵 (medial septal nucleus, MS), 중간뇌망상핵 (mesencephalic reticular nucleus, MRN), 무명질 (substantia innominata, SI)에서 이중염색된 세포가 관찰되었으며, 창백핵 (globus pallidus, lateral segment, GPI), 내측격막핵 (medial septal nucleus, MS), 중간뇌망상핵 (mesencephalic reticular nucleus, MRN), 무명질 (substantia innominata, SI) 등의 신경핵의 종류에 따라 이중양성반응 정도에 차이를 보였다 (Figure 9, Table 2). 또한 30일 후에 흰쥐의 해마에 바이러스를 주입한 뒤 뇌조직을 ChAT와 pseudorabies 바이러스에 대한 이중형광염색을 시행한 결과 무과립

섬겉질 (agranular insular cortex, AId), 줄무늬침상핵 (bed nuclei stria terminalis, BST), 중심편도핵 (central amygdala, CeA), 창백핵 (globus pallidus, lateral segment, GPI), 외측시상하부구역 (lateral hypothalamic area, LHA), 외등측피개핵 (laterodorsal tegmental nucleus, LDT), 중간뇌망상핵 (mesencephalic reticular nucleus, MRN), 무명질 (substantia innominata, SI)에서 이중염색된 세포가 관찰되었으며 신경핵의 종류에 따라 양성반응 정도의 차이를 보였다 (Figure 10, Table 2). 이중양성반응 비율을 보면 ECL 10일 후에 창백핵 (globus pallidus, lateral segment, GPI) 54%, ECL 30일 후 창백핵 (globus pallidus, lateral segment, GPI) 44%, 외등측피개핵 (laterodorsal tegmental nucleus, LDT) 44%로서 가장 높게 조사되었다 (Table 4).

2.3. 해마로 투사하는 도파민성 신경로



속후각겉질의 손상 10일 후에 흰쥐의 해마에 바이러스를 주입한 뒤 뇌조직을 tyrosine hydroxylase (TH)와 pseudorabies 바이러스에 대한 이중형광염색을 시행한 결과 배쪽뒤판핵 (ventral tegmental area, A10), 수도관주위회색질 (periaqueductal gray, PAG), 뒤시상하부핵 (posterior hypothalamic nucleus, PH), 흑색질 (substantia nigra, reticular part, SNr)에서 이중염색된 세포가 관찰되었으며 신경핵의 종류에 따라 이중 양성반응 정도에 차이를 보였으며, 특히 흑색질 (substantia nigra, reticular part, SNr)에서 강한 양성반응이 관찰되었다 (Figure 11, Table 3). 또한 ECL 30일 후에 흰쥐의 해마에 바이러스를 주입한 뒤 뇌조직을 티로신 가수분해효소와 pseudorabies 바이러스에 대한 이중형광염색을 시행한 결과 배쪽뒤판핵 (ventral tegmental area,

A10), 청색반점 (locus coeruleus, LC), 수도관주위회색질 (periaqueductal gray, PAG), 뒤시상하부핵 (posterior hypothalamic nucleus, PH), 흑색질 (substantia nigra, reticular part, SNr)에서 이중염색된 세포가 관찰되었으며 청색반점 (locus coeruleus, LC), 수도관주위회색질 (periaqueductal gray, PAG), 흑색질 (substantia nigra, reticular part, SNr) 등의 신경핵의 종류에 따라 이중양성반응 정도에 차이를 보였다 (Figure 12, Table 3). PRV와 TH에 대한 이중면역형광염색을 통하여 이중양성반응 비율을 보면 ECL 10일 후 배쪽뒤관핵 (ventral tegmental area, A10) 55%, 흑색질 (substantia nigra, reticular part, SNr) 55%, ECL 30일 후 배쪽뒤관핵 (ventral tegmental area, A10) 100%로 가장 높은 수치를 차지하였다 (Table 5).





Figure 1. Photomicrograph of the hippocampus after cresyl violet staining. The pseudorabies virus was injected into the dentate gyrus of hippocampus ($\times 40$).



Figure 2. Cresyl violet stained coronal section of rat brain with cathodic electrolytic lesion of entorhinal cortex ($\times 40$).

Figure 3. Histochemical staining for acetylcholinesterase (AChE) in sections of the hippocampus after entorhinal cortex lesion ($\times 40$).

a: sham, ipsilateral; b: sham, contralateral; c: 10 days after ECL, ipsilateral; d: 10 days after ECL, contralateral; e: 30 days after ECL, ipsilateral; f: 30 days after ECL, contralateral



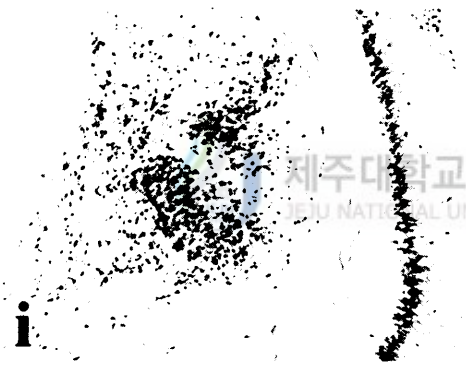
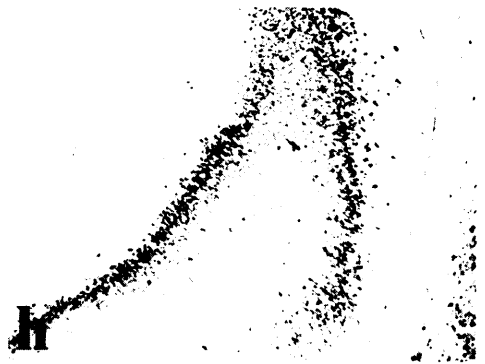


Figure 4. The central nervous system (CNS) hippocampal innervating nuclei labeled with pseudorabies virus (PRV) in the normal rat brain.

a: MS (medial septal nucleus); b: BST (bed nuclei stria terminalis); c: SFO (subfornical organ); d: HP (hippocampus); e: TH (thalamus); f: LM (lateral mammillary nucleus); g: ENT (entorhinal area); h: HP (hippocampus); i: MGm (medial geniculate complex, medial part); j: MGv (medial geniculate complex, ventral part); k: DR (dorsal nucleus raphe); l: CSm (superior central nucleus raphe, medial part); m: LC (locus coeruleus); n: FN (fastigial nucleus); o: A10 (ventral tegmental area, medial part)







제주대학교 중서
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

m

n

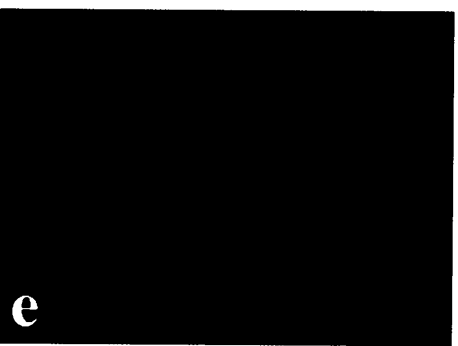
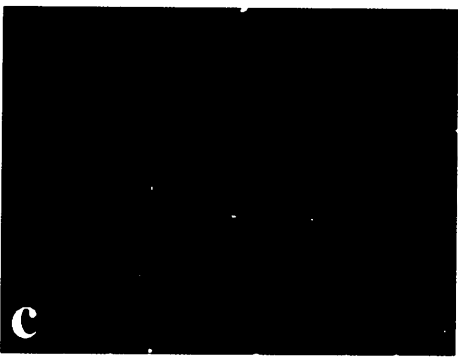
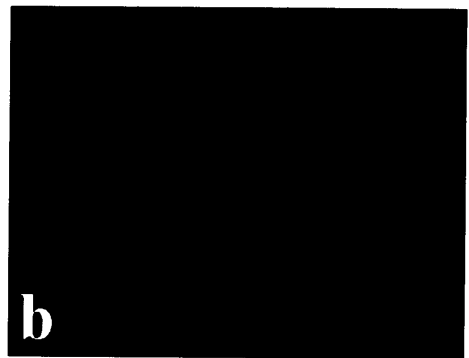
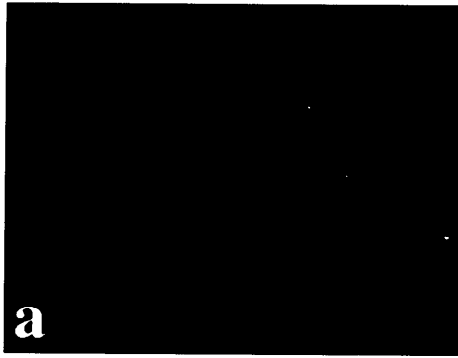
o

