

Eicosanoids가 뇌허혈증 흰쥐의 에너지대사 및 Ca^{++} 이동에 미치는 영향

한현정*·이용규·신정희·윤재순

이화여자대학교 약학대학 약학과

(Received January 8, 1994)

The Effect of Eicosanoids on Cerebral Energy Metabolism and the Ca^{++} Concentration in Ischemic Rats

Hyun J. Han*, Youg K. Lee, Jeung H. Shin and Jae S. Yun
College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract-We studied the effect of eicosanoids on the content of energy metabolites and the intrasynaptosomal Ca^{++} ($[Ca^{++}]_i$) concentration in cerebral ischemic rats. An ischemic model was made by bilateral carotid artery ligation (BCAL) and by incubation of synaptosomes under aglycemic and N_2 gas bubbling condition. The content of ATP, creatine phosphate and glucose decreased at 15 minutes after BCAL while that of lactate increased in male Wistar rats. Oral administration of EPA(100 mg/ml/Kg/day) or DHA(16 mg/ml/Kg/day) for 6 weeks improved both the decreases and the increase of the cerebral energy metabolites. In addition, the increase of $[Ca^{++}]_i$ under BACL was suppressed by EPA or DHA treatment. When the both Wistar rats and SHR were administered orally with EPA or DHA for 6 weeks, the effect on the increase of $[Ca^{++}]_i$ under ischemia by N_2 gas bubbling were protected. From these results, it may be that EPA or DHA treatment were greatly contributed to preservation of ischemic cerebral energy metabolism and Ca^{++} concentration.

Keywords □ Eicosapentaenoic acid, Docosahexaenoic acid, Ischemia, ATP, Glucose, Creatine phosphate, Lactic acid, Ca^{++} .

불포화 지방산인 arachidonic acid(AA, $C_{20:4}$ ω -6), eicosapentaenoic acid(EPA, $C_{20:5}$ ω -3) 및 docosahexaenoic acid(DHA, $C_{22:6}$ ω -3) 등 eicosanoids는 생리 작용이 서로 다른 다양한 prostaglandins(PGs)로 대사된다.¹⁾ AA가 항혈전, 혈관 이완 작용이 있는 prostacycline(PGI_2)과 강한 혈소판 응집과 혈관 수축 작용이 있는 thromboxane A_2 (TXA_2)로 대사되는 것에 반하여, EPA는 PGI_2 와 유사한 작용을 가지는 PGI_3 와 혈관 수축 작용이 없는 TXA_3 로 대사되는 것이 보고되어 있다.²⁻⁴⁾ DHA는 생리적 기능이 EPA와 유사하며

대사된다고 알려져있다.^{5,6)} AA, EPA 및 DHA 등을 기질로 하여 생성되는 PGs는 이와 같이 각각의 다른 특성들을 가지며 이들은 체내에서 일정한 비율로 존재하게 되며, 이 균형이 깨어질때 여러가지 병변이 나타남이 알려져 있다.^{1,7)}

뇌 조직이 그 기능을 유지할 수 없을 정도로 뇌 혈류량이 감소된 뇌 허혈시는 뇌세포막에 결합되어 있던 AA가 많이 유리되어 뇌 세포 손상에 관여하는 것으로 보고되어 있다.^{8,9)} 이때 유리된 AA의 일부분은 강력한 생리 활성을 지닌 PGs류로 전환되어 뇌 미세혈류량, 뇌 부종, 뇌조직 손상 등에 영향을 미친다고 알려져 있다.^{10,11)}

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

이러한 뇌허혈시 나타나는 장애는 크게 ATP, creatine phosphate(Pcr) 및 glucose 등의 고갈에 의한 에너지 대사 장애,¹²⁻¹⁴⁾ glucose의 혐기적 산화 산물인 lactate의 과잉 생성에 의한 세포 산성화,¹²⁻¹⁴⁾ 세포내 이온의 항상성 이상에 의한 Ca^{++} 의 세포 내 과잉 축적¹⁵⁻¹⁷⁾ 및 뇌혈액 관문의 변성¹⁸⁾ 등으로 나타나며 이러한 장애들이 뇌세포의 비가역적 손상을 일으킨다.

뇌출혈, 뇌경색 및 동맥 경화증 등의 대표적인 뇌혈관 질환의 개선제로 Ca^{++} 길항제¹⁹⁾ 및 PGs대사 조절 물질들에 관심이 모아지고 있다.^{20,21)} 뇌 미세혈관 표피 세포에서 EPA가 AA의 대사를 상경적으로 억제하였으며,²²⁾ EPA와 DHA 함유 식이로 사육한 흰쥐에서 심근 관상 혈관의 급성 허혈증으로 나타난 세포 손상이 완화되었다는 보고가 있으며,²³⁾ EPA의 투여가 허혈시 PGs와 TXs의 양에는 영향을 주지 않으면서 뇌부종과 뇌혈류 감소를 개선 한다는 보고가 있다.²⁴⁾

따라서 뇌허혈성 손상의 대표적 원인으로 뇌에너지 대사장애와 세포내 Ca^{++} 농도 변화가 관여함으로 ATP, Pcr 및 glucose의 감소, lactate증가와 세포 내 Ca^{++} 의 과잉 축적을 뇌허혈시 장애의 지표로 하여 EPA 및 DHA의 투여가 이러한 에너지 대사 장애와 Ca^{++} 의 세포 내 과잉 축적에 미치는 영향을 밝힘으로서 뇌허혈시 뇌세포손상을 방어할 수 있는지를 규명하고자 하였다.

실험재료 및 방법

투여약물—99% arachidonic acid (AA, Sigma Co.) 99% docosahexaenoic acid (DHA, Sigma Co.)을 각각 tween 80 (Junsei chem. Co. Ltd.)을 함유한 0.3% carboxy methyl cellulose (CMC, Kanto chem. Co. Ltd.) 생리 식염수 용액으로 희석하여 사용하였다. eicosapentaenoic acid (EPA)는 EPA 19.5%, DHA 13.4%를 함유하는 어유정제액(삼진제약)을 사용하여 위에 기술한 용매에 희석하여 사용하였다. 마취제로는 entobar (pentobarbital sodium 한림제약)를 사용하였다.

