

## Xanthine Oxidase Inhibitor가 저산소성-허혈성 뇌손상이 유도된 신생쥐에 미치는 영향

원광대학교 의과대학 소아과학교실, 해부학교실\*

최대호<sup>†</sup> · 오연균 · 박승택\*

### Effect of Xanthine Oxidase Inhibitor on Cerebral Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rats

Dae-Ho Choi, M.D., Yeon-Kyun Oh, M.D. and Seung-Tak Park, Ph.D.\*

*Department of Pediatrics, Department of Anatomy\*,  
Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Korea*

**Purpose :** In order to evaluate the hypoxia-ischemia(H-I) induced neurotoxicity and the protective effect of xanthine oxidase(XO) inhibitor(allopurinol), cell number, cell viability, lactate dehydrogenase(LDH), protein synthesis(PS) and protein kinase C(PKC) activity were measured in cerebral neurons and astrocytes.

**Methods :** Cytotoxic effect was measured by in vitro assay at 12-72 hours after H-I on cerebral neurons and astrocytes derived from 7-day old neonatal rats which were subjected to unilateral common carotid artery occlusion and exposed to hypoxic condition for 3 hours. The protective effect of XO inhibitor was examined by the cell number, cell viability, LDH and PS on 14 days after H-I with allopurinol intraperitoneal injection 15 minutes prior to H-I. In addition, the effect of allopurinol on PKC activity in hypoxic conditions was examined in neurons.

**Results :** 72 hours from H-I, the cell numbers and viability were decreased significantly in time-dependent manner on neurons and those of astrocytes also decreased slightly, compared with control. In neonatal rats treated with H-I, the cell number, cell viability, and PS in neurons were decreased, but LDH was increased significantly compared with control. In neonatal rats pretreated with allopurinol, the cell number and viability, and PS in neurons were increased and LDH was decreased significantly compared with H-I. PKC was increased remarkably after hypoxic condition. But PKC was decreased significantly against hypoxic condition after allopurinol pretreatment.

**Conclusion :** From these results, it is suggested that H-I is more toxic in neurons than astrocytes and allopurinol is very protective with increasing of PS, and decreasing of LDH and PKC in neurons from hypoxic-ischemic condition. (**J Korean Pediatr Soc 2002;45:732-742**)

**Key Words :** Hypoxia-ischemia, Xanthine oxidase inhibitor, Allopurinol, LDH, Protein synthesis, PKC

<sup>†</sup>현주소 : 최대호 소아과

이 논문은 2001년도 원광대학교 교비 지원에 의해 연구됨.

접수 : 2001년 12월 29일, 승인 : 2002년 3월 6일

책임저자 : 오연균, 원광대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 063)850-1102 Fax : 063)853-3670

E-mail : oyk5412@wonkwang.ac.kr

### 서 론

저산소증 및 허혈증은 뇌손상의 중요한 병인의 하나로 뇌세포의 손상을 초래하여 뇌성마비, 지능저하,

언어장애, 간질 등 만성적 신경학적 손상을 가져오게 한다<sup>1-4</sup>. 특히 신생아에서 태아관란이나 신생아 가사가 있을 때 신생아의 폐를 통한 가스교환의 장애로 전신적인 저산소증 및 과탄산혈증이 초래되고<sup>5,6</sup>, 또한 ATP의 부족으로 인한 에너지 공급의 결핍으로 뇌세포의 손상을 초래하게 됨으로써 심각한 후유증을 유발하게 된다<sup>7,8</sup>. 따라서 국내외 많은 학자들은 저산소증이나 허혈증에 대한 병리적 기전을 규명하기 위하여 꾸준히 연구를 진행하여 왔으며<sup>9,10</sup>, 특히 저산소증이나 뇌허혈에 활성산소의 산화적 손상이 관여하고 있다고 밝혀지면서 이에 대한 병인적 현상을 산화적 측면에서 밝히려는 많은 연구가 시도되어 오고 있다<sup>11,12</sup>. 저산소성 허혈증의 병인은 세포내 에너지 조절자인 ATP의 생산결핍, 활성산소 형성에 의한 세포막 손상, 세포내 젓산과 H<sup>+</sup> 이온 증가에 의한 산혈증, 흥분성 신경전달물질의 유리, 정보전달자의 활성화, 세포질내 칼슘이온 농도의 증가 등으로 설명되어지며, 이들의 상호작용에 의하여 뇌손상이 이루어진다고 밝혀졌다<sup>13</sup>. 따라서 항산화제, xanthine oxidase inhibitor, NMDA receptor antagonist, 칼슘통로 차단제 등 길항제를 투여하고 뇌손상을 억제할 수 있다는 많은 결과들이 보고되고 있으며, 특히 산화적 측면에서 볼 때 활성산소의 형성억제를 위한 xanthine oxidase inhibitor는 뇌손상 경감의 중요한 방안이라 할 수 있고 allopurinol은 그 대표적인 길항제라 할 수 있겠다<sup>14</sup>. 최근, allopurinol이나 그 대사물인 oxypurinol의 신경독성 방어 효과는 일반적인 내용이 되고 있으나 그 효과를 lactate dehydrogenase(LDH), sulforhodamine B(SRB) 분석에 의한 단백질 합성 분석, protein kinase C(PKC)에 미치는 영향 등으로 분석한 연구는 많지 않다<sup>9,15,16</sup>.

따라서, 저자들은 저산소성-허혈이 신생쥐의 대뇌 신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 신생쥐에 저산소성-허혈을 유도한 다음 신경세포에 미치는 독성효과를 관찰하고, 저산소성-허혈에 대하여 대표적 xanthine oxidase inhibitor인 allopurinol을 전 처리하고 그 영향을 보고자 세포생존율을 비롯하여 LDH, SRB 분석에 의한 단백질 합성을 분석하였으며, 또한 허혈이 PKC에 미치는 영향도 조사하였다.

**재료 및 방법**

**1. 실험 동물**

본 실험에 사용한 동물은 암수구별 없이 Sprague-Dawley 계통의 생후 7일된 건강상태가 양호한 120마리의 신생쥐(체중: 10-12 g)였다.

**2. 약 제**

Allopurinol(Sigma Co, USA) 150 mg/kg을 저산소성-허혈에 노출하기 15분 전에 복강내 주사하였다.