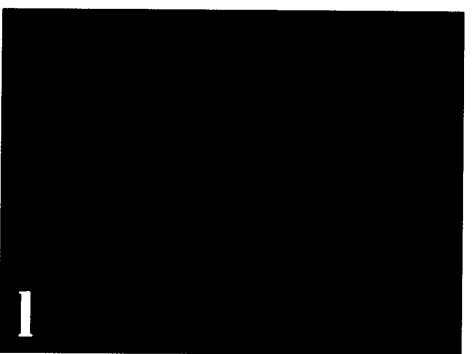
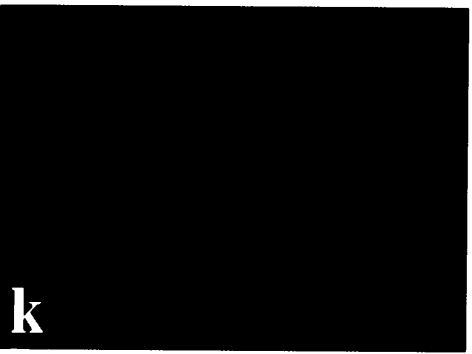
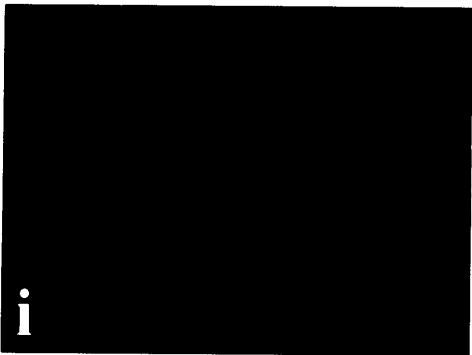
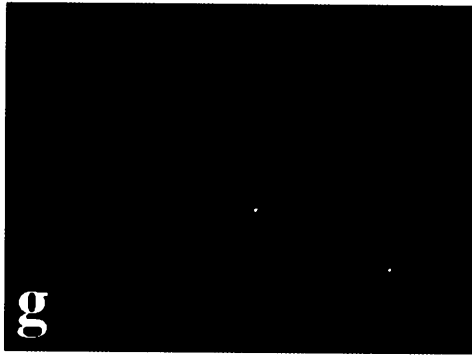


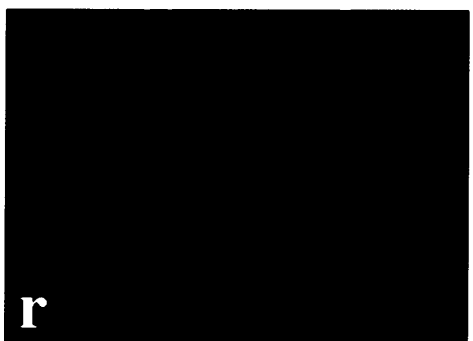
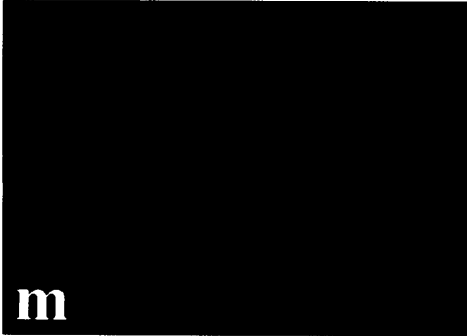
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 5. The CNS hippocampal cholinergic nuclei labeled with choline acetyltransferase and pseudorabies virus (ChAT/PRV) double immunofluorescent staining in the normal rat brain.

a: AId (agranular insular cortex), PRV; b: AId (agranular insular cortex), ChAT; c: BST (bed nuclei stria terminalis), PRV; d: BST (bed nuclei stria terminalis), ChAT; e: CeA (central amygdala), PRV; f: CeA (central amygdala), ChAT; g: GPI (globus pallidus, lateral segment), PRV; h: GPI (globus pallidus, lateral segment), ChAT; i: LHA (lateral hypothalamic area), PRV; j: LHA (lateral hypothalamic area), ChAT; k: LDT(laterodorsal tegmental nucleus), PRV; l: LDT (laterodorsal tegmental nucleus), ChAT; m: MA (magnocellular preoptic nucleus), PRV; n: MA (magnocellular preoptic nucleus), ChAT; o: MRN (mesencephalic reticular nucleus), PRV; p: MRN (mesencephalic reticular nucleus), ChAT; q: MS (medial septal nucleus), PRV; r: MS (medial septal nucleus), ChAT; s: PAG (periaqueductal gray), PRV; t: PAG (periaqueductal gray), ChAT; u: SI (substantia innominata), PRV; v: SI (substantia innominata), ChAT







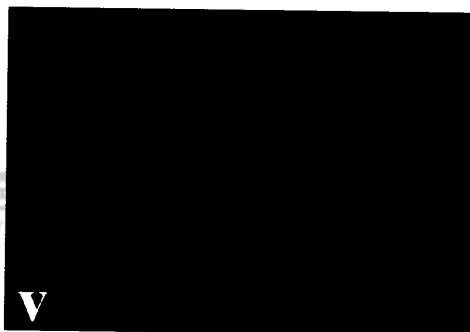
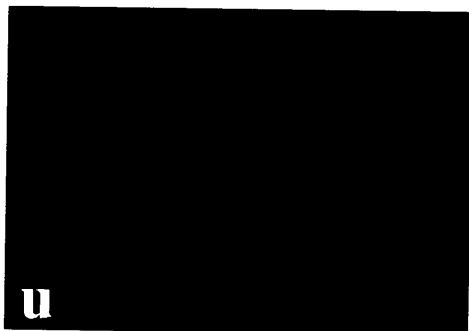
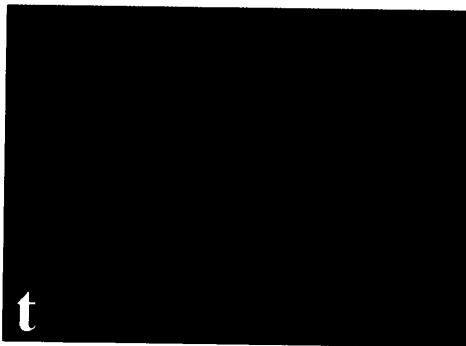
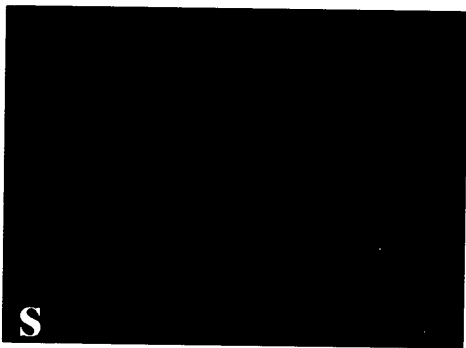
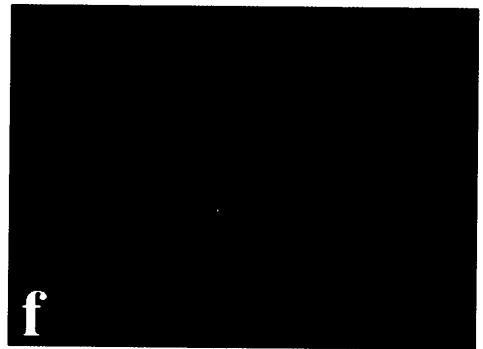
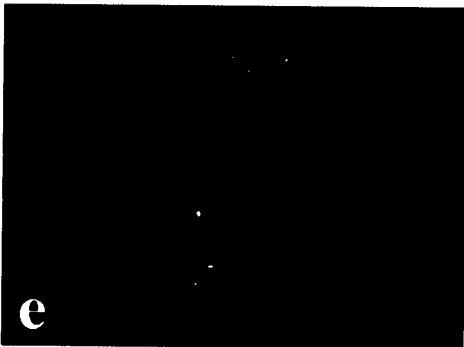
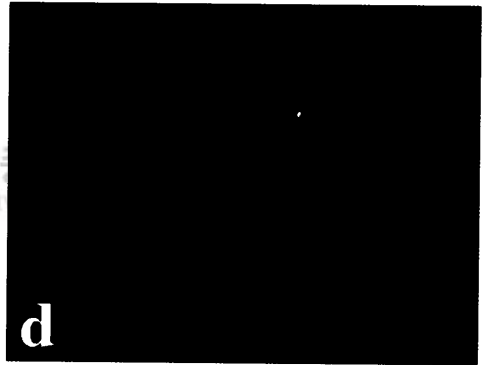
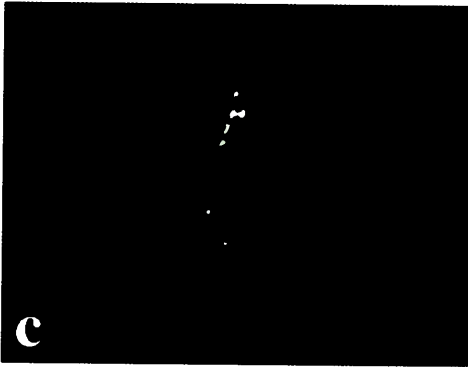
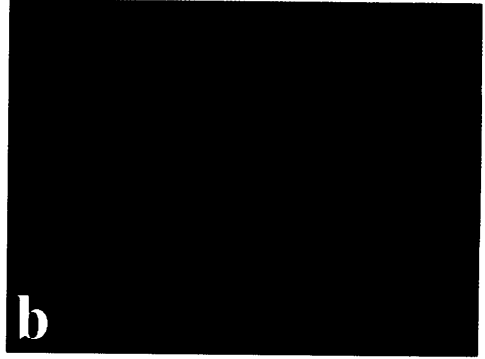
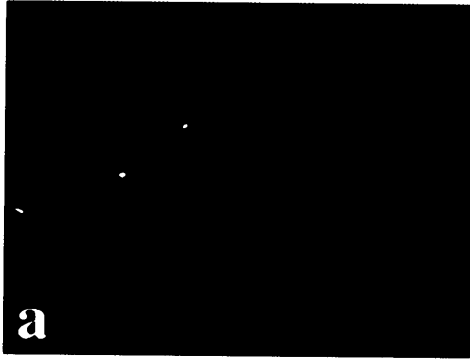


Figure 6. The CNS hippocampal dopaminergic nuclei labeled with tyrosine hydroxylase and PRV (TH/PRV) double immunoflorescent staining in the normal rat brain ($\times 40$).

