

## Diminution of Secondary Injury after Administration of Pharmacologic Agents in Acute Spinal Cord Injury Rat Model

-Comparison of Statins, Erythropoietin and Polyethylene Glycol-

Jae-Won You, M.D., Hong-Moon Sohn, M.D., Sang-Ha Park, M.D.

J Korean Soc Spine Surg 2012 Sep;19(3):77-84.

Originally published online September 30, 2012;

<http://dx.doi.org/10.4184/jkss.2012.19.3.77>

Korean Society of Spine Surgery

Department of Orthopedic Surgery, Inha University School of Medicine  
#7-206, 3rd ST. Sinheung-Dong, Jung-Gu, Incheon, 400-711, Korea Tel: 82-32-890-3044 Fax: 82-32-890-3467

©Copyright 2011 Korean Society of Spine Surgery

pISSN 2093-4378 eISSN 2093-4386

The online version of this article, along with updated information and services, is  
located on the World Wide Web at:

<http://www.krspine.org/DOLx.php?id=10.4184/jkss.2012.19.3.77>

---

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

# Diminution of Secondary Injury after Administration of Pharmacologic Agents in Acute Spinal Cord Injury Rat Model

## -Comparison of Statins, Erythropoietin and Polyethylene Glycol-

Jae-Won You, M.D., Hong-Moon Sohn, M.D., Sang-Ha Park, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea

**Study Design:** An experimental animal study.

**Objectives:** To evaluate and compare the neuroprotective effect of statins, erythropoietin and polyethylene glycol (PEG) after spinal cord injury (SCI).

**Summary of Literature Review:** There are few comparative studies of pharmacological agents for acute SCI.

**Materials and Methods:** Forty Sprague Dawley (SD) rats had a spinal cord injury at T9/T10 using an Ohio State University (OSU) impactor. The animals were randomized to receive one of the following; simvastatin, erythropoietin, PEG or saline. A behavioral outcome assessment was performed on days 2, 4 and 7, and then every week using the Basso, Bresnahan, and Beattie (BBB) score and subscore. The animals were sacrificed at the end of 6 weeks and histologic assessment was performed to measure the areas of white and gray matter.

**Results:** For the animals treated with simvastatin, erythropoietin, PEG and saline, the mean BBB scores at 6 weeks post-injury were  $13.2 \pm 0.1$ ,  $11.7 \pm 0.4$ ,  $13.3 \pm 0.3$ , and  $11.4 \pm 0.2$ , and the BBB subscores were  $9.2 \pm 1.1$ ,  $5.0 \pm 1.3$ ,  $9.1 \pm 1.1$ ,  $4.4 \pm 1.2$ , respectively. The BBB scores and BBB subscores were significantly higher in simvastatin and PEG-treated animals ( $p < 0.05$ ). The areas of white matter at the lesion epicenter were  $0.78 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ ,  $0.46 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ ,  $0.68 \pm 0.15 \text{ mm}^2$ , and  $0.41 \pm 0.04 \text{ mm}^2$  in the simvastatin, erythropoietin, PEG and saline groups, respectively. The simvastatin and PEG-treated animals showed increased sparing of the white matter at the injury epicenter and at 0.2mm rostral and 0.4mm caudal ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Simvastatin and polyethylene glycol administration showed diminished secondary injury after SCI in rats. In addition, they showed almost the same efficacy. However, erythropoietin did not show neuroprotective effect.

**Key Words:** Acute spinal cord injury, Statins, Erythropoietin, Polyethylene glycol, Rat

척수 손상에 의한 마비는 여러 가지 사고 후 발생하는 가장 심각한 합병증 중의 하나이지만 의학이 발전한 현재에도 특별한 치료방법이 없다. 환자 발생이나 유병율에 대한 우리나라의 통계는 아직 없지만 북미에서만 매년 만 명 이상의 환자가 새로 발생하며 병원에 도착하기 전에 사망한 환자를 포함한다면 이보다 많은 발생률을 보일 것이다.<sup>1)</sup> 기원전 3000년경에 기술된 Edwin Smith papyrus에 척수 손상은 치료될 수 없는 질병이라는 기록이 남아있으며, 이러한 개념은 19세기까지 계속되었고 현재에 이르기까지 획기적인 치료 방법이 나와있지는 않지만, 최근의 실험적인 연구에서 척수손상의 병태생리가 밝혀지면서 손상 받은 척수를 보호하거나 재생시킬 수 있는 약물들이 보고되고 있다. 말초 신경계 손상은 적절히 치료되면 신경의 회복을 기대할

**Received:** March 13, 2012

**Revised:** June 1, 2012

**Accepted:** June 7, 2012

**Published Online:** September 30, 2012

**Corresponding author:** Hong-Moon Sohn, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Chosun University Hospital, 588 Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju 501-717, Korea

**TEL:** 82-62-220-3147, **FAX:** 82-62-226-3379

**E-mail:** hmsohn@chosun.ac.kr

"This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited."

이 논문은 2010년도 조선대학교병원 선택진료학술연구비에 의하여 연구되었음.