**3. 방 법**

본 실험을 위해 120마리를 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였다. 이 중 대조군 5마리를 포함한 45마리는 저산소성-허혈 유발 후 시간에 따른 시간독성 효과를 보기 위하여 12, 24, 48 및 72시간 별로 10마리씩 희생하여 neuron과 astrocyte의 세포수와 생존율을 조사하여 대조군과 비교하였다. 또한 55마리를 대상으로 allopurinol 150 mg/kg을 0.9% 생리식염수에 용해하여 생리적 식염수와 병행하여 각각을 복강내 주사 후 14일 만에 희생하여 neuron을 조사하였다. 이를 위해 55마리 중 25마리를 대조군 5마리, 생리식염수 투여군 10마리, allopurinol 투여군 10마리로 나누어 neuron의 수적변화와 생존율을 조사하였다. 또한 나머지 30마리를 대상으로 15마리씩 allopurinol 투여에 대한 LDH와 SRB 분석을 이용한 단백질합성의 조사를 하여 위 분석당 각각 대조군 5마리, 생리식염수 처리군 5마리, allopurinol 처리군 5마리가 이용되었다. 한편, 시험관내 PKC 검사를 위해서는 20마리를 사용하였다.

**4. 저산소성-허혈 유도**

생후 7일된 신생쥐를 에테르로 마취시킨 후 경부의 중양을 따라 절개한 후 우측 총경동맥을 노출시켰다. 노출된 총경동맥을 봉합사를 사용하여 두 곳을 결찰하였고 피부를 봉합한 후 회복기를 거쳐 산소가 8%로 조절된 밀폐된 특수용기에 넣은 후 37℃의 항온기에서 3시간 동안 사육하였다. 처치 완료 후 회복된 다음 신생쥐를 어미 쥐와 같이 사육하였으며, 실험목적에 따라 각각 12-72시간과 14일 후에 희생시킨 다음 저산소-허혈 유도나 약제투여를 하지 않은 대조군과 비교 조사하였다.

## 5. 세포배양

대뇌신경세포의 배양을 위하여 저산소성-허혈을 유도한 신생쥐에서 분리한 뇌조직을 Michikawa 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 행하였다. 즉, 적출한 뇌조직을 0.5% trypsin으로 처리한 후 37°C로 조절된 정온기 내에서 배양하였다. 일정시간 배양이 완료된 세포를 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, Germany)이 포함된 Eagle's minium essential medium(EMEM, Gibco, Germany)에 부유시킨 다음 미리 poly-L-lysine(Sigma, USA)으로 처리된 96-multiwell plate(Gibco, Germany)에  $5 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 분주하였다. 일정한 밀도로 분주된 세포는 5% CO<sub>2</sub>/95% air로 조절된 습기찬 정온기 내에서 3일 동안 배양하였으며 특히 neuron만의 순수배양을 위해서는 배양액에 10  $\mu$ M cytosine arabinoside(Sigma, USA)를 첨가하여 배양하였다.

## 6. 저산소성-허혈이 신경세포에 미치는 영향 조사

### 1) 세포수 조사

세포수의 조사는 trypanblue exclusion test에 의하여 조사하였다.

### 2) 세포생존율 조사(MTX정량)

MTX<2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-(phenylaminocarbonyl)12H-tetrazolium hydroxide>(Sigma, USA) 정량은 Borenfreund와 Puerner<sup>18)</sup>의 방법에 의하였다. 약제를 처리한 배양 신경세포를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 5  $\mu$ g/mL의 XTT를 well당 1 mL씩 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 dimethylsulfoxide(DMSO, Merk, Germany)를 처리한 다음 spectrophotometer로 503 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

## 7. 저산소성-허혈에 대한 Xanthine oxidase inhibitor의 효과 조사

저산소성-허혈을 유도한 신생쥐에 허혈 유도 15분 전에 allopurinol 150 mg/kg을 복강내 주사 후 저산소성-허혈을 유도한 신생쥐를 저산소성-허혈 유도 14일 만에 희생시켜 이의 영향을 조사하였다. 이때 동량의 0.9% 생리식염수를 복강 주사한 군과 전혀 아무것도 처리하지 않은 대조군과도 비교 조사하였다.

## 1) 세포수 및 세포생존율 조사

세포수의 조사는 trypanblue exclusion test에 의하여, 세포생존율은 MTX 분석 의하여 각각 조사하였다.

## 2) LDH 측정

LDH 측정은 Choi<sup>19)</sup>의 방법에 의하였다. 즉, 200 mM Tris-HCl, NAD, phenazine methosulfate (PMS)가 포함된 용액에 시료를 넣어 37°C에서 5분간 반응시킨 다음 HCl을 넣어 잘 흔든 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 3) SRB 분석

배양한 신경세포에 0.4% sulforhodamine B 200  $\mu$ L를 첨가하여 1시간 동안 방치한 후 1% acetic acid로 세척한 다음 10 mM Tris-Base로 처리하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 8. 저산소증에 대한 PKC 측정

PKC 측정은 Hu 등<sup>20)</sup>의 방법에 의하여 조사하였다. 즉, 합성 peptide 및 phosphatidyl serine(PS), CaCl<sub>2</sub>와 Tris-HCl buffer를 함유한 반응액 75  $\mu$ L에 검액을 1:5로 가하여 15분간 반응시킨 후 50  $\mu$ L를 P81검지에 옮겨 건조, 세척한 다음 liquid scintillation counter로 측정하였다.

## 1) 저산소증의 영향

배양된 대뇌신경세포의 저산소증 유도를 위하여 nutrient-deficient balanced salt solution에 세포를 교환 후 PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>로 옮겨 5-60분 동안 처리한 다음 이를 다시 정상 배양액으로 교환하여 PKC를 측정하였다.

## 2) Xanthine oxidase inhibitor의 영향

저산소증에 대한 allopurinol의 영향을 조사하기 위하여 2시간 전에 midcytotoxicity value(MCV)값인 60  $\mu$ M allopurinol이 포함된 배양액에서 처리한 후 10분간 저산소 상태를 유도한 다음 이에 대한 PKC를 측정하였다.

## 9. 형태학적 관찰

저산소증-허혈 유도가 대뇌신경세포에 미치는 영향을 형태학적으로 관찰하기 위하여 세포를 배양 중인 배양용기를 직접 도립위상차 현미경하에 놓고 검경하였으며 현미경에 부착된 사진기로 촬영하였다.

10. 통계처리

대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 ANOVA 검정 후 Student-t test에 의하였으며 P값이 0.05 미만을 유의한 것으로 하였다.