a: A10 (ventral tegmental area), PRV; b: A10 (ventral tegmental area), TH; c: LC (locus coeruleus), PRV; d: LC (locus coeruleus), TH; e: PAG (periaqueductal gray), PRV; f: PAG (periaqueductal gray), TH; g: PH (posterior hypothalamic nucleus), PRV; h: PH (posterior hypothalamic nucleus), TH; i: SNr (substantia nigra, reticular part), PRV; j: SNr (substantia nigra, reticular part), TH





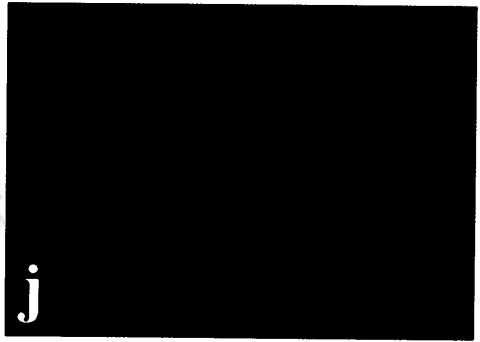
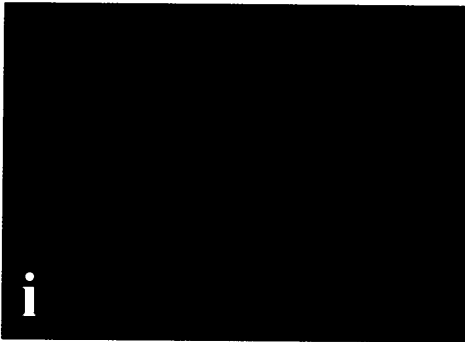
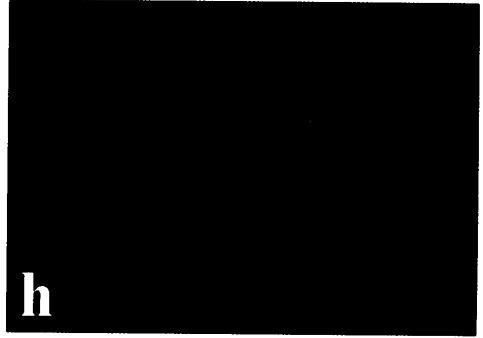
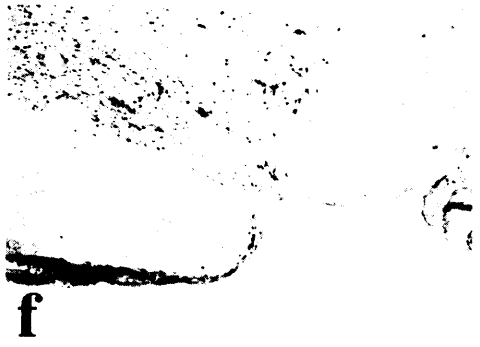
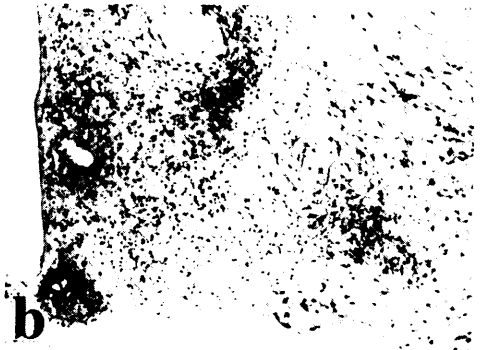
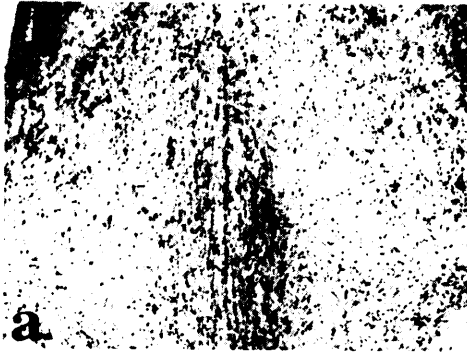


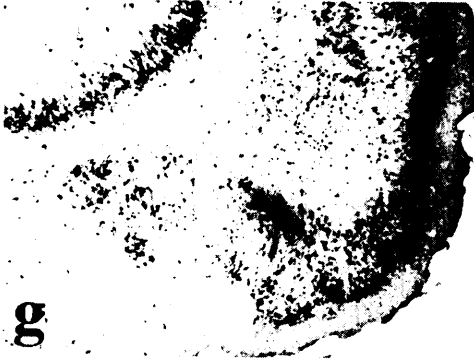
Figure 7. The CNS hippocampal innervating nuclei labeled with PRV at 10 days after ECL ($\times 40$).

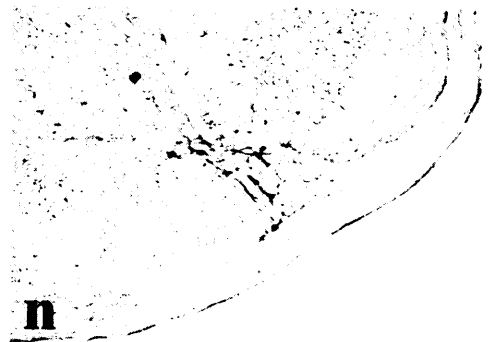
a: MS (medial septal nucleus); b: BST (bed nuclei stria terminalis); c: SFO (subfornical organ); d: HP (hippocampus); e: TH (thalamus); f: LM (lateral mammillary nucleus); g: ENT (entorhinal area); h: HP (hippocampus); i: MGm (medial geniculate complex, medial part); j: MGv (medial geniculate complex, ventral part); k: DR (dorsal nucleus raphe); l: CSm (superior central nucleus raphe, medial part); m: LC (locus coeruleus); n: FN (fastigial nucleus); o: A10 (ventral tegmental area, medial part)





제주대학교
JULIATION



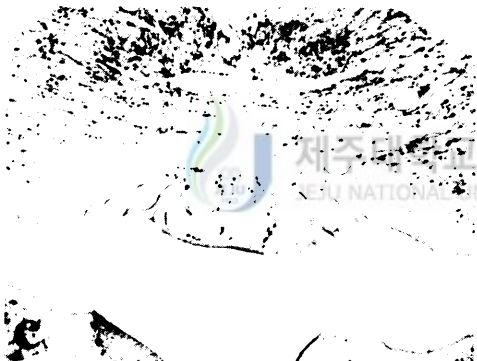
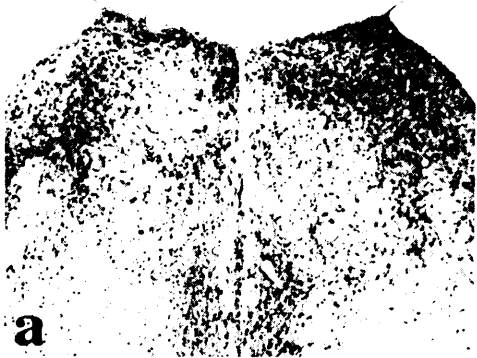


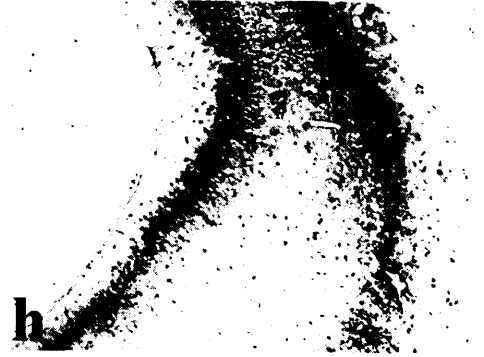
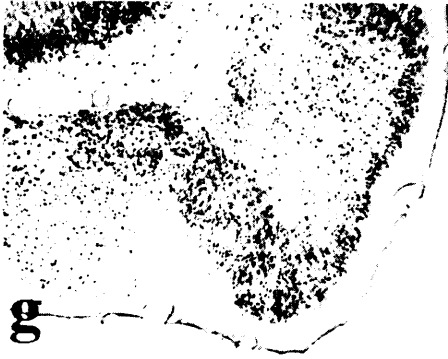
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 8. The CNS hippocampal innervating nuclei labeled with PRV at 30 days after ECL ($\times 40$).

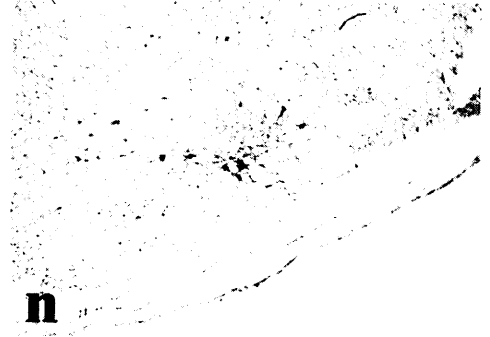
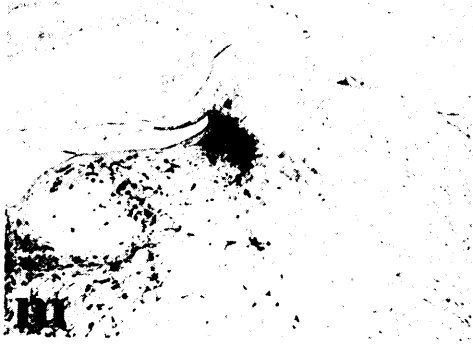
a: MS (medial septal nucleus); b: BST (bed nuclei stria terminalis); c: SFO (subfornical organ); d: HP (hippocampus); e: TH (thalamus); f: LM (lateral mammillary nucleus); g: ENT (entorhinal area); h: HP (hippocampus); i: MGm (medial geniculate complex, medial part); j: MGv (medial geniculate complex, ventral part); k: DR (dorsal nucleus raphe); l: CSm (superior central nucleus raphe, medial part); m: LC (locus coeruleus); n: FN (fastigial nucleus); o: A10 (ventral tegmental area, medial part)







