

척수 손상 후 신경의 회복면에서 Aminoguanidine과 Methylprednisolone 동시 투여의 효과

이현호 · 양준영 · 이준규

충남대학교 의과대학 정형외과학교실

The Impact of Combined Treatments with Aminoguanidine and Methylprednisolone on Neurological Recovery after Spinal Cord Injury

Hyun-Ho Lee, M.D., Jun-Young Yang, M.D., and June-Kyu Lee, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Chungnam National University School of Medicine, Daejeon, Korea

Purpose: To evaluate the effect of a combined treatment with aminoguanidine (AG) and methylprednisolone (MP) on the neurological recovery after a spinal cord injury (SCI).

Materials and Methods: SCI models (weight-drop) of Sprague Dawley rat were divided into 4 groups after the SCI. Group I was injected with normal saline, Group II with MP, Group III with AG and Group IV with MP and AG. The behavioral and immunohistochemical changes along with RT-PCR of TNFRI, TNFRII, XIAP, IL-6, and IL-6R were analyzed quantitatively and compared.

Results: At 7 days, motor recovery was observed in groups II, IV, III, and I with the level of improvement increasing in that order. Neuron cells were observed in groups II, IV=III, and I. TNFRI was not expressed in group I, but was expressed at a similar level in groups II, III and IV. TNFRII was expressed the most in group II but was not expressed in group I. The level of XIAP expression was similar to that of TNFRII. Groups II and IV showed almost no IL-6 expression, while groups I and III showed similar levels of expression. IL-6R showed an opposite pattern to IL-6.

Conclusion: Both drugs have a neuroprotective effect but there was no synergistic effect for simultaneous administration.

Key Words: Spinal cord injury, Methylprednisolone, Aminoguanidine

서 론

현재까지 척수 손상의 치료를 위한 다양한 기초 연구는 척수 손상 후 발생하는 이차적인 변화, 즉 신경 병리학적인 면에서 여러 단계적 반응들을 조절할 수 있는 인자의 규명에 초점이 맞추어지고 있으며⁴⁾, 약리학적 화합물의 혼합체나 신경보호 물질들의 적극적인 개발이 시도되고 있다. 즉, 급성기 변화를 최소화하기 위한 연구들은 현재 관심의 대상이 되고 있는 줄기세포 이식 등의 연구와 더불어 많은 연구가 진행 중이다.

그러나, 현재까지 신경 보호물질들로 알려진 약제들도

급성 척수 손상 후 필연적으로 발생하는 이차 손상의 일 부만을 차단하는 효과만이 있었을 뿐이며 또한 약제의 내 성 또는 독성이 완전 규명되지 않아 현재까지 기초 연구 에 머무르고 있는 실정이다.

Methylprednisolone은 현재 가장 신빙성이 있는 급 성 척수 손상 치료제일 것이다^{2,9)}. 작용 기전으로는 세포 외의 칼슘 농도를 상승시켜, 손상 받은 척수에 국소적으 로 혈관 확장을 유발하며, 또한 척수가 손상 받은 부위에 서 지질 과산화(lipid peroxidation)와 가수 분해를 억제 한다고 알려져 있다. 그러나 현재 임상에서 척수 손상 후

통신저자 : 양 준 영
대전시 중구 대사동 640
충남대학교 의과대학 정형외과학교실
TEL: 042-220-7351 • FAX: 042-252-7098
E-mail: jyyang@cnu.ac.kr

Address reprint requests to
Jun-Young Yang, M.D., Ph.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Chungnam National University
School of Medicine, 640, Daesa-dong, Jung-gu, Daejeon 301-721, Korea
Tel: +82,42-220-7351, Fax: +82,42-252-7098
E-mail: jyyang@cnu.ac.kr

national acute spinal cord injury study (NASCIS) 방법에 따라 이 약제가 투여되고 있으나 효과에 의문점이 있다는 보고와 함께 이 약제의 독성과 후유증 등의 문제로 아직 해결되어야 할 문제가 많다⁶⁾.

Aminoguanidine은 염증성 질소산화 합성제(inflammatory nitric oxide synthase, iNOS)를 억제하는 물질이다. iNOS는 신경 손상 시 신경 회복을 방해하는 물질로 알려져 있으며, 뇌 허혈이나 외상 시에 aminoguanidine을 투여하면 iNOS 활성도가 감소되어, 괴사되는 신경 세포의 수를 감소시켜 척수공동화를 억제할 수 있다고 알려져 있다. 또한 aminoguanidine이 iNOS를 억제하는 작용 이외도 사이토카인 분비와 prostaglandin 합성 및 leukotrien 합성을 감소시켜 중추신경계 손상 후 발생하는 이차 손상 기전을 억제하여 신경 보호 작용을 한다고 알려져 있다^{12,17)}. 이러한 연구 결과를 토대로 본 연구에서는 척수 손상 모델에서 methylprednisolone과 aminoguanidine의 병용 투여를 시도하고, tumor necrosis factor receptor I, II, 세포 자멸사에 관여하는 X-linked apoptosis inhibitor protein (XIAP), 그리고 염증 매개 물질로 알려진 interleukin-6와 interleukin-6-receptor (IL-6-R)를 이용한 실험을 실시하여 과연 이 두 약제의 동시 투여가 척수 손상 후 신경 회복적인 면에서 어떠한 영향이 있는지에 관하여 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 평균 20주된 성숙 Sprague Dawley rat, 수컷을 사용하였고, 평균 체중은 563 g이었다. 수술시 케타민의 복강 내 주사로 마취시킨 후, 경막이 손상되지 않게 흉추 10번 부위에서 후궁절제(laminectomy)를 시행한 후, 10 g의 봉막대를 20 mm 높이에서 떨어뜨리는 방법으로 척수 손상을 유도하였으며 사용된 봉의 단면적은 지름이 3 mm였다. 척수 손상 후 각 동물의 뒷다리의 움직임을 평가하여 손상의 정도를 비교 평가하였다^{1,13)}.

