

토끼를 이용한 척수 허혈 손상 모델에서 Cyclosporin A의 척수 손상에 대한 보호 효과

신 윤 철** · 최 기 영* · 김 원 곤***

Neuroprotective Effect of Cyclosporin A on Spinal Cord Ischemic Injury in Rabbits

Yoon Cheol Shin, M.D.** , Gheeyoung Choe, M.D.* , Won Gon Kim, M.D.***

Background: The purpose of this study is to ascertain the neuroprotective effect of cyclosporin A on the 25-min surgical ischemia model in the spinal cords of rabbits with neuropathological correlation and histoimmunohistochemical analyses. **Material and Method:** Thirty-two New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups: Rabbits were randomly divided into four groups: the control I2 group (n=8), the control I7 group (n=8), the cyclosporin Cs2 group (n=8), and the cyclosporin Cs7 group (n=8). The I2 group underwent a 25-min aortic cross-clamp without intervention and were sacrificed on the 2nd day postoperatively, while the I7 group underwent a 25-min of aortic cross-clamp without intervention and were sacrificed on the 7th day postoperatively. The Cs2 group received cyclosporin A (25 mg/kg) intravenously 15 min after the 25-min cross-clamp and were sacrificed on the 2nd day postoperatively, while the Cs7 group received cyclosporin A (25 mg/kg) intravenously 15 min after the 25-min cross-clamp and were sacrificed on the 7th day postoperatively. The rabbits underwent 25-min surgical aortic cross-clamp. Neurologic functions were evaluated on the 2nd day and 7th postoperative day using Tarlov scoring system. After scoring neurologic function, all rabbits were sacrificed for histopathologic observation. **Result:** All rabbits survived the experimental procedure. The values of Tarlov score did not show any differences between the control and cyclosporin groups on the 2nd day. The scores of group Cs7 (2.75 ± 0.89) were significantly higher than those of group I7 (1.25 ± 1.39) on the 7th day ($p < 0.05$). On the histologic examinations, specimens of the spinal cord showed necrosis and apoptosis. The pathologic scores of group Cs7 (1.0 ± 0.53) was less than those of group I7 (2.13 ± 1.36 , $p < 0.05$). TUNEL staining showed apoptosis of the specimen in group I2 and Cs2 but there was no statistically significant difference between groups on the score. There were more overexpression of HSP70 and nNOS in cyclosporine group than in control group. **Conclusion:** We think that cyclosporin A may decrease neuronal cell death with induced upregulation of HSP70 against 25-min ischemia of the spinal cord in the rabbit.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2006;39:739-748)

Key words: 1. Ischemia
2. Spinal cord
3. Cyclosporin A

*서울대학교 의과대학 분당병원 병리학과

Department of Pathology, Seoul National University Bundang Hospital, Seoul National University College of Medicine

**한림대학교 의과대학 강동성심병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Kangdong Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine

***서울대학교 의과대학 서울대학교병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine

논문접수일 : 2006년 6월 14일, 심사통과일 : 2006년 7월 11일

책임저자 : 김원곤 (110-744) 서울시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

(Tel) 02-2072-2346, (Fax) 02-717-9672, E-mail: wongon@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서 론

하행흉부대동맥이나 흉복부대동맥 수술 시 대동맥 차단이 필요한 경우 술 후 발생하는 허반신 마비나 부분마비는 매우 심각한 문제이다[1]. 마취기술과 수술술기의 발달로 아주 심한 신경합병증은 감소하였으나 아직도 술 후 어떤 환자에서 허반신 마비가 일어날지 예측할 수 없다[2,3]. 따라서 척수허혈 후 신경보호효과가 있는 약물을 알아내고자 많은 동물실험이 이루어졌다. Cyclosporin A는 뇌에서 허혈 후 뇌경색의 크기를 줄였으며 척수허혈 손상에도 신경보호효과가 있다고 보고되었다[4,5]. 그러나 척수허혈 손상에 있어 허혈시간이 15분으로 일반적인 임상수기나 다른 동물모델에 비해 상대적으로 짧았다[6-8]. 또한 심근세포허혈에서 cyclosporin이 HSP70과 NOS의 상승 조절로 심근보호효과가 있다고 보고되었다[9]. 이 연구는 토끼의 척수허혈 모델에서 신경병리학적 관점과 조직면역학적분석(HSP70과 nNOS)을 통하여 cyclosporin A의 신경보호효과를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1) 실험동물

몸무게가 3.0 kg 전후의 뉴질랜드산 토끼를 이용하였고, 서울대학교 동물실험 위원회의 승인이 있었으며 국제적인 기준에 맞춰 실험이 이루어졌다. 실험 토끼는 적어도 실험 12시간 전부터 금식을 시켰으며 마취 전 모든 토끼가 신경학적으로 이상이 없었다.

2) 실험방법

모두 32마리의 토끼를 무작위로 4군으로 나누어 대조군으로 I2군과 I7군, cyclosporin A를 투여한 실험군은 Cs2군과 Cs7군으로 나누었다. I2군(n=8)은 25분 동안 복부 대동맥 차단만 시행한 후 2일째 신경학적 평가를 시행한 후 조직학적 검사를 위해 희생시켰으며 I7군(n=8)은 25분 동안 복부 대동맥 차단만 시행한 후 술 후 2일과 7일째에 신경학적 평가를 시행하였고 7일째 희생시켜 조직학적 검사를 시행하였다. Cs2군(n=8)은 25분간의 복부 대동맥 차단 후 재관류 15분 후에 cyclosporin A (25 mg/kg)를 생리식염수 20 cc에 혼합하여 1시간 동안 정맥 주입한 후 2일째 신경학적 평가와 조직학적 검사를 시행하였다. Cs7군(n=8)은 25분간의 복부 대동맥 차단 후 재관류 15분 후에 cyclosporin A (25 mg/kg)를 생리식염수 20 cc에 혼합하여 1시

간 동안 정맥 주입한 후 2일과 7일째에 신경학적 평가를 시행하였고 7일째 희생시켜 조직학적 검사를 시행하였다.