제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

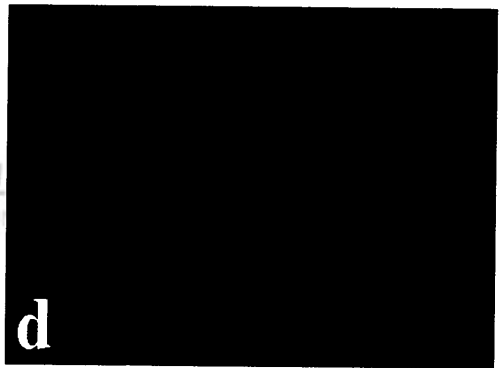
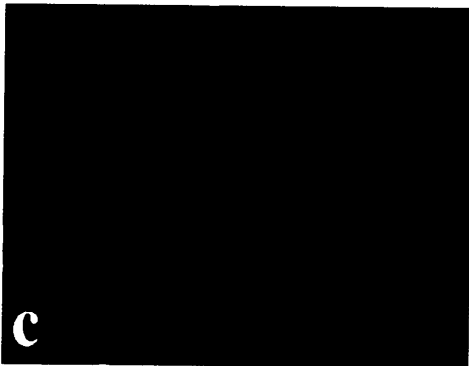
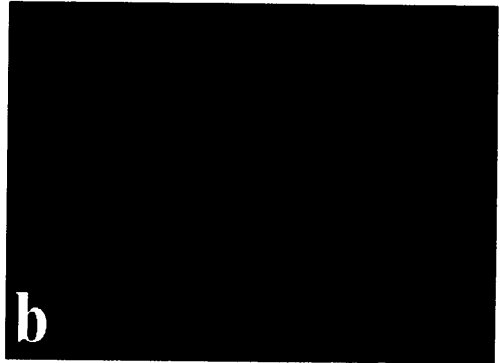
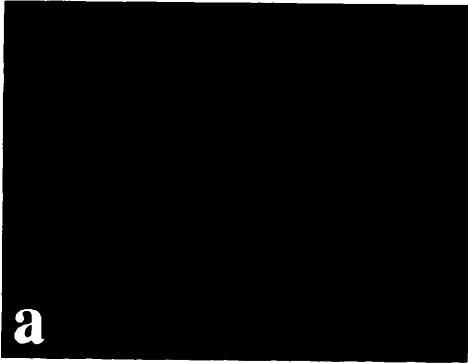


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 9. The CNS hippocampal cholinergic nuclei labeled with choline acetyltransferase and pseudorabies virus (ChAT/PRV) double immunoflorescent staining at 10 days after ECL ($\times 100$).

a: GPI (globus pallidus, lateral segment), PRV; b: GPI (globus pallidus, lateral segment), ChAT; c: LHA (lateral hypothalamic area), PRV; d: LHA (lateral hypothalamic area), ChAT; e: MRN (mesencephalic reticular nucleus), PRV; f: MRN (mesencephalic reticular nucleus), ChAT; g: MS (medial septal nucleus), PRV; h: MS (medial septal nucleus), ChAT; i: SI (substantia innominata), PRV; j: SI (substantia innominata), ChAT





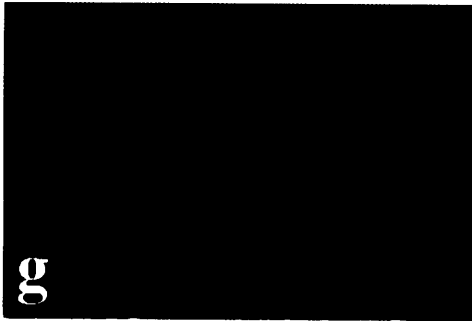
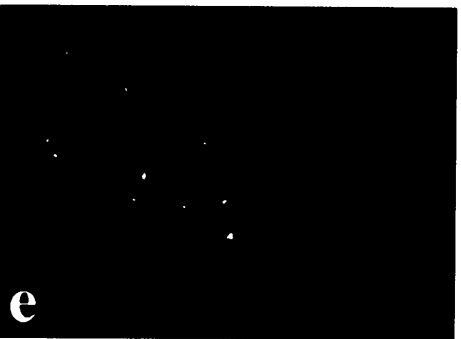
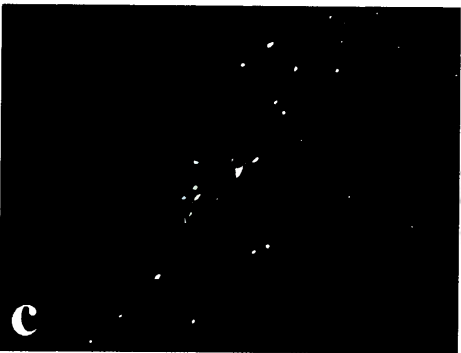
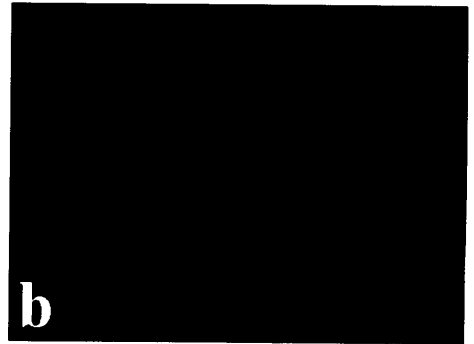
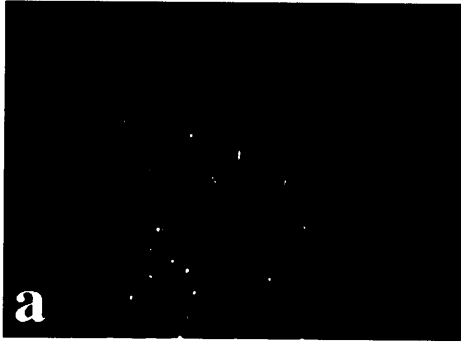
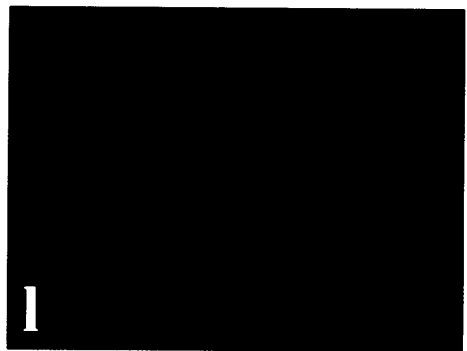
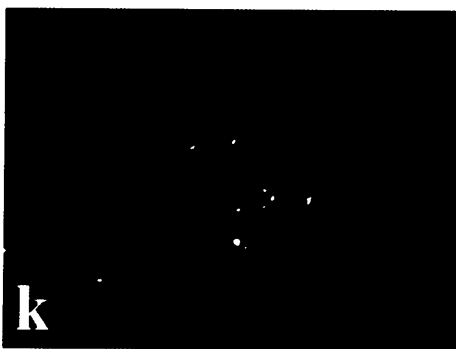
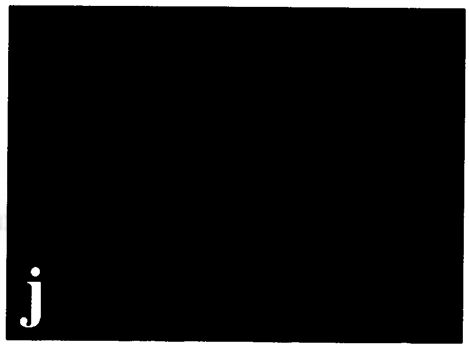
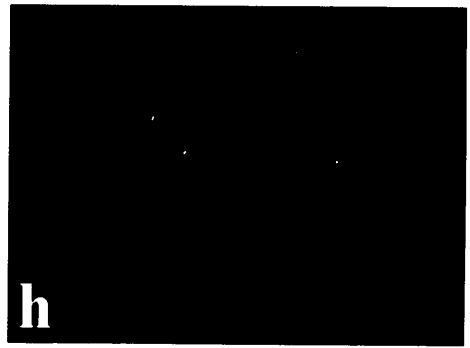


Figure 10. The CNS hippocampal cholinergic nuclei labeled with choline acetyltransferase and pseudorabies virus (ChAT/PRV) double immunoflorescent staining at 30 days after ECL ($\times 100$).

a: AId (agranular insular cortex), PRV; b: AId (agranular insular cortex), ChAT; c: BST (bed nuclei stria terminalis), PRV; d: BST (bed nuclei stria terminalis), ChAT; e: CeA (central amygdala), PRV; f: CeA (central amygdala), ChAT; g: GPI (globus pallidus, lateral subnucleus), PRV; h: GPI (globus pallidus, lateral subnucleus), ChAT; i: LDT (laterodorsal tegmental nucleus), PRV; j: LDT (laterodorsal tegmental nucleus), ChAT; k: LHA (lateral hypothalamic area), PRV; l: LHA (lateral hypothalamic area), ChAT; m: MRN (mesencephalic reticular nucleus), PRV; n: MRN (mesencephalic reticular nucleus), ChAT; o: SI (substantia innominata), PRV; p: SI (substantia innominata), ChAT





