일시적 허혈 손상후 발생하는 성상세포의 지연성 손상에 대한 저온재관류의 효과

삼성의료원 마취과 및 삼성생명공학연구소*

김 명 희 · 신 백 호 · 이 상 은*

- Abstract -

Protective Effect of Hypothermia in Delayed Astrocyte Death after Transient Histotoxic Hypoxia in Vitro

Myung Hee Kim, M.D., Baekhyo Shin, M.D. and Sang Eun Lee, M.S.*

Department of Anesthesiology and Samsung Biomedical Research Institute*,
Samsung Medical Center, Seoul, Korea

Background: It is well known that neuronal degeneration can occur after a brief deprivation of energy source. To investigate whether glial astrocyte can induce a phenomenon of delayed cell death after transient energy loss and to see how different are the effects of nifedipine, lidocaine, carnosine and hypothermia on delayed toxicity in astrocyte.

Methods: Human astrocytoma cells(U1242MG) were used in this study. To assess the astrocyte survival during post-ischemic period after transient histotoxic hypoxia, 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5, diphenyl tetrazolium bromide(MTT) test was used. Compared to MTT test, tryphan blue test was also used to demonstrate membrane damage of affected cells. Studies on intracellular calcium dynamics during ischemic and post-ischemic period were carried out with fluo-3 and flow cytometry system.

Results: The percentage survival of astrocyte during post-ischemic period was decreasing with time. Calcium channel blocker nifedipine, sodium and calcium channel blocker lidocaine and free radical scavenger carnosine could not prevent post-ischemic cell damage. But, hypothermia was only an effective method in ameliorating post-ischemic cell death. Intracellular calcium increase during ischemia and post-ischemia was dependent on extracellular calcium influx.

Conclusions: Only hypothermia was effective in reducing astrocyte death during post-ischemia after transient energy depletion. Intracellular calcium alterations during post-ischemia was from extracellular space. (Korean J Anesthesiol 1997; 33: 422~431)

Key Words: Cells: astrocyte. Hypothermia: hypothermic reperfusion. Metabolism: glycolysis; phosphorylation

서 론

중추 신경계의 신경세포는 허혈 손상 동안보다

논문접수일: 1996년 11월 6일

*삼성생명공학연구소 임상연구비 지원, C-95-057-2

허혈 후 재관류 동안에 손상이 더 심해진다는 것은 이미 널리 알려져 있다. 허혈 또는 물리적 손상으로 영향을 받은 부위의 신경세포는 단지 5분간의 손상이라 할지라도 뒤따른 폭포상(cascade) 현상으로 재관류 동안에 비가역적 손상으로 진전이 된다고 한다¹⁾. 즉 세포손상이 즉시 일어나기 보다는 몇 시간

또는 몇일 후에 발생하게된다. 세포 손상을 의미하는 arachidonic acids의 축적이나 세포내 칼슘이온에 의존적인 효소 등이 허혈 후 60분 정도 지나서부터 증가하기 시작한다²⁾. 재미있는 현상은 이런 불리한 상황에서 성상세포는 신경세포와는 달리 역치 이하의 손상이면 허혈 부위에서 증식을 하게 된다^{3,4)}. 성상세포는 중추 신경계에 가장 많이 있는 세포이고 신경세포를 물리적으로 지지하고 있을 뿐만 아니라 신경세포를 보호하기 위한 여러 가지 기능을 가지고 있다; glutamate와 같은 중요한 신경 전달 물질을 흡수하여 신경 세포를 glutamate에 의한 독성으로부터 벗어나게 하며⁵⁾ 세포외액의 K⁺ 이온을 흡수하여 항상 K⁺치를 최소한으로 유지 하려고 하며⁶⁾ 허혈과 같은 불리한 환경에 처하게 되면 cytokines등을 분비하여 신경 세포의 회생을 꾀하고자 한다⁷⁾. 그러나 성상 세포도 역치 이상의 손상을 받게되면 세포사망의 길로 가게 된다.