**결 과**

1. 저산소성-허혈이 대뇌신경세포에 미치는 영향

1) Neuron

(1) 세포수 조사

저산소성-허혈이 neuron에 미치는 영향을 조사하기 위하여 신생쥐에 저산소성-허혈을 유도시킨 12-72시간 후에 각각 희생시켜서 적출한 대뇌에서 순수분리 배양한 neuron에 대한 세포의 수적변화와 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 대조군(100%)에 비하여 저산소성-허혈을 유도한 후 12시간 경과 후 neuron의 세포수는 96.8%, 24시간 경과 후에는 83.6%, 48시간 경과 후에는 75.4%로 감소를 보였으며, 특히 72시간 경과 후에는 69.8%로 의의 있게 감소하였다( $P < 0.05$ )(Fig. 1).

(2) 세포생존율 조사

세포생존율에 대한 저산소성-허혈의 영향을 조사하기 위하여 MTX 분석에 의하여 조사한 결과 대조군(100%)에 비하여 저산소성-허혈 유도 후 12시간 경과에서는 세포생존율이 88.2%, 24시간 경과에서는 78.5%, 48시간 경과에서는 72.8%로 감소를 보였으며, 특히 72시간 경과에서는 65.9%로 의의 있게 감소하였

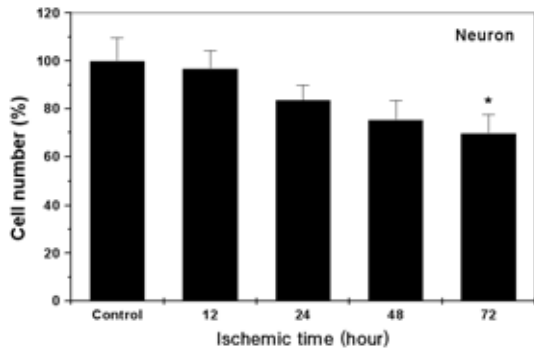


Fig. 1. Time-response relationship of hypoxia-ischemia in cultured cerebral neurons of neonatal rats. Cell number was measured by trypan blue exclusion test. The results indicate the mean  $\pm$  SEM (n=6 experiments). Significant differences from the control are marked with asterisks ( $P < 0.05$ ).

다( $P < 0.05$ )(Fig. 2).

2) Astrocyte

(1) 세포수 조사

Astrocyte에 미치는 저산소성-허혈의 영향을 조사하기 위하여 저산소성-허혈을 유도시킨 신생쥐를 각각 12-72시간 후에 희생시킨 후 위와 동일한 실험조건에서 세포의 수적변화와 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 대조군(100%)에 비하여 저산소성-허혈을 유도한 12시간 경과 후 세포수는 98.8%, 24시간 경과 후에는 93.6%, 48시간 경과 후에는 89.4%, 그리고 72시간 경과 후에는 87.1%로 감소를 보였으나 의의는 없었다(Fig. 3).

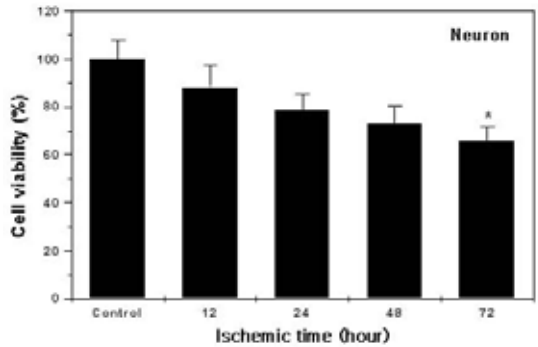


Fig. 2. Time-response relationship of hypoxia-ischemia in cultured cerebral neurons of neonatal rats. Cytotoxicity was measured by MTX assay. The results indicate the mean  $\pm$  SEM (n=6 experiments). Significant differences from the control are marked with asterisks ( $P < 0.05$ ).

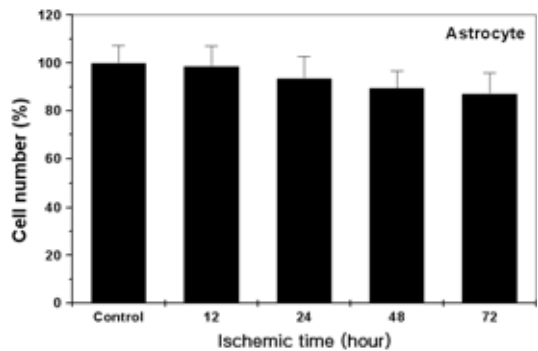


Fig. 3. Time-response relationship of hypoxia-ischemia in cultured cerebral astrocytes of neonatal rats. Cell number was measured by trypan blue exclusion test. The results indicate the mean  $\pm$  SEM (n=6 experiments).

(2) 세포생존율 조사

저산소성-허혈이 세포생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MTX 분석에 의하여 조사한 결과 대조군(100%)에 비하여 저산소성-허혈 유도 12시간 후에는 세포생존율이 93.6%, 24시간 경과에서는 88.4%, 48시간 경과에서는 84.8%, 그리고 72시간 경과에 있어서도 82.9%로 감소를 보였으나 의의는 없었다(Fig. 4).

2. 저산소성-허혈에 대한 Xanthine oxidase inhibitor의 효과

(1) 세포수 조사

Xanthine oxidase inhibitor인 allopurinol이 저산소성-허혈 유도에 의하여 손상된 neuron에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 저산소성-허혈을 유도하지 않은 대조군과 저산소성-허혈 유도 15분 전에 150 mg/kg of allopurinol을 복강 주입한 군과 allopurinol 대신 동량의 생리식염수를 주입한 실험군으로 나눈 후 저산소성-허혈 후 14일째 신생쥐를 희생시켜 적출한 각각의 대뇌조직으로부터 순수 분리 배양한 neuron에서 수적변화를 비교 조사하였다. 그 결과 저산소성-허혈을 유도하지 않은 대조군(100%)에 비하여 저산소성-허혈 유도 전 allopurinol 대신 동량의 생리식염수를 처리한 실험군에서는 33.4%로 나타났으나, allopurinol을 처리한 군에서는 84.7%로 생리식염수 처리군에 비하여 매우 유의하게 높게 나타났다( $P<0.05$ ) (Fig. 5).

(2) 세포생존율 조사

저산소성-허혈에 대하여 allopurinol이 neuron의 세포생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 위와

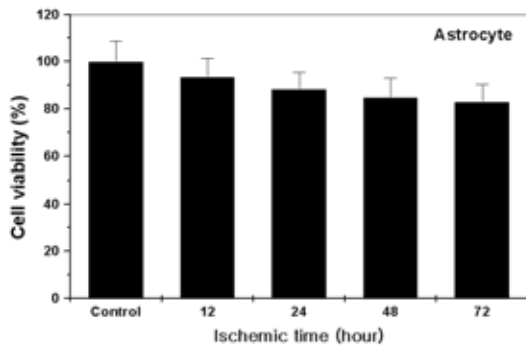


Fig. 4. Time-response relationship of hypoxia-ischemia in cultured cerebral astrocytes of neonatal rats. Cytotoxicity was measured by MTX assay.