측정용 시약—에너지 대사물 측정시 사용한 시약으로 lactic dehydrogenase (from rabbit muscle, 9.4 mg pr./ml), hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase (mixed enzymes from bakers yeast, HK 225U/mg pr., G-6-PDH 85U/mg pr.) 등의 효소시약 및 NADP, ATP, ADP, NAD 등이며 이들은 모두 Si-

gma chem. Co.에서 구입하였으며 bovine albumin (22% 녹십자), $HClO_4$ (Junsei chem. Co.)을 사용하였다.

$[Ca^{++}]_i$ 측정시 사용한 시약으로는 Fura 2/AM, N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (Hepes), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA), sodium dodecyl sulfate (SDS) 등을 Sigma chem. Co.에서 구입하였으며, 그의 시약들도 특급 혹은 일급 시약을 사용하였다.

실험 기기—뇌 시료를 얻기 위하여 homogenizer와 centrifuge (Dupont sorvall RC-5B Refriger Superspeed Centrifuge)를 사용 하였으며 뇌 에너지 대사 관련 물질의 측정을 위하여 UV/visible spectrophotometer (Beckman Du-68 Spectrophotometer)을 사용하였다.

Synaptosome을 얻기 위하여 ultracentrifuge (Beckman L8-M)을 사용하였으며 $[Ca^{++}]_i$ 측정을 위하여 spectrofluorometer 25 (Kotron)을 사용하였다.

실험 동물의 구분 및 처리—체중 200~250 g의 Wistar계 웅성 흰쥐와 체중 250~300 g의 웅성 선천성 고혈압쥐 (spontaneously hypertensive rat, SHR)을 1주일 이상 동물실에서 고형사료 (삼양 유지) 및 물을 자유롭게 공급하면서 주위에 적응하게 한 후 실험에 사용하였다.

실험 동물군은 양측 경동맥 결찰에 의한 뇌 허혈군과 N_2 gas에 의한 뇌 허혈군에서 각각 정상 대조군, 허혈 대조군, AA투여군, EPA투여군 및 DHA투여군으로 나누었으며 6마리를 한군으로 하였다. 0.3% CMC 생리 식염액 (1 ml/Kg), AA (1 mg/ml/Kg), EPA (100 mg/ml/Kg) 및 DHA (16 mg/ml/Kg)을 1일 1회 6 주간 경구 투여하였다.

양측 경동맥 결찰에 의한 뇌 허혈군은 Wistar계 웅성 흰쥐를 사용하여 뇌에너지 대사 관련 물질과 세포 내 $[Ca^{++}]_i$ 를 측정하였으며, N_2 gas에 의한 뇌 허혈군에서는 Wistar계 웅성 흰쥐와 웅성 SHR의 대뇌 피질에서 세포 내 $[Ca^{++}]_i$ 를 측정하였다.

뇌 허혈증 동물 모델—6주 동안 경구 투여한 후 entobar (50 mg/Kg i.p.)로 마취시킨 후 고정, 목의 중앙선을 절개하여 경동맥을 주위로 부터 조심스럽게 분리하고 양측을 거의 동시에 결찰하여 15분간 뇌

혈류를 차단한 동물을 양측 경동맥 결찰에 의한 뇌 허혈군 동물로 사용 하였다.²⁵⁾

N_2 gas에 의한 뇌 허혈군 동물로는 6주간 경구 투여한 Wistar계 웅성 흰쥐와 웅성 SHR을 각각 단 두하여 synaptosome을 만든 후 glucose가 결핍된 완충액(37°C)에서 N_2 gas를 1시간 동안 통과시켰다.²⁶⁾

뇌 시료의 추출—Glowinski 법²⁷⁾에 의하여 적출한 뇌를 얼음 위에서 10분간 고정시킨 후 대뇌 피질을 분리, 무게를 측정된 후 빙냉 3 M-HClO₄ 0.5 ml/수용액에서 10분간 고정시켜 단백질을 침전시킨 후 빙냉한 증류수 1.5 ml를 가하여 homogenizer로 30초간 균질화한 후 30,000 g, 4°C 에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액에 2 M-KHCO₃ 0.75 ml를 가하여 과잉의 HClO₄을 중화시킨 후 30,000 g, 4°C 에서 15분간 원심분리 하였다. 이 상층액을 취하여 ATP, Pcr, glucose 및 lactate 측정용 시료로 사용하였다.

에너지 대사물의 정량—뇌 에너지 대사 관련 물질의 정량은 표준 효소정량법에²⁸⁾ 의하여 ATP, Pcr 및 glucose는 NADPH의 생성을, lactate는 NADH의 생성을 지표로 UV/visible spectrophotometer를 사용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 물질의 양은 흡광도 값의 차에 회색 배율을 곱하여 NAD(P)H의 분자 흡광 계수로 나눈 값으로 $\mu\text{M/g wet tissue}$ 로 표시하였으며 각각의 정량법은 다음과 같다.

ATP와 Pcr의 정량은 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.6)에 H_2O , 0.016 M NADP, 0.6 M glucose와 뇌 시료 0.1 ml를 가하여 흡광도(OD₁)를 측정하였다. 여기에 hexokinase (140 U/ml H_2O)/glucose-6-phosphate dehydrogenase (53 U/ml H_2O)를 가하여 10분간 방치하고 흡광도(OD₂)를 측정한 후 그 차이를 ATP의 흡광도로 하였다. 이 혼합액에 0.03 M ADP를 가하여 흡광도 (OD₃)를 읽은 후 creatine kinase (600 U/ml H_2O)를 가하고 10분 후 흡광도 (OD₄)를 측정하여 그 차이를 Pcr의 흡광도로 하였다.

