

쥐의 척수손상 후 사이토카인 발현 연구를 통한 세포 사멸을 조절하는 길항제의 연구

양준영 · K. Daniel Riew*

충남대학교 의과대학 정형외과학교실, Barnes-Jewish Hospital, Washington University*

Agonist for the Control of Apoptosis through the Study of Cytokine Expression after Spinal Cord Injury in Rats

Jun Young Yang, M.D., and K. Daniel Riew, M.D.*

Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Chungnam National University,
Research Institute of Medical Sciences, Daejeon, Korea, Barnes-Jewish Hospital, Washington University*, USA

Purpose: To analyze the cytokines that appear after a spinal cord injury in rats and to determine the agonists that regulate apoptosis.

Materials and Methods: Sixty female Sprague-Dawley rats were anesthetized, and a laminectomy was performed at the 9th thoracic vertebra. The spinal cord injury was induced by dropping a 10 gm weight at a height of 20 mm. The subjects were divided into 5 groups. Group I was administered aminoguanidine, group II was administered GM-CSF, group III was administered riluzole, group IV was administered erythropoietin, and group V was administered methylprednisolone. A control group was administered normal saline. The results were assessed using the Tarlov motor grading method. In 1, 3, 5 and 7 days after the spinal cord injury, the rats were sacrificed and evaluated using the syringomyelic cavity size. Immunohistochemical staining for e-NOS and RT-PCR for XIAP were also performed.

Results: Groups I, III, and V showed significantly different results in terms of the motor recovery and inhibition of increase in the syringomyelic cavity compared with the other groups ($p < 0.05$). The e-NOS activity was observed in groups I, III, and V. The other groups showed almost no e-NOS activity. On the RT-PCR, groups I, III, and V showed significantly different results in terms of XIAP expression with time compared with the other groups.

Conclusion: Steroids, NOS inhibitors and sodium channel inhibitors appear to be important factors for regulating apoptosis in the early stage of a spinal cord injury. Further study will be needed to develop new pharmaceuticals with synergic effects on spinal cord injuries.

Key Words: Apoptosis, Spinal cord injury

서 론

척수 손상의 증상은 정도에 따라 다양하며 전적으로 신경에 대한 상해 정도에 의존한다. 척수 손상에 뒤따르는 병적 후유증은 시간상으로 크게 두 가지 형태로 나눌

수 있으며, 일차 손상은 직접적인 기계적 외상에 의해 발생한 신경 조직의 국소적 파괴를 포함하고, 이러한 초기의 손상은 이차 손상으로 진행되어 유해한 신경 장애가 연속으로 발생되면서 척수 손상을 악화시킨다. 세포사멸

통신저자 : 양 준 영

대전시 중구 대사동 640

충남대학교 의과대학 정형외과학교실, 의학연구소

TEL: 042-280-7351 · FAX: 042-252-7098

E-mail: jyyang@cnuh.co.kr

Address reprint requests to

Jun Young Yang, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine,

Chungnam National University, Research Institute of Medical Sciences,

640, Daesa-dong, Jung-gu, Daejeon 301-721, Korea

Tel: +82,42-280-7351, Fax: +82,42-252-7098

E-mail: jyyang@cnuh.co.kr

*이 논문은 2004년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2004-M01-2004-000-2-158-0).

(apoptosis)은 척수 손상에 뒤따른 이차 손상의 중요한 매개체이다. 세포사멸은 다양한 세포 종류의 변성으로 괴사를 동반하며, 주로 백색질을 제한하고, 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)와 미세아교세포(microglial cell)를 포함하는 세포 변성을 유도하는 과정이다. 따라서 이러한 이차 손상, 즉 세포사멸을 감소 또는 예방할 수 있다는 가정은 우리에게 급성 척수 손상의 치료에 큰 의미를 줄 수 있을 것이다. 척수 손상에서 세포사멸 억제제를 목적으로한 연구는 현재까지 많이 시도되어 왔으며, 특히 Nottingham이 FK506이라는 케스파제 억제제와 함께 케스파제-3의 억제제 척수 손상 이후 희소돌기아교세포의 세포사멸의 양을 줄인다는 것을 밝힘으로써 이 분야의 연구를 증폭시키는 결과를 가져왔다. 그러나 아직까지 급성 척수 손상 후 세포사멸과 다양한 신경 보호 물질들과의 상호 연관성에 관한 연구는 정확한 결론을 제시하지 못하고 있으며, 또한 신경 보호물질들의 상호 연관 작용 또는 전신적인 합병증에 관한 연구도 기초 연구 단계 수준이다. 저자들은 현재까지 신경 보호물질들로 알려진 여러 약제들 중 스테로이드, aminoguanidine, Na-channel blocker인 riluzole, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), 그리고 조혈 기능이 있는 erythropoietin을 이용하여 과연 이들 물질들이 세포사멸과 어떠한 관계가 있는지를 알아보고, 각각을 비교하여 과연 세포사멸에 대한 길항제와 항길항제가 무엇인지를 살펴보고 향후 이들 물질들의 임상적 접근에 필요한 기초 자료를 제시하는 데 연구의 목적이 있다.