척수 손상 후 약물은 복강 내로 투여하였으며, I군은 생리식염수(1 ml/kg)를, II군은 methylprednisolone (300 mg/kg)을, 그리고 III군은 aminoguanidine (100 mg/kg in saline, 1 ml)을 투여한 군, 그리고 methyl-

prednisolone과 aminoguanidine을 함께 투여한 군을 IV군으로 분류하였으며, 각 군에 사용된 실험동물은 10 마리씩이었다. 척수 손상을 하지 않은 쥐를 대조군으로 하였다. 각 군에서 사용된 약물의 용량은 양 등의 연구를 참고로 하였다¹⁵⁾. 그 후 표준화된 실험 동물의 수술 후 처치 방법에 따라 온도와 습도를 유지하였으며, 물과 먹이를 충분히 제공하였다.

요로 감염 및 방광 기능을 유지하기 위하여 인공 배뇨(2 times/day)를 시행하였고 술 후 3일간 cefazoline (0.5 mg/kg)을 투여하였다.

2. 운동 측정

운동 측정은 척수 손상 후 Basso-Beattie-Bresnahan 척도를 사용하여 시행하였다^{1,13)}.

3. 조직준비

척추 손상 후 1일, 3일, 5일 및 7일에 각각 쥐를 희생시켰다. 4% paraformaldehyde를 사용하여 관류고정을 실시하였으며, 조직절취는 횡단면(cross section)으로 척수 손상 부분의 위아래를 포함하여 조직을 절취하였다. 적출한 조직은 4% paraformaldehyde 용액에 24시간 동안 후고정하고, 30% sucrose 용액에서 하루 밤 동안 담가둔 후, 30 μ m 두께로 냉동절편하여 0.1 M phosphate buffered saline (PBS)가 들어 있는 24-well plate에 모았다. 7일째 희생된 쥐의 일부 손상된 척수 조직은 RT-PCR을 위하여 적출 즉시 RNA purification을 시도하였다.

4. 신경세포 염색

Neuron을 정확히 보기 위하여 본 연구에서는 Nissl stain cresyl violet을 이용하였다. 니슬 염색에서는 H-E 염색에서 관찰되는 모든 구조 외에 신경세포체의 니슬 소체가 뚜렷하게 관찰되므로 본 염색법을 이용하였다. 절제된 조직을 cresyl fast violet으로 30분간 염색한 후 증류수로 세척 과정을 거친다. 그 후 96% 알코올로 염색을 제거하고 xylene 처리 후 봉합하여 관찰하였다. 척수의 횡단면 조직에서 white matter의 전방에서 20 μ m 이상의 세포체를 보이면서 확실한 핵이 보일 때를 양성 세포로 간주하여 측정하였다.

5. TNFRI, II, XIAP, IL-6, IL-6-R의 RT-PCR

1) Probe 제작

TNFRI, TNFRII, XIAP, IL-6에 대한 primer를 사용하여 PCR (annealing 59°C, 35 cycle)을 실시하여 얻은 PCR product를 pGEM-T vector (Promega)에 T4 DNA ligase를 이용 ligation시키고 transformation한 후, DNA miniprep kit를 이용 cDNA를 얻었다. 각각의 plasmids에서 antisense probe 제작을 위해 SalI을 sense probe를 위해 NcoI으로 linearization 한 후, Sp6/T7 polymerase와 10 mM digoxigenin-11-UTP로 전사시켜 probe를 제작하였다.

2) RT-PCR procedures

척수조직을 신속히 추출한 다음 RNA Zol B kit를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 DEPC-treated DW에 녹이고, 2 µg 정도의 total RNA를 65°C에서 5분간 가열하여 denaturation 후 얼음에 급냉시켰다. RT buffer, dNTP, oligo-dT, RNase inhibitor, M-MLV reverse transcriptase를 적절히 가하고 42°C에서 1시간 반응시켜 template cDNA를 제작하였다. cDNA 산물을 99°C에서 5분간 가열 후 ice에서 급냉 후 -70°C에 보관하였다. PCR은 DNA 3 µl, 10xPCR buffer 5 µl, 2.5 mM dNTP 4 µl, forward primer (50 pmole/µl) 1 µl, reverse primer (50 pmole/µl) 1 µl, DW 35.75 µl, Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.25 µl를 넣어 총 50 µl 되게 하여 잘 혼합하였다. 반응이 일어나는 동안 반응 혼합액이 증발하지 않도록 반응 혼합액의 표면을 완전히 덮을 정도로 mineral oil을 한 방울 떨어뜨렸다. Thermocycler (Biometra)를 이용하여 94°C에서 5분간 1주기를 시행한 후 94°C에서 1분, 60°C (각 primer의 쌍의 Tm 값에 따라 일부 조정)에서 1분, 72°C에서 1분씩 25주기(증폭된 DNA의 양에 따라 각 유전자마다 주기 조정)를 반복 수행하여 DNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA를 회수하여 2% agarose gel에 전기영동 한 후 사진을 찍어 정량분석 하였다. 정량 분석은 β-actin을 대조군으로 하여 그 양의 변화를 비교 분석하였다.