동일한 실험조건으로 처리한 후 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 저산소성-허혈을 유도하지 않는 대조군(100%)에 비하여 저산소성-허혈 유도 전 생리식염수를 처리한 군에서는 세포생존율이 29.6%로 나타났으나, allopurinol을 처리한 군에서는 78.3%로 생리적 식염수 처리군에 비하여 매우 유의하게 높았다( $P<0.05$ )(Fig. 6).

(3) LDH 측정

위와 동일한 실험 조건에서 신생쥐를 처리한 다음 저산소성-허혈에 대하여 allopurinol이 LDH에 미치는 영향을 neuron을 대상으로 조사한 결과 저산소성-허혈을 유도하지 않는 대조군(100%)에 비하여 저산소성-허혈 유도 전 생리식염수를 처리한 군에서는 LDH치가 189.6%로 나타났으나, allopurinol을 처리한 군에서는 108.6%로 생리식염수 처리군에 비하여 유의하

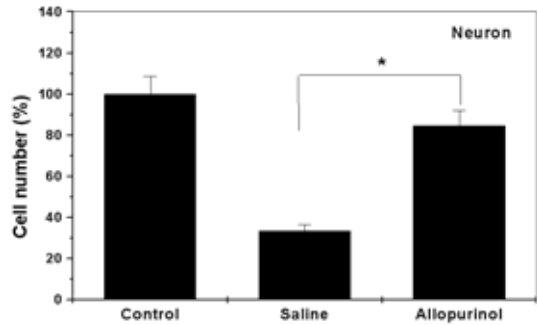


Fig. 5. Neuroprotective effect of allopurinol on hypoxia-ischemia induced neurotoxicity by trypan blue exclusion test. The results indicate the mean  $\pm$  SEM (n=6 experiments). \*Asterisks indicate the significant difference ( $P<0.05$ ) between groups.

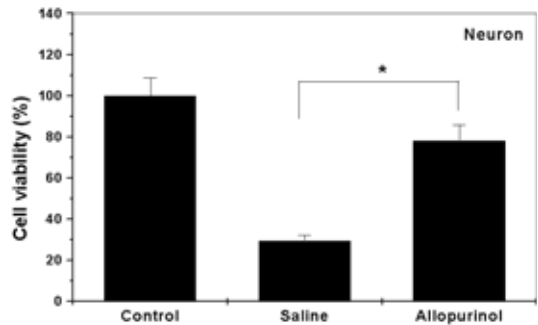


Fig. 6. Neuroprotective effect of allopurinol on hypoxia-ischemia induced neurotoxicity by MTX assay. The results indicate the mean  $\pm$  SEM (n=6 experiments). \*Asterisks indicate the significant difference ( $P<0.05$ ) between groups.

게 낮았다( $P<0.05$ )(Fig. 7).

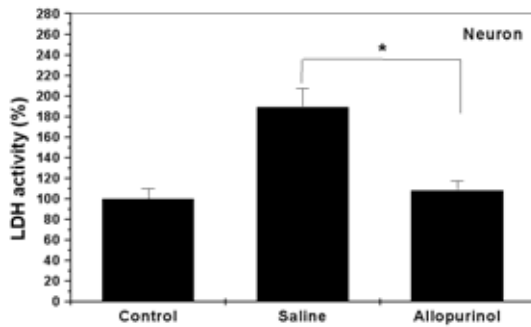
**(4) 단백질 합성 측정**

위와 동일한 실험조건에서 신생쥐를 처리한 다음 저산소성-허혈에 대하여 allopurinol이 단백질 합성에 미치는 영향을 neuron을 대상으로 조사한 결과 저산소성-허혈을 유도하지 않은 대조군(100%)에 비하여 저산소성-허혈 유도 전 생리식염수를 처리한 군에서는 SRB 분석에 의한 단백질 합성률이 41.8%로 나타났다, allopurinol을 전처리한 군에서는 82.4%로 생리식염수 처리군에 비하여 유의하게 높았다( $P<0.05$ )(Fig. 8).

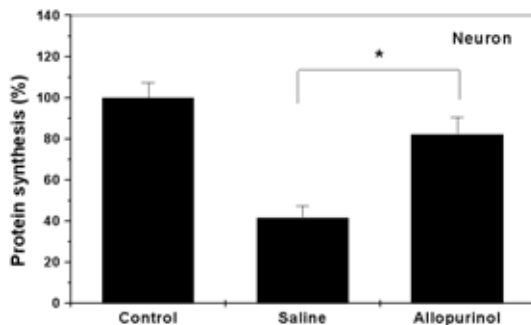
**3. 저산소증에 대한 PKC 측정**

**(1) 저산소증의 영향**

저산소증이 PKC에 미치는 영향을 측정하기 위하



**Fig. 7.** Neuroprotective effect of allopurinol on hypoxia-ischemia induced LDH activity. The results indicate the mean  $\pm$  SEM(n=6 experiments). \*Asterisks indicate the significant difference( $P<0.05$ ) between groups.



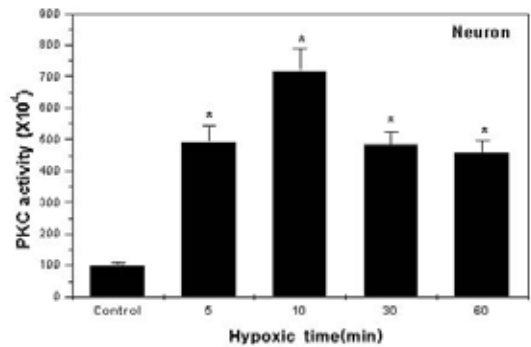
**Fig. 8.** Neuroprotective effect of allopurinol on hypoxia-ischemia induced protein synthesis by SRB assay. The results indicate the mean  $\pm$  SEM(n=6 experiments). \*Asterisks indicate the significant difference( $P<0.05$ ) between groups.

여 신생쥐의 대뇌조직으로 부터 순수분리 배양한 neuron에 5-60분 동안 저산소증을 유도한 후 PKC치를 측정한 결과 대조군 100%( $0.42 \pm 0.05$ )에 비하여 5분간 노출에서는 492.9%( $2.07 \pm 0.18$ ), 10분간 노출 719.0%( $3.02 \pm 0.42$ ), 30분간 노출 483.3%( $2.03 \pm 0.15$ ), 그리고 60분간 노출에서는 457.1%( $1.92 \pm 0.08$ )로 모든 경우에서 유의한 증가를 보였으며( $P<0.05$ ) 특히 10분간 노출에서 가장 높은 증가를 보였다(Fig. 9).

