

신생 백서의 저산소 허혈 뇌손상에서 Transforming Growth Factor- β 1 투여에 따른 Nitric Oxide Synthase 이성체와 N-methyl-D-aspartate 수용체 아단위의 발현

대구가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실, 구미강동병원 소아청소년과*, 동국대학교 의과대학 안과학교실†

고혜영* · 서억수† · 김우택

= Abstract =

Expression of nitric oxide synthase isoforms and N-methyl-D-aspartate receptor subunits according to transforming growth factor- β 1 administration after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats

Hae Young Go, M.D.*, Eok Su Seo, M.D. and Woo Taek Kim, M.D.†

Department of Pediatrics, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu

Department of Pediatrics*, Gumi-Gangdong Hospital, Gumi, Gyungsookdo

Dongguk University College of Medicine†, Gyeongju, Gyungsookdo

Purpose : Transforming growth factor (TGF)- β 1 reportedly increases neuronal survival by inhibiting the induction of inducible nitric oxide synthase (NOS) in astrocytes and protecting neurons after excitotoxic injury. However, the neuroprotective mechanism of TGF- β 1 on hypoxic-ischemic (HI) brain injury in neonatal rats is not clear. The aim of this study was to determine whether TGF- β 1 has neuroprotective effects via a NO-mediated mechanism and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor modulation on perinatal HI brain injury.

Methods : Cortical cells were cultured using 19-day-pregnant Sprague-Dawley (SD) rats treated with TGF- β 1 (1, 5, or 10 ng/mL) and incubated in a 1% O₂ incubator for hypoxia. Seven-day-old SD rat pups were subjected to left carotid occlusion followed by 2 h of hypoxic exposure (7.5% O₂). TGF- β 1 (0.5 ng/kg) was administered intracerebrally to the rats 30 min before HI brain injury. The expressions of NOS and NMDA receptors were measured.

Results : In the *in vitro* model, the expressions of endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (nNOS) increased in the hypoxic group and decreased in the 1 ng/mL TGF- β 1-treated group. In the *in vivo* model, the expression of inducible NOS (iNOS) decreased in the hypoxia group and increased in the TGF- β 1-treated group. The expressions of eNOS and nNOS were reversed compared with the expression of iNOS. The expressions of all NMDA receptor subunits decreased in hypoxia group and increased in the TGF- β 1-treated group except NR2C.

Conclusion : The administration of TGF- β 1 could significantly protect against perinatal HI brain injury via some parts of the NO-mediated or excitotoxic mechanism. (Korean J Pediatr 2009;52:594-602)

Key Words : Transforming growth factor- β 1, Hypoxia, Ischemia, Excitotoxicity, Nitric oxide synthase, N-methyl-D-aspartate receptors

서 론

주산기 저산소 허혈 뇌손상은 신생아 사망률을 높일 뿐만 아니라 생존한다 하더라도 향후 발생할 수 있는 뇌성마비, 인지장애, 학습장애 및 경련 질환 등의 영구적인 신경학적 후유증 때문에 저산소 허혈 뇌손상을 줄이려는 방법의 개발이 매우 중요하다고 할 수 있다^{1,2)}. 이러한 뇌 손상의 발생 기전에 대한 여러 가지 가설이 제시 되고 있지만, 그 중에서도 글루탐산염과 산화유리의 생성, 세포내 칼슘 침착과 산화질소의 생성, 면역/염증 반응의 활성화의

Received : 24 December 2008, Revised : 12 February 2009

Accepted : 13 March 2009

Address for correspondence : Woo Taek Kim, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Daegu Catholic University,

3056-6 Daemyeong 4-dong, Namgu, Daegu 705-718, Korea

Tel : +82-53-650-4250 Fax : +82-53-622-4240

E-mail : woodykim@cu.ac.kr

연관은 명백히 밝혀져 있다³⁾. 저산소 허혈 상태는 에너지 대사를 붕괴시키게 되고 이로 인해 글루탐산염의 생성과 세포내 칼슘침착이 촉진되고 calpains 같은 단백질 분해효소를 활성화 시키면서 결국은 세포흥분성 독성을 통해 뇌세포 괴사가 일어나게 된다⁴⁾. N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 과도한 활성화는 뇌세포의 흥분독성뿐 아니라 허혈 뇌손상의 병태 생리학과도 연관이 있다. 따라서 NMDA나 non-NMDA (AMPA and kainate)의 길항제들은 여러 가지 허혈 뇌손상 모델에서 뇌세포 보호 효과가 있다는 것이 밝혀졌다⁵⁾. NMDA 수용체 아단위는 NR1과 NR2로 나누어지고, NR1 아단위는 NMDA 수용체 형성에 있어서 필수적으로 8종류의 교대 접합 변형체가 있으며, NR2 아단위는 NR2A, NR2B, NR2C 및 NR2D로 나누어지고, NR1 아단위 없이 단독으로 기능을 수행할 수가 없다⁶⁾. 과도한 글루탐산염이 방출됨으로써 발생하는 흥분독성은 산화질소(nitric oxide)의 생성과도 연관이 있다. 산화질소는 무기가스로서 뇌혈류와 열생산, 뇌세포 활동을 조절하는 역할을 한다⁷⁾. 산화질소는 내피세포, 뉴런, 교세포, 대식세포에서 분비되며 3가지의 다른 이성체를 가지는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성된다⁸⁾. 허혈상태에서 칼슘에 의해 유리되는 neuronal NOS (nNOS) 및 대식세포를 비롯한 다른 여러 세포에 있는 inducible NOS (iNOS)로부터 생성되는 산화질소는 염증반응과 세포독성을 일으키게 되고 결국 세포사멸에 이르게 한다⁹⁾. 이와는 반대로, endothelial NOS (eNOS)로부터 생성된 산화질소는 혈소판의 응집을 막고 백혈구가 혈관내막에 부착하는 것을 방해하여 결과적으로 혈관을 확장시키고 뇌혈류를 증가시키는 뇌 보호 효과가 있다⁹⁾.