6. 정량적 분석

척수 손상 후 neuron 양성세포 수는 두 명의 관찰자가

한 마리 쥐 당 무작위로 선택한 5 절편을 이용하여 200배 시야에서 neuron 양성세포 수를 세어 단위 면적(mm²)당 세포 수로 환산하여 평균치를 구한 후 비교하였으며, two-way ANOVA test를 사용하여 각 군의 차이를 비교하였으며, p<0.05 이하이면 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 각 군에서의 행동학적 변화

BBB 점수화 체계를 이용한 결과에서 척수 손상 후 1일째부터 3일째까지는 각 군 간에 통계적 차이를 볼 수 없으나, 5일째에는 II군이 가장 우수하였고, 다른 군과 통계학적 차이를 보였으며, 최종 7일째에 회복의 정도는 II군, IV군, III군, 그리고 I군 순이었다. II군과 나머지 군과는 통계학적 차이가 있었으며 III군과 IV군에서는 통계학적 차이가 없었다(Fig. 1).

2. 각 군에서의 조직학적 변화

각 군에서 정상 군과 비교시 회백질과 백색질에서의 정상 출혈의 정도에서 차이를 보이나, II군에서 회백질은 보존되는 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

3. 각 군에서의 Neuron의 변화

수상 후 1일째에는 각 군에서의 neuron 세포수의 평균은 I군부터 IV군순으로 각각 34.33±9.07, 41.00±6.56, 32.00±3.61, 28.67±4.73이었으며 정상군은

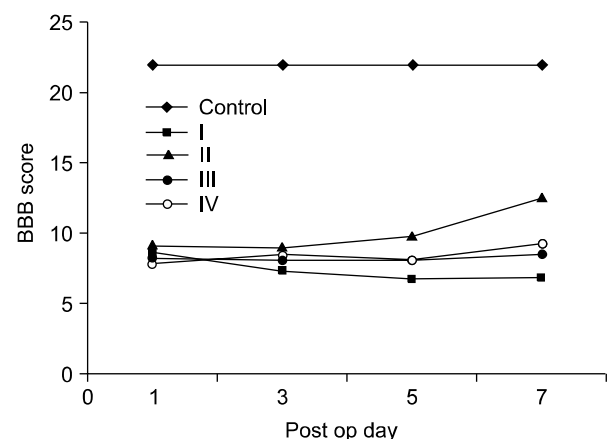


Fig. 1. Open field score of the hind limbs after the spinal cord injury in each group. An open field score of 0 means no observable hind limb movement and an open field score 21 means normal hind limb movement.

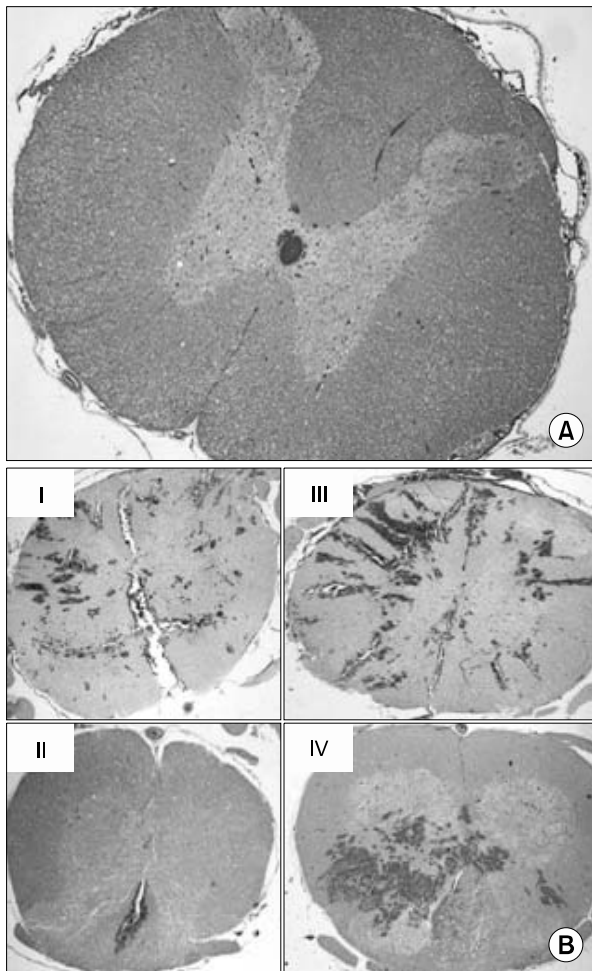


Fig. 2. (A) The findings of the normal spinal cord at 200 magnification, (B) The histology findings of each groups at 7 days after the SCI. The number means the group. There were differences in the degree and involvement of a petechial hemorrhage in each groups. The gray matter was preserved in group II.