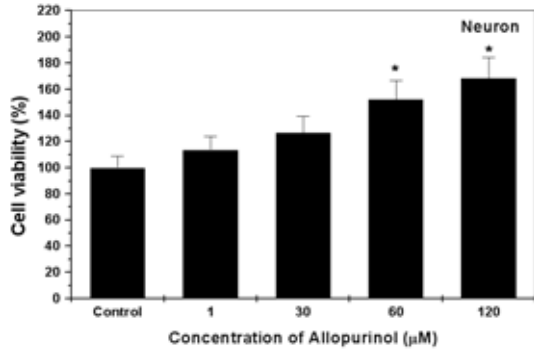
**(2) Xanthine oxidase inhibitor의 효과**

저산소증에 대한 allopurinol의 영향을 PKC 측면에서 조사하기 위하여 먼저 2시간 동안 allopurinol을 전처리한 후 저산소증 유도시 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 먼저 allopurinol의 MCV값을 측정하기 위하여 1-120  $\mu$ M 농도의 allopurinol이 포함된 배양액에서 신경세포를 처리한 결과 허혈 유도군(100%)에 비하여 1  $\mu$ M allopurinol 농도에서는 113.8%, 30  $\mu$ M에서는 126.7%, 또한 60  $\mu$ M과 120  $\mu$ M allopurinol 농도에서는 각각 152.3%( $P<0.05$ )와 168.4%( $P<0.05$ )로 유의하게 증가하였으며 이때 MCV는 60  $\mu$ M 농도에서 나타났다(Fig. 10).

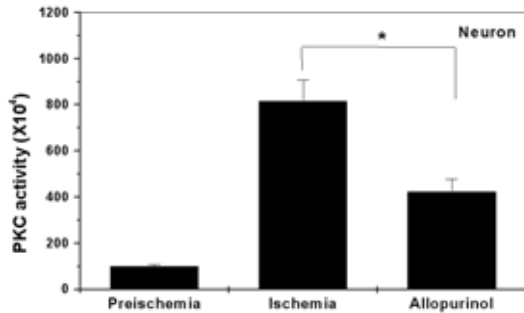
위에서 측정된 allopurinol의 MCV값에서 2시간 동안 neuron을 전 처리한 후 이를 다시 10분 동안 허혈을 유도한 다음 허혈 유도군과 허혈을 유도하지 않은 대조군과의 PKC치를 비교 측정하였다. 그 결과 대조군인 100%( $0.36 \pm 0.02$ )에 비하여 허혈 유도시 PKC치는 816.7%( $2.94 \pm 0.21$ )로 나타난 데 비하여 allopurinol을 전처리한 경우에는 425.0%( $15.3 \pm 0.13$ )



**Fig. 9.** Time-response relationship of hypoxia-ischemia in cultured cerebral neurons of neonatal rats. PKC activity was measured in cerebral neurons induced by hypoxia-ischemia. The results indicate the mean  $\pm$  SEM(n=6 experiments). Significant differences from the control are marked with asterisks( $P<0.05$ ).



**Fig. 10.** Dose-response relationship of allopurinol in cultured cerebral neurons of neonatal rats. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean  $\pm$  SEM (n=6 experiments). Significant differences from the control are marked with asterisks ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 11.** PKC activity was measured in cerebral neurons induced by hypoxia-ischemia or pretreatment of allopurinol. The results indicate the mean  $\pm$  SEM (n=6 experiments). Significant differences from the control are marked with asterisks ( $P < 0.05$ ).

로 허혈 유도에 비하여 매우 유의하게 PKC치가 감소하였다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 11).

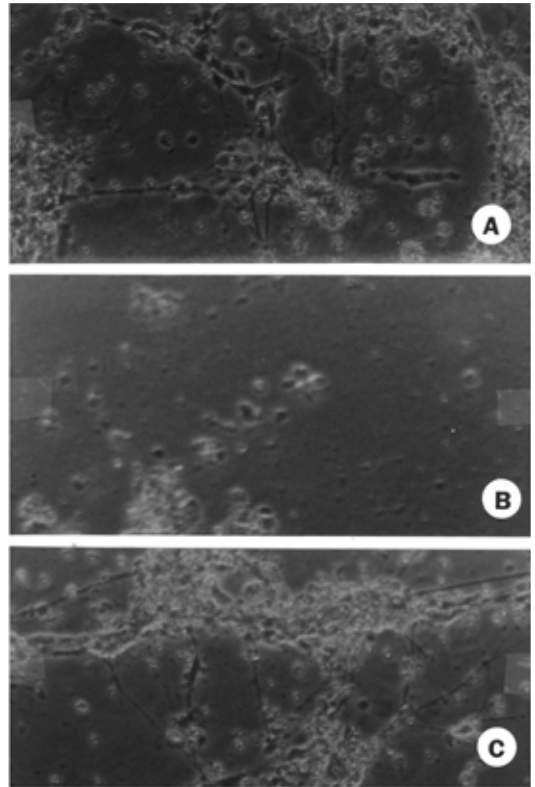
#### 4. 형태학적 관찰

##### 1) 대조군

저산소성-허혈 유도를 하지 않은 대조군에서는 neuron이 다수 관찰되었으며 이들은 서로 신경돌기를 내어 긴밀하게 연결되어 있었다 (Fig. 12A).

##### 2) 저산소성-허혈 유도군

저산소성-허혈을 유도한 군에서는 neuron 중 일부 손상을 입은 세포들이 배양용기의 바닥으로부터 떨어져 나와 대조군에 비하여 현저한 세포수의 감소를 보였다. 동시에 신경세포의 탈락으로 인하여 신경돌기의 소실을 보였다 (Fig. 12B).



**Fig. 12.** Dissociated cerebral neurons of neonatal rats. (A) Cultured cerebral neurons for 3 days in vitro (control) ( $\times 125$ ). (B) Cultured cerebral neurons exposed to hypoxic-ischemic condition for 3 days ( $\times 125$ ). (C) Cultured cerebral neurons treated with 150 mg/kg of allopurinol before exposure to hypoxia-ischemia ( $\times 125$ ).

#### 3) Xanthine oxidase inhibitor 처리군

저산소성-허혈 유도 15분 전에 allopurinol을 처리한 다음 14일 후 신생쥐를 희생시켜 적출한 대뇌에서 neuron을 관찰한 결과 저산소성-허혈을 유도한 실험군에 비하여 세포의 수적인 증가와 함께 신경세포돌기 소실의 감소도 관찰 되었다 (Fig. 12C).