저자들은 성상세포에서 해당작용(glycolysis)를 방해하는 iodoacetate와 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)을 방해하는 carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone(CCCP)를 사용하여 허혈 모델을 만들어 이들 화학적 허혈로 인한 세포 손상의 정도와 허혈 유도 동안의 저온 배양의 효과를 관찰하고 연구 결과를 보고하였다⁸⁾. 그동안 뇌신경 세포나 그의 다른 세포를 이용한 실험에서 허혈 후 재관류시의 손상 요인으로 세포내 칼슘 이온의 축적, 산소 자유전자에 의한 손상 등의 가설이 대두되었고⁹⁻¹¹⁾ 이에 다른 여러가지 약물 요법이 시행되어 있으며 특히 저온 관류의 효과에 대해서도 많은 연구가 in vivo, in vitro에서 행하여졌다^{12,13)}. 이에 본 연구의 목적은 같은 허혈 모델을 사용하여 ① 과연 성상세포에 있어서도 단지 일시적(15분간) 허혈 상태 모사 후 정상 배지 용액으로 재관류 시켰을 때 지연성 손상이 오는지, ② 만약 지연성 손상이 생긴다면, 이는 세포내 칼슘이온 축적 및 산소 자유기 생성이 원인이 되리라는 가설하에 전압 의존적 칼슘 통로 억제제인 nifedipine, 소듐/칼슘 통로를 차단하는 lidocaine, 산소 자유전자 유리를 억제하는 carnosine, 또는 저온 재관류등이 성상세포의 지연성 손상 방지에 어느 정도의 도움이 되는지 알아보려고 하는 것이다.

대상 및 방법

1) 대 상

본 실험에서는 인간의 성상종양 세포(U1242 MG)를 사용하였다. 세포의 배양에 사용되는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)은 10% bovine serum을 포함한 500 ml의 MEM에 5 ml strepto-penicillin/1 ml fungasone으로 만들어진다.

2) 실험방법

(1) 세포 생존율 측정: T-tube flask에서 융합적으로(confluent) 자란 세포를 인산염(phosphate)완충 용액으로 2번 씻은 다음 0.1% trypsin-ethylenediamine tetra-acetic acid로 트립신 처리(trypsinization) 시킨후 5×10^4 밀도로 12 wells tissue chamber에 옮겨 심는다. 세포를 옮겨 심은후 6시간이 지나면 세포는 chamber 바닥에 붙게되고 실험이 가능하게 된다. 성상 세포의 허혈을 모사하기 위해 세포의 대사를 방지하는 화학약품을 사용하여 소위 조직 중독성 저산소증(histotoxic hypoxia)을 만든다. 조직 중독성 저산소증을 유도하기 위해 해당작용을 차단하는 iodoacetate와 산화적 인산화를 차단하는 CCCP를 사용하여 세포내 에너지를 감소시킨다¹⁰⁾. 일시적 허혈 후 재관류 동안에 발생할 수 있는 지연성 손상 현상을 모사하기 위해 IAA/CCCP를 두가지 농도(0.15 mM/2 uM, 1.5 mM/20 uM)에서 각각 15분씩 처리한 후 정상 DMEM 용액으로 재관류시킨다. 재관류 후 1, 3, 6, 9시간에 세포 손상의 정도를 관찰한다. 각 시기마다 4번씩 같은 실험을 반복한다. 그다음 IAA/CCCP 1.5 mM/20 uM을 37°C에서 15분 처리한 후 재관류를 1, 3, 6, 9시간 동안 37°C에서 행해진 군과 30°C에서 행해진 군 두군으로 나누었고 각 군에서 다음 실험을 행하였다: ① 대조군으로 아무 약물 처리를 하지 않은군, ② 15분간 IAA/CCCP 처리하고 재관류를 1, 3, 6, 9시간 동안 시킨 군, ③ 재관류 동안 칼슘 통로 차단제, nifedipine 10 uM을 투여한 군, ④ 재관류 동안 소듐과 칼슘 통로를 차단하는 lidocaine 200 uM을 투여한 군, ⑤ 재관류 동안 산소 유리기 축적을 막는 carnosine 10 mM을 투여한 군, ⑥ 37°C에서 IAA/CCCP를 15분간 처리한후 재관류를 1, 3, 6, 9시간 동안 30°C에서 행한 군으로 나누었다. 그 다음

30°C 실험에서는 재관류를 30°C에서 행하면서 위의 약물들을 첨가하여 상승 효과가 있는지 알아보았다. 이 모든 과정에서 세포의 증식이나 손상의 정도는 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5, diphenyl tetrazolium bromide) assay로 측정하였다. MTT assay란 세포의 생존도를 정량적으로 측정하는데 잘 알려진 방법이다. 즉 살아있는 세포에서 여러 탈수소 효소(dehydrogenase)의 활성도를 측정하는 것이다. MTT salt의 노란 색이 살아있는 세포내에서 검푸른 색깔의 formazan 생성물을 만드는데 이는 활성 미토콘드리아내에서 tetrazolium ring이 깨어져서 생기는 것이다. 세포내의 formazan의 검푸른 색깔의 정도는 실험 판(plate) 내에 살아 남아 있는 세포의 숫자와 비례한다. MTT에 4시간 이상 배양시킨 후 배양판에 있는 완충액을 제거하고 0.5 ml DMSO로 blue formazan을 완전히 녹인 후 ELISA reader를 사용하여 504 nm에서의 흡광도를 읽는다.