수 있지만 척수를 포함하는 중추신경계 신경원 자체는 축삭 재생의 내재적 능력이 떨어지고, 손상 받은 척수의 외재적 주변 환경은 myelin inhibitors나 glia scar inhibitors 같은 요소들로 척수 재생에 불리한 환경이 조성되어 척수 손상 후 축삭의 재생은 되지 않는 것으로 보고되고 있다.<sup>2,3)</sup> 척추 골절 및 탈구 등에 의하여 척수에 기계적인 압박력이 가해지면 일차적 손상이 발생한 후, 수분내지 수시간 후부터 매우 복잡한 급성 병태생리학적 변화가 손상 받은 척수에서 발생하는데 이를 이차 손상이라 하며, 이차 손상은 약물이나 수술적 치료로 손상이 진행되는 것을 막거나 호전시킬 수 있으므로 대부분의 척수 손상 연구는 이차 손상을 줄이려는 노력에 집중되고 있다.<sup>4)</sup>

스테로이드는 척수 손상에 대한 동물 실험 및 임상 실험에서 가장 많이 연구되었고 또한 현재 임상에서 유일하게 승인된 약물이지만 그 효용성에 대해서는 아직까지 의문을 제기하는 저자들이 많고 고 용량을 사용해야 되기 때문에 스테로이드와 연관된 심각한 합병증의 가능성은 항상 존재하여 좀더 안전하고 효과가 큰 약물을 찾는 연구가 계속 진행 중이다.<sup>3,5-9)</sup>

이러한 약물들 중 임상에서 척수 손상 이외의 다른 질환에 오랫동안 사용되어 왔거나 사용중인 약물들 중 부가적인 기능으로 중추신경 보호 또는 재생의 효과가 있다고 보고되고 있는 약물들은 복잡한 생체 안정성 검사가 필요 없이 바로 척수 손상 환자에게 적용될 수 있는 장점이 있어서 척수 손상 치료제를 갈망하는 마비환자나 연구자에게 많은 관심의 대상이 되고 있다. 척수 손상 후 2차 손상을 줄이고 신경학적인 기능을 회복시키기 위한 연구로 많은 약물들이 소개되고 있는데 statins,<sup>9,10)</sup> erythropoietin,<sup>11)</sup> polyethylene glycol(PEG)<sup>12,13)</sup> 등의 약물은 최근의 보고에서 척수 손상에서 신경 보호기능이 있는 것으로 보고되어 관심의 대상이 되고 있으나 아직까지 이들 약물들을 비교하여 어떤 약물이 더 척수 손상 후 신경 보호 효과가 큰 지에 대해서는 체계적인 실험 결과가 없는 실정이다.<sup>14)</sup>

본 연구의 목적은 동물 급성 척수 손상 모델에서 신경보호 작용이 있는 것으로 보고되고 있는 statins 과 erythropoietin, polyethylene glycol을 쥐의 척수 손상 모델에 각각 주입하여 신경 보호 효과가 있는 지와 효과가 있다면 각각을 서로 비교하여 어떤 약제가 더 우수한 효과를 보이는지를 행동평가 및 감각 평가, 조직학적 검사를 통해서 알아 보고자 하였다.

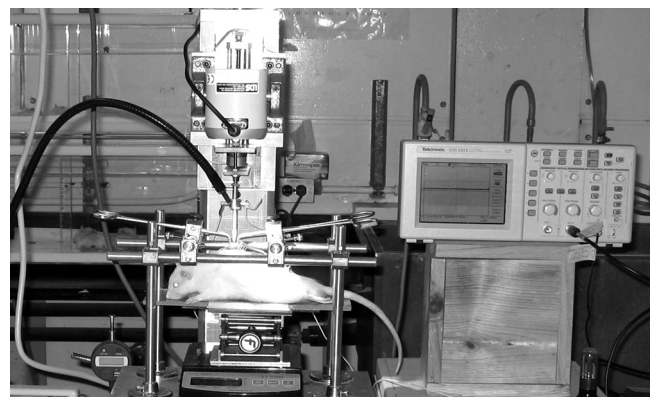
## 대상 및 방법

### 1. 척수 손상 및 관리

흰쥐 수컷 Sprague-Dawley 46마리(300-350gm)에 ketamine hydrochloride (72 mg/kg; Bimeda-MTC, Cambridge, ON)과

xylazine hydrochloride (9 mg/kg; Bayer Inc, Etobicoke, ON)을 20mM Phosphate Buffered Solution (PBS)에 희석시켜 복강내 마취를 하고 후방 정중 절개를 이용해 흉추에 도달 한 후 흉추 T9/10에 후궁 절제술을 하고, Ohio State University (OSU) impactor를 이용하여 척수 손상을 시켰다 (1.5mm displacement, 300m/s), (Fig. 1). 비교적 동일한 손상 조건을 맞추기 위해 손상력이 200-260 kdyne 바깥범위에 있는 동물들은 실험대상에서 제외하여 이 조건에 맞는 40마리를 사용하였다. 척수 손상 후 실험 쥐를 각각 10마리씩 무작위로 네 군으로 나누고 제 1군은 simvastatin(Zorcor®, 20mg/kg)을 위관 영양법(oral gavage)으로 투여하고 동일 용량을 하루에 한차례 각각 7일간 투여하였다. 제 2군은 erythropoietin (Eprex®, 5000 IU/kg)을 경정맥을 통해서 한 차례 투여하였다. 제 3군은 PEG(1g/kg, AAI Pharma Inc., Wilmington, NC)를, 제 4군은 생리 식염수(2ml)를 경정맥을 통해서 6시간 간격으로 총 5회 투여하였다. 제 3,4 군은 약물을 시간간격을 두고 5차례를 투여해야 하므로 약물 투여가 편리하도록 특별한 장치를 만들어서 사용하였는데, 복강내 마취된 상태인 쥐의 목 전방부에 피부절개를 하고 외경정맥을 찾아 절단한 후 근위부는 결찰하고 원위부에는 카테타(3Fr.)를 연결 시키고 피하 박리를 하여 카테타를 목 후방부로 빼낸 후 포트(Plastic soloPort, Insteck Solomon, San Antonio, Tx)에 연결하였다. 포트는 목 후방의 피하층에 심고 피부봉합을 한 후 약물은 포트에 주입하였다. 저 체온증에 의한 신경보호 효과를 차단시키기 위하여 모든 실험동물은 척수 손상 후 37°C의 동물 보육기(incubator)에서 마취가 깰 때까지 관찰하였다.