Transforming growth factor-β1 (TGF-β1)은 다양한 기능을 가진 사이토카인으로 여러 세포들에서 세포 성장과 증식, 분화에 관여한다¹⁰⁾. 그리고 저산소 허혈 뇌손상 후에 뇌세포의 손상을 감소시키는 역할을 하고¹¹⁾, 생체 외 실험에서 rhTGF-β1은 흥분독성 손상으로부터 신경을 보호할 수 있다고 알려져 있다¹²⁾. 또한 저산소 뇌손상을 받은 토끼의 전뇌에서 TGF-β1 mRNA가 증가하였다는 보고가 있으며^{13, 14)}, 현재 TGF-β1의 존재와 뇌손상 보호 효과는 저산소 허혈 뇌손상을 받은 중추신경계에서 여러 변질 과정들의 병리 생리학적인 면에서 중요한 역할을 할 수 있다고 보고되고 있다^{15, 16)}.

저자들은 이전 연구에서 TGF-β1이 항 세포사멸사 작용을 통하여 저산소 허혈 뇌손상을 받은 신생 백서의 뇌를 보호한다는 결과를 낸 적이 있다¹⁷⁾. 이번 연구에서는 TGF-β1가 그 외 다른 기전인 산화질소로 인한 신경독성과의 연관성 및 글루탐산염에 의한 흥분독성과의 관계를 보기위하여 생체 외(*in vitro*) 실험으로 태아 백서 대뇌피질 신경세포를 배양하여 저산소 손상을 주어 western blotting을 통한 iNOS, eNOS, nNOS의 발현을 알아보고, 생체 내(*in vivo*) 실험으로 TGF-β1 투여 후 저산소 허혈 뇌 손상을 받은 신생 백서의 뇌를 western blotting과 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)을 통하여 iNOS, eNOS, nNOS의 발현과 iNOS, eNOS, nNOS mRNA 발현 및 NR1, NR2A, NR2B,

NR2C, NR2D mRNA의 발현을 알아보았다.

대상 및 방법

1. 태아백서 대뇌피질 신경세포 배양

Brewer¹⁸⁾ 방법으로 태아 백서(Sprague-Dawley)로부터 대뇌피질 신경세포의 배양을 실시하였다. 제태 기간 19일째의 임신한 백서를 상온에서 에테르를 흡입시킨 후 자궁을 절제하였으며, 태아 백서는 100% 에탄올과 Hank's balanced salt solution (HBSS) (GibcoBRL, USA)으로 세척하였다. 태아 백서의 뇌는 1 mM 나트륨 파루베이트와 10 mM HEPES (pH 7.4)를 포함한 37°C의 HBSS에서 절개되었으며, 대뇌피질 세포는 2 mL 트립신을 첨가하여 37의 수조에서 1분간 배양하였다. 트립신은 5 mL HBSS에 5번 씻어 제거하였다. 세포들을 1 mL HBSS에서 재부유시킨 후 파스테르 피펫에 6-7회 통과시켜 분산시켰으며 25 °C에서 1,000 rpm으로 5분간 원심 분리하였고, 펠렛은 HBSS로 세척하였다. 세포는 neurobasal medium (GibcoBRL, USA) (100 mL neurobasal medium with 2 mL B27 supplement, 0.25 mL glutamax I, 0.1 mL 25 mM glutamate, and 0.1 mL 25 mM glutamate, and 0.1 mL 25 mM 2-mercaptoethanol)에 배양하였으며 2×10⁶ cells/mL을 10 mL 접시에 각각 배양하였다. 세포들은 매 3일마다 배양액의 1/5을 neurobasal medium (GibcoBRL, USA) (100 mL neurobasal medium with 2 mL B27 supplement and 0.25 mL glutamax I)으로 바꾸기며 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 배양된 세포는 5개 군; 정상 산소군(Control), 저산소군(Hypoxia), 저산소 손상 전 1, 5, 10 ng/mL TGF-β1 (recombinant human transforming growth factor-β1, Biosource international, USA) 투여군(H+TGF-β1)으로 나누었다. 배양배지 10 mL에 TGF-β1 50 μg/mL을 희석하여 최종 배양 배지의 TGF-β1 농도가 1, 5, 10 ng/mL이 되도록 하였다. 정상 산소군은 5% CO₂ 배양기에, 그리고 저산소군과 저산소 손상 전 TGF-β1 투여군은 1% O₂ 배양기(94% N₂, 5% CO₂)에 17시간 동안 넣어두었다. TGF-β1은 저산소 손상 30분 전에 투여하였고 저산소 손상이 끝난 직후 모든 군을 현미경 관찰하여 사진을 찍었으며, 단백질을 분리하여 western blotting에 이용하였다. 위의 실험은 모두 3번씩 반복하였다.

2. 동물 실험

본 연구의 시험내용은 대구가톨릭의과대학병원의 실험동물의 관리와 사용위원회에 의해 검토되고 승인되었으며 실험동물에 대한 지침을 준수하였다. Rice 등¹⁹⁾의 방법에 따라 신생백서에 저산소 허혈 뇌손상을 유발하였다. 실험동물의 암수 차이는 없었고, 만삭아의 뇌와 유사한^{20, 21)} 생후 7일(체중 12-16 g)의 신생 백서(n=40)를 사용하였다. 신생 백서는 에테르로 마취하였으며, 좌측 종경동맥을 노출, 분리하여 5-0 수술용 실크로 이중 결찰하였다.

절개부위는 다시 봉합하여 상온에서 회복시켰으며 이러한 모든 시술은 5분을 넘지 않게 하였다. 1시간 동안 회복시킨 뒤 신생 백서를 37°C 수조에 두어 2시간 동안 저산소(7.5% O₂) 상태로 노출시켰으며, 저산소 노출 후 신생 백서를 우리에 되돌려놓았다. 일주일 후 전뇌(whole brain)를 적출하여 분석하였다.

실험군은 4개 군; 첫 번째 군(n=9)은 아무런 처치도 하지 않은 정상 대조군(Control), 두 번째 군(n=9)은 경동맥 노출 후 봉합 시술만 시행한 Sham 수술군(Sham-OP), 세 번째 군(n=11)은 손상 30분 전 생리식염수(10 uL)를 대뇌로 투여한 저산소 대조군(HI+Vehicle), 네 번째 군(n=11)은 손상 30분 전 TGF-β1를 대뇌로 투여한 저산소 손상 전 TGF-β1 투여군(HI+TGF-β1)으로 나누었다. TGF-β1는 체중 kg당 0.5 ng 용량을 대뇌 내로 투여하였다. 대뇌 내 투여는 투여할 동물의 머리를 움직이지 않도록 고정시킨 다음, 좌측 대뇌를 십자 표시로 그어 구분한 선 중심점에 인슐린주사기를 이용하여 주사침을 3 mm 가량 찔러 넣어 투여하였다.