(2) 세포내 칼슘량 측정: IAA/CCCP를 주입한 15분 동안이나 IAA/CCCP 제거 후 재관류 동안에 세포내 칼슘 이온의 변화를 보기 위해 칼슘 지정 형광 염색소 fluo-3(5 μ M)와 유세포 분석기(flow cytometry, Becton Dickon, Sunnyvale, CA)를 사용하였다. 유세포 분석기는 fluidic system, optic system, electronic system의 세부분으로 구성된다. 형광염색소를 자극시키기 위해 아르곤 laser를 에너지원으로 사용하며 488 nm에서 흥분(excite)하여 525 nm에서 발광(emission)하는 filter를 사용한다. Laser beam을 통과한 입자들은 산란 정도에 따라 forward scatter는 입자의 크기, side scatter는 입자의 과립형태, fluorescent는 형광의 정도를 나타낸다. 일회 측정에 적어도 10,000개 세포를 분석하고 각 세포의 pulse로부터 생기는 신호를 컴퓨터로 분석하기 위해 모두 수치화된다. 형광 염료를 세포에 착색시키기 위해 fluo-3를 정상 세포에 30분간 배양시킨다. 세포 부유액을 원심분리하여 fluo-3를 씻어내고 다시 30분 이상 칼슘을 포함한 Krebs-Henseleit 완충용액에서 부유 시킨 다음 약 10^5 /ml의 밀도로 유세포 분석기에 부착시킬 수 있는 cuvette에 옮긴다. 칼슘 측정을 위한 순서는 다음과 같았다. ① IAA/CCCP(1.5 mM/20 μ M)을 칼슘 완충용액에 넣은 후 1, 5, 10, 15분 후 유세포 분석기에서 세포내 칼슘 이온 농도를 측정하는데 한 번에 10^4 개씩의 세포내 칼슘을 측정한다. ② 재관류 동안에 세포

내 칼슘 이온의 역동에 어떤 변화가 있는지 알아보기 위해 IAA/CCCP 1.5 mM/20 μ M를 15분 처리 후, 원심 분리기로 분리하여 IAA/CCCP 부유액을 버리고 새로운 칼슘 완충용액을 넣고서 10, 30분 후에 세포내 칼슘을 읽는다. ③ 에너지 고갈시 세포의 소포체들로부터 분비되는 칼슘 이온의 정도를 알아보기 위해 이번에는 칼슘없이 EGTA 1mM 첨가한 완충 용액에 IAA/CCCP를 넣고 1, 5, 10, 15분 후에 칼슘을 측정한다. ④ 15분간 3번 실험을 한 후 원심 분리하여 IAA/CCCP 용액은 버리고 다시 칼슘 없는 완충용액을 cuvette에 넣고 세포를 잘 부유시킨 후 10, 30분 후에 세포내 칼슘을 읽는다.

각 실험군의 세포 생존율은 대조군을 기준으로 하여 백분율로 표시하였으며, 대조군과 실험군사이의 생존율의 통계학적 검정은 분산분석(ANOVA)을 이용하였고 $P < 0.05$ 를 의미있는 것으로 간주하였다. 유세포분석기를 이용한 세포내 형광의 변화도 대조군을 기준으로 하여 실험군을 백분율로 표시하였다.

결 과

1) 허혈 후 정상 세포의 증식

IAA/CCCP를 150 μ M/2 μ M로 15분간 처리하고 씻어낸후 DMEM 으로 바꾼 후 1, 3, 6, 9시간 후 세포의 생존율은 각각 $76.10 \pm 6.22\%$, $76.53 \pm 1.55\%$, $95.67 \pm 3.81\%$, $95.91 \pm 2.22\%$ 였다. 정상 배양액으로 바꾼

Fig. 1. Astrocyte proliferation during reperfusion after transient energy loss, assessed by MTT assay. The viability of cultured astrocyte was examined at 1,3,6,9 hours after treatment with IAA/CCCP 1.5mM/20 μ M for 15 minutes. The viability at 6 or 9 hours was significantly increased compared with the values at 1 or 3 hours($P < 0.05$).