통증 관리를 위하여 소염 진통제인 buprenorphine (0.02 mg/kg, Temgesic®, Reckitt Benkiser Healthcare Ltd., UK)을 수술 직전과 수술 후 2일까지 피하 주입하였고, 정상적으로 소변을 볼



**Fig. 1.** Ohio State University (OSU) Impactor. A laminectomy (T9-10) was performed, and the bases of the adjacent spinous processes were secured with modified Allis clamps. The impactor was then triggered to deliver mechanical injury. Animal model of acute spinal cord contusion was made.

**Table 1.** Biomechanical parameters of the contusion injury. There were no significant differences among the four groups with respect to the peak force of the injury and the displacement of the impactor tip.

Groups	Force (kdynes)	Displacement(mm)	n
Simvastatin	227 ± 5.24	1.46 ± 0.03	10
Erythropoietin	225 ± 4.72	1.46 ± 0.03	10
Polyethylene glycol	226 ± 6.74	1.46 ± 0.03	10
Control	226 ± 6.32	1.46 ± 0.03	10

수 있을 때까지 하루에 3회씩 배뇨를 인위적으로 시켰으며, 동물 사육장에서 먹이와 물을 제한 없이 공급하여 사육하였다. 수술 후 6주말에 동물을 희생시키고 척수조직을 채취하였다.

## 2. 행동 평가 및 감각 평가

모든 행동 평가는 척수 손상과 약물 투여에 관여하지 않은 독립된 2사람의 관찰자에 의하여 기록된 후 평균 점수를 이용하였다. 행동 평가를 위하여 모든 실험 쥐는 척수 손상 전에 Basso, Bresnahan, and Beattie(BBB) score<sup>15)</sup>와 BBB subscore<sup>16)</sup>를 측정하였고, 척수 손상 후 각각 2,4,7일째 그 후로는 매주, 수술 후 6주 말까지 BBB score와 BBB subscore를 측정하여 수상 전과 비교하였다. 가로대가 불규칙 적으로(1-3cm 간격) 놓여진 수평 사다리를 건너가게 해서 뒷발이 가로대를 밟지 못하고 빠지는 횟수를 측정하는(foot fall) 사다리 건너기 검사를 척수 손상 전과 손상 후 6주에 시행하여 뒷발 근력의 회복과 앞, 뒷발의 조화(coordination)가 회복되는 정도를 측정하였다. 감각 평가를 위하여 von Frey monofilament device (Semmes-Weinstein monofilament, Stoelting Co., Wood Dale, IL)를 이용한 뒷다리의 pinprick 감각 검사를 시행하였다. 실험 쥐를 철망 위에 올려 놓은 후 유리 커버를 씌우고 3-4분간 자유롭게 놔두어 뒷발이 철망에 닿아있는 상태에서 monofilament로 뒷발에 압력을 가할 때 뒷발을 드는 순간의 압력을 측정하였으며 척수 손상 전과 손상 6주 말에 각각 측정하여 비교하였다.

## 3. 조직학적 평가

수상 후 6주말에 실험동물들에게 pentobarbital sodium (107 mg/kg, Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, Ontario, Canada)을 복강내 주입하여 마취시킨 후 왼쪽 심실을 통하여 phosphate buffered saline을 관류시켜 혈액을 제거한 다음 0.1M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)용액에 녹인 4% paraformaldehyde로 관류 고정시킨 후 척수 손상 부위(epicenter)를 중심으로 위, 아래 약 15mm 정도의 척수를 채취하여 4°C에서 같은 고정액에 3-5시간 더 고정하였다. 그 후 조직은 0.1M PBS용액에 30% sucrose(Sigma)를 희석하여 4°C에서

24시간 침적시킨 다음 드라이아이스를 이용하여 급속 냉동시키고 -80°C의 냉동고에 조직을 보관하였다. 조직학적인 평가를 위해서 냉동 보관된 척수를 냉동절편기(microtome)를 이용하여 20  $\mu$ m 두께로 축방향(axial) 절편을 만들고 eriochrome cyanine (EC)염색과 neutral red 역 염색(counter-stain)을 한 후 5배율의 Zeiss(Oberkochen, Germany) Axioplan2 microscope과 이에 연계된 software(Northern Eclipse: Empix, Mississauga, ON, Canada)를 이용하여 이미지를 저장하였다. 저장된 이미지에서 보존된 회색질과 백색질의 면적은 SigmaScan Pro version 5.0.0 (Systat Software Inc.)을 이용하여 측정하였다.

## 4. 통계처리

모든 통계처리는 윈도우용 SPSS 17.0을 이용하였다. 치료군 간의 차이는 분산분석법(one or two way analysis of variance, ANOVA)을 이용하였고, 감각 검사와 사다리 검사는 Student's t-test를 이용하였으며, p값이 0.05 이하일 때 통계적으로 의의가 있는 것으로 간주하였다.