대상 및 방법

1. 실험 동물 및 약물 투여

실험 동물은 13-14주 된 180-220g에 해당되는 총 60마리의 성숙 Sprague-Dawley종 암컷 쥐를 이용하였으며, 이 동물은 실험용 자가 면역 뇌척수염에 대한 감수성에 상대적 저항성을 보이는 것으로 알려져 있다. 각각의 실험에서 쥐들은 나이와 몸무게를 통제하였으며, 조도와 온도가 통제된 방에서 사육되었다. 모든 동물들은 실험 동물 관리에 대한 NIH 지침서에 따라 관리하였다. 쥐들은 Chanazine (xylazine, 10 mg/kg; Channele Pharmaceuticals, Loughrea, Ireland)과 Vetalar (ketamine, 50 mg/kg; Fort Dodge Laboratories, Fort Dodge, Iowa, USA)를 이용해 근주 마취되었고 척수는

Table 1. Experimental Group

Group	Medication	Dosage	Route
Control	Saline	1 ml/kg	Intra-peritoneal
I	Aminoguanidine	100 gm/kg in 1 ml saline	Intra-peritoneal
II	GM-CSF	20 µg/kg	Intra-peritoneal
III	Riluzole	5 mg/kg	Intra-peritoneal
IV	Erythropoietin	2,680 U/kg	Intra-peritoneal
V	Methylprednisolon	300 mg/kg	Intra-peritoneal

제9흉추 위치에서 후궁 절제술 시행하여 노출되었다. 마취 유도 후에 척수에 well-calibrated contusive injury를 가하는 장치인 신경충격기를 이용하여 20 mm 높이에서 10 g의 봉막대를 떨어뜨려 척수 손상을 유도하였다. 척수 손상 후 적당한 온도와 습도를 유지하였으며, 물과 먹이를 충분히 제공하였다. 요로 감염 및 방광 기능을 유지하기 위하여 하루에 두 차례씩 인공 배뇨를 시켰다.

척수 손상 후 약물은 복강내(intraperitoneal)로 투여하였으며 생리식염수(1 ml/kg)를 투여한 군을 대조군으로 하였고, aminoguanidine (100 mg/kg in saline, 1 ml)을 투여한 군은 I군, GM-CSF (20 µg/kg)를 투여한 군은 II군, riluzole (5 mg/kg)을 투여한 군은 III군, erythropoietin (2,680 U/kg)을 투여한 군은 IV군, methylprednisolone (300 mg/kg)을 투여한 군은 V군으로 분류하였으며 각 군에 사용된 실험 동물은 10마리씩이었다(Table 1). 각 군에서 사용된 약물의 용량은 기존에 발표된 연구들을 참고로 하였다^{4-6,8,15)}

2. 조직 준비

척수 손상 후 1일, 3일, 5일 및 7일에 각각 쥐를 희생시켰다. 4% paraformaldehyde를 사용하여 관류 고정(transcardiac perfusion)을 시행하였고, 조직 절취는 손상부분(T9)을 포함한 종단면(sagittal section)을 절취하였다. 적출한 조직은 4% paraformaldehyde 용액에 24시간 동안 후고정(postfixation)하고, 30% sucrose 용액에서 하룻밤 동안 담가둔 후 30 µm 두께로 냉동절편하여 0.1 M phosphate buffered saline (PBS)이 들어 있는 24-well plate에 모았다.

3. 운동측정

척수 손상 후 뒷다리의 운동 능력은 Tarlov 점수를 사

Table 2. Tarlov Score

Scale	Description
0	No voluntary movement
1	Movement of joints perceptible
2	Active movement but unable to sit without assistance
3	Able to sit but unable to hop
4	Weak hop
5	Complete recovery of hindlimb function

용하여 평가하였다(Table 2)¹⁶⁾.

약물을 투여 후 운동 능력이 회복되는 정도는 One-way ANOVA를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다.