3) 수술 방법

Ketamine hydrochloride (50 mg/kg, Ketalar, Yuhan Co., Korea)와 xylazine (5 mg/kg, Rompum, Bayer Health Care Co., Korea)을 근주하여 마취를 유도하고, 자체 제작한 face cone을 통하여 1.2~3 vol%의 isoflurane (Forane, ChoongWae Co., Korea)과 100% 산소로 마취를 유지하고, 실험 중 자발 호흡을 유지시켰다.

마취 유도 후 토끼의 체온은 항문을 통하여 직장 온도계를 충분히 전진시켜 직장 온도를 연속적으로 측정하여 마취 시작부터 재관류 10분까지 열조절담요(Blanketrol II, Cincimati Sub-Zero Products Inc., Ohio, USA)와 가온 램프(heating lamp)를 이용하여 체온을 37°C 이상으로 유지하였다. 혈류역학적 인자의 측정 및 동맥혈가스분석과 혈당, 혈색소 측정은 마취 유도 후(baseline), 대동맥 차단 10분 후(during-clamp), 그리고 재관류 10분 후(recovery) 각각 시행하였으며, cyclosporin A를 투여한 군에서는 약물 투여 직전(pre-induction)과 투여 직후(post-induction) 평균 동맥압과 심박동수를 측정하였다. 대사성 산증 소견이 있을 때 적정량의 sodium bicarbonate를 투여하였다.

토끼의 좌측 옆구리 부위의 털을 깎은 후, 우측 횡와위로 위치시켜 베타딘으로 수술 부위를 소독하고 무균적으로 드래핑을 하였다. 피부 절개 전에 Cefazolin (10 mg/kg)을 한번 정맥 투여하였다. 좌측 옆구리 부위에 길이 5 cm 정도의 절개를 가한 후, 복부 대동맥을 복막 뒤로(retroperitoneal) 접근하였다. 복부 대동맥의 좌측 신동맥(renal artery)의 기시 부위를 박리하여, 이 동맥 바로 원위부의 복부 대동맥을 차단하였다. 대동맥 차단 10분 전에 heparin 150 U/kg 정맥주사하고, heparin은 수술 후 중화하지 않았다. 대동맥 차단 시간은 25분으로 하였고, 대동맥 차단 동안 대퇴 동맥의 맥박이 없음을 확인하였다. 대동맥 차단 검자를 제거 후 원위부 대동맥의 맥박을 확인하고 재관류 후 10분 동안 마취 상태를 유지하며 활력 징후를 관찰하였다. 마취에서 깨기 전에 통증과 불안을 감소시키기 위해 ketorolac (6 mg, Tarasyn, Roche Co., Switzerland)와 acepromazin (0.6 mg, Sedaject, Samu Chem Ind., Seoul, Korea)을 1회 근육주사 하였다. 마취에서 충분히 회복된 뒤 토끼우리로 옮겼으며, 수술 6시간 후부터 물과 음식을 자유로이 먹게 하였다.

4) 신경학적평가

척수 기능의 평가는 Tarlov scoring system법을 이용하여 다음과 같이 등급을 매겼다[10].

0 등급, 하지의 운동이 전혀 없고, 경직성 하지 마비가 발생한 경우(spastic paraplegia and no movement of lower limbs)

1 등급, 하지의 운동성이 조금 있으며 경직성 하지 마비가 발생한 경우(spastic paraplegia with slight movement)

2 등급, 하지의 움직임은 활발하나 스스로 앉을 수 없을 때(good movement of the hind limbs but unable to stand)

3 등급, 스스로 앉을 수는 있으나, 정상적으로 걸을 수 없을 때(able to stand but unable to walk normally)

4 등급, 완전히 회복된 경우(complete recovery)

각 실험군의 신경학적 등급을 매긴 후 술 후 2일과 7일째에는 허혈 후 cyclosporin A 투여 여부에 따라 두 군으로 나누어 비교하였으며 술 후 2일과 7일째의 비교는 7일 생존한 실험군의 군 내 비교를 하였다.

5) 조직병리학과 면역조직학적 분석

(1) Hematoxylin-eosin 염색과 Luxol-fast blue 염색: 토끼는 수술 후 2일과 7일째 조직학적 검사를 위해 희생시켰는데 토끼의 절멸을 확인하자마자 하부 흉부 및 요부 척추를 일괄 적출하여 10% 중성 포르말린에 보관하였으며 각 실험군의 요부 2, 3번 척수 조직을 2.5 cm 이상 절제하여 10% 중성포르말린에 담가 2일 이상 고정시켰다. 척수 조직을 횡단면을 따라 2 mm 두께로 연속 절제하여 8개의 절편을 얻은 후, 모든 절편을 두 개의 카세트에 나누어 슬라이드를 제작하였다. 통상적인 방법에 따라 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매하여 4 μm 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin 염색과 수초를 검사하기 위한 특수염색인 Luxol-fast blue 염색을 시행하였다.

병리학적 평가는 각 실험군의 내용을 알지 못하는 신경 병리학자에 의뢰하여 독립적으로 시행하였으며, Caparrelli 등과 Wakamatsu 등의 방법을 준용하여 아래와 같이 등급을 매겼다[11,12].

0 등급, 붉은 신경세포 없음(no red neuron detected)

1 등급, 붉은 신경세포 전체 신경세포의 15% 미만(red neurons < 15% of total neurons)

2 등급, 붉은 신경세포가 전체 신경세포의 15% 이상(red neurons > 15% of total neurons)

3 등급, 회색질의 25% 미만의 경색(focal and mild infarc-

tion < 25% of gray matter)

4 등급, 회색질의 25% 이상의 경색(diffuse and severe infarction > 25% of gray matter)

각 실험군에 병리학적 등급을 매긴 후에 전체 32마리의 실험동물의 병리학적 등급과 신경학적 평가 사이의 상관관계를 측정하였고 실험군 간과 실험군 내의 병리학적 등급의 비교는 신경학적 평가와 동일한 방법으로 시행하였다.

(2) TUNEL assay: Apoptosis의 정도를 정량화하기 위해서 2일째 희생시킨 실험군과 대조군을 대상으로 TUNEL 분석을 시행하였다. TUNEL 분석은 TACS™ 2 TdT-DAB In Situ Apoptosis Detection Kit (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하였다.