후 시간이 갈수록 빠른 속도로 증식하여 6시간 후에는 대조군의 95% 정도로 증식하였다. 재관류 9시간에서의 생존율은 1, 3시간에서의 생존율에 대해 통계적으로 유의있게 증가하였고($P < 0.05$), 6시간 재관류군에서도 1, 3시간군에 비해 유의있게 증가하였다($P < 0.05$)(Fig. 1).

2) 15분간 IAA/CCCP 1.5 mM/20uM 처리한 후 재관류 동안의 정상 세포의 생존도(Table 1)

IAA/CCCP를 1.5 mM/20 uM로(1번 실험의 10배의 농도) 15분간 처리한 후 정상 DMEM으로 바꾼 후 1, 3, 6, 9시간 후 세포의 생존율은 각각 $65.71 \pm 3.95\%$, $50.24 \pm 2.35\%$, $5.14 \pm 0.44\%$, $2.79 \pm 0.23\%$ 로 6, 9시간

Table 1. Astrocyte Viability(% of control) During the Reperfusion

Treatment	1h	3h	6h	9h
Reperfusion at 37°C				
no treatment	65.71 ± 3.95	50.24 ± 2.35	5.14 ± 0.44	2.79 ± 0.23
10 μ M nifedipine	66.82 ± 2.04	51.30 ± 3.11	5.00 ± 0.35	2.31 ± 0.32
200 μ M lidocaine	65.88 ± 2.90	50.12 ± 2.91	4.19 ± 0.22	2.44 ± 0.31
10 mM carnosine	62.08 ± 1.75	36.83 ± 0.22	4.48 ± 0.17	1.78 ± 0.32
Reperfusion at 30°C				
no treatment	66.47 ± 3.18	64.20 ± 2.77	58.99 ± 1.43	43.93 ± 1.93
10 μ M nifedipine	66.38 ± 2.34	62.41 ± 2.20	52.22 ± 1.86	32.95 ± 4.04
200 μ M lidocaine	70.7 ± 31.69	62.78 ± 2.10	45.22 ± 4.48	34.17 ± 4.78
10 mM carnosine	65.73 ± 2.78	64.67 ± 1.81	49.56 ± 2.66	33.47 ± 4.20

Data are mean $\pm$ SE values of 12 culture wells

All the values of viability during reperfusion for 3, 6, 9, hours at 30°C were significantly different compared to those at 37°C($P < 0.05$), however the efficacies of applied drugs were not shown at 30°C and 37°C

Fig. 2. The effect of hypothermic reperfusion on astrocyte viability. When cells were reperfused with 20 μ M nifedipine, 200 μ M lidocaine or 10 mM carnosine at 37°C after IAA/CCCP 1.5 mM/20 uM treatment for 15 minutes, cell viability was the same as the control. However, reperfusion at 30°C was very effective in reducing astrocyte degeneration($P < 0.05$).

군에서는 세포 생존율이 급격히 감소하였다. 3시간 군은 1시간군에 비해, 6시간군은 3시간, 1시간 군에 비해, 9시간군은 3시간, 1시간군에 비해 통계적으로 유의있게 감소하였다($P < 0.05$). IAA/CCCP 150 μM /2 μM 실험에서 보이는 것과 같이 정상세포의 증식과는 반대로, IAA/CCCP 농도를 10배로 높혔을 경우 일시적 허혈 후 지연성 손상을 관찰할 수 있었고 IAA/CCCP의 이 농도에서 재관류 동안에 칼슘 이온이 세포외액으로부터 주입되는 것을 알았기 때문에(결과 3의 실험) 칼슘통로 차단제인 nifedipine 10 μM , lidocaine 200 μM 또는 산소 유리기 차단제 carnosine 10 mM을 재관류 동안 주입하였으나 재관류 동안에 세포 생존율을 증가시키지 못하였다. 그러나 IAA/CCCP로 15분 처리 후 재관류를 30°C에서 행한 경우 세포 손상이 크게 감소하였다. 30°C에서 재관류 1, 3, 6, 9 시간 동안의 세포 생존율은 다음과 같았다: $66.47 \pm 3.18\%$, $64.20 \pm 2.77\%$, $58.99 \pm 1.43\%$, $43.93 \pm 1.93\%$. 30°C에서 3, 6, 9시간 동안의 생존율은 37°C에서의 3, 6, 9시간 동안의 생존율에 비해 각각 유의있게 증가하였다($P < 0.05$)(Fig. 2). 그러나 30°C에서 재관류 동안에 다시 nifedipine, lidocaine, carnosine 등을 첨가시켜 보았으나 전혀 효과가 없었다(Fig. 3).