4. 척수 공동 크기의 측정

손상 부분(제9흉추)을 포함한 종단면(sagittal section)을 H-E 염색하여 100배 시야에서 관찰하였다. 이후 척수 공동 크기의 결정은 Photoshop 6.0을 이용하여 손상된 부분을 기준으로 척수 전체의 횡 직경(B)을 구한 뒤, 척수 공동의 가장 큰 횡 직경(A)을 구하여 척수 공동의 횡 직경을 척수 전체의 횡 직경으로 나누어 구하였다(척수 공동의 크기=A/B, Fig. 1). 척수 공동의 크기는 One-way ANOVA를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다.

5. e-NOS에 대한 면역조직화학염색

Nitric oxide synthase의 아형인 e-NOS는 신경 보호 및 재생에 관계된 인자로 알려져 있어 각 군에서의 이 물질의 변화를 실험하고자 하였다. 척수 동결 절편을 0.1 M PBS로 수세 후 0.1 M PBS에 1 mM β -NADPH, 0.1 mM NBT 및 0.3% Triton X-100을 더한 용액에 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 증류수로 수세 후 이차항체(Verterstain kit의 biotinylated anti-rabbit IgG)를 1 : 200으로 일차항체에 사용한 동일한 용액에 희석)에 2시간 동안 실온에서 반응시키고, ABC reagent (Vecterstain kit)를 0.1 M PBS에 1 : 100으로 희석한 다음 2시간 동안 실온에서 처리하였다.

발색제로는 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)를 사용하였으며, 0.1 M PBS에 0.05% DAB와 0.02% H_2O_2 를 더하여 용액을 만들어 발색 반응시켰다. 발색 반응이 끝난 조직은 증류수로 수세한 후 조직을 슬라이드에 붙인 다음 통상적인 방법으로 봉입하였다. 척

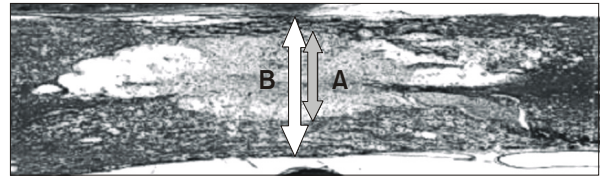


Fig. 1. A is longest cavity length and B is transverse cord length over the longest cavity length.

수 손상 후 e-NOS 활성도는 두 명의 관찰자가 한 마리 쥐 당 무작위로 선택한 5 절편에서 평가하였다. 전반적으로 배경 염색이 되어 있으면서 약한 양성을 보이는 경우 음성으로 판정하였으며, 위양성과 위음성을 고려하여 양성 대조법을 이용하여 정도 관리(quality control)를 시행하였다.

6. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)에 대한 RT-PCR

XIAP는 caspase의 활성화를 억제하여 항세포사멸 기능을 갖는 물질이다. 따라서 XIAP의 변화는 세포 생존과 연관성이 있으므로 각 실험군에서의 변화를 살펴보고자 하였다.

척수 조직을 신속히 적출한 다음 RNA Zol B kit를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 DEPC-treated DW에 녹이고, 2 μ g 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 급랭 후 -70°C에 보관하였다. PCR은 DNA 3 μ g, 10xPCR buffer 5 μ g, 2.5 mM 4dNTP 4 μ g, forward primer (50 pmole/ μ g) 1 μ g, reverse primer (50 pmole/ μ g) 1 μ g, DW 35.75 μ l, Taq DNA polymerase (5 U/ μ g) 0.25 μ g를 넣어 총 50 μ g 되게 하여 잘 혼합하였다. 반응이 일어나는 동안 반응 혼합액이 증발하지 않도록 반응 혼합액의 표면을 완전히 덮을 정도로 mineral oil을 한방울을 떨어뜨렸다. Thermocycler (Biometra)를 이용하여 94°C에서 5분간 1주기를 시행한 후 94°C에서 1분, 60°C에서 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 정량 분석하였다. XIAP의 정량 분석은 GAPDH를 대조군으로 하여 그 양의 변화를 비교 분석하였다.

결 과

1. 운동능력

실험 동물의 운동 능력 회복은 시간이 경과함에 따라 호전되는 양상을 보였고, 운동 능력의 회복 정도는 가장 우수한 군부터 V군, I군, III군, IV군, II군의 순서였다. 이중 II군은 대조군과 동일한 결과를 보였다(Fig. 2). 특히 methylprednisolone을 투여한 군에서 가장 우수한 회복을 보였는데, 수상 7일째에 대조군에 비해 평균 1점 정도의 운동 능력 회복을 보였다. 이러한 결과는 amino-guanidine을 투여한 I군 및 riluzole을 투여한 III군에서

도 비슷한 양상을 보여 V군, I군, III군은 다른 군에 비해 통계적으로 유의한 운동 능력의 회복을 보였다($P < 0.05$).