43.30±2.75이었다. 수상 후 3일째에는 21.67±5.69, 33.67±4.04, 22.33±1.53, 24.33±3.06이었으며 5일째에는 13.33±0.58, 22.67±4.51, 17.33±2.08, 22.33±4.16이었으며 최종 7일째에는 9.33±1.53, 20.67±3.51, 17.00±1.73, 17.00±3.61로 각 군에서 측정되었다. II군에서 neuron 세포수가 가장 많이 관찰되었으나 나머지 군과 통계학적 차이는 없었고, 3일째에는 II, IV, III, I 순서로, 5일째에는 II=IV, III, I 순서로, 7일째에는 II, IV=III, I 순서로 neuron 세포수가 많이 관찰되었다. 통계학적 차이를 보이는 시기와 군은 3일째 II군과 나머지 군, 그리고 7일째 I군과 나머지 군에서 의미 있는 차이를 보였다(Fig. 3).

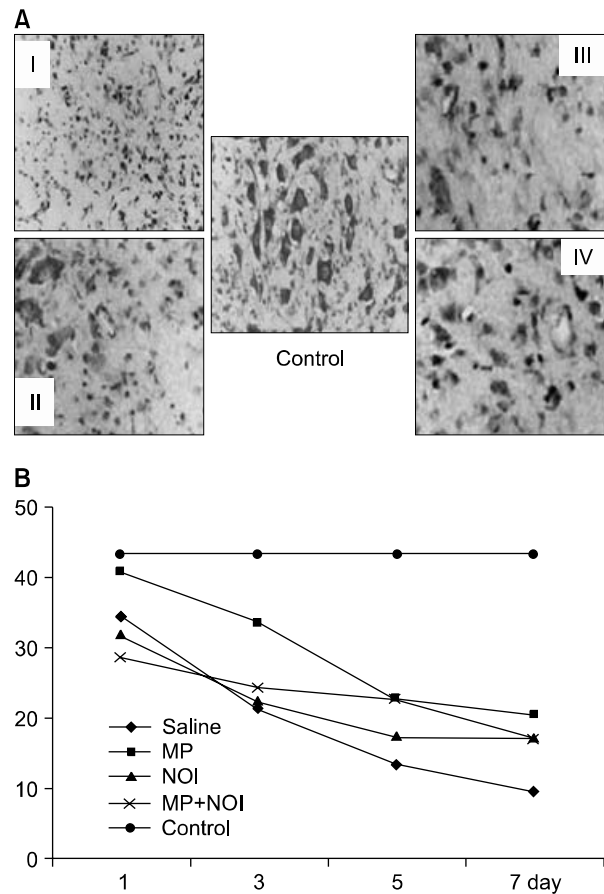


Fig. 3. (A) Nissle cresyl violet stain for each group. Note the differences in neuron cells in each group, (B) Graph showing the change in neuron cells in each group according to the time after the spinal cord injury.

4. TNFRI, TNFRII의 RT-PCR

각 인자에 대한 RT-PCR은 최종 7일째의 조직만을 이용하여 각 군을 비교하였다. 대조군으로 사용된 β -lactin의 양은 일정하게 관찰되어 RNA purification은 잘 이루어진 것으로 나타났다. TNFRI의 정량적 분석에서는 I군에서는 거의 발현이 되지 않았으나 II, III, IV군에서는 거의 동일한 발현 양상을 보였다. TNFRII에서는 II군에서 가장 많이 발현되었고 이 보다는 조금 감소된 양상이지만 비슷한 정도로 III군과 IV군에서도 발현되었다. 그러나 I군에서는 TNFRI와 유사하게 거의 발현이 되지 않았다(Fig. 4).

5. XIAP의 RT-PCR

세포 사멸의 조절과 관계된 XIAP의 발현 양상은

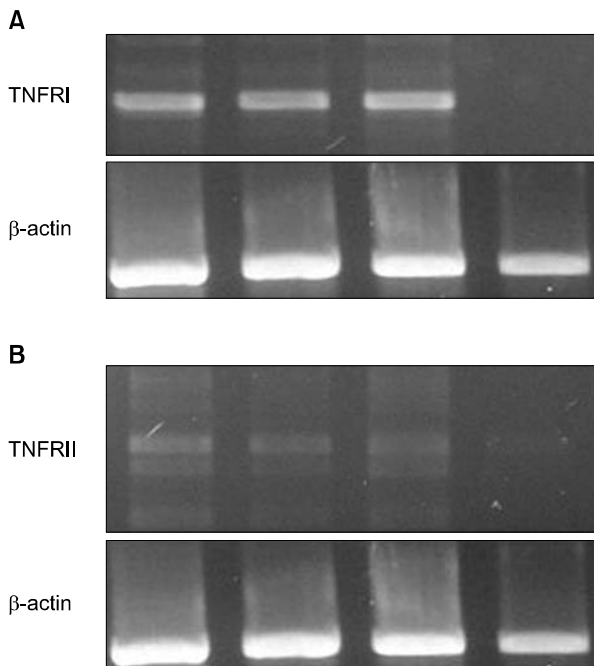


Fig. 4. (A) The results of RT-PCR for TNFR1: the order of the groups from left to right is II, III, IV and I. Note the similar pattern in groups II, III, and IV. TNFR1 was not observed in group I. β -actin was used as the control. (B) RT-PCR results for TNFR2: the order of the groups from left to right is II, III, IV and I. TNFR2 was expressed at different levels in groups II, III, and IV. However TNFR1 was not expressed in group I.