## 결과

각 군간의 OSU impactor 최대 가력력은 큰 차이가 없어 흉수 좌상의 생역학적 효과는 비슷했을 것으로 판단된다(Table 1).

### 1. 행동평가 및 감각 평가

모든 실험동물에서 수상 후 2일째 BBB score가 0이었으며 시간이 지날수록 호전되면서 수상 후 7일째 가장 많은 호전을 보였다. 6주째 평균 BBB score는 simvastatin군 13.2±0.1, erythropoietin군 11.7±0.4, PEG군 13.3±0.3, 생리식염수군 11.4±0.2 이었으며, BBB subscore는 각각 9.2±1.1, 5.0±1.3, 9.1±1.1, 4.4±1.2이었다(Fig. 2, 3). BBB와 BBB subscore 모두 수상 후 4주째부터 6주째까지 simvastatin과 PEG군에서 erythropoietin과 대조군에 비해 의의 있는 호전을 보였다(p<0.05).

6주말에 시행한 사다리 건너기 검사에서는 총 뒷발자국에 대

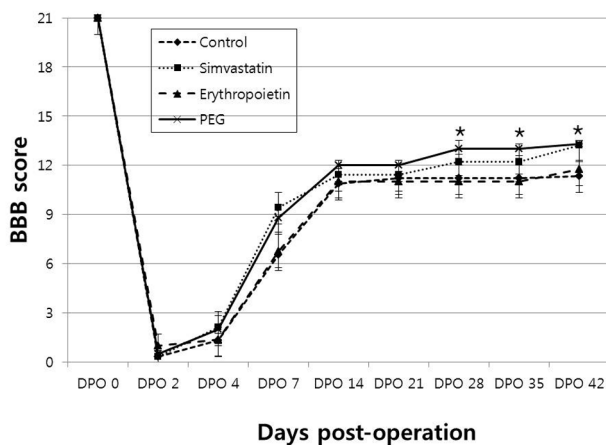


한 가로대를 밟지 못한 뒷발(missed step)의 백분율을 구하였는데 simvastatin군  $28.0 \pm 3.9\%$ , erythropoietin군  $27.2 \pm 7.8\%$ , PEG군  $30.1 \pm 4.1\%$ , 생리식염수군  $29.2 \pm 5.8\%$ 이었으며, 각 군간에 유의 있는 차이는 없었다(Fig. 4)( $p > 0.05$ ).

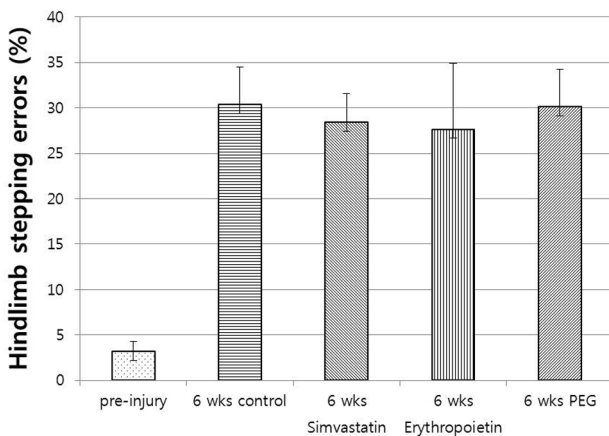
6주말에 시행한 감각검사에서는 simvastatin군  $32.1 \pm 2.5g$ , erythropoietin군  $31.1 \pm 2.1g$ , PEG군  $30.6 \pm 0.2g$ , 생리식염수군  $32.3 \pm 0.1g$ 으로 각 군 간의 유의 있는 차이는 없었다(Fig. 5)( $p > 0.05$ ).

## 2. 조직학적 평가

수상 후 6주말에 채취한 척수조직에 대한 조직학적 평가에서 회색질의 면적을 비교한 결과 네 군 간의 유의 있는 차이가



**Fig. 2.** BBB score. Simvastatin and PEG-treated animals showed improved open-field locomotor (BBB) scores compared with erythropoietin and saline-treated control animals (\*,  $p < 0.05$ ).

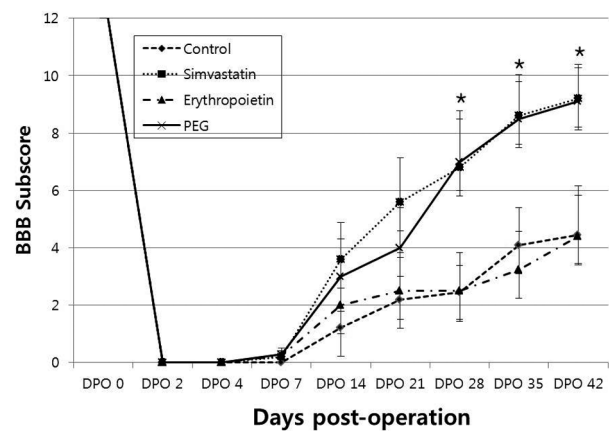


**Fig. 4.** Horizontal ladder test. Comparing with preinjury, four groups showed increased hindlimb stepping errors. There was no difference among the four groups after 6 weeks post injury ( $p > 0.05$ ).