Glucose의 정량은 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.6)에 0.016 M NADP, 0.016 M ATP와 뇌 시료 0.1 ml를 가하여 흡광도(OD₁)를 측정한 후 hexokinase (140 U/ml H_2O)/glucose-6-phosphate dehydrogenase (53 U/ml H_2O)를 가하여 10분 후 흡광도(OD₂)를 측정하고 그 차이를 glucose의 흡광도로 하였다.

Lactate의 정량은 0.4 M glycine-hydrazine buffer액 (pH 9.0)에 뇌 시료 0.1 ml, 0.027 M NAD와 lactic de-

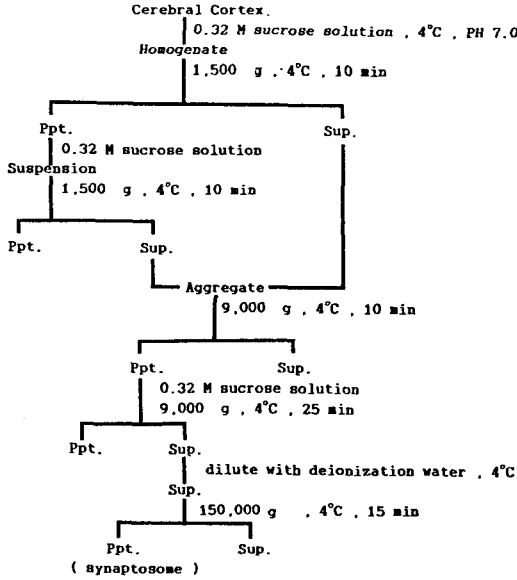
hydrogenase (2 ml pr./ml H_2O)를 가하여 37°C 수욕상에서 60분간 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 대조액은 뇌 시료 대신 H_2O 0.1 ml를 가하여 동일한 조건에서 흡광도를 측정하고 그 차이를 lactate의 흡광도로 하였다.

Synaptosome 제조—Dodd 등의 방법을 수정한 Komulainen과 Bondy의 방법²⁹⁾에 따라 synaptosome을 제조하였다. 0.45 g의 대뇌 피질에 0.32 M sucrose (4°C, pH 7.0)를 가하여 homogenizer로 균질화(4°C)하고 1,500 g, 4°C 에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 다시 9,000 g, 4°C 에서 20분간 원심분리 시킨 후 침전물을 다시 0.32 M sucrose로 분산시켜 9,000 g, 4°C 에서 25분간 원심분리하여 0.8 M sucrose용액층인 중간층 (nerve ending particles)을 취하여 동량의 정제수 (4°C)로 희석하여 0.3 M~0.4 M sucrose용액이 되도록 하였으며, 그 후 150,000 g에서 15분간 초원심분리하여 침전물인 synaptosome을 얻어 25 mM hepes buffer A(4°C, pH 7.4; NaCl 125 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaHCO₃ 5 mM, glucose 6 mM, CaCl₂ 1 mM)에 0.15 g equivalent/ml이 되도록 분산시켰다(Scheme 1).

이 실험에서 synaptosome제조 시간은 2시간이 넘지 않도록 신속하게 하였으며 각각의 synaptosome이 섞이지 않게하였다.

synaptosome내 Ca^{++} ($[Ca^{++}]_i$) 정량—Komulainen과 Bondy의 방법²⁹⁾에 따라 형광 지시약인 fura 2/AM을 이용하여 $[Ca^{++}]_i$ 를 측정하였다. 최근 미세한 용량으로 실험되는 $[Ca^{++}]_i$ 측정을 위하여 여러가지 방법이 연구된 결과, 새로운 지시약인 fura 2/AM은 세포막을 통과할 수 있으며 세포내 esterase에 의하여 가수 분해 되는 장점을 지니고 있어, fura 2의 형광을 확장 시키게 되며, 이 결합체는 Ca^{++} 을 정량하는데 유용하여 근래에 synaptosome과 같은 다양한 포유 동물 세포의 Ca^{++} 을 정량하는데 쓰이고 있다.³⁰⁾ fura 2는 앞서 사용된 qine 2에 비하여 형광 강도가 30배 정도 더 크고 Mg^{++} , Zn^{++} 등과 같은 다른 2가 양이온에 대하여 Ca^{++} 에 대한 선택성을 향상 시킨 것이다.

Hepes buffer A에 분산 되어있는 synaptosome을 1 ml씩 두 번 취하여 37°C 에서 10분간 incubation 시켰다. 각각의 Ca^{++} 에 형광성을 부여하는 fura 2/AM을 첨가하여 다시 37°C 에서 20분간 incubation 후



Scheme I—Method for synaptosome preparation.

9,000 g, 4°C 에서 5분간 원심분리 하여 얻은 침전에 hepes buffer A을 가하여 분산시킨 다음, 분산된 용액을 0.5 ml씩 두번 부분 표준화하여 13,000 g, 4°C 에서 1분간 microcentrifuge하였다. 얻어진 침전에 25 mM hepes buffer B(37°C, pH 7.4; NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, glucose 6 mM, CaCl₂ 1 mM)을 가하여 분산시킨 후 spectrofluorometer를 이용하여 excitation wavelength는 340 nm, emmission wavelength는 510 nm에서 측정하였다(F). 대조군은 fura 2/AM 대신 용매인 DMSO를 첨가하여 동일하게 처리하였다.

그 후 10 mM EGTA와 SDS을 처리한 후 F_{min}을 측정하고, 마지막으로 11 mM Ca⁺⁺을 가하여 fura 2/AM을 Ca⁺⁺으로 포화시킨 후 F_{max}을 측정 하였다.