3. 뇌 조직표본의 조직학적 관찰

저산소 뇌손상을 받은 지 7일에 백서의 뇌를 적출하였으며, 적출 즉시 뇌의 표본을 디지털카메라로 찍어 densitometer (Multi Gauge Software, Fuji Photofilm)를 이용하여 뇌의 면적을 측정하였다. 각 군마다 우반구를 100%로 기준을 잡고 좌반구의 면적을 비교하였으며 대조군과도 함께 비교하였다.

4. 신생백서 뇌적출 및 단백질 분리

저산소 뇌손상을 받은 지 7일에 백서의 좌반구를 적출하였으며, 적출 즉시 액체 질소로 뇌 조직을 얼린 후 다음 사용 때까지 -70°C로 저장하였다. 얼린 뇌 조직을 단백질 분해 효소 억제제(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)와 1 M Tris-HCL (pH 8.0), 5 M NaCl, 10% Nonidet P-40 and 1 M 1,4-dithio-DL-threitol (DTT)가 포함된 버퍼 용액에 담구어 단백질을 분리시켰다. 20분간 얼음 위에 방치한 후 12,000 rpm으로 4에서 30분간 원심 분리한 다음 상층액을 분리하였다. 총 단백질 양은 Bio-Rad Bradford kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

5. 단백질 분리 및 western blot analysis

동량(30 μg)의 단백질을 버퍼용액(100 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 20% glycerol, 4% SDS and 0.2% bromophenol blue)에서 10분간 끓인 다음, 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)에서 전기 영동시켰다. 전기 영동 후 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF)막 (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 10 V 일정한 전압으로 30분간 이동시켰다. 그 다음 막을 1×Tris-buffered saline (TBS)와 0.1% Tween-20 (TBST, pH 7.4)로 2번 씻어낸 다음 blocking buffer (5% nonfat dry milk in TBST)와 함께 한 시간 동안 실온에 두었

다. 단백질이 이동된 막은 토끼의 다클론성 항체인 iNOS (Stressgen Bioreagents Corporation, Stressgen, Victoria, CANADA), eNOS (Stressgen Bioreagents Corporation, Stressgen, Ann Arbor, USA), nNOS 항체 (Stressgen Bioreagents Corporation, Stressgen, Victoria, CANADA)와 1:10,000 배로 희석시킨 TBS 용액에서 4°C에서 하룻밤 동안 두었다. 막을 씻어낸 뒤 이차 항체로 항 토끼 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 1:2,000배로 희석한 horseradish peroxidase용액에 담구어 실온에 1시간 동안 두었다. 마지막으로, 막을 씻어낸 다음 Enhanced Chemiluminescence (ECL)와 Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 western blotting하였다. Western blot에서 나타나는 띠의 강도를 densitometer (Multi Gauge Software, Fuji Photofilm)를 이용하여 측정하였다.

6. RNA추출 및 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR)

총 RNA는 TRIzol 시약(Invitrogen corporation, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 뇌 조직에서 추출하였다. 먼저 1 mL의 TRIzol 시약과 조직을 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 DNA와 단백질을 분리하였고, 이소프로판올을 사용하여 침전시켰다. 침전물은 75% 에탄올로 두 번 세척하고 대기에서 건조시켰으며 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리된 증류수로 다시 희석하였다. 추출된 RNA의 양과 순도는 spectrophotometry (Beckman, USA)로 측정하였으며 다음 연구를 위해 RNA는 -70°C에 저장하였다.

Real-time PCR을 위해 20 U RNase inhibitor (Promega, Madison, WI, USA), 1mM dNTP (Takara, Otsu, Japan), 0.5 ng oligo-(dT) 15 primer (Promega), 1×RT buffer와 200 U M-MLV reverse transcriptase (Promega)를 포함한 반응 혼합물에서 총 RNA (1 μg)를 37°C에서 1시간 동안 역전사 시켰다. 이후 반응 혼합물은 95에서 5분간 배양하여 반응을 끝냈으며, cDNA는 -20°C에 보관하였다. Real-time PCR은 48-well PCR plate (Mini Opticon™ Real-time PCR System, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)에서 이루어졌으며 Finnzymes DyNAmo SYBR green qPCR kit (Finnzymes, Beverly, MA, USA)를 사용하였다. 증폭 조건은 95에서 15분 처리 후, Table 1에 정리한 온도에서 1분간 40회 주기로 증폭하였다. 전체 반응은 Opticon Monitor™ software version 3.1 (Bio-Rad Laboratories)로 분석하였으며 각 primer의 측정값은 β-actin의 측정값으로 보정하여 상대적 발현량을 산출하였다.

7. 통계학적 방법

데이터는 평균값을 나타내며 각 군의 평균값의 비교에는 Student's t-test 이외에 Mann-Whitney U-test를 사용하여 검정하였다. P 값이 0.05 이하인 경우에 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

1. TGF-β1을 농도별로 투여한 신생 백서 대뇌피질 신경세포 배양에서 현미경 소견

배양된 대뇌 피질 세포를 고배율(×400) 형광 현미경으로 관찰한 결과 정상 산소군(Fig. 1A)은 핵막이 뚜렷하고 세포질의 균질한 정상 세포 조직을 보였으나 저산소 군 (Fig. 1B)에서는 세

포가 전반적으로 부풀어 있으면서 핵막이 뚜렷하지 못하고 세포질 내에 여러개의 공포(vacuoles)가 보였다. 저농도(1 ng/mL) TGF-β1 투여군(Fig. 1C)에서는 정상 산소군과 비슷한 소견을 보였으나 오히려 고농도(5, 10 ng/mL) TGF-β1 투여군(Fig. 1D and 1E)은 저농도 TGF-β1 투여군보다 손상이 더 많았다. 따라서 저농도 TGF-β1 투여로 저산소에 의한 손상을 더 감소시킬 수 있었다.