병리조직학적 분석을 시행하였던 척수 절편에서 허혈성 변화가 가장 심한 절편에서 TUNEL 염색에 양성인 신경세포의 수를 측정하였다.

(3) Heat shock protein-70과 Neuronal nitric oxide synthase (nNOS)에 대한 면역조직화학검사: HSP70과 nNOS에 대한 면역조직화학검사를 시행하였으며 정량적으로 분석하기 위해서, 음성인 예를 0, 신경세포의 세포막에서만 발현한 경우를 1+, 신경세포의 세포막과 세포질에서 발현한 경우를 2+, 신경세포의 세포질과 핵 모두에서 발현한 경우를 3+로 분류하였다. 발현 정도가 2+ 및 3+인 경우를 과발현으로 정의하여 실험군과 대조군 간 과발현에 대해 비교하였다.

6) 통계적 처리

자료의 분석 및 통계 처리는 전문 통계 프로그램 패키지인 SPSS (version 10.0 for windows)를 이용하였으며, 모든 연속변수는 평균±표준편차로 나타내었으며, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 하였다. 마취 유도 후 대동맥 차단 전, 대동맥차단 후 10분, 대동맥 재관류 10분 후에 혈류역학적 변화 중 평균 동맥압, 맥박수를 측정하였고 그 외 동맥혈 가스 분석, 혈당, 혈색소를 각각 측정하여 각각의 변수에 대하여 Kruskal-Wallis로 그룹 간 비교를 하였으며 대동맥 차단 전후에 각각의 변수의 변화는 대동맥 차단 전 값을 기준으로 Mann-Whitney rank sum법으로 검정하였다. Tarlov 점수와 변성된 신경세포의 비율 사이의 연관성은 Spearman rank order correlation 법으로 검정하였으며 각 군 간의 변성된 신경세포의 비율에 따른 조직학적 등급과 Tarlov 점수를 이용한 신경학적 평가는 Mann-Whitney rank sum법으로 검정하였다.

Table 1. Hemodynamic and temperature data, blood gas, hemoglobin and glucose

	Group	Preischemia	Intraischemia	Postischemia
HR, beats/min	I7	170±39	153±32*	202±44
	Cs7	179±27	191±48	227±37*
	I2	168±24	181±19	205±21*
	Cs2	191±36	187±50	211±41
MAP, mmHg, ear arteryg	I7	74±7.4	77±11.3	62±8.1*
	Cs7	76±9.5	70±12.7	59±12.9*
	I2	77±9.1	74±9.4	58±6.8*
	Cs2	75±6.3	76±12.8	66±14.0*
Temperature, °C, rectum	I7	39.2±0.7	38.7±0.7	38.1±0.7
	Cs7	39.8±1.1	39.3±1.1	38.7±1.1
	I2	39.9±0.8	39.4±0.8	38.7±0.7
	Cs2	39.5±0.5	39.7±0.6	39.0±0.3
PaO ₂ , mmHg	I7	303.0±143.3	340.6±132.7	399.0±28.4
	Cs7	373.1±98.5	407.4±93.6	443.1±61.9
	I2	348.5±106.2	376.0±89.9	373.4±96.9
	Cs2	414.2±64.8	381.6±91.5	405.9±28.2
PaCO ₂ , mmHg	I7	37.6±8.0	39.1±7.8	44.1±10.6*
	Cs7	45.0±8.5	43.1±7.9	49.9±9.2
	I2	40.3±6.8	38.4±8.5	47.5±3.9*
	Cs2	39.2±6.5	45±5.9*	47.1±7.2*
pH	I7	7.36±0.07	7.38±0.04	7.36±0.08
	Cs7	7.33±0.05	7.34±0.07	7.30±0.08*
	I2	7.33±0.04	7.36±0.05	7.29±0.04
	Cs2	7.33±0.04	7.34±0.04	7.31±0.05
Hb, g/dL	I7	9.9±1.1	10.3±1.4	9.2±1.1
	Cs7	11.1±1.4	10.4±1.4	9.9±1.3*
	I2	11.0±1.5	10.8±1.2	9.4±1.4*
	Cs2	10.7±1.7	10.6±0.9	9.5±1.4
Glucose, mg/dL	I7	119.5±48.1	125.3±47.8	109.0±35.8
	Cs7	127.4±33.0	130.3±41.5	132.0±35.4
	I2	112.6±48.9	124.5±65.9	107.2±57.4
	Cs2	128.8±35.7	155.0±40.0*	139.5±44.9

*p<0.05 vs preischemia. Values are means±SD. HR=Heart rate; MAP=Mean arterial pressure.

결 과

1) 수술 후 일반적 사항

몸무게 3 kg 정도의 토끼 복부대동맥의 직경은 약 3 mm 정도였으며 모든 토끼에서 좌측 옆구리를 통한 후복막 접근으로 복부대동맥과 이에서 나오는 좌측 신동맥을 쉽게 확인할 수 있었으며 복부대동맥을 신동맥 직하방에서 쉽게

차단할 수 있었다. 수술에 따른 혈액학적 변화와 직장온도, 동맥혈가스검사와 혈당, 혈색소는 Table 1에 제시하였다. 혈액학적 변화는 대동맥 재관류 후 모든 군에서 대동맥 차단 전에 비해 의미 있게 평균동맥압이 감소하였으며 심박동수의 증가가 의미 있던 군이 있었다. 직장온도는 모든 군에서 수술 내내 37°C 이상으로 유지되었다.

Table 2. Neurologic outcome on the day 2 and 7 after ischemia

Tarlov score	Group I2 (n=8)	Group Cs2 (n=8)	Group I7 (n=8)	Group Cs7 (n=8)*†
Day 2				
4	0	0	1	0
3	0	0	2	2
2	2	6	1	3
1	2	2	0	3
0	4	0	4	0
Day 7				
4			0	2
3			2	2
2			2	4
1			0	0
0			4	0

*=Group I7 vs group Cs7 on the day 7 ($p < 0.05$); †=On the day 2 vs on the day 7 of group Cs7 ($p < 0.05$).