2. 척수 공동 증가의 억제

척수 공동의 크기는 시간이 경과함에 따라 다소 커지는 양상을 보였으나, II군을 제외한 다른 군에서는 척수 공동의 크기가 더 증가하지 않는 것으로 나타났다. 척수 공동 증가의 억제 효과는 methylprednisolone을 투여한 군에서 가장 우수한 결과를 보였으며(Fig. 3), 가장 우수한 군부터 V군, I군, III군, IV군, II군의 순서였다. 이중 II군은 대조군과 동일한 결과를 보여(Fig. 4), 운동 능력 회복의 정도와 유사한 결과를 보였다. 척수 공동 증가의 억제 효과는 V군, I군 및 III군에서 다른 군에 비해 통계적으로 유의한 억제 효과를 보였다($p < 0.05$).

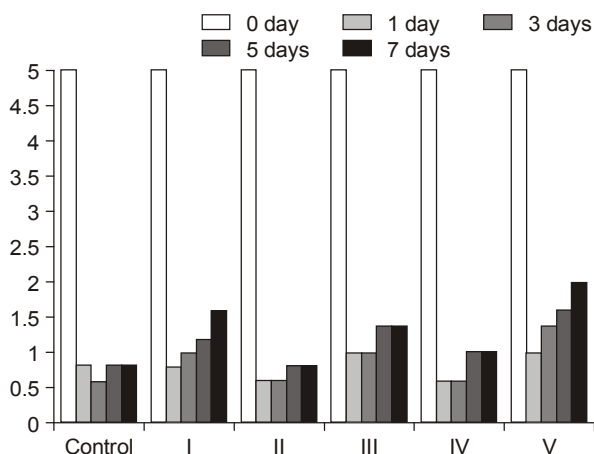


Fig. 2. Methylprednisolone, aminoguanidine, and sodium channel blocker show similar effects but there are significant differences between groups I, III, and V and the Control, II and IV groups.

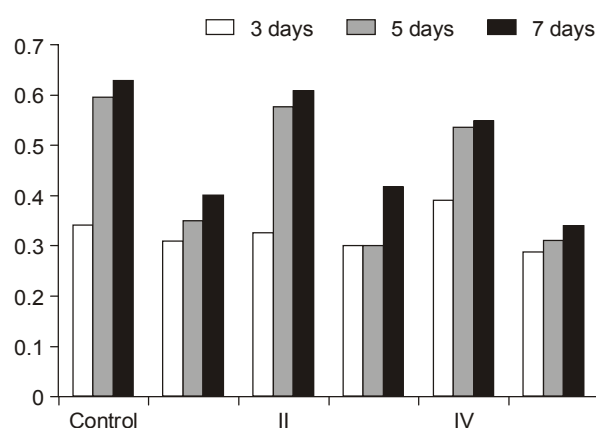


Fig. 4. The largest cavities was noted in the control, II and IV. There are significant differences between the control, II and IV, and groups I, III, and V. These results are similar to the result of the recovery of motor function.

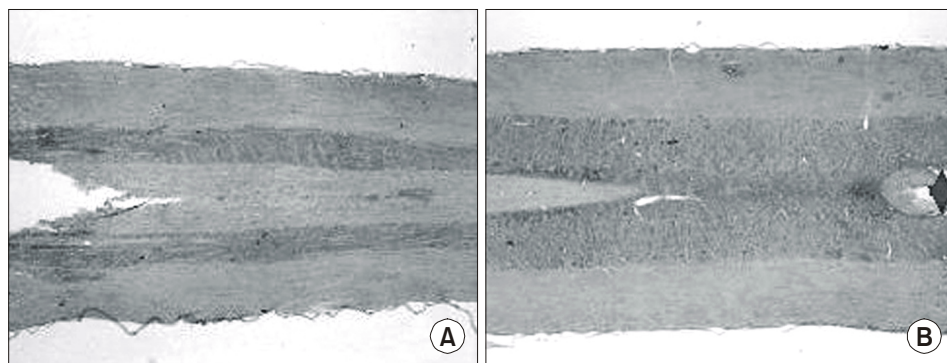


Fig. 3. (A) control in H-E stain, (B) group V in H-E stain. The cavity size of the control group is three times than group V, methylprednisolone administration group.