2. 신생 백서 대뇌피질 신경세포 배양에서 western blotting에 의한 iNOS, eNOS, nNOS의 발현

iNOS의 발현은 정상 산소군과 저산소군 간에 차이가 없었으며, TGF-β1 투여군에서 농도와는 상관성이 없이 증가하였다(Fig. 2A). eNOS의 발현은 정상 산소군에 비하여 저산소군에서 증가하였고, 저농도 TGF-β1 투여군에서는 저산소군보다 감소하였으나 고농도 TGF-β1 투여군에서는 증가하였다(Fig. 2B). nNOS의 발현은 정상 산소군에 비하여 저산소군에서 증가하였고, TGF-β1 투여군 모두에서 저산소군보다 감소하였다(Fig. 2C). 모두 통계학적으로 유의성을 보였다($P < 0.05$)

3. 신생 백서 뇌 조직표본의 관찰

정상 대조군(n=4, Fig. 3A, 100±5%)의 뇌 면적이 Sham 수술군(n=4, Fig. 3B, 88.8±4.4%) 보다 작았으며, 저산소 대조군(n=4, Fig. 3C, 49.7±2.5%)에서는 정상 대조군과 Sham 수술군에 비하여 더 작았다. 그리고 저산소 손상 전 TGF-β1 투여군(n=4, Fig. 3D, 77.9±3.9%)의 면적은 저산소 대조군보다 28.2±1.4% 증가하였으며 통계학적으로 유의하였다($P < 0.05$).

Table 1. Primer Pairs and Annealing Temperatures for Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR)

Name	Primer Sequence (5' -3')	Annealing
β-Actin	F:TTGCTGATCCACATCTGCTG R:GACAGGATGCAGAAGGAGAT	53
NR1	F:AAGCCCAACGCCATACAGAT R:AGGCGGGTGGCTAACTAGGA	53
NR2A	F:GCTATGGGCAGGCAGAGAAG R:GTGGTTGTCTCTGGCTCGC	58
NR2B	F:GCTACAACACCCACGAGAAGAG R:GAGAGGGTCCACGCTTTC	58
NR2C	F:AACCACACCTTCAGCAGCG R:GGTTTCTTGCCCTTGGTGAG	56
NR2D	F:CGATGGCGTCTGGAATGG R:AGATGAAAAGTGTGACGGCG	54
iNOS	F:AGGCTTGGGTCTGTAGCCTAGT R:ATTCTGTGCAGTCCCAGTGAGGAA	55
eNOS	F:GGATTCTGGCAAGACCGATTAC R:GGTGAGGACTTGTCCAAACACT	57
nNOS	F:CCTTCCGAAGCTTCTGGCAACAGC R:TGGACTCAGATCTAAGGCGGTTGG	59

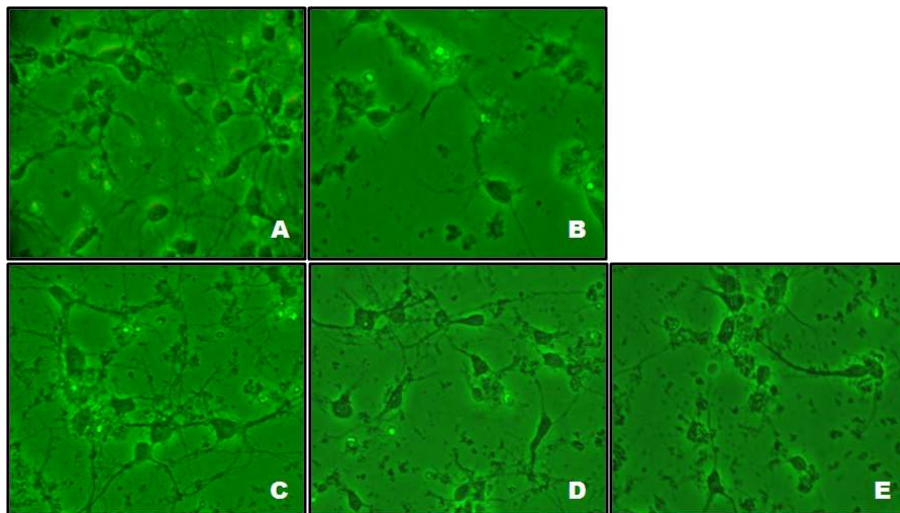


Fig. 1. High magnification (×400) photomicrographs of cultured embryonic cortical neuronal cells from 19-day-old rats (*in vitro* study). (A) Control group, (B) hypoxia group, (C) hypoxia+TGF-β1 (1 ng/mL) group, (D) hypoxia+TGF-β1 (5 ng/mL) group, and (E) hypoxia+TGF-β1 (10 ng/mL) group.

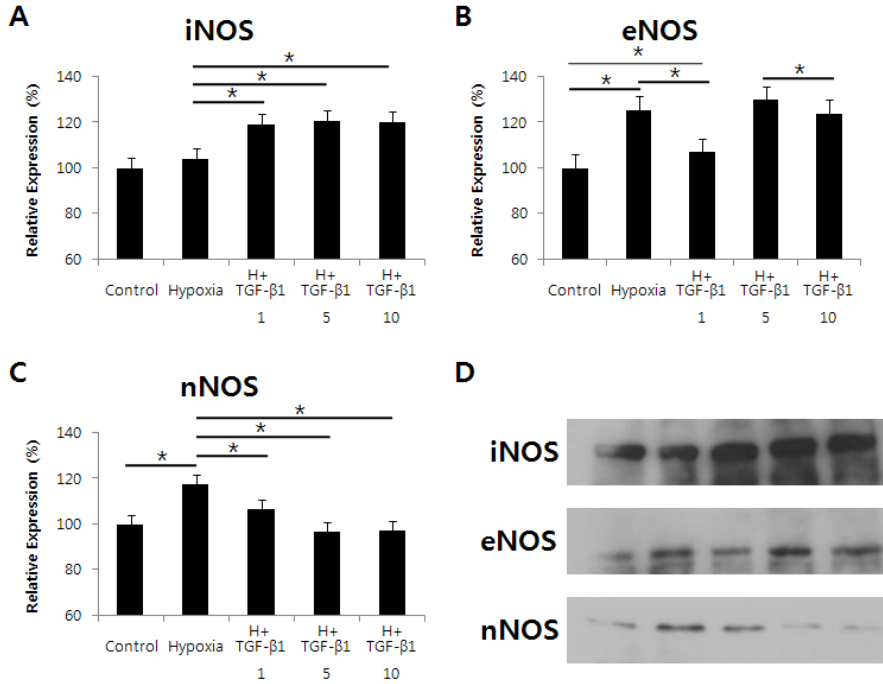


Fig. 2. Western blotting of iNOS (A), eNOS (B), nNOS (C), and band (D) from cultured cortical neuronal cells from 19-day-old rat embryos (*in vitro* study). The cells were treated with 1, 5, and 10 ng/mL of TGF-β1. Data are presented as the ratios of band intensities for the control, hypoxia, and TGF-β1-treated groups to those in the contralateral group. Abbreviations: iNOS, inducible nitric oxide synthase; eNOS, endothelial NOS; nNOS, neuronal NOS. * $P < 0.05$ versus the control.