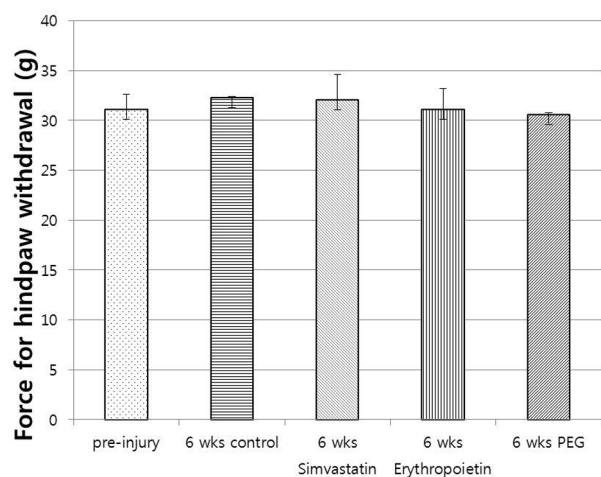
없었지만 백색질의 면적은 수상 중심부에서 simvastatin 군  $0.78 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ , erythropoietin 군  $0.46 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ , PEG 군  $0.68 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ , 생리식염수 군  $0.41 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ 으로 simvastatin 군과 PEG 군에서 유의 하게 백색질의 보존이 많았다( $p < 0.05$ ).

## 고찰

척수 손상 후 신경 재생이나 보호에 대한 연구가 최근 활발히 진행되고 있는데 많은 연구자들에 의하여 동물 실험에서 척수 재생이나 보호에 효과가 있는 치료 방법으로 줄기세포, 신경보호 약물, neurotrophic factors 등이 보고되고 있지만 실제 환자에 적용하기 위한 임상 실험이 되기까지는 배아줄기세포는 윤리



**Fig. 3.** BBB subscore. Simvastatin and PEG-treated animals showed improved BBB subscores compared with erythropoietin and saline-treated control animals (\*,  $p < 0.05$ ).



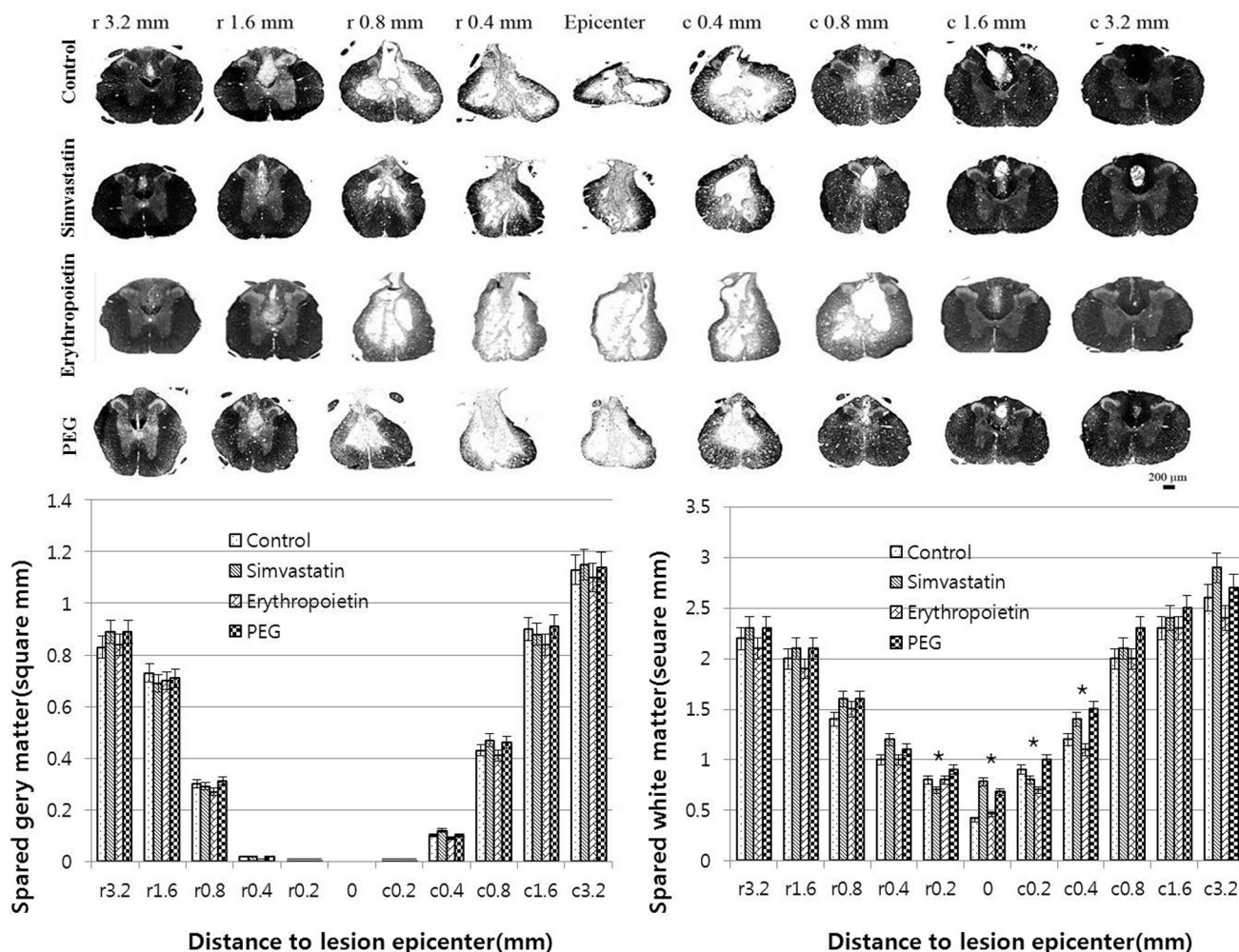
**Fig. 5.** Pinprick sensory test. There was no difference among the four groups after 6 weeks post injury ( $p > 0.05$ ).