Table 3. Histopathologic grade

Grade	Group I2 (n=8)	Group Cs2 (n=8)	Group I7 (n=8)	Group Cs7 (n=8)*
Day 2				
4	2	1		
3	1	2		
2	4	0		
1	1	4		
0	0	0		
Day 7				
4			2	0
3			0	0
2			4	1
1			1	6
0			1	1

*=Group I7 vs group Cs7 on the day 7 ($p < 0.05$).

2) 신경학적 기능평가

Tarlov score에 따른 신경학적 평가의 결과를 Table 2에 기록하였으며 각 군의 평균을 막대 그래프로 표시하였다 (Fig. 1). 신경학적 평가는 술 후 2일째 신경학적 평가에 있어서는 Tarlov score의 평균이 I2군 0.75 ± 0.89 , I7군이 1.5 ± 1.69 , Cs2군이 1.75 ± 0.46 , Cs7군이 1.87 ± 0.83 이었으

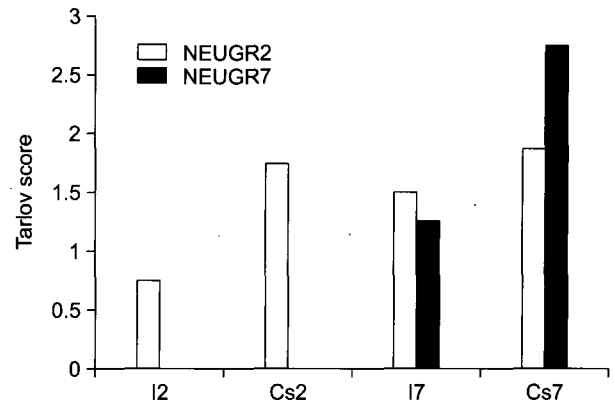


Fig. 1. Mean neurologic grade by Tarlov score. NEUGR2=Neurologic grade on the second day after operation; NEUGR7=Neurologic grade on the seventh day after operation.

며 크게 대조군과 실험군 둘로 나누어 비교하였을 때 대조군인 I2군과 I7군이 1.13 ± 1.81 , 실험군인 Cs2군과 Cs7군이 1.81 ± 0.66 으로 차이가 없었다($p > 0.05$). 술 후 2일째 I2군과 Cs2군은 조직학적 검사를 위해 희생시켰기 때문에 술 후 7일째 I7군과 Cs7군만 신경학적 검사를 시행하였고 Cs7군이 평균 2.75 ± 0.89 로 투여하지 않은 I7군의 1.25 ± 1.39 에 비해 의미 있게 높아 신경학적평가상 우수함을 알 수 있었다($p < 0.05$). 또한 대조군 I7군에서는 신경학적 평가가 2일째보다 7일째 악화하는 경향이었으나 통계학적으로 의미 있게 나오지 않았고 실험군 Cs7군에 있어서는 신경학적 평가가 2일째 1.87 ± 0.83 에 비해 7일째 2.75 ± 0.89 로 의미 있게 호전되었다($p < 0.05$, Fig. 1).

3) 병리학적 검사 결과

(1) **Hematoxylin-eosin 염색과 Luxol-fast blue 염색:** 신경세포는 그 크기와 형태에 따라 세 종류로 분류할 수 있었다. 첫째, Nissl 소체를 풍부하게 갖고 있는 커다란 신경세포는 허혈성 변화를 전혀 보이지 않는 정상적인 형태를 유지하고 있었다(Fig. 2C). 둘째, 소수의 Nissl 소체를 보이거나 Nissl 소체가 없이 세포질은 응축되어 있으나 핵소체는 유지하고 있는 작은 신경세포는 허혈성 변화를 보이지만 아직 비가역적인 세포사의 단계에는 이르지 않은 형태라고 추정되었다(Fig. 2B). 셋째, 비가역적인 허혈성 변화로 잘 알려져 있는 red neuron의 전형적인 형태를 보이는 세포도 관찰되었으며, 이러한 red neuron은 경색 주위에서 흔히 관찰되었다(Fig. 2A).

각 실험군을 조직학적 등급과 신경학적 등급 간의 상관

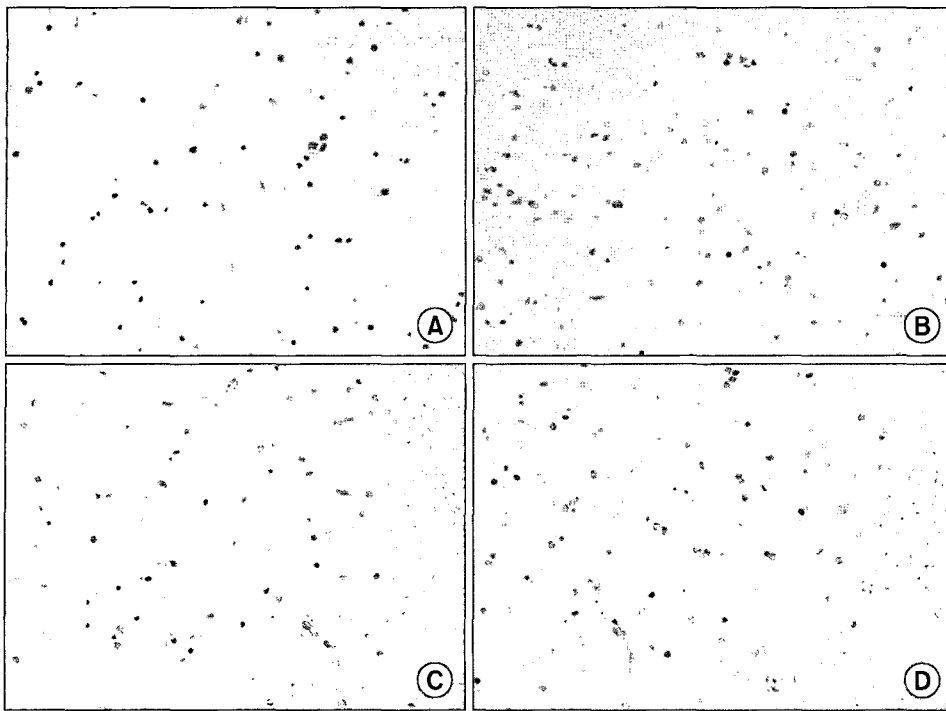


Fig. 2. Representative photographs of spinal cord sections stained with hematoxylin & eosin. (A) Red neurons with pyknotic nuclei and eosinophilic cytoplasm (H&E, ×400). (B) Small neurons with shrunken cytoplasm and scanty Nissl substances in the cytoplasm (H&E, ×400). (C) Large neurons with numerous Nissl substances, abundant cytoplasm and prominent nucleoli (H&E, ×400). (D) Comparison of large neurons and small neurons (H&E, ×400).