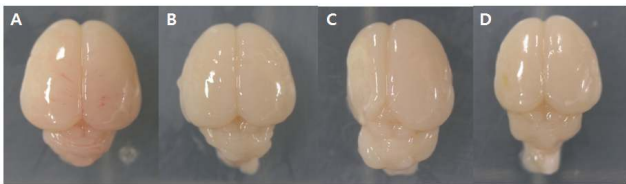


Fig. 3. Photographs of 7-day-old rat brains after hypoxic-ischemic (HI) injury. (A) Control group, (B) sham-operated group, (C) HI+vehicle group, (D) HI+TGF-β1-treated group. Brain gross area was measured with a densitometer, and was significantly increased by the treatment with TGF-β1. Abbreviations: Sham-OP, sham-operated group; HI+Vehicle, HI brain injury+ saline injection group; HI+TGF-β1, HI brain injury+ TGF-β1-treated group. * $P < 0.05$.

4. 저산소성 허혈성 뇌손상 신생 백서에서의 western blotting에 의한 iNOS, eNOS, nNOS의 발현

iNOS 발현은 저산소 대조군(n=7)에서 정상 대조군(n=5)이나 Sham 수술군(n=5)에 비하여 감소되었으나 저산소 손상 전 TGF-β1 투여군(n=7)에서는 저산소 대조군에 비하여 상대적으로 증가하였다(Fig. 4A). nNOS의 발현은 저산소 대조군에서 정상 대조군이나 Sham 수술군에 비하여 감소되었으나 저산소 손상 전 TGF-β1 투여군에서는 저산소 대조군에 비하여 미세한 증가로 보이나 통계적으로는 유의성이 없었다(Fig. 4C). 한편,

eNOS의 발현은 저산소 대조군에서 증가하고 저산소 손상 전 TGF-β1 투여군에서 감소하였다(Fig. 4B). 모두 통계학적으로 유의성을 보였다($P < 0.05$)

5. 저산소성 허혈성 뇌손상 신생 백서에서 실시간 중합효소연쇄반응에 의한 iNOS, eNOS, nNOS mRNA의 발현

iNOS mRNA 발현은 정상 대조군(n=5)과 Sham 수술군(n=5)에 비해 저산소 대조군에서 감소하였으나 저산소 손상 전 TGF-β1 투여군(n=7)에서는 저산소 대조군에 비해 상대적으로 증가하였다(Fig. 5A). 그러나 eNOS와 nNOS mRNA의 발현은 반대로 저산소 대조군에서 증가하였고 저산소 손상 전 TGF-β1 투여군에서는 감소하였다(Fig. 5B, 5C). 모두 통계학적으로 유의성을 보였다($P < 0.05$)

6. 저산소성 허혈성 뇌손상 신생 백서에서 실시간 중합효소연쇄반응을 통한 NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D mRNA의 발현

NR1, NR2A, NR2B, NR2C 및 NR2D mRNA 발현은 저산소 대조군(n=7)에서 정상 대조군(n=5)과 Sham 수술군(n=5)에 비해 모두 감소하였다. 그리고 저산소 손상 전 TGF-β1 투여군(n=7)에는 NR2C를 제외한 NR 아단위들의 발현은 저산소 대조군보

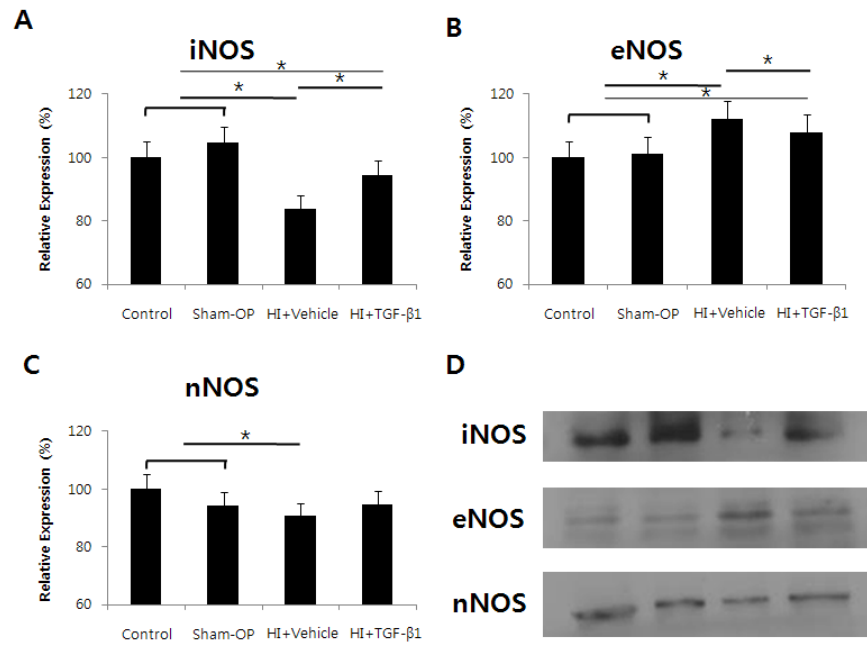


Fig. 4. Western blotting for iNOS (A), eNOS (B), nNOS (C), and band (D) at 1 week after hypoxic-ischemic (HI) injury (*in vivo* study with TGF- β 1 injection [0.5 ng/kg]). Abbreviations: Sham-OP, sham-operated group; HI+Vehicle, HI brain injury+saline injection group; HI+TGF- β 1, HI brain injury+TGF- β 1-treated group. iNOS, inducible nitric oxide synthase; eNOS, endothelial NOS; nNOS, neuronal NOS. * P <0.05.