3) 재관류 동안의 세포내 칼슘 이온의 역동 (Table 2)

유세포 분석기에서 한 번에 10^4 개씩의 세포의 형광값 즉 칼슘 이온의 농도를 측정하였고 같은 실험을 3번 연속하여 그 평균값을 구하였다. Table 2에서 보이는 숫자는 대조군의 세포내 형광값을 100으로 임의로 지정하였을 때 실험군에서의 세포내 형광값의 상대적인 증가 또는 감소를 나타낸다. 이로써 세포내 칼슘의 증가 또는 감소를 알 수가 있는 것이다. 칼슘 완충용액에서 대조군의 값, IAA/CCCP 1.5 mM/20 μM 를 첨가한 후 1, 5, 10, 15분에 그리고 IAA/CCCP 씻어낸후 10, 30분에 측정한 세포내 칼슘값은, IAA/CCCP 처리하에서 시간이 흐름에 따라 계속 값이 올라가기 시작하여 IAA/CCCP를 씻어낸후 10, 30분에서도 칼슘값은 증가하였고, 이때의 칼슘값은 칼슘대조군 값이나 IAA/CCCP 준 후 1분 값보다는 통계적으로 유의있게 높았다($P < 0.05$). 칼슘을 제거한 완충용액에서도 IAA/CCCP 주입으로 시간이 흐름에 따라 세포내 칼슘값이 증가하였다. 이것은 외부로부터 칼슘 유입이 없기 때문에 이때의 증가된 칼슘값은 세포내 칼슘 저장고로부터의 칼슘이온의 유리에 의한 것이다. 그러나 IAA/CCCP를 제거하

Fig. 3. No additive effect of nifedipine, lidocaine, or carnosine with hypothermic reperfusion. Hypothermic reperfusion-induced amelioration in astrocyte degeneration after transient ischemic insult was not better than hypothermia alone.

Table 2. The Change of Intracellular Fluorescence(% of control) by Fluo-3

Control	LAA/CCCP			Wash out & Reperfusion		
	1 min	5 min	10 min	15 min	10 min	0 min
Ca buffer						
100	100.99 $\pm$ 1.0	105.60 $\pm$ 1.40	105.91 $\pm$ 0.87	106.5 $\pm$ 1.28	109.30 $\pm$ 1.16	104.67 $\pm$ 1.59
0 Ca buffer						
100	102.12 $\pm$ 0.86	107.96 $\pm$ 1.12	107.98 $\pm$ 1.66	107.68 $\pm$ 1.79	98.79 $\pm$ 2.29	94.58 $\pm$ 1.59

Data are mean $\pm$ SE values of 3 experiments

LAA: Iodoacetic acid, CCCP: carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone

Fig. 4. Examples of fluorescence signals. Fig. 4A indicates fluorescence signals 1) in calcium free buffer solution, 2) at 10 minutes after IAA/CCCP in calcium free buffer, and 3) at 10 minutes after washout IAA/CCCP with calcium free buffer. During the reperfusion period intracellular calcium dropped below the control level in the absence of calcium. The same experiments were conducted in the presence of calcium in 4B. Figure 4B shows that calcium entry occurs from extracellular fluid during the reperfusion period after ischemic insult in the presence of calcium.

고 칼슘없는 완충용액으로 재관류 하였을 경우, 재관류 10, 30분에서 세포내 칼슘량은 대조군값 이하로 떨어졌다($P < 0.05$). 이 실험으로 볼 때 15분간 에너지를 고갈 시킨후 재관류 시켰을 경우 세포내 칼슘 이온의 증가는 주로 세포외액의 칼슘이온의 세포내 유입에 의하는 것을 알 수 있다. Fig. 4A, 4B는 유세포 분석기에서 세포의 칼슘이온 농도에 의한 형광의 정도를 보여주는 실제 신호(signal)의 예이다. 칼슘 완충액 또는 칼슘 없는 완충액에서의 대조군과 실험군의 신호를 중복시켜 보았을 때 세포내 칼슘이온의 역동을 잘 알 수가 있다.