적인 문제를 해결해야 되고, 유전자 치료와 실험 약물들은 엄격한 인체 안정성 실험 등이 필요하여 연구가 계속되지 못하고 동물 실험 자체에서만 끝나 척수 재생에 대한 병태생리를 이해하는 데에만 이용되는 경우가 대부분이다.<sup>2,3,17)</sup>

이러한 이유 때문에 임상에서 여러 가지 질환에 실제로 사용되고 있는 약물 중에 그 부가작용으로 신경 보호 기능이 있는 스테로이드, minocycline, erythropoietin 같은 약물들에 많은 관심이 집중되고 있으며 일부 약제들은 임상 실험이 계획되거나 진행 중이다.<sup>17,18)</sup> 그러나 이차 손상이 여러 가지 복잡한 경로에 의하여 발생하고 아직까지는 절대적인 역할을 하는 한가지 요소가 밝혀져 있지 않은 상태에서, 그동안 다른 질환에서 사용되었던 약물은 투여 용량이나 부작용 등이 알려져 있으므로 신경 보호 효과가 있는 것으로 확인되면 쉽게 임상에서도 사용할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 최근에 신경 보호 효과가 있는 것으로 보고되고 있는 약물들 중에서 임상에 쉽게 적용이 가능하

고 생각되는 statins와 erythropoietin, polyethylene glycol이 신경 보호 효과가 있는지를 확인하고 신경 보호 효과가 있다면 어떤 약물이 더 효과적인가를 동물실험을 통해서 확인하고자 하였다.

척수 손상 모델을 만들기 위해서는 척수를 완전 혹은 부분 절단 하거나 여러 가지 impactor나 balloon, clip 등을 이용하여 척수 손상을 유발 시킬 수 있는데 실제로 임상에서 발생하는 척수 손상은 완전 절단 보다는 신경 타박에 의한 척수 압박이 대부분 이므로 본 연구에서는 OSU impactor를 이용한 신경 타박으로 척수 손상을 유발 시켰으며, 일정한 정도의 손상을 유지하기 위하여 손상력이 200-260 kdyn에 이내의 실험 쥐만을 연구 대상으로 삼았고, 이 동물 들은 모두 수술 후 2일째 BBB score가 0으로 완전 하지 마비를 보였다. 행동 평가에서 gross locomotion의 회복은 BBB score로 확인되지만 뒷발과 앞발의 조화(coordination)가 회복되지 않은 상태에서 뒷발의 위치나 뒷발 들기(paw positioning or toe clearance) 등의 fine locomotion은 BBB score



**Fig. 6.** Histology assessment. There was no significant difference of gray matter sparing among the four groups. The simvastatin and PEG-treated animals showed increased sparing of the white matter at the injury epicenter and at 0.2mm rostral and 0.4mm caudal (\*,  $p < 0.05$ ).

만으로는 측정하기 어려우므로 BBB subscore를 같이 사용하였다. 또한 실제 임상에서의 신경 보호 효과는 운동 기능의 호전으로 판단하므로 뒷발의 근력 회복이나 앞, 뒷발의 조화를 확인할 수 있는 사다리 검사를 추가하여 운동기능의 호전여부를 여러 방법을 통하여 확인하고자 하였다.

Statins는 HMA-CoA reductase inhibitor로 체내 콜레스테롤 합성 효소를 억제하여 저 밀도 지단백(low density lipoprotein, LDL) 수용체의 수와 활성도를 감소시켜 결과적으로 혈장내 콜레스테롤을 감소시키는 기능을 한다. 이러한 이유로 비만 환자에 대한 보조 약제로 사용되거나, 순환기 내과 영역에서 심장병, 협심증, 뇌졸중 및 심장 발작 환자에서 흔히 이용되는 약물이다. 또한 혈관내피세포에서 일산화질소(nitric oxide)의 농도를 증가시키고, 산화적 스트레스(oxidative stress)를 줄이며, 항 염증 효과를 나타내어 뇌신경 질환에서 효과를 나타내는 것으로 추정된다.<sup>10)</sup> 본 연구에서는 statins 중 흔히 임상에서 사용되고 있는 simvastatin을 인간에 사용하는 용량을 쥐의 체중으로 환산하여 위관 영양법을 이용하여 주입하였으며, Zacco 등<sup>19)</sup>이 생쥐 모델에서 사용한 양과 비슷한 용량을 사용하였다. 약물의 주입 양이나 주입 횟수 등에 대해서는 추가적인 연구가 필요하겠지만 경구 투여 약이므로 척수 손상 후에 오는 2차적인 손상을 줄일 수 있는 정도의 기간으로 일주일간 투여하였으며 erythropoietin이나 대조군에 비해 유의 있는 이차 척수 손상 감소 효과를 나타냈다. Erythropoietin은 저산소증에 반응하여 주로 신장에서 만들어지는 호르몬으로 항암요법, 만성 신부전, 자가 수혈 등에 의한 빈혈에 광범위하게 임상에서 사용되는 약물이다. 동물 실험에서 노졸중, 다발성 경화증, 파킨슨 병, 심근 경색, 척수 손상 등에서 조직 보존 특성이 있는 것으로 보고되고 있으며, 대동맥 협착으로 유발된 척수의 허혈 모델에서 운동 신경 세포의 세포자멸사를 억제하고 운동 기능을 향상 시킨 것으로 보고되고 있다.<sup>11)</sup> Gorio 등<sup>17)</sup>은 외상성 척수 손상 동물 모델에서 손상 후 즉시 erythropoietin을 주입하여 행동 평가와 조직학적인 평가에서 신경 보호 효과를 확인하였으며 동물 모델에서 신경 보호 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 Gorio 등<sup>17)</sup>에 의하여 신경보호 효과가 있었다는 용량인 5000 IU/kg을 사용하였는데 대조군에 비하여 유의 있는 신경 보호 효과를 확인할 수 없었으며 이는 신경 보호 효과가 있었다고 보고하는 저자들의 결과와 다른데, 실험동물의 성, 종류 및 체중 그리고 약물의 용량이나 투여 시기 등 여러 가지 변수가 있을 수 있으므로 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