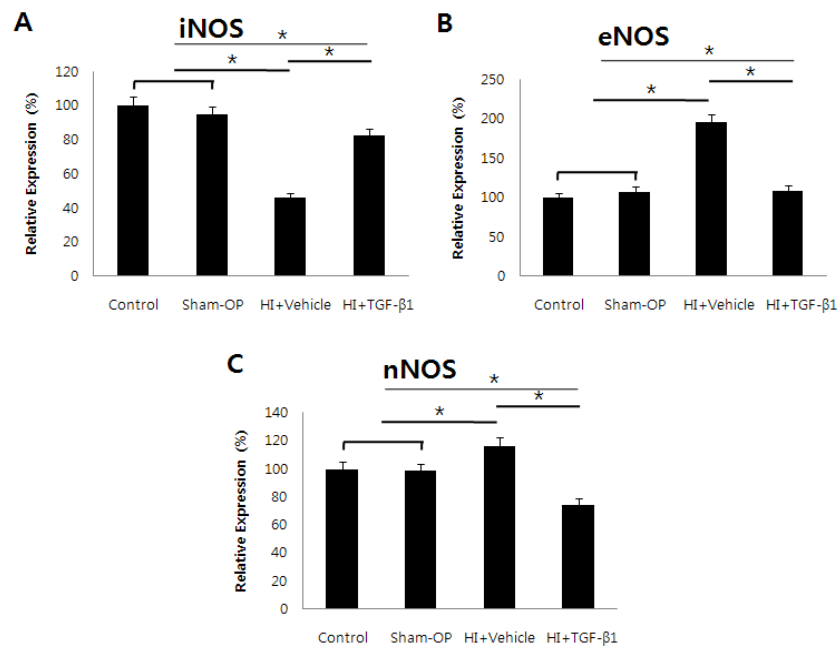


Fig. 5. Real-time polymerase chain reaction (PCR) for iNOS (A), eNOS (B), and nNOS (C) messenger ribonucleic acid (mRNA) at 7 days after hypoxic-ischemic (HI) injury (*in vivo* study with TGF- β 1 treatment [0.5 ng/kg]). Abbreviations: Sham-OP, sham-operated group; HI+Vehicle, HI brain injury+saline injection group; HI+TGF- β 1, HI brain injury+ TGF- β 1-treated group. iNOS, inducible nitric oxide synthase; eNOS, endothelial NOS; nNOS, neuronal NOS. * P <0.05.



Fig. 6. Real-time polymerase chain reaction (PCR) for NR1 (A), NR2A (B), NR2B (C), NR2C (D), and NR2D (E) messenger ribonucleic acid (mRNA) at 7 days after hypoxic-ischemic (HI) injury (*in vivo* study with TGF-β1 treatment [0.5 ng/kg]). Abbreviations : Sham-OP, sham-operated group; HI+Vehicle, HI brain injury+saline injection group; HI+TGF-β1, HI brain injury+TGF-β1-treated group NR, N-methyl-D-aspartate receptor. *P<0.05.

다 증가하였고 통계학적으로 유의성을 보였다(P<0.05) (Fig. 6).

고찰

글루탐산염 수용체의 과 항진성이 저산소 허혈 뇌증의 병태생리에 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 대부분의 글루탐산염은 중추신경계의 시냅스 앞부분의 소포에 들어 있다가 탈분극이 끝나면 다시 소포체로 돌아가 저장된다²²⁾. 그러나 저산소 상태나 허혈 상태가 되면 소포체 밖으로 방출된 글루탐산염이 다시 되돌아가지 못하고 세포밖에 축적됨으로써 흥분 독성이라 불리는 뇌세포 사멸 상태가 된다²³⁾. TGF-β1의 신경 보호효과는 칼슘항상성의 안정화와 연관이 있고²⁴⁾. NMDA에 의해 유도된 괴사를 제한하여 뇌신경보호 효과를 나타낸다²⁵⁾. 시냅스를 빠져나온 글루탐산염은 경색 주변 세포들에서도 탈분극을 연속적으로 일으키면서 뇌세포의 사멸을 더욱 조장하게 되는데 이 과정에서 NMDA 수용체를 통해 글루탐산염은 칼슘과 나트륨이온을 세포 안으로 들여보내는 역할을 하게 되고 이로 인해 세포내 저장되어있던 칼슘이 방출되고 지방을 산화시키고, 자유 유리가 방출되게 된다²⁶⁾. 이러한 NMDA

수용체로 인한 자유 유리의 생성은 칼슘으로 인한 것이거나 직접적인 NMDA 수용체로 인한 신경독성에 기인한다^{26, 27)}. 따라서 중추신경의 흥분성 시냅스에서 NMDA 수용체들이 매우 중요한 역할을 담당하고 있다²⁸⁾. 수용체는 세포안 밖의 전압의 차이에 의해 조절되고 마그네슘에 의해 차단되며 칼슘의 이동통로가 되면서 학습과 기억뿐아니라 어른과 발달과정에 있는 뇌에 주요한 시냅스의 형태로서의 기능을 담당하고 있다²⁸⁻³¹⁾. 또한 뇌손상에 따르는 퇴행성 뇌질환의 병태생리에도 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다³²⁾.

이 연구에서 우리는 TGF-β1의 흥분독성에 의한 신경보호 작용을 알아보기 위해 실시간 중합효소연쇄반응을 통해 NMDA 수용체 mRNA의 발현을 살펴보았다. 저산소군에서는 NMDA 수용체 아단위들의 mRNA 모두가 감소하였으며 TGF-β1을 투여한 군에서는 NR2C mRNA를 제외한 다른 아단위들의 mRNA가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 저산소 상태에서 NMDA 수용체의 기능적인 증가가 있음에도 불구하고 질적인 면에서 수용체 전체의 숫자는 감소한다는 것을 알 수 있다. 따라서 저산소성 허혈성 뇌손상은 시냅스 전 NMDA 수용체에는 해가 된다. 뇌손상 전에 TGF-β1를 투여한 군에서는 저산소군에 비해 전체 수용체의 숫자가 증가였다. 따라서 TGF-β1는 NMDA 수용체를 매개로 한 흥분성 신경독성을 제한하는 작용이 있을 수 있다고 생각되며 이에 대한 연관성은 추후 연구가 더 필요하다고 판단된다.

글루탐산염에 의한 신경 흥분독성에는 산화질소의 생성도 중요한 부분을 차지한다. 활성산소는 산화질소와 반응하여 신경독성을 가진 과산화아질산염(peroxynitrite)을 생성하게 된다. NOS는 칼슘 농도에 따라 자극되는데 뇌 허혈 상태에서 이 효소의 작용이 차단될 경우 허혈성 뇌손상의 범위가 상당히 줄어들게 된다. 이번 연구에서는 저산소 손상을 받은 지 7일이 지난 신생백서의 뇌조직의 관찰에서 정상 대조군에 비해 전체 뇌조직의 면적이 감소하였고, 저산소 허혈 TGF-β1 투여군에서는 뇌조직의 면적이 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있었다. 이는 TGF-β1의 신경보호 효과를 반영하는 결과라 할 수 있다.