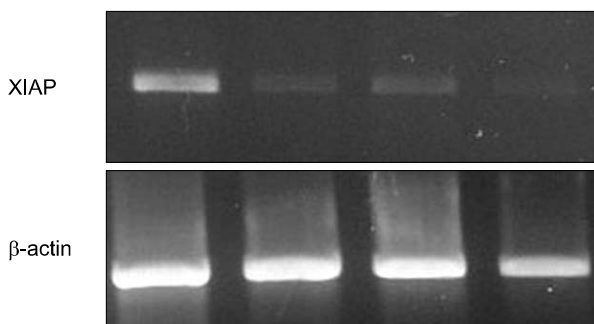


Fig. 5. RT-PCR results for XIAP: the changes in the expression of XIAP were similar to TNFR2.

TNFR2와 아주 유사하였다. 즉 II군의 발현이 가장 현저하였으며, III군과 IV군은 비슷하게 발현되었고, I군에서는 관찰되지 않았다(Fig. 5).

6. IL-6, IL-6-R의 RT-PCR

IL-6의 발현 정도는 II군과 IV군에서는 거의 발현이

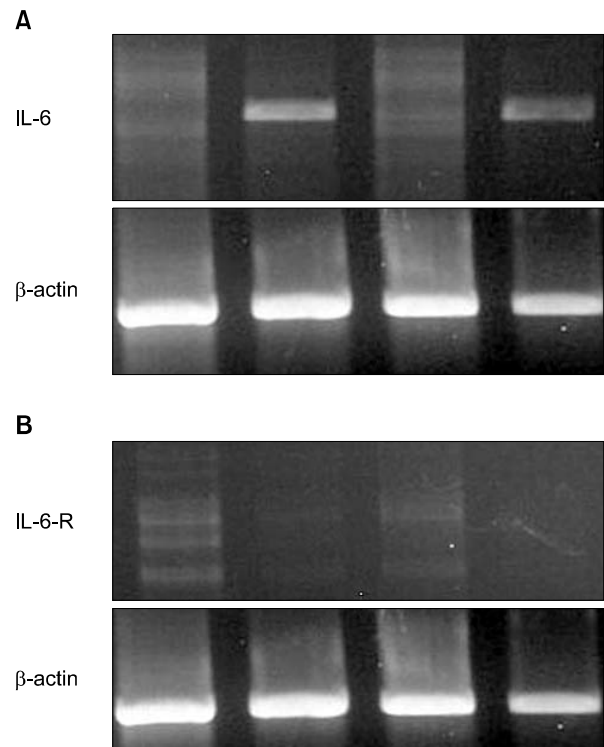


Fig. 6. (A) RT-PCR results for IL-6: noted in group III and I, (B) RT-PCR results for IL-6R: the change in IL-6R occurred in an opposite manner to IL-6.

되지 않았으나 III군과 I군에서는 비슷한 정도로 발현되었다. 그러나 IL-6-R은 이와는 반대로 II군에서 미약하게 발현되었고 IV군에서도 아주 약한 반응을 보였으나 이에 대한 정량적 분석은 의미가 없는 것으로 나타났다(Fig. 6).

고 찰

척수 손상은 흔히 심각한 신경학적 결과를 유발하여 환자 자신 뿐 만 아니라 사회 경제적 손실을 가져온다. 인체 손상의 정도는 최초의 손상 정도가 가장 중요하지만, 이 손상 후에 발생되어지는 합병증에 의해서도 영향을 받으며, 손상의 정도는 파괴된 조직의 양에 비례한다¹¹⁾.

중추신경계의 손상 후에 일어나는 신경 조직의 손상을 줄이기 위해서 현재도 많은 치료적 시도들이 이루어지고 있다. 최근에는 T세포가 직접 myelin과 연관된 항원을 매개하는 세포성 면역 반응을 강화하여 조절하는 혁신적인 치료개념이 소개되기도 하며 줄기세포와 같은 세포이식도 많은 관심을 가지고 있으나 이러한 세포이식은 아직

해결되어야 할 전제 조건이 너무나 많은 것이 현실이다.

그리고 척수 손상 후 필연적으로 발생하는 신경 조직의 이차적 변화에 대한 연구가 많이 진행되고 있으나 이 역시 임상적 적용에는 한계가 있다.