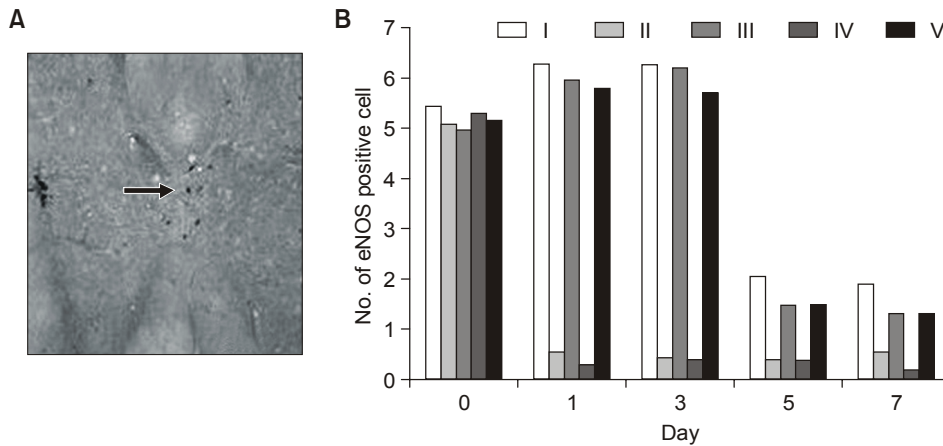


Fig. 5. (A) Noted expression eNOS activity (B) groups I, V and III noted expression eNOS activity.

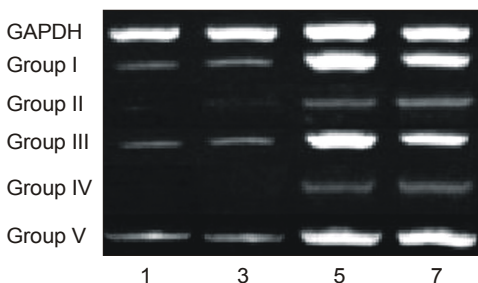


Fig. 6. The groups administered aminoguanidine as a NO inhibitor, riluzole as a sodium channel blocker and methylprednisolone show prominent XIAP expression according with time.

3. e-NOS 활성화도

Aminoguanidine을 투여한 I군에서 e-NOS 활성화도가 가장 많이 관찰되었으며, methylprednisolone을 투여한 V군과 riluzole 투여군에서는 유사한 발현 정도를 보였다. 나머지 군에서는 e-NOS 활성화도가 거의 발현되지 않았다(Fig. 5).

4. X-Linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP) 발현도

척수 손상 후 XIAP의 발현은 약물을 투여한 군에서 점차 증가하는 양상을 보였으며, 이 중 V군, I군 및 III군에서 1일째부터 XIAP의 발현을 볼 수 있었으며, 나머지 군과 비교시 7일째 까지 현저한 발현이 관찰되었다(Fig. 6). II군과 IV군에서는 5일째 XIAP의 발현이 되는 것을 관찰하였으나 그 정도는 V, I, III군보다는 약한 발현을 보였다.

고 찰

급성 외상성 척수 손상의 병리적 기전은 일차 손상과 이차 손상으로 나눌 수 있다^{2,3}. 일차 손상은 직접적인 기계적 외상에 의해 발생한 신경 조직의 국소적 파괴를 포함하며 이는 외상의 빈도를 감소시키거나 외상 시 인체를 보호하는 방법 외에는 막을 방법이 없다. 척수 손상 후 척수의 중앙 부위는 일차성 기계적 손상에 의하여 손상 받고, 출혈성 괴사(hemorrhagic necrosis)가 생기며, 이후 시간이 지남에 따라 이차 손상이 활성화됨에 따라 괴사 부위가 커지며 이 과정에서 척수 공동(cavity)이 형성된다. 이러한 초기의 손상은 이차 손상으로 진행되고, 이차 손상의 원인으로 신경계의 부종, 허혈, 염증반응, 전해질 불균형, 과다한 사이토카인(cytokine)의 분비, caspase 및 calpain의 항진, 세포사멸 등이 관여한다^{7,12,17}. 따라서 외상성 척수 손상의 치료로 신경 보호 및 신경 재생에 관련되는 약물의 개발은 이차 손상의 병리 작용을 조절하는 방향으로 개발되어 왔다. 그러나 현재까지 신경 보호물질들로 알려진 약제들도 급성 척수 손상 후 필연적으로 발생하는 이차 손상의 일부를 차단하는 효과만이 있었을 뿐이며 또한 약제의 내성 또는 독성이 완전 규명되지 않아 현재까지 기초 연구에 머무르고 있는 실정이다.