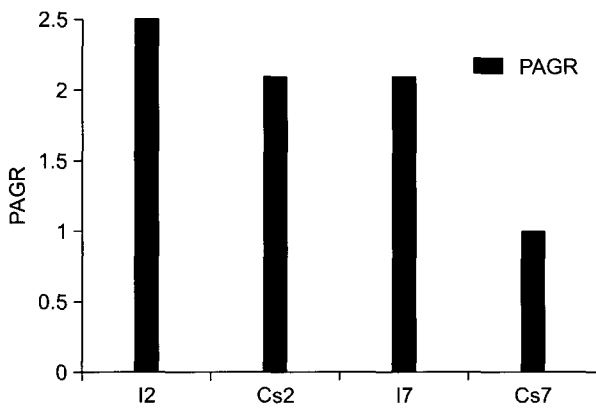


Fig. 3. Mean pathologic grade in each group. PAGR=Pathologic grade.

관계를 분석하였는데 상관계수 -0.44 로 조직학적 손상 정도와 신경학적 평가 사이에 유의한 관계가 있었다($p=0.009$). 각 군의 병리조직학적등급의 검사결과를 Table 3에 기재하였으며 I2군이 2.5 ± 1.07 , Cs2군이 2.13 ± 1.25 로 2일째 희생시킨 대조군과 실험군 사이에는 유의한 차이가 없었으나 7일째 희생시킨 대조군 I7군은 2.13 ± 1.36 이었으나 실험군 Cs7군은 1.0 ± 0.53 으로 두 그룹 간 유의한 차이가 있어 병리학적으로도 cyclosporin A를 투여한 실험군 Cs7군이 대조군 I7군에 비해 덜 손상을 받았음을 알 수 있었다($p=0.039$, Fig. 3).

(2) TUNEL assay: 실험군과 같은 조건으로 동시에 염색하여 양성 대조군으로 사용한 편도조직에서 TUNEL 염색에 양성인 세포는 편도의 여포에 분포하고 있어서, TUNEL 염색이 기술적인 문제 없이 성공적으로 시행되었음을 확인하였다(Fig. 4A).

실험군에서 양성반응은 세포의 핵에서 관찰되었으며, 양성반응을 보이는 아교세포(glial cell)는 제외하고 양성반응을 보이는 신경세포의 수를 측정하였다. 양성반응을 보이는 신경세포의 수는 대조군 I2군이 17.5 ± 22.6 개였고 실험군 Cs2군이 12.5 ± 11.1 개로 실험군이 양성인 수가 적어 보였으나 통계학적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$).

TUNEL 염색에 양성인 신경세포는 경색 주위에서 흔히 관찰되었으며, 병리학적 검사에서 red neuron의 형태를 보인 세포들이 TUNEL 염색에 양성을 보였기 때문에 형태학적인 분석과 TUNEL 분석은 일치하는 소견을 보였다. Cyclosporin A를 처리하지 않은 대조군에서 TUNEL 염색에 양성인 신경세포는 경색 주위에서 고밀도로 관찰되었으며(Fig. 4B), 실험군에서는 상대적으로 저밀도의 양성세포가 경색주위에 관찰되거나(Fig. 4C) 경색이 없는 경우에는 양성세포가 거의 관찰되지 않았다(Fig. 4D).

(3) HSP70과 nNOS에 대한 면역조직화학검사: 면역조직화학검사에서 HSP70과 nNOS는 신경세포의 세포막 및 세포질 혹은 핵에서 발현하였다. 경색의 주위에서 신경세

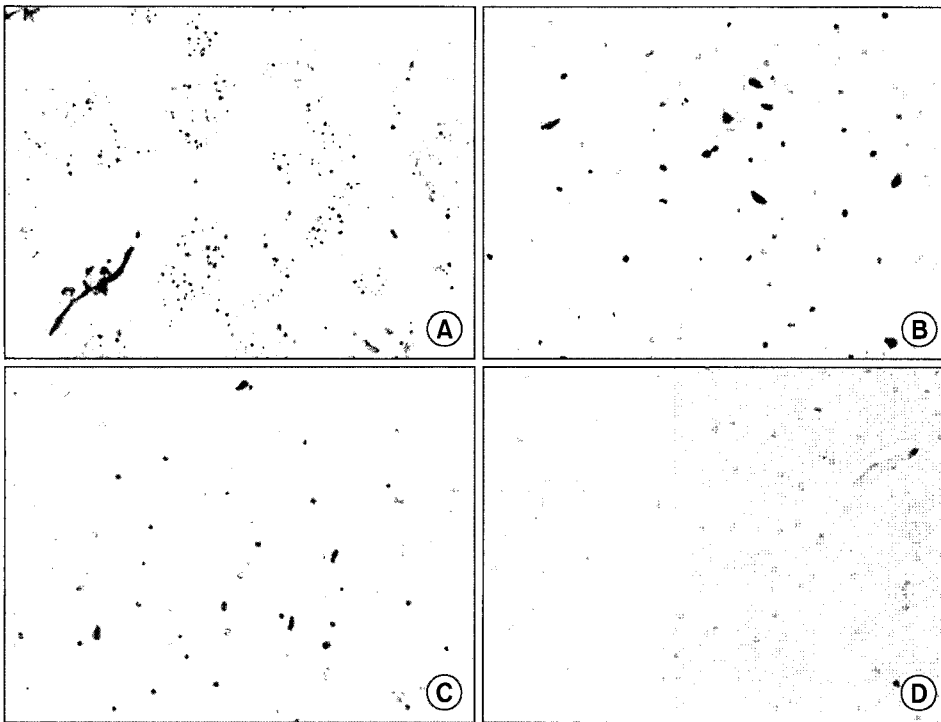


Fig. 4. Representative photographs of spinal cord sections stained with TUNEL assay. (A) Note TUNEL-positive cells in lymphoid follicles of palatine tonsil as a positive control (TdT, $\times 40$). (B) Note many red neurons with TUNEL-positive nuclei in a control group (TdT, $\times 400$). (C) Note scattered red neurons with TUNEL-positive nuclei in an experimental group (TdT, $\times 400$). (D) No neuron expresses TUNEL-positivity in an experimental group (TdT, $\times 400$).