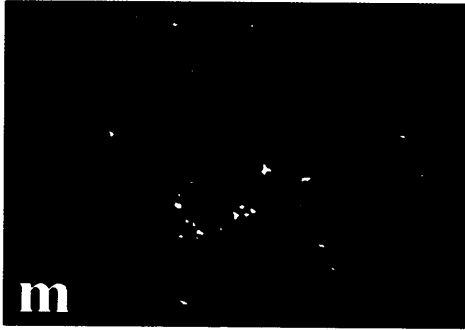
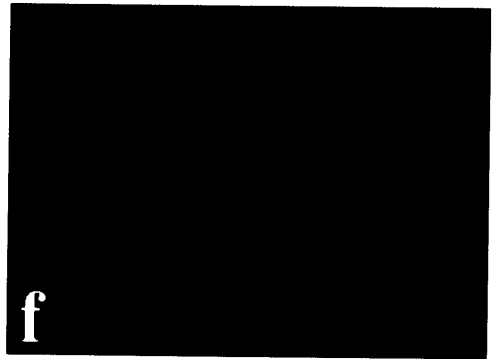
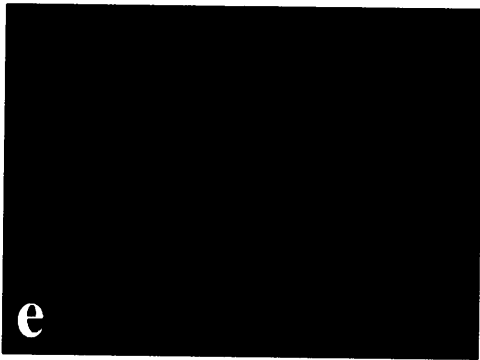
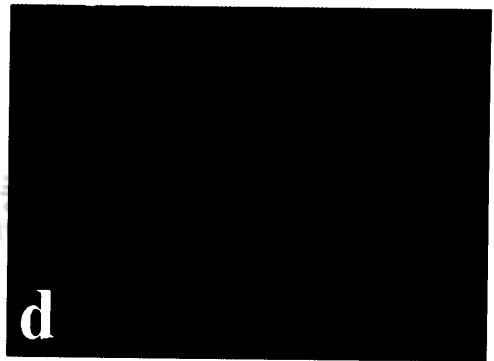
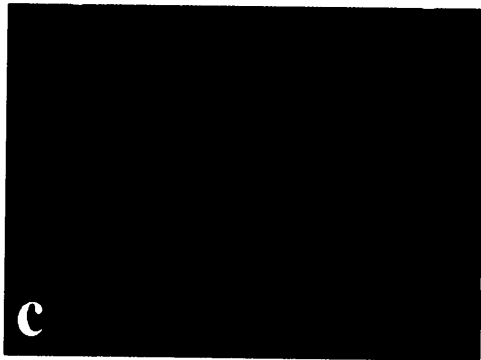
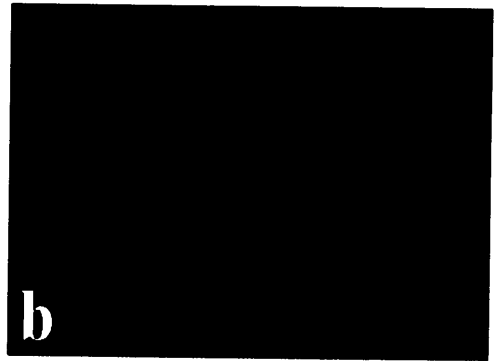
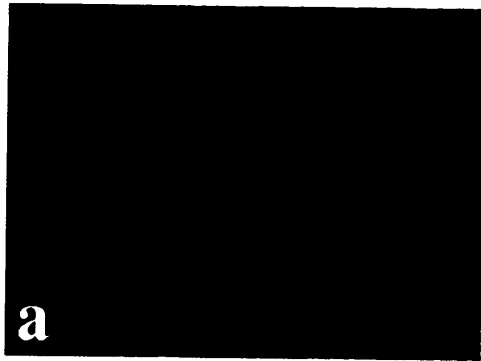


Figure 11. The CNS hippocampal dopaminergic nuclei labeled with tyrosine hydroxylase and PRV (TH/PRV) double immunoflorescent staining at 10 days after ECL ($\times 100$).

a: SNr (substantia nigra, reticular part), PRV; b: SNr (substantia nigra, reticular part), TH; c: PAG (periaqueductal gray), PRV; d: PAG (periaqueductal gray), TH; e: A10 (ventral tegmental area), PRV; f: A10 (ventral tegmental area), TH; g: PH (posterior hypothalamic nucleus), PRV; h: PH (posterior hypothalamic nucleus), TH





g

h

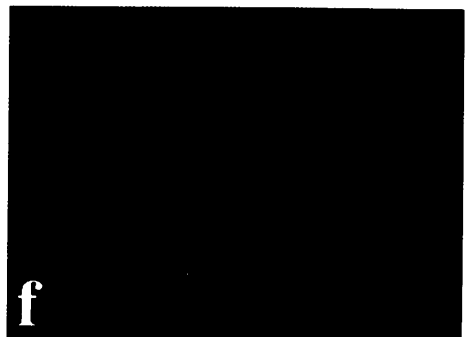
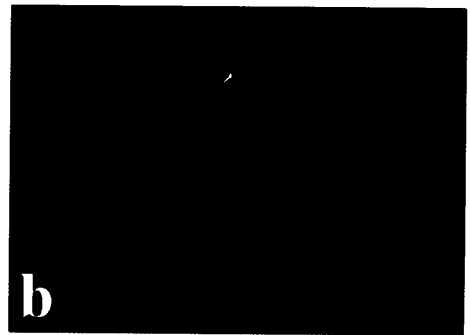


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 12. The CNS hippocampal dopaminergic nuclei labeled with tyrosine hydroxylase and PRV (TH/PRV) double immunoflorescent staining at 30 days after ECL ($\times 100$).

a: A10 (ventral tegmental area), PRV; b: A10 (ventral tegmental area), TH; c: LC (locus coeruleus), PRV; d: LC (locus coeruleus), TH; e: PAG (periaqueductal gray), PRV; f: PAG (periaqueductal gray), TH; g: PH (posterior hypothalamic nucleus), PRV; h: PH (posterior hypothalamic nucleus), TH; i: SNr (substantia nigra, reticular part), PRV; j: SNr (substantia nigra, reticular part), TH





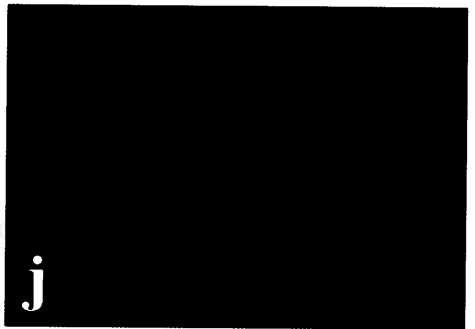
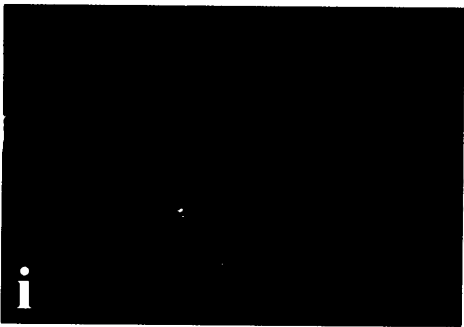
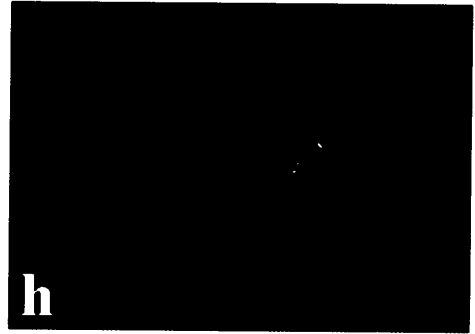
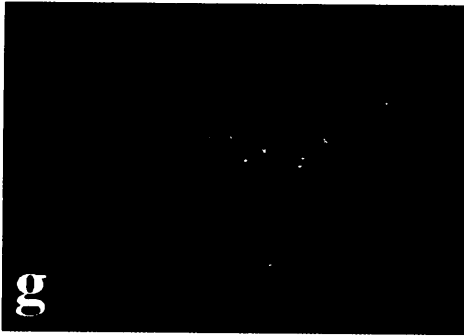


Table 1. The distributions of PRV labeled cells in the brain after injection into the hippocampus of the normal and ECL rats

| Nucleus | PRV labeling | | |
|---------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Normal (n=3) | 10 days after ECL (n=3) | 30 days after ECL (n=3) |
| A10 | + | + | ± |
| BST | +++ | ++++ | +++ |
| DR | ++ | +++ | +++ |
| ENT | +++ | +++ | +++ |
| FN | + | ± | ± |
| HP | +++ | +++ | ++++ |
| LM | + | ± | ++ |
| LC | + | +++ | +++ |
| MGm | +++ | ± | ± |
| MGv | +++ | + | ++ |
| MS | +++ | ++++ | ++++ |
| SFO | + | ++ | + |
| CSm | ++ | +++ | +++ |
| TH | +++ | - | - |

The quantity of labeled cells were counted in each group of nuclei and presented as follows(-: not detection; ±: rare; +: a few; ++: moderate; +++: abundant; ++++: extremely rich)

Table 2. The changes of ChAT/PRV double labeled cells in the nucleus of the normal and ECL rats after PRV injection into the hippocampus

| Nucleus | ChAT/PRV labeling | | |
|---------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Normal (n=3) | 10 days after ECL (n=3) | 30 days after ECL (n=3) |
| AId | ++ | - | ++ |
| BST | + | - | + |
| CeA | + | - | + |
| GPI | ++ | ++ | ++ |
| LHA | ++ | + | + |
| LDT | +++ | + | ++ |
| MS | ++ | ++++ | - |
| MRN | + | ++ | ++ |
| PAG | ++ | - | - |
| SI | ++ | + | ++ |