### 고 찰

주산기 가사, 뇌졸중, 뇌허혈 등에 의한 신경세포의 손상은 저산소 및 허혈에 의한 혈류의 감소로 산소와 영양공급이 부족하게 됨으로써 세포의 퇴화는 물론 고사를 초래하게 된다<sup>6, 12</sup>. 초기에는 뇌혈류량의 증가에 의해 보상이 되나 진행되면 혐기성 해당이 진행되어 뇌세포의 손상을 초래하게 되는 등 저산소성-허혈

시 세포 내에서는 다양한 생화학적 변화가 유발되게 된다.

세포내 산소부족은 산화적 인산화 반응이 차단되며 그 결과 ATP생산이 감소되고 이 상태가 더욱 진행된다면 결국 세포독성으로 인하여 세포의 괴사를 유발함은 이미 잘 알려져 있다<sup>21, 22</sup>. 조직내 산소가 결핍되면 산화적 인산화가 저하되어<sup>21, 23</sup>, 그 결과 reduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)나 flavin-adenine dinucleotide(FADH)가 축적되며 또한 ATP의 생산이 감소된다<sup>24, 25</sup>. 더욱 산소결핍이 진행되면 ATP가 더욱 감소되고 동시에 이를 이용한 효소작용의 저하로 세포내 Na<sup>+</sup> 방출 및 K<sup>+</sup> 유입이 저하됨으로써<sup>26, 27</sup>, 결국 세포내의 Na<sup>+</sup> 축적과 Cl<sup>-</sup> 및 물의 유입으로 인하여 다른 요인들과 함께 세포에 독성을 나타내게 된다<sup>15, 16</sup>.

특히 호기성 세포에서는 사립체내의 산화적 인산화 작용 동안 전자 전달계에 의하여 산소라디칼이 생성된다<sup>28, 29</sup>. 이렇게 생성된 과산화 음이온(superoxide anion)은 superoxide dismutase(SOD)에 의해 과산화수소를 생성하며<sup>30, 31</sup>, 이는 다시 사립체내의 glutathione peroxidase나 catalase에 의하여 물로 치환됨으로서 인체에는 아무런 손상을 주지 않게 된다<sup>32, 33</sup>. 그러나 병적인 상태, 즉 근 위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)의 경우 SOD-1 유전자의 점 돌연변이로 인하여 항산화 효소에 의하여 미처 제거되지 못한 활성 산소들이<sup>31, 34</sup> 환자의 뇌 속에 축적됨으로서 세포의 손상은 물론 병변을 더욱 악화시킨다고 한다<sup>17, 35</sup>. 따라서 저산소성-허혈로 뇌 손상을 유발하는 주산기 가사, 뇌졸중과 같은 치료에 비타민 C나  $\alpha$ -tocopherol과 같은 활성산소 제거제들의 투여가 병변의 효과적인 치료 방법으로 부각되고 있다<sup>36, 37</sup>. 활성 산소 발생의 중요한 기전은 저산소성-허혈시 에너지가 결핍되면 ATP가 ADP, AMP로 분해되고 AMP는 다시 아데노신, 이노신으로 대사되고 계속해서 hypoxanthine, xanthine으로 대사되는 과정에서 xanthine oxidase가 NAD 대신 산소분자를 이용하면서 발생하는데 특히 재관류시 잘 발생되며, 이때 xanthine oxidase inhibitor인 allopurinol은 활성산소의 발생을 저해하여 세포손상을 억제하게 한다.

한편 활성산소의 산화적 손상에 관한 연구에서 활성산소가 흥분성 아미노산(excitatory amino acid, EAA)을 분비케 한다는 것이 보고됨으로서 이들간의

상호작용에 대한 기전규명이 활발히 진행 중에 있다<sup>38, 39</sup>. 특히, 활성산소에 의하여 분비된 EAA는 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 활성화시켜<sup>26, 40</sup>, 그 결과 세포내 칼슘의 증가를 초래한다고 하며<sup>41</sup>, 또한 활성산소는 더욱이 phospholipase A<sub>2</sub>를 자극하여 새로운 활성산소의 생성은 물론<sup>19, 42</sup> 이는 다시 nitric oxide와 결합하여 peroxy-nitrate라는 독성물질을 형성함으로써 세포의 손상은 물론 나아가서 세포 고사를 초래한다고 한다<sup>35, 43</sup>. 한편, 세포내 칼슘증가는 diacylglycerol(DAG)에 의한 calcium-dependent protein kinase C(PKC)의 활성화에 기인한다고 알려져 있으며<sup>16, 39</sup>, PKC는 세포내 신호전달과 세포분열에 관계하고 있는 이차전달자(second messenger)로서 PKC- $\alpha$ 를 비롯하여 PKC- $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$  등 약 10종으로 구성되어 있다<sup>16, 23</sup>. PKC의 활성화는 transforming growth factor(TGF)- $\alpha$ 나 epithelial growth factor receptor(EGFR)의 활성을 유도함으로써 수용체의 intrinsic tyrosine kinase를 활성화 시켜 inositol phospholipid(IP)형성과 칼슘의 세포내 유입, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>의 교환, c-fos와 c-myc의 발현으로 DNA의 증가와 세포의 분화 및 세포의 종양적 변환을 유발시킨다고 알려져 있다<sup>37</sup>. 이와 같이 저산소성-허혈은 활성산소에 의한 산화적 손상과 밀접한 관련이 있음이 알려지면서<sup>4, 5</sup> 산화적 손상 측면에서 기전규명을 시도하려는 연구가 진행되어 왔다<sup>9, 10</sup>.