고 찰

뇌는 정상적인 기능을 유지하기 위해 끊임없이 산소와 탄수화물이 공급되어야 한다. 몇분간만 이들 공급이 중단되어도 신경세포는 세포 사멸의 길로 가게된다. 저산소증이나 허혈을 일으키는 뇌졸중이 인간에서 가장 흔한 뇌손상 중의 하나이다. 이러한 뇌손상을 경감 시키고 그 기전을 연구하고자 동물 실험이나 신경 조직을 이용한 실험이 많이 행해졌다. 신경 조직을 이용한 실험에서는 그러나 여러 인자,

즉 이온통로, pH, 시냅스 전달 물질등이 동시에 관여하기 때문에 자세하게 하나의 기전을 연구하기에는 배양 세포 사용이 편리하다고 하겠다. 배양 세포를 이용한 많은 실험에서 주로 신경세포를 사용하였는데 본 연구에서는 신경교 세포인 성상 세포를 이용하였다. 본 저자들의 *in vitro* 허혈 실험에서 IAA/CCCP(150 μ M/2 μ M)를 15분간 투여한후 정상 관류액으로 재관류하였을 때 재관류 첫 1시간과 3시간에는 24% 정도의 사망을 보였으나 6시간 지난 후에는 대조군의 95%까지 세포의 증식을 보였다. 아직 발표되지 않은 본인의 연구에서 보면 신경세포에서 심각한 손상을 초래하는 1 mM glutamate를 성상 세포에 주입시 24시간 후 상당히 증식하였다. 다른 저자들의 연구에도 저산소증이나 허혈 등의 병리적 상태하에서는 성상세포는 신경 세포를 보호하기 위해 interleukine 6와 같은 cytokine을 분비하고 손상 받은 신경 세포의 회복에 기여한다고한다⁷⁾. 생화학적으로 성상세포 고유의 단백질인 glial fibrillary acidic protein 이 증가하고 glutamate 대사가 증가하여 glutamine synthetase 에 양성 반응을 보이는 세포가 많아지는 등¹⁴⁾ 빠른 속도로 증식한다고 한다. 일반적으로 성상 세포는 신경세포 보다 불리한 환경에서 더 잘 견디는데⁹⁾, 이는 뇌의 에너지 대사에 있어서 성상세포가 신경세포보다 산소 이용의 비율이나 탄수화물의 이용이 크고^{15,16)} 에너지원으로 glutamate도 효과적으로 사용하고¹⁶⁾ ATP나 phosphocreatine의 양이 신경 세포보다 거의 2배 정도로 많기 때문에 손상을 주는 환경에 처하더라도 신경 세포보다 더 잘 견디는 것으로 간주된다^{17,18)}. 한편으로 이러한 성상 세포의 증식 작용은 성상세포 자체의 손상에 의존하기 보다는 손상 받은 신경세포의 정도에 의존한다는 보고도 있다¹⁹⁾. 그러나 성상 세포에 물리적 손상이나 허혈 손상이 심해져서 종창을 일으키게 되고 미토콘드리아막의 전위가 유지되지 않으면 세포 내 ATP 량도 감소하고 glutamate 흡수가 되지않아 신경세포의 손상을 더욱 악화시키게 되며 결국 성상 세포도 죽게 된다²⁰⁾. 본 연구에서는 성상세포가 손상을 극복하고 증식할 수 있는 IAA/CCCP 농도(150 μ M/2 μ M)의 10배인 IAA/CCCP 1.5 mM/20 μ M를 사용하였을 경우, 15분 후 재관류 동안에 시간이 흐름에 따라 세포 사망이 증가하였다. 즉 지연성 손상을 보여 주었다. 여기서 우리는 성상 세포에서 어떤 병리