The quantity of labeled cells were counted in each group of nuclei and presented as follows(-: not detection; ±: rare; +: a few; ++: moderate; +++: abundant; ++++: extremely rich)

Table 3. The changes of TH/PRV double labeled cells in the nucleus of the normal and ECL rats after PRV injection into the hippocampus

| Nucleus | TH/PRV labeling | | |
|---------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Normal (n=3) | 10 days after ECL (n=3) | 30 days after ECL (n=3) |
| A10 | + | + | + |
| IPNI | +++ | - | - |
| LC | + | - | ++ |
| LDT | + | - | - |
| PAG | ++ | + | ++ |
| PH | ++ | + | + |
| SNr | +++ | ++ | ++ |

The quantity of labeled cells were counted in each group of nuclei and presented as follows(-: not detection; ±: rare; +: a few; ++: moderate; +++: abundant; ++++: extremely rich)

Table 4. Comparative analysis of relative ratios of ChAT/PRV double labeled cells in the normal and ECL rats

| Nucleus | Percentage of double labeled neurons | | |
|---------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Normal (n=3) | 10 days after ECL (n=3) | 30 days after ECL (n=3) |
| AId | 9 | 0 | 22 |
| BST | 14 | 0 | 1 |
| CeA | 12 | 0 | 41 |
| GPI | 54 | 44 | 64 |
| LHA | 26 | 27 | 38 |
| LDT | 24 | 44 | 29 |
| MS | 23 | 37 | 0 |
| MRN | 44 | 31 | 49 |
| PAG | 16 | 0 | 0 |
| SI | 22 | 40 | 16 |

Table 5. Comparative analysis of relative ratios of TH/PRV double labeled cells in the normal and ECL rats

| Nucleus | Percentage of double labeled neurons | | |
|---------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Normal (n=3) | 10 days after ECL (n=3) | 30 days after ECL (n=3) |
| A10 | 82 | 55 | 100 |
| IPNI | 100 | 0 | 0 |
| LC | 57 | 0 | 72 |
| LDT | 12 | 0 | 0 |
| PAG | 18 | 31 | 22 |
| PH | 67 | 21 | 68 |
| SNr | 60 | 55 | 32 |



IV. 고 찰

PRV를 이용하여 소뇌겉질 (cerebellar cortex), 시상 (thalamus), 편도체 (amygdala), 청색반점 (locus coeruleus) 등의 중추신경계에 직접 주입시킨 후 각각의 신경로가 보고되었으나 (Kaufman 등, 1996; Jasmin 등, 1997; Chen 등, 1999), 해마의 신경로에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 지금까지 보편적으로 쓰이는 추적자로는 형광물질이나 방사선동위원소에 표지된 단백질 또는 HRP 등이 쓰여지고 있다 (Moore 와 Lenn, 1972; Fryscak 등, 1984; Altschuler 등, 1989; 1991). 그러나 이들은 신경추적자로서 한계점을 가지고 있는데 중추신경이나 말초신경을 통과할 때 상위신경부분으로 이동할 수록 그 농도가 희석되며 신경축삭을 통해 상위신경세포로 이동하는 과정 중 연접을 건너가지 못하거나 건너가지만 극히 제한적이다. 근간에 사용되기 시작한 신경친화성 바이러스인 pseudorabies 바이러스는 다른 신경추적자들의 한계점을 보완할 수 있다. 즉 바이러스는 양방향 이동추적자이지만 축삭을 따라 이동하면서 바이러스가 증식되어 그 수가 증가될 뿐 아니라 연접을 쉽게 통과할 수 있다 (Card 등, 1990, 1993). 그리고 사람에서는 감염이 되지 않아 손쉽게 이용되고, 다른 신경추적자들과 같이 사용되어 이중 또는 다중 염색을 통하여 신경전달물질의 변화와 신경로 추적에 널리 사용되고 있다 (Deng, & Rogers, 1999). 이런 장점을 이용하여 본 실험에서는 해마에 PRV를 주입하여 면역염색을 통한 해마로 투사되는 신경로를 구축하였다.

치아이랑의 콜린성 구심성섬유들은 정상적으로 분자층의 바깥쪽 3/4에 의해 신경지배를 받으며, 신경절단부위의 말단부위에 밀도가 증가된다 (Lynch 등, 1972; Storm-Mathisen, 1974).

Lynch등 (1972)은 한쪽 속후각겉질 손상 후 흰쥐의 해마구성체 (hippocampal formation)에서 아세틸콜린 분해효소를 면역조직화학염색한 결과 동측 (ipsilateral)의 치아이랑의 분자층에서 현저하게 진한 밴드가 관찰되며, 속후각겉질 신경섬유들이 정상적으로 투사된다고 보고하였다. 본 실험에서 해마에 pseudorabies 바이러스를 주입하는 과정에서 정확한 위치, 속후각겉질 손상된 위치를 cresyl violet 염색을 통하여 확인하였다. 그리고 속후각겉질 손상 후 쥐의 해마구성체에서 AChE 세포화학적 염색을 수행한 결과 동측 (ipsilateral) 치아이랑 분자층에서 현저하게 진한 밴드가 조사된 것으로 보아 ECL 모델의 일반적인 변화를 관찰하였다.

특히 해마로 PRV를 주입한 결과 해마로 투사되는 신경로는 정상 흰쥐에서 내측안쪽무릎핵 (medial geniculate complex, medial part, MGm)은 강한 양성반응을 보인 반면에 속후각겉질의 손상 후에는 각각 드물게 나타났다. 그리고 시상 (thalamus, TH)에서 정상 흰쥐에서는 강한 양성반응이 관찰되었으나, 속후각겉질 손상 후에는 음성반응으로 조사되어 일부 뇌손상 후에 신경세포의 변화를 보이고 있었다.

본 실험에서는 해마로 투사되는 콜린성 신경로는 정상 흰쥐에서의 PRV를 해마로 직접 주입하고 이중염색을 통해 살펴보면 정상 흰쥐에서는 많은 신경핵에서 조사되었으나 속후각겉질 손상 후에 많은 변화가 일어났다. 특히 정상 흰쥐에서는 무과립섬겉질 (agranular insular cortex, AI_d), 줄무늬침상핵 (bed nuclei stria terminalis, BST), 중심편도핵 (central amygdala, CeA)에서 양성반응이 관찰되었으나 ECL 10일 후에는 음성반응을 보이다가 ECL 30일 후에는 양성반응이 조사되었다. 이는 ECL 후에 시간이 경과함에 따라 제 3의 신경로를 통해 보상이 된다는 것을 시사한다고 할 수 있다. 또한 콜린성 신경로의 주요 핵인 내측격막핵 (medial septal nucleus, MS)에서는 정

상 흰쥐와 ECL 10일 후에는 양성 반응을 보인 반면 ECL 30일 후에는 음성 반응, 수도관주위회색질 (periaqueductal gray, PAG)에서도 정상 흰쥐에서는 양성반응, ECL 10일, 30일 후에는 음성반응을 보여 콜린성 신경로가 속후각 결질의 손상 후에 많은 변화를 보인다는 것을 알 수 있었다.

흰쥐 뇌에서 도파민 세포는 여러 가지 면역조직화학법 및 역방향 추적자를 통하여 A8 (retrobulbar), 흑색질 (substantia nigra, A9), 배쪽뒤관핵 (ventral tegmental area, A10), 뇌실주위 회색질 (periventricular gray, A11), 활꼴핵 (arcuate nucleus, A12), 등쪽시상하부 (dorsal hypothalamus, A13), 전측뇌실 주위 (rostral periventricular, A14), 등쪽시각로앞핵 (dorsal preoptic, A15), A16 (periglomerular), 망막 (A17, retina) 등 10개의 그룹에서 조사되었다 (Dahlström 와 Fuxe, 1964; Björklund 와 Lindvall, 1984). 도파민성 A8 (retrobulbar), 흑색질 (substantia nigra, A9), 배쪽뒤관핵 (ventral tegmental area, A10) 등의 중뇌신경세포들은 해마구성체로 투사된다 (Dahlström 와 Fuxe, 1964; Ungerstedt, 1971; Lindvall 와 Björklund, 1974; German 와 Manaye, 1993).

도파민성 신경로의 변화를 보면 다리사이핵 (interpeduncular nucleus, lateral subnucleus, IPNI), 청색반점 (locus coeruleus, LC), 외등측피개핵 (laterodorsal tegmental nucleus, LDT)의 신경핵에서 정상 흰쥐에서는 양성 반응을 보이다가 ECL 후에는 음성반응으로 나타났다. 그리고 청색반점 (locus coeruleus, LC)에서는 ECL 30일 후에 강한 양성반응을 보였다. 이와 같은 변화는 ECL 후에 많은 핵에서 도파민성 신경세포들이 많이 관여한다고 볼 수 있다. 다리사이핵 (interpeduncular nucleus, lateral subnucleus, IPNI)에서는 PRV에 대한 TH의 이중염색이 정상 흰쥐에서는 전 세포에 걸쳐 조사되었으나 ECL 후에는 전혀 조사되지 않는 것으로 보아 가장 많은 변화를 보였다.

본 실험을 통해 정상 흰쥐와 ECL 후의 흰쥐에서 해마의 신경로는 ECL 후에 내측안쪽무릎핵 (medial geniculate complex, medial part, MGm), 시상 (thalamus, TH), 콜린성 신경로는 줄무늬침상핵 (bed nuclei stria terminalis, BST), 중심편도핵 (central amygdala, CeA), 수도관주위회색질 (periaqueductal gray, PAG), 무명질 (substantia innominata, SI), 도파민성 신경로에서는 다리사이핵 (interpeduncular nucleus, lateral subnucleus, IPNI), 청색반점 (locus coeruleus, LC) 등의 신경핵에서 많은 변화가 조사되었으며, 대체적으로 AD 모델인 ECL 후에 콜린성 및 도파민성 신경핵들이 감소되었다.