포는 핵과 세포질 모두에서 강하게 HSP70과 nNOS를 발현하였고, 이 세포들은 TUNEL 염색에서 양성을 보인 신경세포의 분포와 상당히 일치하였다.

대조군에서는 8예 중 3예에서 HSP-70의 과발현을 보인 반면 실험군에서는 8예 중 7예에서 HSP-70의 과발현을 보여, 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). nNOS의 과발현은 대조군에서는 8예 중 4예에서 nNOS의 과발현을 보인 반면 실험군에서는 8예 중 8예 모두에서 nNOS의 과발현을 보여, 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$).

nNOS에 대한 면역조직화학검사와 HSP70에 대한 면역조직화학검사 결과를 서로 비교분석 하였더니, nNOS와 HSP70의 발현은 강한 연관성을 보였다(상관계수 0.91, $p = 0.000$), nNOS를 발현하는 세포가 동시에 HSP70도 발현함을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 따라서, Cyclosporin A를 처리한 실험군에서 관찰되는 신경보호효과가 nNOS와 HSP70의 발현 및 활성화와 연관되어 있음을 시사하였다.

고 찰

이 실험에서 cyclosporine A는 토끼의 25분간의 척수허혈 모델에서 병리 조직학적, 신경학적 검사에서 보듯이 허혈로 인한 척수의 신경손상을 줄여주었다. Cyclosporine

A의 용량은 이전에 보고된 논문을 참조로 하였으며 토끼의 고동맥을 통한 도관의 풍선확장에 의한 척수허혈의 유발보다는 저자들의 방법이 좀 더 임상상황을 잘 반영한다고 생각했다[5]. 실험은 결과에서처럼 특별한 문제 없이 시행되었으며 실험군은 7일째만 대조군에 비해 손상을 덜 받은 것으로 나타났는데 이는 이전 실험에 비해 허혈시간이 길었기 때문이라고 생각한다[5]. 이러한 결과를 실험 전 어느 정도 예측하였으나 심한 척수허혈손상에도 cyclosporin A가 신경보호효과가 있음을 보려고 하였다.

세포자멸사(apoptosis)를 분석하기 위해 TUNEL 염색을 술 후 2일째 시행하였는데 두 군 간 차이가 없었다. 이러한 결과는 이전 보고에서 cyclosporin A가 15분간의 척수허혈 후 세포자멸사를 줄이는 기전을 통하여 척수 보호 효과가 있었다는 보고와는 다른 결과이다[5]. 이는 실험군에서 경색이 있던 경우 주위에 많은 TUNEL 양성세포가 나타나 대조군과 차이가 유의하지 않았으며 이는 긴 허혈시간에 의한 심한 손상이 원인인 것 같고 cyclosporine A의 신경보호효과가 세포자멸사를 줄이는 것 외에 다른 기전이 있음을 암시한다고 생각한다. 또한 세포자멸사가 재관류 없이 허혈만으로 유발될 수 있으며 세포자멸사의 정도가 허혈 시간에 비례한다는 보고가 있으며, TUNEL 염색이 세포자멸사에 특이적이지 않으며 괴사된 세포도 양성