허혈성 뇌손상 후 NOS 단백질의 변화는 3개의 서로 다른 isoenzyme 때문이다^{33, 34)}. NOS의 활성은 카인산에 의한 흥분독성에 의해 증가된다³⁵⁾. 그러나 생체내에서 흥분독성에 의한 신경퇴행에 대한 각각의 isoform의 역할이 무엇인지에 대해서는 아직까지 정확하게 알려져 있지는 않다. nNOS와 eNOS는 국소적인 칼슘/칼모듈린의 농도에 의해 발현되며 iNOS는 여러 가지 병적상태에서 뉴런, 혈관세포, 교질세포로부터 칼슘농도와 상관없이 산화질소를 생성한다. 대뇌 허혈 상태에서 산화질소는 그 생성원에 따라서 위해하거나 뇌 보호 효과도 있다³⁶⁻³⁸⁾. NOS 억제약물을 투여하거나 isoenzyme이 결여된 돌연변이 쥐 실험에서 nNOS나 iNOS로부터 생성된 산화질소는 세포독성이 있음이 밝혀졌다. 그러나 독성의 기전은 밝혀지지 않은 상태이다^{33, 34)}. 이와는 반대로 eNOS로부터 생성된 산화질소는 허혈상태에서 혈소판 응집과 백혈구의 부

작용 방해함으로써 뇌혈류를 증가시켜 뇌를 보호하는 효과가 있다³⁸⁾. 또한 eNOS로부터 생성된 산화질소는 손상된 조직내 혈관 신생효과도 있다^{36, 39)}. 혈관 내 eNOS의 생성은 국소적인 허혈 상태 시 매우 빠르게 증가하는데 허혈 손상 후의 eNOS의 생성증가 기전은 현재까지도 알려지지 않고 있다. 또 다른 연구에서는 국소적인 허혈 모델에서 nNOS의 활성의 증가가 세포독성을 조장하고 eNOS의 활성의 증가가 신경세포를 보호하는 효과가 있음이 입증되었는데³⁴⁾ 혈액 뇌장벽의 투과도에 미치는 영향 때문으로 밝혀졌다³⁸⁾. 대뇌 피질세포에 nNOS가 결여된 쥐는 NMDA와 저산소 손상을 입지 않았다⁴⁰⁾.

저자들은 실험에서, 생체 외 western blotting에서 iNOS의 발현은 정상 산소군과 저산소군 간에 차이가 없었으며, TGF-β1 투여군에서 농도와는 상관성이 없이 증가하였다. eNOS의 발현은 정상 산소군에 비하여 저산소군에서 증가하였고, 저농도 TGF-β1 투여군에서는 저산소군보다 감소하였으나 고농도 TGF-β1 투여군에서는 증가하였다. 이는 아마도 고농도의 TGF-β1 자체가 세포에 대해 독성으로 작용했을 것으로 추측된다. nNOS의 발현은 정상 산소군에 비하여 저산소군에서 증가하였고, TGF-β1 투여군 모두에서 저산소군보다 감소하였다. 생체 내 western blotting이나 실시간 증합효소연쇄반응에서 iNOS 발현은 정상 대조군에 비해 저산소 대조군에서 감소되었으나 TGF-β1 투여군에서는 상대적으로 증가하였다. 그러나 eNOS와 nNOS의 발현은 반대로 저산소 대조군에서 증가하였고 TGF-β1 투여군에서는 감소하였다. 이는 앞서 서술한 이미 보고된 논문^{8, 9)}의 NOS 결과 부분과 이번 연구 결과부분과는 차이가 있으며, 현재 NOS의 뇌 보호 효과는 여러 보고된 논문에 의하면 NOS 별로 다르게 나오고 있어 추후 연구가 더 필요하다고 생각된다.

이번 연구에서, TGF-β1은 광범위한 저산소 허혈 뇌손상으로 인한 신생 백서의 뇌세포의 손상을 막을 수 있다는 결론을 얻게 되었으며 이는 TGF-β1가 생체 외, 그리고 생체 내 실험에서 알 수 있듯이 흥분 독성과 산화질소 매개의 뇌손상으로부터 뇌세포를 보호하는 작용과 관계가 있다. 이번 연구가 저산소 허혈 뇌손상으로 인한 주산기와 신생아의 뇌세포 손상의 임상적 치료의 계발에 유용한 자료가 되리라 생각한다.

요 약

목 적 : TGF-β1는 흥분독성을 억제시키고 질소 산화물 생성 억제를 통한 신경세포 보호 효과가 있다고 알려져 있지만 주산기 저산소 허혈 뇌손상에서 그 기전은 아직도 확실히 밝혀져 있지 않고 있다. 따라서 이번 연구에서는 신생 백서의 저산소 허혈 뇌손상에서 산화질소로 인한 신경독성 및 글루탐산염에 의한 흥분 독성과 TGF-β1의 관계를 보고자 하였다.

방 법 : 생체외 실험으로 제태 기간 19일된 태아 백서의 대뇌피질 세포를 배양하여 1% O₂ 배양기에서 저산소 상태로 뇌세포손상을 유도하여 저산소군(Hypoxia), 저산소 손상 30분 전 TGF-β

1 (1, 5, 10 ng/mL) 투여군(H+TGF-β1)으로 나누어 정상 산소군(Control)과 비교하였다. 생체 내 실험은 생후 7일된 백서의 좌측 중 경동맥을 결찰한 후 저산소(7.5% O₂) 상태로 2시간 노출시켜서, 저산소 허혈 뇌손상을 유발하였다. 아무런 처치도 하지 않은 정상 대조군(Control), 경동맥 노출 후 봉합 시술만 시행한 정상 Sham 수술군(Sham-OP), 손상 30분 전 생리식염수를 주입 후 경동맥 결찰과 저산소 노출을 시행한 저산소 허혈 대조군(HI+Vehicle), 손상 30분 전 TGF-β1을 대뇌로 투여하고 경동맥 결찰과 저산소 노출을 시행한 저산소 허혈 TGF-β1 투여군(HI+TGF-β1)으로 나누어 비교분석하였다. 흥분독성과의 관련을 알아보기 위하여 NMDA 수용체 아단위를 이용하였고, 질소산화물과의 관련을 알아보기 위해 iNOS, eNOS 및 nNOS를 이용하여 western blotting과 실시간 증합효소연쇄반응을 하였다.