각 시료중 [Ca⁺⁺]_i는 Nachshen 등의 방법³¹⁾에 따라 다음과같이 계산하였다.

$$[Ca^{++}]_i = K_d \frac{F - F_{MIN}}{F_{MAX} - F}$$

K_d: the association constant of fura 2-Ca⁺⁺ complex

F_{min}: the calcium-independent fluorescence

$$[Ca^{++}]_i < 1 nM$$

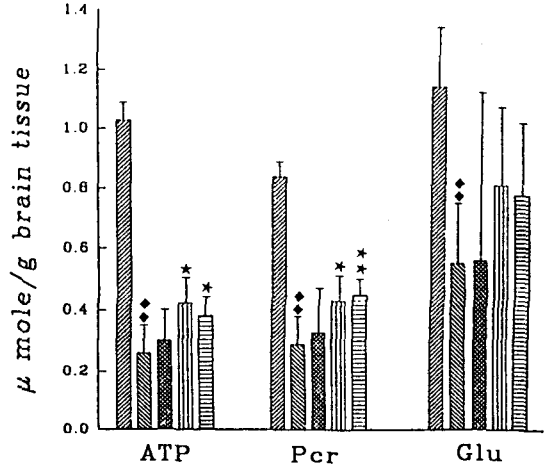


Fig. 1—The effect of oral administration of AA, EPA and DHA for 6 weeks on the content of energy metabolites under ischemia by bilateral carotid artery ligation in Wistar male rats.

Each value is mean ± S.E. of 6 animals
 ▨: normal control group ▩: AA(1 mg/Kg/day) treated group
 ▤: ischemic control group ▥: EPA(100 mg/Kg/day) treated group
 ▦: DHA(16 mg/Kg/day) treated group
 Significantly different from the normal control values, ◆◆p<0.01
 Significantly different from the ischemic control values, ★p<0.05, ★★p<0.01

F_{max}: the maximal fura 2 fluorescence
 [Ca⁺⁺]_i ≫ 1 mM

통계 처리—모든 실험값은 T-test에 의하여 통계 처리 하였으며, P<0.05 일때 유의성이 있는것으로 판정하였다.

결 과

뇌허혈시 에너지대사에 미치는 eicosanoid의 영향 양측 경동맥 결찰 15분 후 뇌 에너지 대사 관련 물질의 변화를 지표로 eicosanoids 장기투여시 뇌 에너지 대사 장애에 대한 작용을 검토하여 그결과를 Fig. 1,2에 나타내었다.

정상 대조군 에서의 ATP, Pcr, glucose 및 lactate양은 1.03, 0.84, 1.14, 9.56 μM/g brain이었고, 허혈성 뇌에서는 ATP, Pcr, glucose양이 정상 대조군에

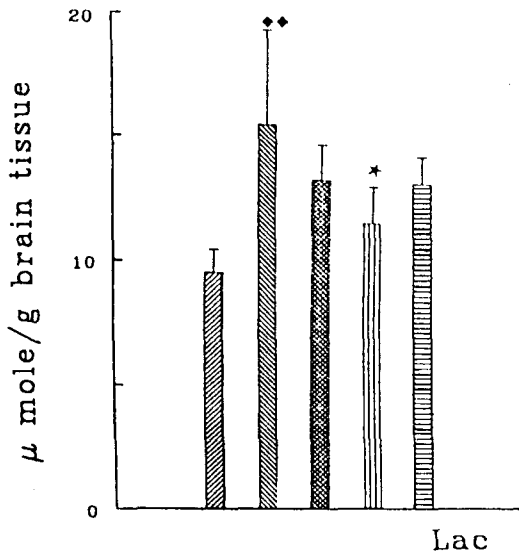


Fig. 2—The effect of oral administration of AA, EPA and DHA for 6 weeks on the content of lactic acid under ischemia by bilateral carotid artery ligation in Wistar male rats.

Each value is mean±S.E. of 6 animals

▨: normal control group ▩: AA(1 mg/Kg/day) treated group

■: ischemic control group ▨: EPA(100 mg/Kg/day treated group

▤: DHA(16 mg/Kg/day) treated group

Significantly different from the normal control values, ♦♦p<0.01

Significantly different from the ischemic control values, ★p<0.05

비해 25.3, 34.5 및 48.2% 유의적으로 감소하였으며 (p<0.01), lactate양은 61.7% 유의적으로 증가하였다 (p<0.01).

AA 장기투여군에서 에너지 대사관련 물질의 유의적인 증감은 없었으나, EPA 장기투여군에서는 허혈 대조군에 비해 ATP, Pcr은 61.5%, 48.3% 유의적(P<0.05, 0.01)으로 증가하였으며, glucose양도 증가하였고, lactate는 35.5% 유의적(P<0.05)으로 감소하였다. DHA 장기투여군에서도 ATP, Pcr양이 각각 46.2%, 55.2% 유의적(P<0.05, 0.01)으로 증가하였으며, glucose는 증가, lactate는 감소하였다.

즉, EPA 장기투여군과 DHA 장기투여군에서 허혈 시 뇌 에너지 대사장애에 개선효과가 있는 것으로 나타났다.

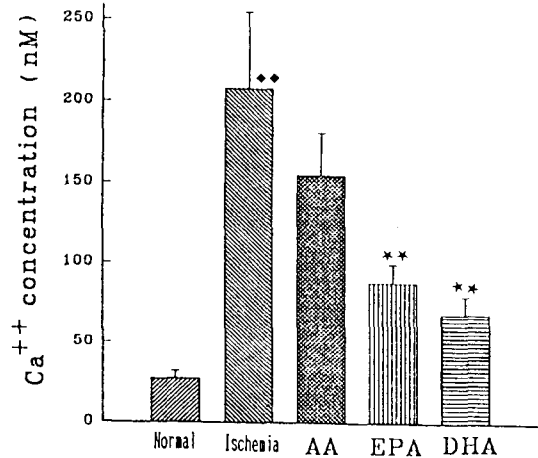


Fig. 3—The effect of oral administration of AA(1 mg/Kg/day), EPA(100 mg/Kg/day) and DHA(16 mg/Kg/day) for 6 weeks on the increase of free intrasynaptosomal Ca⁺⁺ concentration under ischemia by bilateral carotid artery ligation in Wistar male rats.