본 실험은 PRV를 이용하여 해마로 투사되는 정상적인 해마의 신경로와 콜린성 신경로 및 도파민성 신경로를 처음으로 구축한 것으로서 학습과 기억에 관련된 신경핵들을 직접적으로 확인할 수 있는 중요한 자료로서 제공할 수 있다. 또한 AD 모델로서 ECL 후의 뇌내에서의 해마로 투사되는 해마의 신경로, 콜린성 및 도파민성 신경세포의 형태학적인 변화 및 신경로의 구축은 AD 뿐만 아니라 다른 신경질환에 대한 연구에서 응용되어질 것이라고 사료된다.

V. 요약

Pseudorabies 바이러스 (PRV)의 Bartha stain은 여러 바이러스 중에서 시냅스를 건너는 추적자로 흰쥐에서 말초기관 (peripheral organs)과 뇌 (brain)에 주입한 후 다단계 시냅스 회로를 분석하는데 널리 이용되고 있다. 해마 (hippocampus)의 역할은 학습과 기억에 관여하며, 속후각겉질 (entorhinal cortex)은 새겉질 (neocortex)과 해마구성체 (hippocampal formation)을 연결하는 통로로서 중요한 역할을 한다. 속후각겉질 손상은 Alzheimer's disease (AD) 모델로서 해마부위에서 신경손상으로 인한 새로운 섬유들의 sprouting에 관여하는 신경화학적 특징을 연구하는데 많이 이용되고 있다.

본 연구에서의 첫째, 해마로 PRV를 주입한 후 흰쥐 뇌 내에서의 해마의 신경로, 콜린성 또는 도파민성 신경로를 구축하였다. 둘째, 속후각겉질 손상 후에 PRV를 주입한 후 해마로 투사되는 해마의 신경로, 콜린성 또는 도파민성 뉴런의 형태학적인 변화를 관찰하였다.

실험동물로서는 무게가 200-350g 정도의 Sprague-Dawley 계통의 암·수를 사용하였다. 속후각겉질의 손상을 위한 뇌정위수술기구의 좌표는 외측으로부터 10° 각도를 준 후 bregma를 기준으로 위로 8.3mm (AP-8.3mm), 정중선을 기준하여 옆으로 4.8mm (ML-4.8mm), dura matter에서 6mm (DV 6mm)과 4mm (DV 4mm), 다시 정중선에서 옆으로 4.3mm (ML-4.3mm), dura matter에서 5mm (DV 5mm), 그리고 bregma를 기준으로 위로 8.8mm (AP-8.8mm), 정중선을 기준으로 옆으로 3.65mm (ML-3.65mm), dura matter에서 5mm (DV 5mm) 각각 네 곳에 우측 속후각겉질을 파괴하였다. 전기적 손상은 1mA의 음전류를 26-gage의 stainless-steel electrode를 이용하여 전기를 45초 동안 실시하였다.

정상 흰쥐와 속후각겉질 손상 후 10일, 30일에서 뇌정위수술기구에서 $10\mu\text{l}$ 헤밀턴 주사기를 이용 ($0.05\mu\text{l}/\text{min}$)하여 PRV $3\mu\text{l}$ 를 해마부위에 주입하였다.

흰쥐에 감염된 후 4% PLP (paraformaldehyde-lysine-periodate)를 사용하여 관류 고정하고 뇌를 적출하였다. PRV 양성신경세포는 1차 항체 rabbit anti-PRV를 이용하여 면역조직화학염색을 통하여 확인하였다. 속후각겉질 손상 후 이중형광염색은 같은 뇌조직에서 PRV와 ChAT (choline acetyltransferase) 양성 신경세포 (rabbit anti-PRV, FITC conjugated donkey-anti rabbit IgG; goat anti-ChAT, TRITC conjugated donkey-anti goat IgG), PRV와 TH (tyrosine hydroxylase) 양성 신경세포 (rabbit anti-PRV, FITC conjugated donkey-anti rabbit IgG; mouse anti-TH, TRITC conjugated donkey-anti mouse IgG)를 신경전달물질의 효소로서 확실한 콜린성, 도파민성 신경세포관찰에 이용하였다. 모든 고정된 조직들은 면역조직화학염색 또는 이중형광염색을 통하여 광학, 형광, 공초점 레이저 스캐닝 현미경을 통하여 관찰하였다.

콜린아세틸 전이효소와 티로신 가수분해효소의 면역조직화학염색을 통하여 PRV의 역방향 표지는 흰쥐의 해마구성체로 투사하는 중추신경계의 콜린성, 도파민성 신경세포를 구축하는데 사용되었다. ChAT와 PRV, TH와 PRV의 이중형광염색된 신경세포들은 뇌줄기에서 대뇌의 속후각겉질에 이르기까지 몇 개의 다른 핵들이 분포되었다. 정상 흰쥐에서 해마로 투사되는 해마의 신경로, 콜린성 또는 도파민성 신경로를 구축하였다. 그리고 속후각겉질 손상 후에 해마로 투사하는 콜린성 및 도파민성 신경세포의 형태학적 변화가 조사되었다. 이런 자료들은 속후각겉질의 손상이 뇌 내에서 시냅스를 통과하는 방법에서 해마로 투사되는 해마의 신경로와 콜린성, 도파민성 신경세포들의 형태학적 변화를 보여주고 있다.

VI. 참고문헌

- Altschuler, S. M., X. Bao, D. Bieger, D. A. Hopkins, and R. R. Miselis, 1989. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. *J. Comp. Neurol.* 283: 248-268.
- Armstrong, D. M., C. B. Saper, A. I. Levey, B. H. Wainer, and R. D. Terry, 1983. Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *The Journal of Comparative Neurology* 216: 53-68.
- Altschuler, S. M., D. A. Ferenci, R. B. Lynn, and R. R. Miselis, 1991. Representation of the cecum in the lateral dorsal motor nucleus of the vagus nerve and commissural subnucleus of the nucleus tractus solitarii in rat. *J. Comp. Neurol.* 304: 261-274.
- Ball, M. J., 1978. Topographic distribution of neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in hippocampal cortex of aging and demented patients. *Acta Neuropathl.* 42: 73-80.
- Balthazart, J., C. Castagna, and G. F. Ball, 1997. Differential effects of D₁ and D₂ dopamine-receptor agonists and antagonists on appetitive and consummatory aspects of male sexual behavior in Japanese quail. *Physiol. Behav.* 62: 571-580.

- Bartus, R. T., III R. L. Dean, B. Berr, and A. S. Lipka, 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-417.
- Card, J. P., L. Rinaman, J. S. Schwaber, R. R. Miselis, M. E. Whealy, A. K. Robbins, and L. W. Enquist, 1990. Neurotropic properties of pseudorabies virus: uptake and transneuronal passage in the rat central nervous system. *J. Neurosci.* 10: 1976-1994.
- Card, J. P., L. M. Rinaman, R. B. Lynn, B. H. Lee, R. P. Meade, R. R. Miselis, and L. M. Enquist, 1993. Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system: ultrastructural characterization of viral replication, transport, and pathogenesis. *J. Neurosci.* 13: 2515-2539.
- Card, J. P., 1998. Practical Considerations for the use of pseudorabies virus in transneuronal studies of neural circuitry. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 22: 685-694.
- Chen, S., M. Yang, R. R. Miselis, and G. S. Aston-Jones, 1999. Characterization of transsynaptic tracing with central application of pseudorabies virus. *Brain Res.* 838: 171-183.
- Coyle, J. R., D. L. Price, and M. R. DeLong, 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219: 1184-1190.
- Dahlström, A., and K. Fuxe, 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62. Suppl. 232: 1-55.

- Delfs, J. M., Y. Zhu, J. P. Druhan, and G. S. Aston-jones, 1998. Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res.* 806: 127-140.
- Deng, C., and L. J. Rogers., 1999. Differential sensitivities of the two visual pathways of the chick to labelling by fluorescent retrograde tracers. *J. Neurosci. Meth.* 89: 75-86.
- Doggweiler, R., L. Jasmin, and R. A. Schmidt, 1998. Neurogenically mediated cystitis in rats: an animal model. *J. Urology* 160: 1551-1556.
- Farkas, E., A. S. P. Jansen, and A. D. Loewy, 1998. Periaqueductal gray matter input to cardiac-related sympathetic premotor neurons. *Brain Res.* 792: 179-192.
- Freedman, M., and M. Oscar-Berman, 1986. Selective delayed response deficits in Parkinson's and Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 43: 886-890.
- Fryszak, R., W. Zenker, and D. Kantner, 1984. Afferent and efferent innervation of the rat esophagus. A tracing study with horseradish peroxidase and nuclear yellow. *Anat. Embryol.* 170: 63-70.
- Geddes, J. W., C. W. Cotman, I. T. Lott, R. C. Kim, and H. C. Chui, 1985. Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science* 230: 1179-1181.