Methylprednisolone은 아마도 현재 가장 신빙성이 있는 급성 척수 손상 치료제 일 것이다. 작용 기전으로는 세포 외의 칼슘 농도를 상승시켜, 손상 받은 척수에 국소적으로 혈관 확장을 유발하며, 또한 척수가 손상 받은 부위에서 지질 과산화(lipid peroxidation)와 가수 분해를 억제한다고 알려져 있다^{3,4}. 이러한 효과는 미세 혈관 손상을 줄이고 관류가 증가되어 이차적인 허혈을 막을 수

있다. 손상 부위 세포막의 파괴는 손상 받은 후 첫 8시간 내에 시작되고, 8시간에 최고 상태에 이른다고 한다¹⁹⁾. 따라서 NASCIS와 Braken은 척수 손상 후 8시간 이내에 대량의 methylprednisolone을 투여하여 초기의 신경학적 손상을 줄이는 치료를 제안하였다^{1,2)}. 그러나 세포 사멸에 관한 스테로이드의 효과는 연구가 미비하다. 본 연구에서는 수상 후 단시간에 대량의 methylprednisolone 주입으로 3일째, 5일째, 7일째에 Tarlov 점수의 유의한 호전을 보였으며, XIAP 유전자의 발현은 1일째부터 출현하고 5일째 및 7일째에 저명하게 나타나 XIAP의 발현에도 효과가 있음을 확인한바, methylprednisolone의 작용 기전에 손상 후 초기에 세포사멸의 억제 기능도 추가할 수 있을 것이다.

Aminoguanidine은 선택적으로 강력히 iNOS를 억제하는 물질이다. iNOS는 신경 손상 시 신경 회복을 방해하는 물질이다. 뇌 허혈이나 외상 시에 aminoguanidine을 투여하면 iNOS 활성도를 감소시키며^{15,21)}, 전체 괴사된 신경 세포의 수를 감소시킨다고 알려져 있다. 특히 Wada 등²⁰⁾의 연구에서는 aminoguanidine이 iNOS를 억제하는 작용 이외도 사이토카인 분비와 prostaglandin 합성 및 leukotrien 합성을 감소시켜 뇌 손상 후 발생하는 이차 손상 기전을 억제하여 신경 보호 작용을 한다고 하였다. 이후 척수 손상에 따른 연구로 Soy 등¹⁵⁾은 외상을 입힌 쥐에서 최초 1시간에 fibrinoid necrosis가 aminoguanidine을 투여한 쥐에서는 보이지 않았다고 하였으며, 대조군에서는 수상 후 3일 및 5일째 백질과 회백질의 넓은 괴사, 혈관벽의 fibrinoid necrosis, 혈관 내벽의 국소 혈전 형성이 관찰되었다고 하였다. 반면에 aminoguanidine을 투여한 쥐에서는 회백질에 국소적인 괴사만 보였고, 혈관벽의 fibrinoid necrosis와 혈관 내벽의 국소 혈전은 없었다고 하였다. 본 연구에서도 aminoguanidine을 투여한 I군은 척수 공동의 크기가 시간이 경과함에 따라 비교적 더 커지지 않았으며 fibrinoid necrosis 및 국소 혈전 형성이 관찰되지 않았다. 이는 aminoguanidine이 지질 과산화 감소, 혈전형성 억제 및 혈관수축 억제의 효과가 있어 손상된 신경의 괴사 방지와 혈류 공급을 향상시켜 신경 보호 작용을 하는 것으로 사료되며 또한 iNOS의 발현의 억제로 인한 세포 사멸의 조절에 관여한 것으로 추정된다.

Riluzole은 신경 시냅스의 말단에서 glutamate 분비

를 억제하는데, glutamate 수용체의 과잉 자극은 척수 손상에서 신경 세포의 사멸에 중요 역할을 한다⁶⁾. Riluzole은 Na 통로를 차단하며, 특히 손상되어 있는 신경의 Na 통로에 더욱 잘 결합하여 신경 시냅스 말단에서 glutamate 분비를 억제한다¹⁷⁾. Riluzole은 또한 신경 보호 활성을 갖는 high voltage-gated N-type과 P/Q type의 Ca 통로를 차단하며, Ca 통로가 시냅스 말단에서 신경 전달 물질의 분비를 조절하기 때문에 riluzole의 Ca 통로 차단은 glutamate 분비를 감소시킨다^{9,11,14)}. 저자들의 연구에서는 riluzole 투여로 척수 공동 크기 증가가 억제되었는데 이는 glutamate 분비의 감소에 따라 glutamate로 매개되는 지질 과산화 감소의 효과로 사료된다. 또한 수상 후 1일째부터 약하게 발현되어 5일째부터 XIAP 유전자의 발현 정도가 I군 및 V군에서 처럼 비슷하게 증가하여 riluzole의 효과는 glutamate 분비 억제, 지질 과산화 감소 이외에도 다른 신경 보호 작용이 있을 것으로 사료되며 이 부분에 대한 추가 연구가 필요하다.