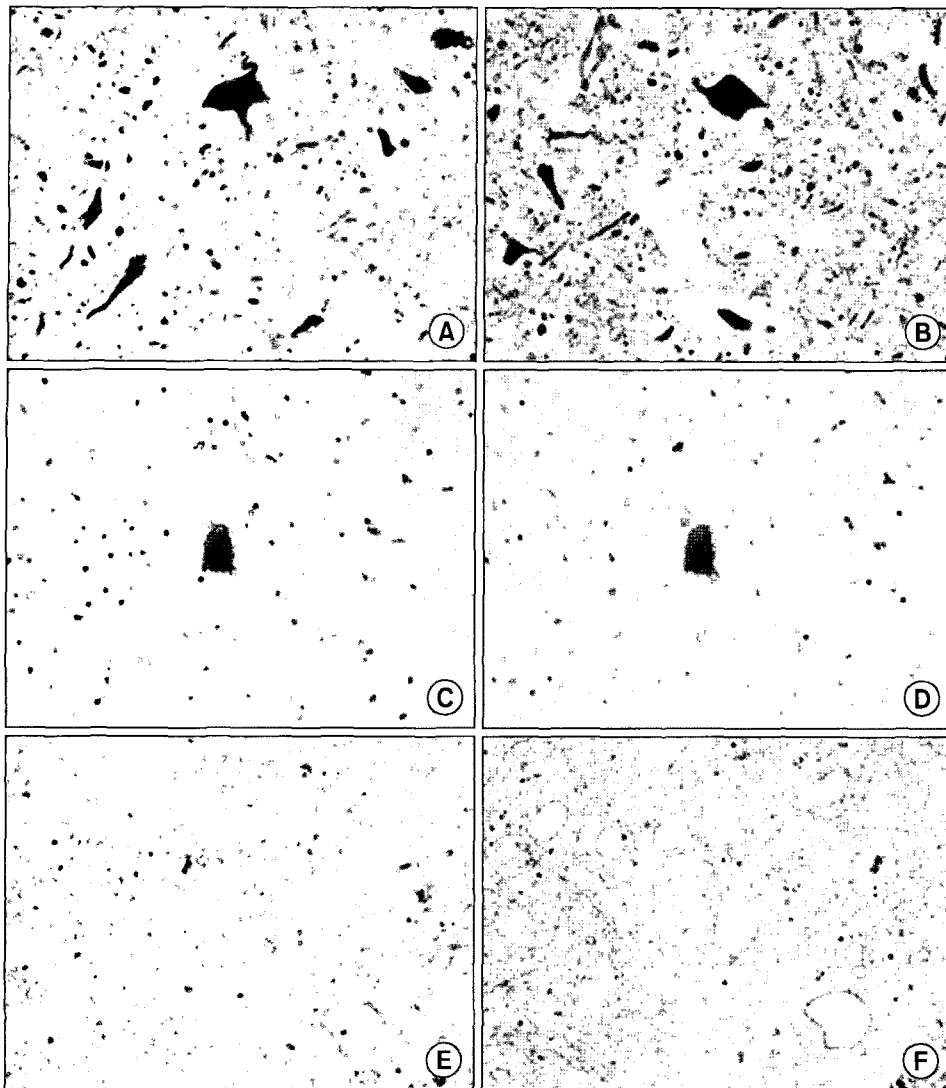


Fig. 5. Expression of both nNOS and HSP-70 in the same neurons. Compare expression of nNOS (A, C and E) and HSP-70 (B, D and F) and note expression of both nNOS and HSP-70 in the same neurons. (A) Note strong expression of nNOS in both cytoplasm and nuclei of neurons in a control group (nNOS, $\times 400$). (B) Note strong expression of HSP-70 in both cytoplasm and nuclei of neurons in the same case with A (HSP70, $\times 400$). (C) Note focal strong cytoplasmic expression and diffuse weak membranous expression of nNOS in an experimental group (nNOS, $\times 400$). (D) Note focal strong cytoplasmic expression and diffuse weak membranous expression of HSP-70 in the same case with C (HSP70, $\times 400$). (E) Note expression of nNOS in the cytoplasmic membrane of neurons in an experimental group (nNOS, $\times 400$). (F) Note expression of HSP-70 in the cytoplasmic membrane of neurons in the same case with E (HSP70, $\times 400$).

으로 나올 수 있다고 한다[13,14]. 따라서 저자들의 TUNEL 염색 허혈시간이 25분간으로 길었다는 점, 허혈 후 cyclosporin A를 투여한 점, 괴사된 신경세포의 양성반응 등의 영향을 받을 수 있었다고 생각한다.

HSP70은 스트레스 상황에서 과발현되며 “force-generating protein”으로 알려져 있다[15]. HSP70의 과발현은 세포가 저산소증, 허혈, 산화제, 독성물질, 이산화질소(NO₂) 등에 저항을 갖도록 한다[16,17]. 근래에 HSP70이 뇌경색에 대해 신경보호효과가 있었음이 알려졌으며 이러한 보호기전은 HSP70이 chaperone으로서 기능하기 때문으로 생각하고 있다[18]. 세포내 단백질의 변형을 일으키는 허혈, 열 손상, 중금속, 저혈당 등의 모든 자극에 HSP70의 활성화가 유도되며 HSP70의 과발현은 HSP90 또는 다른 chap-

erone과 함께 변형된 단백질을 복원(re-nature)시킨다고 하며 분자적인 반응영 부위(molecular penumbra)에서 HSP70의 세포보호기능이 부각되고 있다[19]. 반응영 부위는 경색과 선택적 신경세포사망 부위 너머로 넓게 존재한다고 한다. 본 실험에서 대조군과 실험군에 있어 TUNEL 염색이 차이가 없었으나 술 후 2일째 실험군에서 HSP70의 과발현이 대조군에 비해 유의하게 높은 점으로 미루어 선택적 신경세포 사망 부위에서는 차이가 없었으나 반응영 부위에서 실험군이 HSP70의 과발현으로 세포보호가 더 잘 되었음을 유추할 수 있겠다. 또한 이러한 결과가 술 후 7일째 대조군에 비해 실험군에서 신경학적, 병리조직학적으로 덜 손상 받은 것을 설명해줄 수 있다고 생각한다.

뇌에서 허혈, 저산소증으로 칼슘이온의 신경세포내 유입

이 일어나고 이것이 NOS의 활성화를 일으켜 산화질소가 생성된다[20]. NOS에는 세 종류의 isoform이 있으며 inducible NOS (iNOS), neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS)가 있다. NOS는 isoform에 따라 신경보호적이거나 신경독성인 것으로 알려져 있으며 nNOS와 iNOS는 신경독성인 것으로 알려져있다. 그러나 본 연구에서 nNOS가 대조군에 비해 실험군에서 유의하게 과발현이 많았으며 HSP70의 과발현과 강한 연관성이 있었다. nNOS의 과발현이 cyclosporin A의 신경보호효과의 결과물인지 부작용인지에 대해서는 연구가 더 필요하다고 생각한다.

결 론

우리는 cyclosporin A가 토끼의 25분간의 척수허혈에 대해 척수보호효과가 있었으며 이는 세포자멸사의 감소보다는 HSP70의 과발현으로 인한 반음영부위에서의 세포보호기전과 연관이 있으리라 생각한다.