- German, D. C., and K. F. Manaye, 1993. Midbrain dopaminergic neurons(nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J. Comp. Neurol.* 331: 297-309.
- Gutierrez-Figueroa, G. P., C. Dalmaz, and I. Izquierdo, 1997. Effects of entorhianl cortex lesions on memory in different tasks. *Brazilian J. of Medical and Biological Research* 30: 769-774.
- Heimer, L., and L. Zaborszky, 1989. *Neuroanatomical tract-tracing methods 2.* Plenum Press. New York and London.
- Henderson, Z., P. S. Harrison, Jagger, E. Harrison, and H. J. Beeby, 1998. Density of choline acetyltransferase-immunoreactive terminals in the rat dentate gyrus after entorhinal cortex lesions: a quantitative light microscope study. *Exp. Neurology* 152: 50-63.
- Hsu, S. M., L. Raine, and H. Fanger, 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures. *J. Histochem.* 29: 557-580.
- Hyman, B. T., G. W. Van Hoesen, A. R. Damasio, and C. L. Barnes, 1984. Alzheimer's disease: Cell specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225: 1168-1170.
- Jansen, A. S. P., E. Farkas, J. M. Sams, and A. D. Loewy, 1998. Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. *Brain Res.* 784: 329-336.

- Jasmin, L., 1995. Pseudorabies virus as a neuroanatomical tracer. *J. Neurovirol.* 1: 326-327.
- Jasmin, L., A. R. Burkey, J. P. Card, and A. I. Basbaum, 1997. Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the spino-(trigeminal) parabrachio-amygdaloid, in the rat. *J. Neurosci.* 17: 3751-3765.
- Kaufman, G. D., M. J. Mustari, R. R. Miselis, and A. A. Perachio, 1996. Transneuronal pathways to the vestibulocerebellum. *J. Comp. Neurol.* 370: 501-523.
- Kim, E. S., H. Li, P. F. McCulloch, L. A. Morrison, K. W. Yoon, and X. M. Xu, 2000. Spatial and temporal patterns of transneuronal labeling in CNS neurons after infection of pseudorabies virus into the sciatic nerve of adult rats. *Brain Res.* 857: 41-55.
- Lee, B. H., R. Lynn, H. S. Lee, R. R. Miselis, and S. M. Altschuler, 1992. Calcitonin-gene related peptide of nucleus ambiguus motoneurons in the rat: viscerotopic organization. *J. Comp. Neurol.* 320: 531-543.
- Lindvall, O., and A. Björklund, 1974. Dopamine- and norepinephrine-containing neuron systems: their anatomy in the rat brain. In: *Chemical Neuroanatomy*. P. C. Emos(Ed.). pp229-256.
- Lynch, G., D. A. Matthews, S. Mosko, T. Parks, and C. Cotman, 1972. Induced acetylcholinesterase-rich layer in rat dentate gyrus following entorhinal lesions. *Brain Res.* 42: 311-318.

- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Wienman, G. Multhaup, B. L. McDonald, and K. Beyreuther, 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down's syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8: 4245-4249.
- Mathews, D. M., C. W. Cotman, and G. Lynch, 1976a. An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration. *Brain Res.* 115: 1-21.
- Mathews, D. A. , C. W. Cotman, and G. Lynch, 1976b. An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Reappearance of morphologically normal synaptic contacts. *Brain Res.* 115: 23-41.
- McDougall, S. A., and B. A. Mattingly, 1987. Effects of apomorphine and haloperidol on response suppression learning of young chicks. *Behav. Neurosci.* 101: 254-263.
- Moore, R. Y., and N. J. Lenn, 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* 146: 1-14.
- Morris, R. G. M., and M. D. Kopelman, 1986. The memory deficits in Alzheimer-type dementia: A review. *Q. J. Exp. Psychol.* 38A: 375-602.
- Paxinos, D., 1995. *The rat nervous system*. 2nd Ed. Academic Press. Australia.
- Paxinos, G., and C. Watson, 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th Ed. Academic Press. Australia.

- Poirier, J., and N. R. Nichols, 1991. Alteration of hippocampal RNA prevalence in response to deafferentation. *Methods in Neuroscience* Vol. 7.
- Polster, M. R., L. Nadel, and D. L. Schacter, 1991. Cognitive neuroscience. Analysis of memory: a historical perspective. *J. Cog. Neurosci.* 3: 95-116.
- Price, J. L., P. B. Bavid, J. C. Morris, and D. L. White, 1991. The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 12: 295-312.
- Reinikainen, K. J., H. Soininen, and P. J. Riekkinen, 1990. Neurotransmitter changes in Alzheimer's disease: implications to diagnosis and therapy. *J. Neurosci. Res.* 27: 576-586.
- Rotto-Percelay, D. M., J. G. Wheeler, F. A. Osorio, K. B. Platt, and A. D. Lowey, 1992. Transneuronal labeling of spinal interneurons and sympathetic preganglionic neurons after pseudorabies virus injections in the rat medial gastrocnemius. *Brain Res.* 574: 291-306.
- Salamone, J. D., 1992. Complex motor and sensorimotor functions of striatal and accumbens dopamine: involvement in instrumental behavior process. *Psychopharmacology* 107: 160-174.
- Selkoe, D. J., 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6: 487-499.

- Squire, C. W., 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis of findings with rats, monkeys and humans. *Psychol. Rev.* 99: 195-221.
- Storm-Mathisen, J., 1974. Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in fascia dentate following lesion of the entorhinal afferents. *Brain Res.* 80: 181-197.
- Swanson, L. W., 1998. *Brain Maps: structure of the rat brain.* 2nd Ed. Elsevier. Amsterdam.
- Tago, H., H. Kimura, and T. Maeda, 1986. Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat brain by a sensitive histochemical procedure. *J. Histochem. Cytochem.* 34: 1431-1438.
- Terry, R. D., R. Katzman, and L. B. Katherine, 1996. *Alzheimer's disease.* Lippincott-Raven Publishers. New York.
- Tsai, T., 2000. Separation methods used in the determination of choline and acetylcholine. *Journal of Chromatography* 747: 111-122.
- Ungerstedt, U., 1971. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol. Scand. (suppl.)* 367: 1-41.
- Van Hoesen, G. W., B. T. Hyman, and A. R. Damasio, 1991. Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus* 1: 1-8.

Whitehouse, P. J., D. L. Price, and A. W. Clark, 1981. Alzheimer disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* 10: 122-126.

Whitehouse, P. J., D. L. Price, R. G. Struble, A. W. Clark, J. T. Coyle, and M. R. DeLong, 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215: 1237-1239.



감사의 글..... 끝이 아니라 또 다른 시작을 의미한다는 사실!

교정에 들어서면 한라산과 바다를 한눈에 그릴 수 있는 저의 모교인 아름다운 제주대학교는 저에게 있어 산소 같은 마음의 안식처였습니다.

아직은 부족함이 많지만 끝까지 많은 지도와 격려를 아끼지 않으신 나의 은사님이신 오문유 선생님께 정말 감사의 말을 전합니다. 학자로서의 모습을 단 한번도 흔들림 없이 보여주셨던 선생님을 옆에서 모실 수 있었다는 것은 저에게 큰 힘이 되었습니다. 그리고 “항상 모든 일에 최선을 다해라”는 선생님의 따뜻한 말씀 정말 감사합니다. 늘 건강하십시오.

모자란 논문을 정성껏 다듬어주신 이봉희 선생님, 서울대 김경진 선생님, 김원택 선생님, 이영재 선생님 정말 수고가 많으셨습니다. 심사를 하시면서 저의 서투른 논문을 보시면서 논문이 어떻게 쓰여져야 하는지를 일깨워 주신 점 고개숙여 고마움을 전합니다.

지금도 스승의 날이면 생물학과 로비에서 또는 강의실에서 ‘스승의 은혜’를 제자들과 같이 부르시던 나의 생물학과 은사님들 뭐라고 감사를 드려야 할지 말문이 막힙니다. 연구와 교육에 누구보다도 열정적으로 가르쳐 주시는 나의 영원한 은사님들이 계셨기에 저는 어디에서도 최선을 다할 수 있었습니다. 어떻게 표현해야 이 고마움을 모두 다 전하겠습니까? 나의 진정한 은사님이신 생물학과 오문유 선생님, 허인옥 선생님, 이용필 선생님, 오덕철 선생님, 김문홍 선생님, 김원택 선생님, 이화자 선생님, 고석찬 선생님, 김세재 선생님께 이 글을 통해 고마움을 전합니다.

실험..... 라면..... 커피 한잔..... 같이했던 후배들과의 훈훈한 유전학실험실 생활은 저에게 있어서 정말 소중한 잊을 수 없는 시간들이었습니다. 사랑하는 나의 후배 유성, 용환, 상현, 용욱, 재환, 지훈, 선경, 유경! 그 동안 너무 고맙습니다. 아직은 모자란 선배이지만 앞으로 열심히 하는 선배가 되도록 노력하겠습니다. 옆에서 논문 발표연습부터 도움을 아끼지 않은 희경이에게도 고마움을 표합니다. 항상 연구에 열정적이신 홍성수 박사님과 김기옥 박사님께 고마움을 전합니다. 그리고 따뜻한 격려를 아끼지 않은 선배님들, 나의 사랑하는 후배들, 소중한 친구들에게도 진심으로 고개숙여 고마움을 전합니다.

그리고 초창기에 제주대학교 의과대학장을 지내셨던 장가용 학장님을 비롯한 의과대학 선생님들께도 이 지면을 통해 진심으로 고마움을 전합니다.

가족의 소중함을 깨닫지도 못하고 지금까지 달려온 것 같습니다. 그 동안 소홀했던 가족들의 사랑을 느끼면서 최선을 다하겠습니다. 지금까지는 도움을 받으면서 온실 속에 나로 존재했지만 이제는 거친 바람과 파도를 헤쳐나갈 수 있는 진정한 나로 태어나겠습니다. 어머니의 그 따스한 말씀 한마디를 가슴 깊게 간직하면서 말이지요. 어머니! 그리고 소중한 가족들! 모두 사랑합니다.