GM-CSF는 조혈형성인자이면서 염증반응성 사이토카인으로 골수 모세포(bone marrow stem cell)의 분화를 촉진시키고, 백혈구의 세포 사멸을 감소시킨다. 이러한 이유로 골수가 억제된 환자에서 조혈 기능의 회복을 위해 사용되고 있지만 신경 세포에서 세포 사멸을 조절하는 기전은 명확하지 않으나, 중추신경계와 말초신경계의 손상 또는 질병, 그리고 미세아교세포(microglia)와 대식세포(macrophage)의 분화 및 기능 조절에 연관이 있음이 점차 밝혀져 가고 있어, GM-CSF 활성도의 조절은 신경계에서 중요한 역할을 할 것으로 추정되었다. Kan-nan 등은 대개의 신경 세포에 IL-3과 GM-CSF 수용체가 있어 IL-3과 GM-CSF가 이 수용체와 결합하여 mitogen-activated protein (MAP) kinase를 활성화시켜 신경세포 보호 및 재생에 효과가 있다고 하였고¹⁰⁾, Ha 등은 쥐의 N2A 세포를 이용한 연구에서 GM-CSF 투여로 세포 사멸이 감소하며, 실험동물의 기능에도 호전을 보였다고 하였다⁸⁾. 이러한 연구 결과를 토대로 본 연구에서도 GM-CSF를 투여하였으나 신경 보호적인 면에서 뚜렷한 증거를 찾아 볼 수가 없었다. 이는 투여 용량 등 외적인 요인과 이 물질에 대한 수용체 등의 내적인 요인에서 기인한 것으로 사료되나 보다 정확한 결과 분석을 위하여 추후 연구가 뒤따라야 한다. 본 연구에서 사용된 erythropoietin도 중추 신경계 질환이나 허혈 시 신경 보

호 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, Sekiguchi 등에 의하면 신경근 손상 이후 erythropoietin은 척수 신경 세포 사멸을 억제한다고 하였다^{5,13)}. 그러나 저자들의 연구에서는 GM-CSF를 투여한 군과 erythropoietin을 투여한 군에서 척수 공동의 크기가 통계적으로 유의하게 줄어들지 않았고, 운동력의 회복에서도 유의한 효과가 없어 이전의 보고와는 다른 연구 결과를 나타내었다. 척수 신경 회복에 혈류의 차단은 신경 보호적인 면에서는 상당히 해로운 결과를 초래할 것이라는 것은 일반적인 결과이나¹⁸⁾ GM-CSF와 erythropoietin의 투여가 척수 손상 후 급성기에 어떠한 작용을 할 것인가에 대한 추가 연구가 필요하며 또한 이 물질들이 실제로 척수 혈액 공급에 어떠한 영향이 있는지에 대한 실험도 필요할 것이다. 혈류 회복을 위하여 본 실험에 사용된 투여 방법과 투여량이 적절하였는지에 대한 추가 연구도 필요할 것이나, 본 실험의 방법으로는 신경 회복적인면에서 다른 군 보다는 효과가 적은 것으로 나타났다.

이번 연구에서 실험 동물의 운동 능력 회복과 척수 공동 크기, 그리고 XIAP의 발현 정도가 일치하는 점으로 볼 때 실험의 객관성이 있다고 사료된다. 신경 회복이 가장 우수한 군부터 차례대로 V군, I군, III군, IV군, II군의 순서였다. 이 중 II군은 대조군과 동일한 결과를 보였다. 특히 methylprednisolone을 투여한 V군에서 가장 우수한 결과를 보였으며, 이러한 결과는 aminoguanidine을 투여한 I군 및 riluzole을 투여한 III군에서도 비슷한 양상을 보여 V군, I군, III군은 다른 군에 비해 통계적으로 유의한 운동 능력의 회복 및 척수 공동 증가의 억제 효과($p < 0.05$)를 보였다. 또한 e-NOS 활성도는 aminoguanidine을 투여한 I군과, methylprednisolone을 투여한 V군, riluzole 투여군인 III군에서 손상된 척수에 관찰되었으나 나머지 군에서는 신경 보호 작용이 있는 eNOS 활성도가 거의 발현되지 않았다. 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(com-

bination therapy)에 있다고 생각된다. 척수 손상 후 이차적 반응인 세포 사멸을 조절하기 위하여는 여러 가지 사이토카인을 서로 다른 기전으로 조절 할 수 있는 약물의 병용법을 찾는다면 급성 척수 손상 후 만성화 단계로 가는 병리학적 기전을 최소한으로 감소시킬 수 있어 향후 임상적 치료에 큰 도움을 줄 수 있을 것이다. 저자는 본 연구의 결과를 바탕으로 향후 methylprednisolone, aminoguanidine, 그리고 riluzole의 병용 치료를 계획하고 또한 병용 치료시 전신적인 합병증의 유무를 알아보는 추가 연구를 계획하고 있다.