Each value is mean±S.E. of 6 animals.(quaduplicate for each animal)

Significantly different the normal control values, ♦♦p<0.01

Significantly different from the ischemic control values, ★★p<0.01

허혈성 synaptosome내 [Ca⁺⁺]_i에 미치는 영향

양측 경동맥 결찰에 의한 허혈시 [Ca⁺⁺]_i 변화—양측 경동맥 결찰 15분후 적출한 뇌조직의 synaptosome에서 [Ca⁺⁺]_i를 측정하여 AA, EPA 및 DHA의 장기 투여가 [Ca⁺⁺]_i 변화에 미치는 영향을 비교하여 Fig. 3에 나타내었다.

정상 대조군에서의 [Ca⁺⁺]_i는 26.89 nM인데 비하여 허혈시 208.23 nM로 크게 증가되었다. 이에 대하여 EPA장기 투여군과 DHA장기 투여군에서는 허혈 대조군에 비하여 각각 42.3%, 33.0% 유의적으로 감소하였다(P<0.01).

N₂ gas에 의한 허혈시 [Ca⁺⁺]_i 변화—AA, EPA 및 DHA를 장기 투여한 Wistar계 웅성 흰쥐와 웅성 SHR의 synaptosome에 N₂ gas를 통과시켜 허혈을 유발시킨 후 [Ca⁺⁺]_i 변화를 각각 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다.

Wistar계 웅성 흰쥐에서 허혈 전 [Ca⁺⁺]_i은 정상 대조군과 거의 유사 하였으나, 허혈 후에는 EPA투

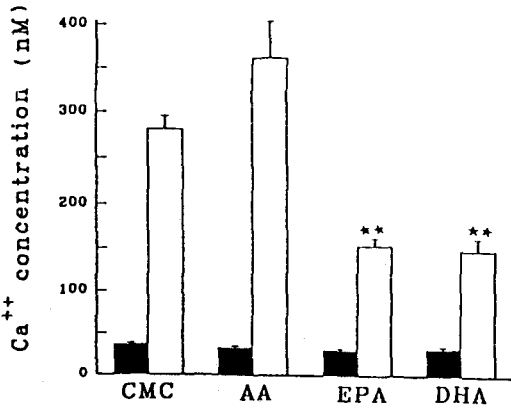


Fig. 4—The effect of oral administration of AA(1mg/Kg/day), EPA(100 mg/Kg/day) and DHA(16 mg/Kg/day) for 6 weeks on the increase of free intrasynaptosomal Ca⁺⁺ concentration under ischemia by N₂ gas bubbling in Wistar male rats. Each value is mean ± S. E. of 6 animals(quaduplicate for each animal) ■: normal group □: ischemic group Significantly different from the ischemic control values, ★ ★p<0.01

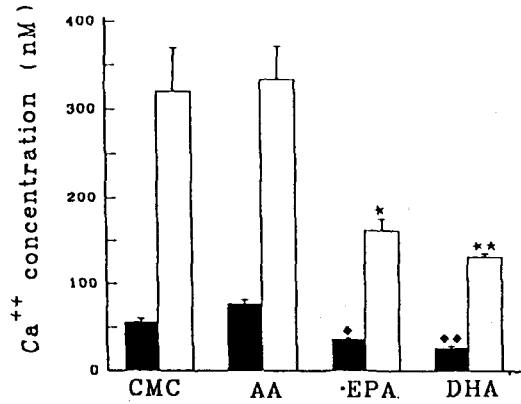


Fig. 5—The effect of oral administration of AA(1 mg/Kg/day), EPA(100 mg/Kg/day) and DHA(16 mg/Kg/day) for 6 weeks on the increase of free intrasynaptosomal Ca⁺⁺ concentration under ischemia by N₂ gas bubbling in SHR. Each value is mean ± S. E. of 6 animals(quaduplicate for each animal) ■: normal group □: ischemic group Significantly different from the normal control values, ◆p<0.05, ◆◆p<0.01 Significantly different from the ischemic control values, ★p<0.05, ★★p<0.01

여군과 DHA투여군에서 허혈 대조군에 비하여 각각 54.8%, 52.9%의 유의적인(P<0.01) 감소를 보였다 (Fig. 4).

웅성 SHR에서는 허혈 전 [Ca⁺⁺]_i가 정상 대조군에 비하여 EPA투여군과 DHA투여군에서 각각 65.4%, 48.5% 유의적(P<0.05, 0.01)으로 감소하였으며, 허혈 후에는 허혈 대조군에 비하여 EPA나 DHA투여군에서의 [Ca⁺⁺]_i가 각각 유의적(P<0.05, 0.01)으로 감소하였다(Fig. 5).

또한, Wistar계 웅성 흰쥐와 웅성 SHR에서의 정상 상태에서의 [Ca⁺⁺]_i를 비교하여 Fig. 6에 나타내었다. Wistar계 웅성 흰쥐에서 허혈 전 [Ca⁺⁺]_i은 정상 대조군과 거의 유사 하였으나, 웅성 SHR에서는 허혈 전 [Ca⁺⁺]_i가 Wistar계 웅성 흰쥐에 비하여 현저히 높았으며, EPA나 DHA가 투여된 웅성 SHR에서는 Wistar계 웅성 흰쥐와 거의 유사한 수준으로 낮아졌다 (Fig. 6).