척수 손상 후 고용량의 스테로이드 투여에 대한 일부 의문성의 제기에도 불구하고, 유럽 경추 연구 학회의 발표에서는 조사자의 75%가 NASCIS II와 NASCIS III의 방법에 따라서 급성 외상성 척수 손상환자에게 이 약제를 투여한다는 사실을 보고했으며, 조사자의 1/3은 연구 결과의 효능에 대하여 약제의 위험성보다는 잠재적인 효과가 더 가치가 있다고 판단하고 있다고 한다^{2,5,9}.

현재까지 알려진 methylprednisolone의 신경에 대한 효과를 요약하면 항산화, 항염증 효과로 대분되어지며¹⁰, 양과 김 등의 최근 연구에서 methylprednisolone의 조기 투여로 척수 손상 후 발생하는 세포사멸을 조절할 수 있다는 실험적 연구 결과도 있다¹⁸. 또한 methylprednisolone의 효과를 증대하기 위하여 백신과 함께 병용 투여의 연구도 있으나 현재에도 Methylprednisolone의 고용량 투여로 인한 인체의 전신적 문제, 즉 합병증은 해결해야될 과제이기도하다^{6,8}. 이 점이 methylprednisolone의 사용에 많은 제약을 준다. 따라서 이러한 합병증을 최소화 할 수 있는 대체 방법의 연구는 많은 의미가 있을 것이다.

척수 손상의 급성 기간 동안 손상 받은 부위와 주위 조직에서는, 염증 이전의 사이토카인인 종양괴사성인자- α (TNF- α)와 Interleukin-6 (IL-6)의 mRNA 수치의 대부분이 중추 신경계의 구성 물질에서 증가한다. TNF- α 와 Interleukin이 수용체에 결합하면 핵인자 κ B 경로(NF κ B pathway)를 통해 신호를 전달함으로써 염증 반응을 유도시키게 되고 이 경로의 마지막 생산물인 NF κ B가 증가되고, 이로써 유도된 산화질소 합성효소(iNOS), 프로스타글란딘(prostaglandin)과 같은 염증 매개물질의 생산을 자극 시킨다. Methylprednisolone은 NF κ B 경로를 억제하는 것으로 알려져 있다^{3,14}. TNF- α 는 TNF 수용체 I과 II의 두 표면 수용체의 상호작용으로 생물학적 반응을 일으키는 것으로, 양 등의 연구에서 척수 손상 시 신경세포에서의 TNF 수용체의 발현은 XIAP와 유사한 발현 양상을 보이는 것으로 보아 세포생존과 관련 있을 것으로 보고한 바 있다¹⁷. 이러한 연구 결과 등을 기초로 하여 본 연구자는 methylpre-

dnisolone의 투여 후 TNFR의 변화를 살펴봄과 동시에 Nitric oxide inhibitor로 알려진 aminoguanidine의^{7,15} 투여 결과, 그리고 이 두 약제의 동시 투여 후의 TNFR의 변화를 살펴보았으며, Interleukin-6와 interleukin-6-r의 변화도 살펴보았다.

우선 본 연구자는 각각의 약제 투여와 동시 투여에서 척수 손상 후 1일부터 7일까지 행동학적 변화 양상을 살펴보았다. 행동학적 분석은 Tarlov 분석법과 BBB 분류법이 가장 흔히 사용되고 있고 전자는 간편하여 사용하기 쉬우나 너무 분석 체계가 미약한 점이 단점이며 후자는 보다 세분화된 점수체계이나 너무 복잡하고 또 관찰자 간에 오차가 있을 수 있다는 점이 단점이 있다. 그러나 행동학적 분석면에서는 BBB score가 더 우수하여 본 연구에서는 이 방법을 이용하였다. 결과를 살펴보면, 손상 후 1일째부터 3일째까지는 각 군 간에 통계적 차이를 볼 수 없었으나, 최종 7일째에 회복의 정도는 II군, IV군, III군, 그리고 I군 순이었고, II군과 나머지 군과는 통계학적 차이가 있었으며 III군과 IV군에서는 통계학적 차이가 없는 것으로 나타났다.

신경원의 형태와 배열에 의해 신경핵과 피질의 각 부분을 분류하는 세포구조학적 연구(cytoarchitectonic study)는 니슬 염색을 기본으로 한다. 본 연구에서는 H-E 염색과 더불어 니슬 염색을 시행하여 정확한 neuron 세포수를 계측하고자 하였다. II군에서 neuron 세포수가 가장 많이 관찰되었으나 나머지 군과 통계학적 차이는 없었고, 3일째에는 II, IV, III, I 순서로, 5일째에는 II=IV, III, I 순서로, 7일째에는 II, IV=III, I 순서로 neuron 세포수가 많이 관찰되었다. 통계학적 차이를 보이는 시기와 군은 3일째 II군과 나머지 군, 그리고 7일째 I군과 나머지 군에서 의미 있는 차이를 보였다. 이상의 결과만을 고려한다면, methylprednisolone과 aminoguanidine의 병용 투여가 methylprednisolone의 단독 투여보다 우수하다는 결론은 불가능하다. 양 등의 연구에서 methylprednisolone과 aminoguanidine의 단독 투여를 시행한 비교에서의 두 약제 모두 신경 보호 약제로 보고되었으나¹⁵, 두 약제의 상승효과(synergic effect)는 없는 것으로 보여 진다. 세포 사멸의 조기억제 효과와 nitric oxide synthase의 억제면에서 상승효과를 기대하였으나^{7,16,19}, 본 실험에서는 기대할 수 없는 결과로 해석되어지며 이러한 결과를 설명할 수 있는 실험적 연구가 추후

에 필요할 것이다. 단 본 연구자의 생각으로는 투여 용량 등 외적인 요인과 이 물질에 대한 수용체 등의 내적인 요인에서 기인한 것으로 사료된다.