적인 현상으로 인해 지연성 손상이 일어나는지 그 기전을 알아보고자 하였다. 그동안의 연구들을 보면 저산소증이나 허혈 손상의 초기에는 대개 세포내 에너지 량만 감소하지만 시간이 흐르면서 이온의 항상성이 장애를 받는데 특히 칼슘 이온이 세포내 축적하게 되어 세포의 지연성 손상의 기전으로 설명이 되고 있다⁹⁾. 세포내 칼슘 이온의 축적이 또한 세포내 에너지 감소를 일으킨다. Nicotera등²¹⁾과 Trump 등²²⁾에 의하면 iodoacetate에 의한 해당작용 장애나 KCN 의한 산화적 인산화 장애로 인한 ATP의 감소는 직접적으로 세포내 칼슘의 이온 축적을 가져 온다고 하였다. 성상 세포는 특별히 해당작용이 세포 기능을 유지하는데 중요한 역할을 하는데 저산소증이나 해당작용 억제제를 사용할 때 성상 세포내 ATP 량은 심하게 감소하게되고 신경세포에 악영향을 미치는 흥분성 아미노산들이 분비된다고한다. Uto등¹⁰⁾에 의하면 세포의 대사를 방해하는 iodoacetate를 5분간 투여한후 재관류 시켰을 때 6시간 후에는 대뇌 피질 신경세포가 대부분 생존해 있었으나, 24시간 후에는 거의다 사망하였다. 일시적인 허혈후에도 이화대사(catabolic pathway)를 통하여 영향을 받은 세포가 사망의 길로 가게 되는데 Uto등은 대뇌피질 또는 해마 신경세포에서의 재관류 동안의 손상기전으로 세포막을 통한 칼슘 이온 유입에 의하기 보다는 이 기간 동안에 발생한 산소 자유유리기에 의한다고 보고 하였다. Hori¹¹⁾는 성상세포를 이용하여 저산소중/reoxygenation 실험에서 성상세포가 정상 산소 공급의 환경으로 돌아왔을 때 차라리 ATP 량이 감소되고 AMP 량이 증가하였다고 보고하였다. 또한 reoxygenation시 산소 자유유리기가 증가하였고 이 산소 자유기가 성상 세포 생존에 영향을 끼치는 요인일 것이라고 하였다. 성상세포를 이용한 또다른 실험에서 산소와 탄수화물이 제거되었을 때 불포화 지방산이 30분 후에 증가하기 시작하고 arachidonic acid가 1시간 후에 증가하기 시작하였다²³⁾. Arachidonic acid가 시간이 지날수록 점점 더 많아지고 세포 외액의 칼슘이온의 존재 유무와 상관없이 증가한다고 하였다. 이는 ATP가 감소된 상태에서 세포막의 인지질 파괴가 재생이 되지않음을 시사하고 있다. 중대뇌 동맥을 절찰한 *in vivo* 실험에서도 에너지 대사나 이온의 항상성 변화 보다는 단백질 합성의 장애가 시간이 흐름에 따라 세포 사망이 증가

하는 요인이라는 보고도 있다²⁴⁾. 이들 연구를 종합해보면 허혈 손상에 관여하는 인자로 세포내 에너지 감소, 칼슘 이온의 증가, 산소자유기 발생, 지방산 축적, 단백질 합성 장애 등이다. 본 연구에서 유세포분석기를 사용하여 15분간 허혈 모사 후 재관류 동안에 정상세포의 크기에 어느정도 변화가 있는지, 어느정도 칼슘 이온의 증가가 일어나는지 알아보았다. 종창을 일으키는데 관여되는 기전으로 허혈 동안에 분비되는 glutamate가 정상세포를 탈분극시킬 뿐만 아니라 종창을 일으켜 세포사이의 공간을 감소시키는 것을 보고하였고 재관류 동안에 세포내 산성화로부터 Na^+/H^+ 교환 운반체(exchange transporter)가 활성화되어 정상세포에서 종창이 일어난다고 하였다^{25,26)}. 저자의 다른 실험에서 세포내 칼슘이온이 증가됨에 따라 세포의 크기가 줄어들을 볼 수 있었다(결과 발표 안됨). 본 실험에서 사용된 인간의 정상중양세포도 IAA/CCCP에 의한 세포내 칼슘이온의 증가가 초기에는 세포내 소포체들로부터 유리된 것이지만 IAA/CCCP를 씻어낸 후에는 세포내 칼슘 이온의 증가가 세포외액의 칼슘이온에 의존하였다. 이러한 세포외액으로부터의 칼슘이온의 세포내 유입이 본 정상세포의 손상에 관련되는지 알아보기 위해 15분 허혈 유도후 재관류시 전압 의존적 칼슘통로 차단제인 nifedipine 10 μM 을 투여하였으나 nifedipine을 투여하지 않은 세포공간에 생존율에는 전혀 차이가 없었다. 그다음은 칼슘 통로뿐만 아니라 소듐 통로도 차단하는 lidocaine 200 μM 을 시도하여 보았다. Lidocaine, a diethylamino-2,6-acetoxy-lidide는 가장 보편적으로 사용되는 국소 마취제인데, 이 물질은 말초 신경 및 중추 신경계에서의 세포막 이온통로에 대한 여러 작용으로 인해 in vivo, in vitro 허혈 연구에서 lidocaine이 탈분극을 지연시키고 세포막에서의 이온 변화를 감소시켜 세포막을 안정시키는 등의 효과에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다^{27,28)}. Nifedipine과 마찬가지로 lidocaine도 재관류 동안의 정상 세포의 손상을 막지 못하였다. 이는 본 실험에서의 재관류 동안에 발생하는 세포 사멸으로 치닫는 병리 현상에 칼슘이온 또는 소듐 이온의 유입이 주된 요인이 아니라고 생각된다. 그다음 혹시 재관류 동안에 형성된 산소 유리기가 세포 손상의 주원인인지 알아보기 위해 산소 유리기 축적을 막는 carnosine 10 mM을 투여하였다.