결 과 : 생체 외 실험에서 iNOS의 발현은 정상 산소군과 저산소군 간에 차이가 없었으며, TGF-β1 투여군에서는 발현이 증가하였으며 이는 농도와는 상관성이 없었다. eNOS, nNOS의 발현은 1 ng/mL의 TGF-β1 투여군에서 저산소군보다 감소하였다. 생체 내 실험에서는 iNOS와 iNOS mRNA의 발현은 TGF-β1 투여한 후 저산소 대조군보다 증가하였다. eNOS와 nNOS 발현은 정상 대조군 보다 저산소 대조군에서 감소하였고, eNOS의 발현은 TGF-β1 투여군에서 증가하였지만 nNOS의 발현은 증가하지 않아 통계적 유의성이 없었다. eNOS mRNA와 nNOS mRNA의 발현은 iNOS와 반대로 TGF-β1 투여군에서 저산소 대조군보다 감소하였다. NMDA 수용체 아단위 mRNA의 발현은 정상 대조군과 Sham 수술군에 비해 저산소 대조군에서 모두 감소하였으나 TGF-β1 투여군에서 NR2C를 제외한 나머지 아단위의 발현은 저산소 대조군보다 증가하였다.

결 론 : 신생백서의 저산소 허혈 뇌손상에서 TGF-β1 치료군에서 저산소로 인하여 감소된 NMDA 수용체 아단위의 발현을 증가시켜 흥분독성 기전과 관련성을 보이며, 증가된 iNOS 발현을 감소시키고 감소된 eNOS 발현을 증가시키는 질소 산화물 중재를 통한 뇌 보호 작용에 연관이 있을 것으로 생각된다.

References

- 1) Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;30:107-34.
- 2) Towfighi J, Mauger D, Vannucci R.C, Vannucci S.J. Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia ischemia: a light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res* 1997;100:149-60.
- 3) Tan S, Zhou F, Nielsen V.G, Wang Z, Gladson C.L, Parks D.A. Sustained hypoxia-ischemia results in reactive nitrogen and oxygen species production and injury in the premature fetal rabbit brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:544-53.
- 4) Vannucci R.C. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 1990;27:317-26.

- 5) Peruche B, Kriegstein J. Mechanisms of drug actions against neuronal damage caused by ischemia—an overview. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1993;17:21–70.
- 6) Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004;255:re16
- 7) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109–42.
- 8) Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:175–92.
- 9) Stagliano NE, Zhao W, Prado R, Dewanjee MK, Ginsberg MD, Dietrich WD. The effect of nitric oxide synthase inhibition on acute platelet accumulation and hemodynamic depression in a rat model of thromboembolic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:1182–90.
- 10) Massagué J. TGFβ signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 1996;85:1947–50.
- 11) Lorez H, Keller F, Ruess G, Otten U. Nerve growth factor increases in adult rat brain after hypoxic injury. *Neurosci Lett* 1989;98:339–44.
- 12) Williams C, Guan J, Miller O, Beilharz E, McNeill H, Sirimanne E, Gluckman P. The role of the growth factors IGF-1 and TGF beta 1 after hypoxic-ischemic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 1995;765:306–7.
- 13) Wiessner C, Gehrman J, Lindholm D, Tüpper R, Kreutzberg GW, Hossmann KA. Expression of transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 1993;86:439–46.
- 14) Gross CE, Bednar MM, Howard DB, Sporn MB. Transforming growth factor-beta 1 reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model. *Stroke* 1993;24:558–62.
- 15) Vivien D, Bernaudin M, Buisson A, Divoux D, MacKenzie ET, Nouvelot A. Evidence of type I and type II transforming growth factor-beta receptors in central nervous tissues: changes induced by focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 1998;70:2296–304.
- 16) Flanders KC, Ren RF, Lippa CF. Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol* 1998;54:71–85.
- 17) Chung HM, Choi EJ, Seo ES, Kim WT. The neuroprotective effect of transforming growth factor-beta1 via anti-apoptosis on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Korean J Perinatol* 2008;19:42–53.
- 18) Brewer GJ. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci Methods* 1997;71:143–55.
- 19) Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981;9:131–41.
- 20) Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol* 2000;17:113–20.
- 21) Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev* 1991;26:61–7.
- 22) Naito S, Ueda T. Adenosine triphosphate-dependent uptake of glutamate into protein I-associated synaptic vesicles. *J Biol Chem* 1983;258:696–9.
- 23) Dienel G, Hertz L. Astrocytic contributions to bioenergetics of cerebral ischemia. *Glia* 2005;50:362–88.
- 24) Prehn JH, Bindokas VP, Marcuccilli CJ, Krajewski S, Reed JC, Miller RJ. Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type beta confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12599–603.
- 25) Buisson A, Nicole O, Docagne F, Sartelet H, Mackenzie ET, Vivien D. Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *FASEB J* 1998;12:1683–91.
- 26) Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 1993;364:535–7.
- 27) Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Re. Neurosci* 1994;17:31–108.
- 28) Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31–9.
- 29) Malenka R, Nicoll RA. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 1993;16:521–7.
- 30) Nicoll RA, Malenka RC. Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1999;868:515–25.
- 31) Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996;87:1327–38.
- 32) Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992;23:1261–76.
- 33) Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997;20:132–9.
- 34) Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997;28:1283–8.
- 35) Parathath S, Parathath S, Tsirka S. Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *J Cell Sci* 2006;119:339–49.
- 36) Zollner S, Aberle S, Harvey SE, Polokoff MA, Rubanyi GM. Changes of endothelial nitric oxide synthase level and activity during endothelial cell proliferation. *Endothelium* 2000;7:169–84.
- 37) Wong D, Dorovini-Zis K, Vincent S. Cytokines, nitric oxide and CGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood brain barrier. *Exp Neurol* 2004;190:446–55.
- 38) Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, et al. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:981–7.
- 39) Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher A. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 2000;477:258–62.
- 40) Dawson V, Kizushi V, Huang P, Snyder S, Dawson T. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 1996;16:2479–87.