결론

쥐의 척수손상 후 초기에 세포 사멸을 조절하는 인자로 steroid, aminoguanidine, Na 통로 억제제 등이 중요할 것으로 사료되며, 추후의 연구는 이들 약물의 부작용을 최소화하고 또한 synergic effect를 일으킬 수 있는 약물의 개발에 중점을 두어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. **Bracken MB:** Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence. *Spine*, 26(24 Suppl): S55, 2001.
2. **Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, et al:** Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. *National Acute Spinal Cord Injury Study*. *JAMA*, 277: 1597-1604, 1997.
3. **Braughler JM, Hall ED:** Correlation of methylprednisolone levels in cat spinal cord with its effects on (Na++K+)-ATPase, lipid peroxidation, and alpha motor neuron function. *J Neurosurg*, 56: 838-844, 1982.
4. **Braughler JM, Hall ED, Means ED, Waters TR, Anderson DK:** Evaluation of an intensive methylprednisolone sodium succinate dosing regimen in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg*, 67: 102-105, 1987.
5. **Brines M:** What evidence supports use of erythropoietin as a novel neurotherapeutic? *Oncology (Williston Park)*, 16(9 Suppl 10): S79-S89, 2002.
6. **Doble A:** The pharmacology and mechanism of action of

- riluzole. Neurology*, 47(6 Suppl 4): S233-S241, 1996.
7. **Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R:** *The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. Science*, 244: 798-800, 1989.
8. **Ha Y, Kim YS, Cho JM, et al:** *Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in preventing apoptosis and improving functional outcome in experimental spinal cord contusion injury. J Neurosurg Spine*, 2: 55-61, 2005.
9. **Huang CS, Song JH, Nagata K, Yeh JZ, Narahashi T:** *Effects of the neuroprotective agent riluzole on the high voltage-activated calcium channels of rat dorsal root ganglion neurons. J Pharmacol Exp Ther*, 282: 1280-1290, 1997.
10. **Kannan Y, Moriyama M, Sugano T, et al:** *Neurotrophic action of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on murine sympathetic neurons. Neuroimmunomodulation*, 8: 132-141, 2000.
11. **Mu X, Azbill RD, Springer JE:** *Riluzole improves measures of oxidative stress following traumatic spinal cord injury. Brain Res*, 870: 66-72, 2000.
12. **Sekhon LH, Fehlings MG:** *Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. Spine*, 26(24 Suppl): S2-S12, 2001.
13. **Sekiguchi Y, Kikuchi S, Myers RR, Campana WM:** *ISSLS prize winner: Erythropoietin inhibits spinal neuronal apoptosis and pain following nerve root crush. Spine*, 28: 2577-2584, 2003.
14. **Song JH, Huang CS, Nagata K, Yeh JZ, Narahashi T:** *Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. J Pharmacol Exp Ther*, 282: 707-714, 1997.
15. **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.
16. **Tarlov IM:** *Acute spinal cord compression paralysis. J Neurosurg*, 36: 10-20, 1972.
17. **Tator CH:** *Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. Brain Pathol*, 5: 407-413, 1995.
18. **Tator CH, Fehlings MG:** *Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. J Neurosurg*, 75: 15-26, 1991.
19. **Young W, Flamm ES:** *Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury. J Neurosurg*, 57: 667-673, 1982.
20. **Wada K, Chatzipanteli K, Kraydieh S, Busto R, Dietrich WD:** *Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. Neurosurgery*, 43: 1427-1436, 1998.
21. **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:

대상 및 방법: 16 Sprague-Dawley rat, 60 , 9
 riluzole III , erythropoietin IV , aminoguanidine I , GM-CSF II ,
 Tarlov , 1 , 3 , 5 , 7 methylprednisolone V
 , e-NOS XIAP RT-PCR .

결 과: 가 V, I, III (p < 0.05).

e-NOS I V, III , e-NOS .

RT-PCR XIAP V, I, III .

결 론: steroid, NOS , Na
 synergic effect

색인 단어: ,