본 연구에서는 저산소성-허혈이 neuron과 astrocyte에 미치는 영향을 조사하기 위하여 저산소성-허혈에 노출된 후 12-72시간 경과된 신생쥐의 뇌조직으로 부터 순수분리 배양한 neuron과 astrocyte에 대하여 조사하였으며, 그 결과는 저산소성-허혈에 노출된 시간에 비례하여 세포의 수적인 감소와 세포생존율이 감소되는 세포독성을 나타냈다. 본 연구의 이 같은 결과는 저산소성-허혈의 시작에서부터 재관류가 일어나는 3일 후 회복기까지도 뇌 세포 손상이 계속된다는 보고와 일치하였으며<sup>4, 7</sup>, 동시에 저산소성-허혈은 신생쥐의 대뇌신경세포에 세포독성이 있음을 증명하고 있다<sup>3, 9</sup>. 저산소성-허혈이 활성산소의 산화적 손상과 밀접한 관련이 있다고 제시되고 있으나 이에 대한 연구는 많지 않다<sup>8, 12</sup>. 따라서 본 연구는 저산소성-허혈과 산화적 손상간의 상호작용현상을 밝히기 위하여 hydroxy radical을 분비하는 xanthine oxidase에 대한 길항제인 allopurinol을 저산소성-허혈유도 15분



전에 신생쥐에 복강주사한 다음 저산소성-허혈유도 14일 후에 이의 뇌조직으로부터 순수 분리 배양한 neuron에 대하여 세포의 수적인 변화와 세포생존율에 대하여 조사한 결과 allopurinol 대신 생리식염수를 주사한 실험군에 비하여 유의하게 세포의 수적증가와 생존율의 증가를 보임으로서 저산소성-허혈은 활성산소의 산화적 손상과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다. 이는 저산소-허혈동안 혈관내피세포에서 생성 축적된 활성산소에 의하여 세포의 손상이 초래된다는 것을 간접적으로 증명해 주는 결과이다<sup>27, 44</sup>.

또한 저산소성-허혈에 대한 allopurinol의 영향을 LDH 측면에서 조사하기 위하여 위와 동일한 실험조건에서 allopurinol을 처리한 다음 이의 영향을 분석한 결과 생리식염수 처리군에서는 LDH치가 대조군에 비하여 189.6%로 높게 나타났으나 allopurinol 처리군에서는 108.6%로 생리식염수 처리군에 비하여 유의하게 감소( $P < 0.05$ )됨으로서 저산소성-허혈에 의한 산화적 손상으로 부터 세포를 방어하였음을 알 수 있었다. 활성산소에 의한 산화적 손상은 세포막의 지질 과산화 반응을 촉진시킴으로서 막의 손상을 유도하는데 LDH 감소는 allopurinol이 xanthine oxidase에 의한 hydroxy radical의 생성을 억제한 결과라고 생각된다<sup>15</sup>.

한편, 저산소성-허혈에 대하여 allopurinol이 SRB에 의한 단백질합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 위와 동일한 실험조건에서 분석한 결과 생리식염수 처리군에서 단백질 합성율은 대조군에 비하여 41.8%로 낮게 나타났는데 비하여, allopurinol 처리군에서는 82.4%( $P < 0.05$ )로 매우 높게 나타났다. 이는 아마도 전 처리시 세포막을 통하여 침투한 allopurinol이 xanthine의 산화적 손상으로부터 단백질합성에 관여하는 과립내 형질세망이나 리보솜 등의 손상을 방어한 결과일 것으로 생각한다<sup>9</sup>. 한편, NMDA receptor의 활성화는 세포내 칼슘농도를 증가시키고 phospholipase C를 활성화하여 phospholipid를 가수분해하며, 대사산물로 나온 DAG는 PKC(calcium-phospholipid-dependent-protein kinase C)를 활성화하며<sup>13, 16</sup>, PKC는 흥분성 전달물질의 분비에 관여한다. 따라서 본 연구에서는 허혈이 PKC에 미치는 영향을 보고자 시험관내에서 배양된 neuron에 5-60분 동안 허혈을 유도한 후 이에 따른 PKC를 조사하였으며, 그 결과 허혈유도 10분에 허혈유도전의 대조군에 비하여 719.0%( $P < 0.05$ )로 매우 유의하게 증가하였으며 이 후부터

점차 감소하여 허혈이 PKC를 증가시킴을 알 수 있었다<sup>16, 22</sup>. PKC의 증가는 세포의 투과성을 비롯하여 세포분열이나 호르몬의 분비조절에 변화를 초래하며<sup>37</sup>, 특히 세포내 신호전달 체계의 영향을 준다고 알려져 있다<sup>23, 24</sup>. 허혈 유도로 증가된 PKC activity에 대한 allopurinol의 영향에 관한 조사에 있어서 allopurinol을 신경세포에 전 처리한 후 이를 다시 허혈 유도에 노출시킨 결과 허혈 유도시 증가된 PKC activity (816.7%)가 감소(425.0%)를 보여 allopurinol은 허혈 유도에 의한 PKC activity 증가를 유의하게 감소( $P < 0.05$ )시켰고, 이러한 본 연구의 결과는 허혈이 산화적 손상과 밀접한 관련이 있으며<sup>16</sup>, 동시에 허혈에 의한 산화적 손상이 allopurinol에 의해 저해되어 그 결과 NMDA receptor를 통한 세포내 칼슘증가의 억제에 의하여 DAG-PKC의 통로가 차단된 결과일 것으로 생각된다<sup>16, 36</sup>.

## 요 약

**목 적 :** 저산소-허혈에 대한 신경독성의 규명 및 xanthine oxidase inhibitor인 allopurinol의 저산소성-허혈 유도에 미치는 방어효과를 조사하기 위하여 본 연구를 시도하였다.

**방 법 :** 신생쥐에 우측 총경동맥을 결찰 및 8% O<sub>2</sub>의 노출로 허혈 및 저산소 상태를 만든 후 저산소성-허혈이 12-72시간 동안 대뇌의 neuron과 astrocyte에 미치는 영향을 조사하여 신경독성을 규명하고, 또한 xanthine oxidase inhibitor인 allopurinol이 저산소성-허혈 유도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 저산소성-허혈 유도 15분 전에 150 mg/kg의 allopurinol을 복강 투여한 다음 투여 후 14일 후에 신생쥐를 희생하여 이의 뇌 조직으로부터 순수분리 배양한 신경세포에 대하여 세포의 수적 변화와 생존율을 비롯하여 LDH와 단백질합성 및 PKC를 조사하였다.

## 결 과 :

- 1) 저산소성-허혈은 저산소-허혈 유도 직후부터 72시간 동안 시간경과에 비례하여 신생쥐의 대뇌 neurons의 수와 세포생존율을 유의하게 감소시켰다.
- 2) 저산소성-허혈은 저산소-허혈 유도 직후부터 72시간 동안 시간경과에 비례하여 신생쥐의 대뇌 astrocyte의 수와 세포생존율을 다소 감소시켰다.
- 3) 저산소-허혈 유도 14일 후 neuron의 수와 세포

생존율 및 단백질합성은 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으나 LDH는 매우 증가하였다.

4) 저산소-허혈 유도 직전 allopurinol 처리에 의하여 neuron의 수와 세포생존율 및 단백질합성은 유의하게 증가하였고 LDH치는 현저히 감소하였다.