Polyethylene glycol(PEG)은 수용성 계면활성제/중합체(hydrophilic surfactant/polymer)로 N-methyl-D-aspartate(NMDA)수용체를 생리적으로 차단하며, caspase-3 억제 작용

으로 척수 손상후 신경원을 복구하거나 보호하는 기능이 있는 것으로 보고되었으며 최근에는 guinea pig에서 체성 감각 유발 전위를 강화시키고 척수 백색질에 의해서 매개되는 반사를 회복시켰다는 보고가 있어 인체에서 신경조직을 복구하고 신경전도성을 회복시킬 가능성이 많은 약물이다.<sup>20-22)</sup> 투여된 PEG의 용량 또한 Ditor 등<sup>23)</sup>에 의해서 신경보호 효과가 있다는 용량(1g/kg)을 사용하였으며 쥐의 목 피부아래에 연결된 포트를 통하여 30 시간 동안 주입하여 수상 후 이틀 정도의 기간 동안 혈액내의 약물 농도를 일정 수준으로 유지하여 신경 보호 효과를 확인하려 하였으며 erythropoietin이나 대조군에 비해 유의 있는 이차 손상 감소 효과를 확인할 수 있었다.

수상 6주 말에 시행된 조직학적 평가에서 수상 중심부에서 3mm 정도 상하 부위내의 척수 조직은 손상되어 있었으며 낭종 공동(cystic cavity)이나 아교세포 반흔 조직(glia scar tissue)으로 채워져 있어서 척수 손상을 확인할 수 있었고, 백색질과 회색질의 대한 남아있는 면적을 구하여서 조직학적인 이차 손상 감소 효과를 평가하였는데, 회색질의 보존은 네 군간에 차이가 없었으며, 중심부에서 두부(cranial) 0.2mm, 미부(caudal) 0.4mm 까지는 simvastatin 군과 PEG군에서 유의 있게 백색질이 많이 보존되어 있었다. 이는 타박상 모델(contusion injury model)에서는 척수의 중심부에서부터 이차 손상이 발생하여 변연부쪽으로 진행하므로 완전 마비를 보일 정도의 심한 손상이 가해졌기 때문에 회색질은 거의 파괴되어 각 군간의 효과를 비교하기가 어려우며, 변연부의 백색질 일부만 보존되어 이곳에서 약물의 효과에 의한 차이를 보인 것으로 판단된다. 그러므로 척수에 가해지는 손상력을 줄인다면 각 약물간에 세밀한 효과의 차이를 확인할 수 있을 것이라는 가정이 가능하며 이에 대해서도 추가적인 연구가 필요할 것이다.

대부분의 급성 척수 손상에 대한 연구가 수상 일주일 이내의 결과를 보고하는 것과 달리 본 연구에서는 초기에 완전 손상을 유발 시키고 6주 동안 충분히 뒷발의 운동 능력이 회복되는 것을 관찰하였으며 실제적인 임상에서는 마비환자의 운동능력 회복이 주요한 관심사 이므로 행동평가에 중점을 주어 관찰하였고 추가적으로 척수 손상 후 약물의 효과로 보존된 회색질과 백색질의 단면적을 비교하여 약물이 효과가 있는지를 확인하였다. 본 연구에서는 시행하지 않았지만 면역조직학적 염색으로 생존한 신경원이나 회색아돌기세포(oligodendrocyte)의 수를 비교하거나 caspase-3를 이용한 세포들의 세포자멸사 비율 등을 확인하는 방법 등을 추가할 수 있겠지만 이용된 약물들이 모두 신경 보호 효과가 있다고 보고된 약물들이고 임상에서의 이용을 염두에 둔 행동평가가 더 중요하다고 판단하여 본 연구에서는 면역조직학적 평가는 시행하지 않았다. 임상에서 척수 손상 환자에



게 효과가 있는 것으로 알려져 있는 methylprednisolone과 각 약물과의 효과를 비교하거나 면역 조직학적 평가를 추가하는 등의 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

## 결론

쥐의 척수 손상 후 simvastatin과 erythropoietin, polyethylene glycol을 투여한 결과 simvastatin과 polyethylene glycol은 행동평가 및 조직학적 평가에서 이차 손상의 감소 효과가 있었으며 두 약물의 효과는 비슷하였다. 그러나 본 연구에서는 erythropoietin의 신경 보호 효과를 확인할 수 없었으며, 이는 다른 저자들의 결과와 상이한 결과로 그 이유에 대해서는 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다. Erythropoietin의 결과에서 보듯이 약물의 효과는 투여 시기나 용량, 또는 이용된 동물의 종류, 성, 체중 등 여러 가지 변수에 의해서 약물의 효과가 결정될 수 있으므로 임상에서 위의 약물들을 사용하기 위해서는 단순한 체중에 따른 약물의 용량 증가만으로는 충분하지 않고 각각 약물에 대한 인체에서의 약물 대사나 약동학에 대한 이해가 필요하리라 사료됩니다.