척수 손상 시 염증반응을 일으키는 cytokine인 TNF- α 가 in vitro상에서 희소돌기아교세포와 신경세포에서 세포 사멸을 일으키며, 생체 내에서 희소돌기아교세포의 지연된 세포 사멸이 TNFR1의 과발현에 의해 일어나고, TNFR1과 다른 관련 수용체들의 death domain에 관한 연구에서 caspase-8과 caspase-3의 활동으로 세포사멸이 일어난다는 세포 신호 전달 시스템이 보고된 바 있다. 따라서 TNFR1과 TNFII의 변화는 세포 사멸에 직접적인 영향을 미칠 것이다¹⁷⁾. 본 연구에서는 각 인자에 대한 RT-PCR은 최종 7일째의 조직만을 이용하여 각 군을 비교하였다. 3일째와 5일째의 시기에서도 이러한 변화를 분석하여 시간별 분석 결과를 제시하고자 하였으나, 일부 실험 동물의 RNA 추출 과정에서 신뢰성을 얻지 못하여 최종 7일째의 결과만을 보고한 점이 추후 보완되어야 할 부분으로 생각된다. 최종 7일째의 결과에서는 대조군으로 사용된 β -lactin의 양은 일정하게 관찰되어 RNA purification은 잘 이루어진 것으로 나타났다. TNFR1과 II의 정량적 분석에서는, 각각의 약제에서 두 수용체의 변화를 확인하여, 신경 보호물질로 일부 확인할 수 있었으나 두 약제의 상승 효과 면에서는 명확한 결론은 낼 수 없었다. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)의 발현은 TNFR1과 아주 유사하였으며, 그 발현 정도는 II군이 가장 우수하였고, III군과 IV군은 비슷하게 발현되었으나 발현 정도는 II군 보다 미약하였으며, I군에서는 관찰되지 않은 점 역시 상승 효과를 확인 할 수 없는 근거이다.

Interleukin-6는 척수 손상 후 급성기에 증가하여 손상 후 7일 정도까지는 증가된 상태로 유지되며 그 이후는 감소하는 양상을 보인다. 본 연구에서 IL-6의 발현 정도는 II군과 IV군에서는 거의 발현이 되지를 않았으나, IL-6 수용체의 결과는 정 반대로 II군에서 미약하게 발현되었고 IV군에서도 아주 약한 반응을 보였으나 이에 대한 정량적 분석은 의미가 없는 것으로 나타났다. IV군에서 IL-6의 감소와 IL-6 수용체의 일부 발현이 과연 methylprednisolone의 효과인지, 아니면 두 약제의 동시 작용인지는 알 수 없다. 그러나 IL-6가 aminoguanidine의 단독 투여 군에서는 I군과 거의 유사한 발현 양

상을 보여 aminoguanidine보다는 methylprednisolone의 효과로 해석할 수도 있을 것이다.

외상성 척수 손상 환자는 전신 기능이 황폐해지는 결과를 낳기 때문에, 모든 치료를 위한 시도들은 환자의 가능한 모든 기능 회복을 위해서 이루어져야 한다. Methylprednisolone은 임상적으로 현재 사용되고 있는 유용한 약물이다. 그러나 현재까지 더 효용이 뛰어나고 부작용이 없는 강력한 치료제 개발이 불가능한 것은 현재 연구되고 있는 치료제의 신경 보호 작용이 한 가지 기전에 의해 설명되지 않고, 척수 손상의 과정이 복잡하기 때문이다. 따라서 단일 치료제로 신경 보호의 충분한 효과를 내기는 어려울 것이다. 즉 척수 손상을 줄이고 손상된 조직의 회복을 도모하기 위한 최선의 방법은 병용 치료(combination therapy)에 있다고 생각된다. 척수 손상 후 이차적 반응인 세포 사멸을 조절하기 위하여는 여러 가지 사이토카인을 서로 다른 기전으로 조절할 수 있는 약물의 병용법을 찾는다면 급성 척수 손상 후 만성화 단계로 가는 병리학적 기전을 최소한으로 감소시킬 수 있다고 생각된다. 본 연구에서 두 약제의 투여가 신경 회복에 확실한 상승효과를 보여 주지 못하였지만 다양한 투여 용량의 조절과 이들 물질로 변화되는 다양한 사이토카인 및 수용체에 대한 추가적인 연구가 반드시 필요할 것이다.