5) 배양된 neuron에 대한 PKC 조사에 있어서 허혈 유도 10분에 현저한 PKC치의 증가를 보였으며, allopurinol의 전 처리는 허혈 유도에 의한 PKC치의 증가를 유의하게 감소시켰다.

**결론:** 저산소성-허혈은 신생쥐의 대뇌 신경세포에 독성효과를 나타냈으며 활성산소 제거제인 allopurinol은 세포수 및 세포생존률의 증가에 의한 신경세포의 손상보호를 나타내었고, 단백질합성 증가, LDH치 및 PKC치의 감소로 세포손상에 대한 효과적 방어도 관찰할 수 있었다.

**참 고 문 헌**

- 1) Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res* 1990;27:332-6.
- 2) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Meth* 1983; 65:55-63.
- 3) Burgers M, Vandeplassche G, van Reempts J. Cytochemical markers of ischemia in the heart and brain. *Histochem J* 1990;22:125-33.
- 4) Hammerman C, Kaplan M. Ischemia and reperfusion injury: the ultimate pathophysiologic paradox. *Clin Perinatol* 1998;25:757-77.
- 5) Prehn JH, Welsh M, Backihauss C, Nuglisch J, Ausmeier F, Kakoutly C, et al. Effect of serotonergic drugs in experimental brain ischemia: evidence for a protective role of serotonin in cerebral ischemia. *Brain Res* 1993;630:10-20.
- 6) Mohr JP, Orgogozo JM, Harrison MJG, Hennerici M, Wahlgren NG, Gelmers JH, et al. Meta-analysis of oral nimodipine trials in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 1994;4:197-203.
- 7) Silverstein FS, Buckanan K, Hudson C, Johnston MV. Flunarizine limits hypoxia-ischemia induced morphologic injury in immature rat brain. *Stroke* 1986;117:477-82.
- 8) du Plessis AJ, Johnston MV. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: cellular mechanism and potential strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol* 1997;24:627-54.

- 9) Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alphatocopherol administration. *Stroke* 1983;14:977-82.
- 10) Park ST, Mun YJ, Oh JM, Kim JJ, Choi MK, Shim JH, et al. Effect of iron-chelator on oxygen radicals in cultured oligodendrocytes. *Korean J Phys Anthropol* 1996;9:189-95.
- 11) Chunmas PD, Del Bigio MR, Drake JM, Tuor UI. A comparison of the protective effect of dexamethasone to other potential prophylactic agents in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurosurg* 1993;79:414-20.
- 12) Hong IH, Kim HM. Therapeutic effect of nimodipine in neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Pediatr* 1999;42:1552-8.
- 13) Vannucci RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 1990;27:317-26.
- 14) Itoh T, Kawakami M, Yamauchi Y. Effect of allopurinol on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 1986;17:1284-7.
- 15) Takahashi K, Fujita T, Mayum T, Kish T. Effect of adriamycin on cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem Pharm* 1987;35(1):326-34.
- 16) Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1986;258:607-14.
- 17) Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 1994;37: 62-70.
- 18) Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay(HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth* 1984;9:7-9.
- 19) Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987;7:369-79.
- 20) Hu KQ, Backer JM, Sahagian G, Feener EP, King GL. Modulation of the insulin growth factor 2/mannose 6-phosphate receptor in microvascular endothelial cells by phorbol ester via protein kinase C. *J Biol Chem* 1990;265:13864-70.
- 21) Hall E, Braughler JM. Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *CNS Trauma* 1986;3:281-94.
- 22) Lynch JJ, Ferro TJ, Blumenstock FA, Brockenauer AM, Malik AM. Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *J Clin Invest* 1990;85:1991-8.
- 23) Jacken S, Kiley SC. Purification and characteri-

- zation of three types of protein kinase C from rabbit brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4418-26.
- 24) Ase K, Berry N, Kikawa U, Kishimoto A, Nishizuka Y. Differential down-regulation of protein kinase C subspecies in KM3 cells. *PEBS Lett* 1988;236:396-401.
  - 25) Zeman S, Lloyd C, Meldrum B, Leigh PN. Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994;20:219-31.
  - 26) Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* 1988;336:68-70.
  - 27) Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP. Mechanism of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998;132(Suppl 3):S30-4.
  - 28) Kontos H, Wei E, Ellis E, Jenkins L, Povlishock J, Rowe G, et al. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cat. *Circ Res* 1985;57:142-51.
  - 29) Fernando MR, Nanri H, Yoshitake S, Nagata-kuno K, Minakami S. Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. *Eur J Biochem* 1992;207:917-22.
  - 30) Michelon AM, Puget K. Cell penetration by exogenous superoxide dismutase. *Acta Physiol Scand* 1980;492:67-77.
  - 31) Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, et al. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59-62.
  - 32) Kim YS, Kim SU. Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res* 1991;29:100-6.
  - 33) Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 1997;4:2587-97.
  - 34) Jackson GR, Apfell L, Werrbach-Perex K, Perex-Polo JR. Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balanced and neuronal injury: 1. stimulation of hydrogen peroxide resistance. *J Neurosci Res* 1990;25:360-8.
  - 35) Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL. Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium- and free radical mediated excitotoxic injury: implications for treating neurodegenerative disorders. *J Exp Neurol* 1993;124:89-95.
  - 36) Mayer ML, Westbrook GL. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J Physiol* 1987;394:501-27.
  - 37) Nowak TS, Ikeda J, Nakajima T. 70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Stroke Suppl III* 1990;21:107-11.
  - 38) Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F. Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J Neurochem* 1988;51:1960-3.
  - 39) Buchan A, Gertler SZ, Li H, Xue D, Huang ZG, Chaundy KE, et al. A selective N-type  $Ca^{2+}$ -channel block prevents CA1 injury 24h following severe forebrain ischemia and reduces infarction following focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:903-10.
  - 40) Heizmann CW, Hunziker W. Intercellular calcium binding molecules. In: Bronner F, editor. *Intracellular calcium regulation*. 1st ed.: New York, Alan R Liss, 1990:211.
  - 41) Michaels RL, Rothman SM. Glutamate neurotoxicity in vitro: Antagonist pharmacology and intercellular calcium concentrations. *J Neurosci*. 1990; 10:283-92.
  - 42) Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F. Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 1990;10:1035-41.
  - 43) Gelmers HJ. Calcium-channel blockers in the treatment of migraine. *Am J Cardiol* 1985;55: S139-43.
  - 44) Pryds O, Greisen G, Lou H, Friss-Hansen B. Vasoparalysis associated with brain damage in asphyxiated term infants. *J Pediatr* 1990;117:119-25.