고 찰

뇌 허혈시 나타나는 뇌 신경 세포의 사멸 원인으로

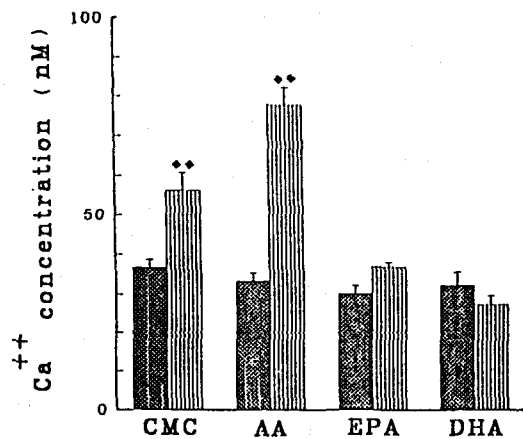


Fig. 6—The effect of oral administration of AA(1 mg/Kg/day), EPA(100 mg/Kg/day) and DHA(16 mg/Kg/day) for 6 weeks on the free intrasynaptosomal Ca⁺⁺ concentration in Wistar male rats and SHR. Each value is mean±S.E. of 6 animals(quaduplicate for each animal) ■: normal group ▨: ischemic group Significantly different from the normal control values, ◆◆p<0.01

지금까지 알려진 것으로는 고 에너지 인산 고갈 등의 에너지 대사장애,¹²⁻¹⁴⁾ glucose의 혐기적 산화물인 lactate의 과잉 생성에 의한 세포 산화,¹²⁻¹⁴⁾ 뇌 미세순환의 손상, 흥분성 신경전달 물질의 영향, 이온 pump의 변성에 의한 Ca^{++} 등의 이온의 불균형,¹⁵⁻¹⁷⁾ free radical류의 영향^{32,33)} 및 허혈 후 오는 허혈성 반점 등이다. 이러한 원인들은 허혈시 뇌 세포손상의 척도로써, 허혈성 뇌 장애의 개선 효과가 예상되는 물질의 효능을 입증하는 데 활용되고 있다.

대표적으로, 세포 피사의 최종 단계(final common pathway)라²⁸⁾ 일컬어 지는 세포내 Ca^{++} 의 과잉 축적이 뇌세포 손상의 지표로 사용되고 있으며,^{15,34,35)} 이러한 뇌 세포내 Ca^{++} 의 축적을 위하여 흰쥐의 뇌 조직(cerebrum)으로부터 유리된 절전 신경 조직의 기능적 및 형태학적인 성질을 그대로 유지하고 있어 신경에 작용하는 신경 전달물질의 합성, 분비, 약물의 작용 기전 연구 및 포유동물 세포의 신경말단에 대한 활성 연구에 유용하게 쓰여지고 있고, 실제로 acetylcholine, catecholamine 및 ATP 정량, K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Cl^- 변화의 정량에 활용되고 있다. synaptosome의 형태학적인 연구에 따르면, 얇은 외막으로 둘러싸인 신경 전달물질을 함유하는 synaptic vesicle이 다수 존재하고 free mitochondria와 다른 조직들도 약간 있으며, 신경 세포가 균질화 하는 동안 신경말단이 axon으로부터 떨어져 나오고, 이 순간 신경말단은 self sealing성질이 있어 단단히 봉합하여 주위의 구성물을 함유하는 연속적인 구조를 형성하는 것으로 알려져 있다.³⁶⁾

본 실험에서는 뇌 허혈시 대표적인 뇌 손상의 원인인 에너지 대사장애에 의한 ATP, Pcr 및 glucose의 감소, lactate의 증가와 세포 내 Ca^{++} 의 축적을 뇌 허혈시 장애의 지표로 하여 AA, EPA 및 DHA의 투여가 이러한 뇌 허혈시의 에너지 대사장애와 세포내 Ca^{++} 의 과잉축적에 어떠한 영향을 미치는지를 알아 보았다.

양측 경동맥 결찰에 의한 뇌 허혈시 ATP, Pcr 및 glucose의 양이 정상 대조군에 비하여 각각 25.3%, 34.5% 및 48.2% 감소하였고 lactate의 양은 61.7% 유의적($P < 0.01$)으로 증가하였으며, 이러한 허혈 대조군에 비하여 EPA투여군과 DHA투여군에서는 각각 유의적으로 그 증감에 억제되었으나, AA투여군에서는

이러한 유의적인 억제가 없었다(Fig. 1,2). 또한 $[Ca^{++}]_i$ 는 정상 대조군에 비하여 현저히 증가하였으며 EPA, DHA투여군에서 허혈 대조군에 비하여 각각 42.3%, 33.0% 유의적으로 감소되었다(Fig. 3).

AA, EPA 및 DHA가 투여된 Wistar계 웅성 흰쥐에서의 허혈 전 $[Ca^{++}]_i$ 는 거의 유사하였으나, N_2 gas에 의한 허혈 후에는 허혈 대조군에 비하여 EPA, DHA투여군에서 각각 54.8%, 52.9%의 유의적($P < 0.01$)인 감소를 보였으며 AA투여군에서는 증가한 것을 볼 수 있었다(Fig. 4). 또한 같은 방법으로 처리한 웅성 SHR에서 허혈전 $[Ca^{++}]_i$ 가 Wistar계 웅성 흰쥐보다 높았으며, 정상 대조군에 비하여 EPA, DHA투여군에서 허혈 전 $[Ca^{++}]_i$ 가 각각 65.4%, 48.5%의 유의적($P < 0.05, 0.01$)인 감소를 보임으로써 Wistar계 웅성 흰쥐와 비슷한 수준이 되었다(Fig. 6). 또한 N_2 gas에 의한 허혈 후에 EPA, DHA투여군에서 허혈 대조군에 비하여 유의적인 $[Ca^{++}]_i$ 감소가 보였다(Fig. 5).