결론

본 실험에 사용된 두 약제는 신경 보호적인 효과가 있는 것으로 확인되나 두 약제의 동시 투여에서 상승 효과는 확인할 수 없어 추후 두 약제의 용량 조절, 그리고 이 약제와 연관된 사이토카인 및 그 수용체에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

참고문헌

1. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC: A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, 12: 1-21, 1995.
2. Bracken MB: Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence. *Spine*, 26: S47-S54, 2001.
3. Carlson GD, Gorden CD, Nakazawa S, Wada E, Smith JS, LaManna JC: Sustained spinal cord compression: part II: effect of methylprednisolone on regional blood flow and

- recovery of somatosensory evoked potentials. *J Bone Joint Surg Am*, 85: 95-101, 2003.
4. **Fernandez E, Pallini R, Marchese E, Talamonti G:** Experimental studies on spinal cord injuries in the last fifteen years. *Neurol Res*, 13: 138-159, 1991.
 5. **Hulbert RJ, Moulton R:** Why do you prescribe methylprednisolone for acute spinal cord injury? A Canadian perspective and a position statement. *Can J Neurol Sci*, 29: 236-239, 2002.
 6. **Hurlbert RJ:** Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg*, 93(Suppl 1): S1-S7, 2000.
 7. **Ishikawa M, Sekizuka E, Kirschek B, Sure U, Becker R, Bertalanffy H:** Role of nitric oxide in the regulation of spinal arteriolar tone. *Neurosurgery*, 50: 371-377, 2002.
 8. **Matsumoto T, Tamaki T, Kawakami M, Yoshida M, Ando M, Yamada H:** Early complications of high-dose methylprednisolone sodium succinate treatment in the follow-up of acute cervical spinal cord injury. *Spine*, 26: 426-430, 2001.
 9. **Nesathruai S:** Steroids and spinal cord injury: revisiting NASCIS 2 and NASCIS 3 trials. *J Trauma*, 45: 1088-1093, 1998.
 10. **Peter Vellman W, Hawkes AP, Lammertse DP:** Administration of corticosteroids for acute spinal cord injury: the current practice of trauma medical directors and emergency medical system physician advisors. *Spine*, 28: 941-947, 2003.
 11. **Sekhon LH, Fehlings MG:** Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, 26(Suppl 24): S2-S12, 2001.
 12. **Soy O, Aslan O, Uzun H, et al:** Time-level relationship for nitric oxide and the protective effects of aminoguanidine in experimental spinal cord injury. *Acta Neurochir (Wien)*, 146: 1329-1335, 2004.
 13. **Tarlov IM:** Acute spinal cord compression paralysis. *J Neurosurg*, 36: 10-20, 1972.
 14. **Tator CH:** Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol*, 5: 407-413, 1995.
 15. **Yang JY, Riew KD:** Agonist for the control of apoptosis through the study of cytokine expression after spinal cord injury in rats. *J Korean Orthop Assoc*, 42: 106-114, 2007.
 16. **Yang JY, Lee JK, Kim YM, Kim KC, Lee CH, Kim HS:** The changes of nitric oxide synthase after spinal cord injury according to the age in rats. *J Korean Orthop Assoc*, 41: 703-710, 2006.
 17. **Yang JY, Lee JK, Kim KT, Lee HH, Byun BN, Ahn SH:** The expression and function of the tumor necrosis factor receptor I (TNFRI), TNFRII, and X-linked inhibitor of apoptosis genes after spinal cord injury in rats. *J Korean Soc Spine Surg*, 11: 14-23, 2004.
 18. **Yang JY, Lee JK, Kim SB:** The changes of apoptosis according to the time of administration of methylprednisolone after spinal cord injury in rats. *The Spine J*, 6: 5s, 23s, 2006.
 19. **Zhang F, Iadecola C:** Temporal characteristics of the protective effect of aminoguanidine on cerebral ischemic damage. *Brain Res*, 802: 104-110, 1998.

= 국문초록 =

목 적: 척수 손상 후에 aminoguanidine (AG)과 methylprednisolone (MP)의 동시 투여가 신경 회복에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: Sprague Dawley rat을 이용하여 척수 손상을 유도 후 투여한 약물에 따라, I군은 생리식염수, II군은 MP, III군은 AG, 그리고 IV군은 MP와 AG를 투여한 군으로 분류하였다. 행동 및 면역조직 검사와 TNFRI와 II, XIAP, 그리고 IL-6와 이 수용체에 대한 RT-PCR의 결과를 비교하였다.

결 과: 손상 후 7일 째, 운동 회복의 정도는 II, IV, III, I군 순이었고, Neuron의 세포 수는 II군이 가장 많았으며, IV와 III, 그리고 I군 순이었다. TNFRI에서는 I에서는 거의 발현이 되지 않았으나 II부터 IV군까지 동일한 양상을 보였고, TNFRII는 II에서 가장 많이 발현되었으나, I군에서는 발현이 안 되었다. XIAP은 TNFRII와 유사하였다. IL-6는 II와 IV에서는 발현이 안되었고, III과 I에서는 발현되었다. 그러나 IL-6-R은 반대 양상이었다.

결 론: 두 약제 모두 신경 보호 효과가 있는 것으로 확인되나, 동시 투여시 상승 효과는 확인할 수 없어 추후 추가적인 연구가 필요하다.

색인 단어: 척수 손상, Methylprednisolone, Aminoguanidine