참 고 문 헌

1. Mauncy MC, Blackbourne LH, Langenburg SE, Buchanan SA, Kron IL, Tribble CG. *Prevention of spinal cord injury after repair of the thoracic or thoracoabdominal aorta.* Ann Thorac Surg 1995;59:245-52.
2. Coselli JS, Conflin LD, LeMaire SA. *Thoracoabdominal aortic aneurysm repair: review and update of current strategies.* Ann Thorac Surg 2002;74:S1881-4.
3. Kuniyoshi Y, Koja K, Miyagi K, et al. *Prevention of postoperative paraplegia during thoracoabdominal aortic surgery.* Ann Thorac Surg 2003;76:1477-84.
4. Shiga Y, Onodera H, Matsuo Y, Kogure K. *Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain.* Brain Res 1992;595:145-8.
5. Sato M, Horinouchi T, Sakurai M, Murakami N, Sato S, Kato M. *Cyclosporin A reduces delayed motor neuron death after spinal cord ischemia in rabbits.* Ann Thorac Surg 2003;75:1294-9.
6. Lee CH, Choi KY, Kim YJ, Kim WG. *Neuroprotective effect of KR-31,378, a novel potassium channel activator, on spinal cord ischemic injury in rabbits.* J Invest Surg 2005; 18:297-304.
7. Johnson SH, Kraimer JM, Graeber GM. *Effects of flunarizine on neurological recovery and spinal cord blood flow in experimental spinal cord ischemia in 20 rabbits.* Stoke 1993; 24:1547-53.
8. Cassada DC, Tribble CG, Long SM, et al. *Adenosine A_{2A} agonist reduces paralysis after spinal cord ischemia: correlation with A_{2A} receptor expression on motor neurons.* Ann Thorac Surg 2002;74:846-50.
9. Chen HW, Chien CT, Yu SL, Lee YT, Chen WJ. *Cyclosporin A regulate oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanism via ROS generation, iNOS and Hsp 70.* Br J Pharmacol 2002;137:771-81.
10. Tarlov IM. *Spinal cord compression: mechanisms of paralysis and treatment.* Springfield: Charles C Thomas. 1957.
11. Wakamatsu Y, Shiiya N, Kunihara T, Watanabe S, Yasuda K. *The adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener nicornadil protects the ischemic rabbit spinal cord.* J Thorac Cardiovasc Surg 2001;122:728-33.
12. Caparrelli DJ, Cattaneo SM 2nd, Bethea BT, et al. *Pharmacological preconditioning ameliorates neurological injury in a model of spinal cord ischemia.* Ann Thorac Surg 2002; 74:838-45.
13. Borutaite V, Jekabsone A, Morkuniene R, Brown GC. *Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia.* J Mol Cell Cardiol 2003;35:357-66.
14. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. *A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis.* Neuroreport 1995;7:61-4.
15. Glick BS. *Can HSP70 proteins act as force-generating motors?* Cell 1995;80:11-4.
16. Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, Brunton LL, Dillmann WH. *Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocyte.* Circulation 1997;96:4343-8.
17. Xu Q, Hu Y, Kleindienst R, Wick G. *Nitric oxide induces heat shock proteins 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor I.* J Clin Invest 1997;100:1089-97.
18. Rajdev S, Hara K, Kokubo Y, et al. *Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction.* Ann Neurol 2000;47:779-82.
19. Sharp AR, Lu A, Tang Y, Milhorn DE. *Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia.* J Cereb Blood Flow Metab 2000;20:1011-32.
20. Yan XB, Meng FJ, Zhang GY. *Brain ischemia induces serine phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase by Ca (2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in rat hippocampus.* Acta Pharmacol Sin 2004;25:617-22.

=국문 초록=

배경: 토끼의 25분간의 척수허혈 모델에서 cyclosporin A의 신경보호효과를 신경병리학적 연관성과 면역조직화학적분석을 통하여 알아보려고 하였다. 대상 및 방법: 몸무게가 3.0 kg 전후의 뉴질랜드산 토끼를 이용하였고 복부 대동맥을 25분간 차단하였다. 32마리의 토끼를 무작위로 4군으로 나누어 대조군인 I2군(n=8)과 I7군(n=8)은 복부 대동맥 차단만 시행한 후 I2군은 2일째, I7군은 7일째 희생시켜 신경학적 평가와 조직학적 검사를 시행하였다. 실험군인 Cs2군(n=8)과 Cs7군(n=8)은 복부 대동맥을 차단 후 재관류 15분 후에 cyclosporin A (25 mg/kg)를 정맥 주입한 후 Cs2군은 2일째, Cs7군은 7일째 희생시켜 신경학적 평가와 조직학적 검사를 시행하였다. 결과: 모든 토끼가 술 후 생존하였으며 술 후 2일째 신경학적 평가에 있어서는 군들 간 차이가 없었으나 술 후 7일째 시행한 평가에서 복부대동맥 허혈 후 cyclosporin A를 투여한 Cs7군의 Tarlov score가 평균 2.75 ± 0.89 로 투여하지 않은 I7군의 1.25 ± 1.39 에 비해 의미 있게 높아 신경학적 평가상 덜 손상을 받았음을 알 수 있었다($p < 0.05$). 또한 대조군 I7군에서는 신경학적 평가가 2일째보다 7일째 악화하는 경향이었으나 통계학적으로 의미 있는 차이는 없었고 실험군 Cs7군에 있어서는 신경학적 평가가 2일째 1.87 ± 0.83 에 비해 7일째 2.75 ± 0.89 로 의미 있게 호전되었다($p < 0.05$). 모든 군을 조직학적으로 손상의 정도에 따라 등급을 매겼으며 신경학적 평가와의 상관관계를 분석하였는데 상관계수 -0.44 로 조직학적 손상도와 신경학적 평가 사이에 유의한 관계가 있었다($p=0.009$). 병리조직학적 등급을 4군 간 비교하였을 때 2일째 희생시킨 대조군과 실험군 사이에는 유의한 차이가 없었으나 7일째 희생시킨 I7군은 조직학적 등급이 2.13 ± 1.36 이었으나 Cs7군은 1.0 ± 0.53 으로 두 군 간 유의한 차이가 있어 병리학적으로도 cyclosporin A를 투여한 실험군 Cs7군이 대조군 I7군에 비해 덜 손상을 받았음을 알 수 있었다($p=0.039$). I2군과 Cs2군에서 TUNEL 염색에 양성반응을 보이는 신경세포의 수는 I2군이 17.5 ± 22.6 개였고 Cs2군이 12.5 ± 11.1 개로 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. Heat shock protein-70 (HSP70)과 neuronal nitric oxide synthase (nNOS)에 대한 면역조직화학적검사에서 실험군 Cs2군의 신경세포가 대조군 I2군에 비해 HSP70과 nNOS의 과발현을 보였으며, 이는 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). nNOS와 HSP70의 발현은 강한 연관성을 보였고(상관계수 0.91, $p=0.000$), nNOS를 발현하는 세포가 동시에 HSP70도 발현함을 확인할 수 있었다. 결론: 우리는 cyclosporin A가 토끼의 25분간의 척수허혈에 대해 척수보호 효과가 있었으며 이는 HSP70의 과발현과 연관이 있으리라 생각한다.

- 중심 단어 : 1. 허혈
2. 척수
3. 사이클로스포린