이러한 결과에 의하여 EPA 및 DHA투여가, 비록 허혈 전 정상 대조군의 상태까지 회복되지는 않았지만, 뇌 허혈에 의한 뇌 에너지 대사장애를 개선하고 Ca^{++} 의 세포내 과잉 축적을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

EPA를 장기 투여하였을때 허혈에 의한 뇌 부종이 감소되었으며 이는 뇌 미세혈관에서 EPA가 lipoxigenase에 대하여 AA와 상경적으로 작용하여, 혈관 투과성 증가와 자체의 세포막 독성을 지닌 leukotriene의 합성을 감소시키기 때문이라고 보고되었다.³⁸⁾ 또한 뇌 허혈시 과잉으로 유리된 AA가 혈소판 응집을 촉진하며 이것이 뇌혈관내피의 손상을 촉진시켜 뇌 미세순환 장애의 요인이 된다고 하였으며,³⁹⁾ TX synthetase저해제가 허혈시 뇌 미세순환장애를 보호하고 뇌 에너지 대사장애를 개선한다고 보고 되어있다.²⁰⁾ 또한, 뇌조직의 인지질이 AA대신 ω -3계 지방산인 EPA나 DHA와 치환되므로서 cyclooxygenase 의존적인 대사산물인 PGI_3 와 TXA_3 와 같은 3계의 PGs류가 뇌 미세혈류의 개선 효과가 있다고 보고되었으며,³⁸⁾ 혈소판의 인지질 내 EPA, DHA가 풍부할 때 TX A_2 및 PG H_2 가 수용체 결합하는 것이 억제되어 그 기능이 억제된다는 보고가 있다.⁴⁰⁾

뇌 허혈시 신경 독성을 유발하는 synaptosome내 Ca^{++} 의 축적은 Na^+ 과 유리 지방산에 의한 mitochon-

ndria로부터 Ca^{++} 의 유리가 증가되는 것과 ATP고갈에 의한 endoplasmic reticulum으로부터 Ca^{++} 의 증가에 기인한다. 또한 세포 내 Ca^{++} 이 과잉 증가되면 membrane phospholipase가 활성화 되어 막 구성 인 지질이 유리지방산 형태로 빠져 나오며 이러한 막구성 변화는 막 투과성을 크게 변화시켜 Ca^{++} 의 유입이 더욱 커져 세포 독작용을 한다고 한다.⁴¹⁾

그러므로 EPA와 DHA의 장기투여에 의하여 ω -3계 지방산인 EPA와 DHA가 뇌 조직 및 혈관에서 AA와 일부 치환되므로써 뇌 허혈시 과잉 유리되는 AA에 의한 뇌 미세순환 장애를 방어하여 에너지 대사장애를 개선하며, 이러한 효과들은 결과적으로 세포 괴사의 최종 단계인 세포 내 Ca^{++} 의 과잉 축적을 억제하므로써 뇌 허혈시의 뇌 세포 손상을 방어하리라 생각한다.

결 론

본 실험에서 뇌 허혈시 대표적 뇌 손상의 지표인 뇌 에너지 대사 장애에 의한 ATP, Pcr 및 glucose의 감소, lactate의 증가와 세포 내 Ca^{++} 의 축적에 미치는 AA, EPA 및 DHA의 영향을 알아보았다.

양측 경동맥 결찰에 의한 뇌 허혈시 ATP, Pcr 및 glucose의 양이 정상 대조군에 비하여 현저히 감소하였으며, lactate의 양은 크게 증가하였으나, 6주간 EPA 및 DHA투여군은 그 증감이 유의적으로 억제되어 허혈에 의한 에너지 대사 장애가 개선되었다. SHR 및 Wistar계 웅성흰쥐의 뇌에서 얻은 synaptosome의 $[Ca^{++}]_i$ 는 N_2 gas에 의한 허혈시 유의성있게 증가하였으나 EPA 및 DHA 투여로 $[Ca^{++}]_i$ 의 이상 축적은 유의적으로 방어되었다.

이러한 결과에 의하여 EPA와 DHA의 투여가 뇌 허혈증으로 나타나는 에너지 대사 장애와 세포내 Ca^{++} 의 과잉 축적을 방어하여 뇌 허혈시 뇌세포 손상을 방지하리라 생각한다.

감사의 말씀

본 연구는 1993년도 이대 약학 연구소 연구비 지원에 의하여 이루어졌음에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Artemis P., Simopoulou; Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. clin. Nutr.* **54**, 438 (1991).
- 2) Hamasaki T., Hirai A., Terano T., Sajiki J., Kondo S., Fusita T.; Effect of orally administrated ethylester of eicosapentaenoic acid (EPA; $C_{20:5}$, ω -3) on PGI_2 -like substance production by rat aorta. *Prostaglandins*, **23**, 557 (1982).
- 3) Jaknowski J. A., Ardlie N. G.; Evidence for the mechanism by which eicosapentaenoic acid inhibit human platelet aggregation and secretion. Implication for the prevention of vascular disease. *Thromb. Res.* **16**, 205 (1979).
- 4) Dyerberg J.; Human umbilical blood vessel converts all cis-5, 8, 11, 14, 17 eicosapentaenoic acid to prostaglandin I_3 . *Prostaglandins*, **22**(6), 857 (1981).
- 5) Clemens V. S., Weber P. C.; Metabolism and effects on platelet function of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acids in humans. *J. Clin. Invest.* **76**, 2446 (1985).
- 6) Sven Fischer, Axel Vischer; Dietary docosahexaenoic acid is retroconverted in man to eicosapentaenoic acid, which can be quickly transformed to prostaglandin I_3 . *Prostaglandins*, **34**, 367 (1987).
- 7) U. Forstermann., K. Kuhn. K. Green, U. Frei, J. C. Frolich.; An increase in the ratio of thromboxane A_2 to prostaglandin I_2 in association with increased blood pressure in patient on cyclosporine A. *Prostaglandins*, **37**(5), 567 (1989).
- 8) Shen T. C., Chung Y. S., Edward L. H., Perry V. H., Otto I. L., Fank M. Y.; Thromboxane, Prostacyclin and leukotrienes in cerebral ischemia. *Neurology*, **36**, 466 (1976).
- 9) Bosisio E., Galli C; Correlation between release of free arachidonic acid and prostaglandin formation in brain cortex and cerebellum. *Prostaglandins*, **11**, 773 (1976).
- 10) Robert J. G., Lawrence L.; Transient cerebral ischemia and brain prostaglandins. *Biochem. Biophysical Res. Comm.*, **83**(3), 893 (1979).