## REFERENCES

1. Nobunaga AI, Go BK, Karunas RB. Recent demographic and injury trends in people served by the Model Spinal Cord Injury Care Systems. *Arch Phys Med Rehabil*. 1999;80:1372-82.
2. Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci*. 1999;19:5810-22.
3. Fournier AE, Strittmatter SM. Repulsive factors and axon regeneration in the CNS. *Curr Opin Neurobiol*. 2001;11:89-94.
4. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J*. 2004;4:451-64.
5. Bracken MB, Collins WF, Freeman DF, et al. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA*. 1984;251:45-52.
6. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med*. 1990;322:1405-11.
7. 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*. 1997;277:1597-604.
8. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx*. 2004;1:80-100.
9. Pannu R, Barbosa E, Singh AK, Singh I. Attenuation of acute inflammatory response by atorvastatin after spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res*. 2005;79:340-50.
10. Stepien K, Tomaszewski M, Czuczwar SJ. Neuroprotective properties of statins. *Pharmacol Rep*. 2005;57:561-9.
11. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:2258-63.
12. Luo J, Shi R. Polyethylene glycol inhibits apoptotic cell death following traumatic spinal cord injury. *Brain Res*. 2007;1155:10-6.
13. Kwon BK, Roy J, Lee JH, et al. Magnesium chloride in a polyethylene glycol formulation as a neuroprotective therapy for acute spinal cord injury: preclinical refinement and optimization. *J Neurotrauma*. 2009;26:1379-93.
14. Kwon BK, Sekhon LH, Fehlings MG. Emerging repair, regeneration, and translational research advances for spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010;35:S263-70.
15. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12:1-21.
16. Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van Rooijen N, Stokes BT. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*. 1999;158:351-65.
17. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:9450-5.
18. Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VW. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain*. 2003;126:1628-37.
19. Zacco A, Togo J, Spence K, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical



- neurons from excitotoxicity. J Neurosci. 2003;23:11104-11.
20. Borgens RB, Bohnert D. Rapid recovery from spinal cord injury after subcutaneously administered polyethylene glycol. J Neurosci Res. 2001;66:1179-86.
  21. Borgens RB, Shi R. Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol. FASEB J. 2000;14:27-35.
  22. Borgens RB, Shi R, Bohnert D. Behavioral recovery from spinal cord injury following delayed application of polyethylene glycol. J Exp Biol. 2002;205:1-12.
  23. Ditor DS, John SM, Roy J, Marx JC, Kittner C, Weaver LC. Effects of polyethylene glycol and magnesium sulfate administration on clinically relevant neurological outcomes after spinal cord injury in the rat. J Neurosci Res. 2007;85:1458-67.

## 급성 척수 손상 쥐 모델에서 약물 투여 후 이차 척수 손상 감소 효과

### - Statins과 Erythropoietin, Polyethylene Glycol의 효과 비교 -

유재원 • 손홍문 • 박상하

조선대학교 의학전문대학원 정형외과학교실

**연구 계획:** 실험 동물 연구

**목적:** 급성 척수 손상에서 statins과 erythropoietin, polyethylene glycol(PEG)을 투여하여 신경 보호 효과를 평가하고 비교하고자 하였다.

**선행문헌의 요약:** 척수손상에서 치료약물의 비교연구는 드물다.

**대상 및 방법:** Sprague Dawley 흰 쥐 40마리(300-350gm)를 사용하여 흉추 T9/10에 Ohio State University(OSU) impactor를 이용하여 척수 손상을 시킨 후 무작위로 4군으로 나누고 statins과 erythropoietin, polyethylene glycol(PEG), 생리식염수를 투여하였다. 행동평가는 수술 후 각각 2, 4, 7일 및 매주에 Basso, Bresnahan, and Beattie(BBB) score와 BBB subscore를 이용하였다. 조직학적 평가는 수상 후 6주째 쥐를 희생시킨 후 척수 조직을 채취하여 회색질과 백색질의 면적을 구하였다.

**결과:** simvastatin과 erythropoietin, PEG, 생리식염수 투여군에서 수상 6주째 평균 BBB score는 각각  $13.2 \pm 0.1$ ,  $11.7 \pm 0.4$ ,  $13.3 \pm 0.3$ , and  $11.4 \pm 0.2$  이었으며, BBB subscore는  $9.2 \pm 1.1$ ,  $5.0 \pm 1.3$ ,  $9.1 \pm 1.1$ ,  $4.4 \pm 1.2$  이었다. BBB score와 BBB subscore는 simvastatin과 PEG 투여군에서 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 손상 중심부 백색질의 면적은 simvastatin과 erythropoietin, PEG, 생리식염수 투여군에서 각각  $0.78 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ ,  $0.46 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ ,  $0.68 \pm 0.15 \text{ mm}^2$ ,  $0.41 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ 로 측정되었다. simvastatin 과 PEG 투여군에서 손상 중심부 및 두부 2mm와 미부 4mm에서 백색질의 보존이 많았다( $p < 0.05$ ).

**결론:** 쥐의 급성 척수 손상후 simvastatin과 PEG 투여한 결과 이차 손상의 감소 효과가 확인되었으며 두 약물은 비슷한 효과를 보였다. 그러나 erythropoietin은 신경보호 효과가 없었다.

**색인 단어:** 급성 척수 손상, Statins, Erythropoietin, Polyethylene glycol, 쥐

**약칭 제목:** 급성 척수 손상에서 이차 손상 감소