- 11) Robert J. G., Iftekhar A., Lawrence L.; Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J. Neurochem*, **35**(3), 653 (1980).
- 12) Kobayashi M., Lust W. D., Janet V. P.; Concentration of energy metabolites and cyclic nucleotides during and bilateral ischemia in the gerbil cerebral cortex. *J. Neurochem*, **29**, 53 (1977).
- 13) Junji K., Buichi F. Keiji N., Toshiaki K., Kouchi Y., Masanao S.; Biochemical changes in unilateral brain injury in the rat: A possible role of free fatty acid accumulation. *Brain Res.*, **110**, 547 (1976).
- 14) Siesjo B. K.; Cerebral circulation and metabolism. *J. Neurosurg*, **60**, 883 (1984).
- 15) John L. Farber; The role of calcium in the cell death. *Life Sci*, **29**, 1289 (1981).
- 16) Schlaepfer W. W.; Experimental alteration of neurofilaments and neurotubules by calcium and other ions, *Exp. Cell. Res.*, **67**, 73 (1971).
- 17) Francis A. X., Schanne A. B., Kane E. E., Young J. L., Farber; Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*, **206**, 700 (1979).
- 18) Petito C. K.; Early and late mechanisms of increased vascular permeability following experimental cerebral infarction. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, **38**, 222 (1979).
- 19) Reemts J. V. Borgers M., Dael L. V., Eyndhoven J. V., Van De Ven; Protection of hypoxic ischemic damage of the rat cerebral cortex. A quantitative morphologic assessment. *Arch. Int. Pharmacodyn*, **262**, 76 (1983).
- 20) Seizo S., Hiroaki O., Yasuchi O., Hiroshi Y., Takao I., Masatoshi F.; Effect of thromboxane synthetase inhibitor on cerebral circulation and metabolism during experimental cerebral ischemia in SHR. *Europ. J. Pharm*, **169**, 75 (1989).
- 21) Hohlfeld T., Strobach H., Schror K.; Stimulation of endogenous prostacyclin protects the reperfused pig myocardium from ischemic injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, **264**(1), 397 (1993).
- 22) Yerram N. R., Moore S. A., Spector A. A.; Eicosapentaenoic acid metabolism in brain microvessel endothelium: Effect on prostaglandin formation. *J. Lipid Res.*, **30**(11), 1747 (1989).
- 23) Yanagisawa A., Mineo S.; Protection of the rat myocardium from ischemic injury by dietary lamprey oil. *Eicosanoids*, **1**(2), 93 (1988).
- 24) Marcus E. Raichle; The pathophysiology of brain ischemia. *Ann. Neurol*, **13**, 2 (1983).
- 25) Crockard H. A., Jishore K. B., Peter T. L.; Regional prostaglandin levels in cerebral ischemia. *J. Neurochem*, **38**, 1311 (1982).
- 26) Pearl B., Elizabeth J. W., John B. C.; Protection of ischemic synaptosomes from calcium overload by addition of exogenous lactate. *J. Neurochem*, **57**, 88 (1991).
- 27) Glowinski J., L. L. Iversen; Regional studies of catecholamines in the rat brain (I). *J. Neurochem*, **13**, 655 (1966).
- 28) Methods of enzymatic analysis I-IV, ed. Bergmeyer, H. U., 2nd edition, Academic press (1974).
- 29) Komulainen H., Stephen C. Bondy; Increased free intrasynaptosomal calcium by neurotoxic organometals; distinctive mechanisms. *Toxicol. Applied Pharmacol*, **88**, 77 (1987).
- 30) Komulainen H., Tuomisto J.; Interference of methyl mercury with monoamine uptake and release in the rat brain synaptosome. *Acta. Pharmacol. Toxicol*, **48**, 214 (1987).
- 31) Nachshen D. A., S. Sanchez-armass; Cooperative action of calcium ions in dopamine release from rat brain synaptosomes. *J. Physiol*, **387**, 415 (1987).
- 32) Demopoulous H. B., Flamm E. S., Pietronigro D. D.; The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta. Physiol. Scand [Suppl]*, **492**, 91 (1980).
- 33) Del Maestro R. F.; An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta. Physiol. Scand [Suppl]*, **492**, 153 (1980).
- 34) Paul G. L. Tian-Li Y., Juan-Li G., Giora F.; Neuroprotection mechanism of (+)SKF10.047 in vitro and in gerbil global brain ischemia. *Stroke*, **23**, 1319 (1992).
- 35) Avital S., Michael T. T., Catherine A. W., Benzamin M. R.; Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia; an in vitro

- study. *Life Science*, **40**, 2059 (1987).
- 36) Gray E. G., Whittaker V. P.; The isolation of nerve endings from brain; An electron microscopic study of cell fragments divide by homogenization and centrifugation. *J. Anat (Lond)*, **96**, 79 (1962).
- 37) Black K. L., Hoff J. T., Radin N. S., Desnmukh G. D; Eicosapentaenoic acid; effect on brain prostaglandins, cerebral blood flow and edema in ischemic gerbils. *Stroke*, **15**(1), 65 (1984).
- 38) Farl F. E., Richard J. P., Lyn M. Y., Margaret N. G., Marcia L. H., Sallie A. H.; Effect of fish oil n-3 fatty acids on cerebral microcirculation. *Am. J. Physiol*, **258**, H1780 (1990).
- 39) Fredriksson K., Rosen I., Johansson B. B., Wieloch T.; Cerebral platelet thromboembolism and thromboxane synthetase inhibition. *Stroke*, **16**, 800 (1985).
- 40) Patrick G. S., Carole A. P., Martine C., Pierre F., Michel L., Duane L. V., Guy C. Le Breton; Enrichment of Platelet phospholipids with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibits thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor binding and function. *J. Biol. Chem*, **265**(35), 21692 (1990).
- 41) John L. F., Kenneth R. C., Stewart M.; The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am. J. Pathol*, **102**, 271 (1981).