Carnosine은 endogenous peptide로서 우리몸의 여러 종류의 조직, 골격근, 심근 조직, 뇌 등에 많이 있는 것으로 알려졌지만 그 역할은 아직 확실히 규명되지 않았다. 지금까지의 연구에 의하면 carnosine이 antioxidant, pH buffering, immunopotentiating 한 효과가 있다고 한다²⁹⁻³¹⁾. 그러나 carnosine이 본 실험의 재관류 동안의 정상세포 손상을 방지하지는 못하였다. 본인의 진행중인 연구에 의하면 carnosine은 세포내 에너지 고갈 없이 칼슘 이온의 증가에 의한 손상을 예방하는 데는 효과가 있었다.

마지막으로 허혈후 재관류 온도를 30°C로 내린 후 그 효과를 보기로 하였다. 저체온 요법이 저산소증이나 허혈 손상으로 인한 뇌신경 손상을 감소 시키는데 대한 연구는 1950년대부터 시작되었다^{32,33)}. 뇌세포에 대한 저온 관류의 효과는 세포의 이온 항상성 유지, 칼슘 이온 세포내 유입의 억제, 세포막의 지질의 분해 억제^{34,35)} 또한 glutamate와 같은 신경 전달 물질의 분비 감소 등을 들 수 있다. 특히 세포에서 소듐 이온 농도 유지에 주된 역할을 하는 Na^+/K^+ ATPase는 특별히 온도에 예민하게 반응하고 30°C 정도에서는 Na^+/K^+ ATPase 활동성이 심하게 감소된다고 한다³⁶⁾. 허혈 유도를 단지 5분간 행한후 정상관류액으로 돌아온후 세포의 사멸이 일어나는데 저체온을 유지할 경우에는 세포 모양의 유지나 실험동물의 behavioral 검사에서도 탁월한 효과가 있었다^{37,38)}. Shuaib등³⁹⁾의 연구에 의하면 정상세포의 in vitro culture에서 허혈손상 후 lactic dehydrogenase (LDH)분비가 시간에 비례하여 증가하였으나 저온 관류 시킨 실험군에서는 LDH 분비가 현저하게 감소되었다.

뇌신경 허혈 손상을 감소시키기 위한 여러 방법들이 마취과에서도 모색되고 있는데 특히 저온 요법에 관해서는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 결론적으로, 정상 세포에서도 15분간의 허혈후 재관류 시 지연성 세포 손상이 오며 칼슘 통로, 소듐 통로 차단제 및 산소 유리기 배출을 촉진하는 carnosine 등이 효과가 없었고 30°C의 저온 재관류만이 정상세포 손상을 경감시킬 수 있다는 것을 보고한다.

참 고 문 헌

1. Choi DW, Maulucci-gedde M, Kriegstein AR: Gluta-

- mate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987; 7: 357-68.
2. Nemoto EM, Hossmann KM, Cooper HK: Post-ischemic hypermetabolism in cat brain. *Stroke* 1981; 12: 666-76.
3. Janeczko K: The proliferative response of S-100 protein positive glial cells to injury in the neonatal rat brain. *Brain Res* 1991; 564: 86-90.
4. Petito CK, Morgello S, Felix JC, Lesser ML: The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10: 850-9.
5. Berg CJ, Garfinkel D: A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochem J* 1971; 123: 211-8.
6. Nilius B, Reichenbach A: Efficient K buffering by mammalian retinal glial cells is due to cooperation of space channels. *Pflugers Arch* 1988; 411: 654-60.
7. Maeda Y, Matsumoto M, Hori O, Kuwabara K, Ogawa S, Yan SD et al: Hypoxia/Reoxygenation-mediated induction of astrocyte Interleukin: A paracrine mechanism potentially enhancing neuron survival. *J Exp Med* 1994; 2297-308.
8. 김명희, 신백효: 저온배양이 탈분극 및 대사 장애로 인한 정상세포의 손상에 미치는 영향. *대한마취과학회지* 1997; 32: 895-901.
9. Goldberg MP, Choi DW: Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neuro* 1993; 13(8): 3510-24.
10. Uto A, Dux E, Kusumoto M, Hossmann KA: Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro. *J Neurochem* 1995; 64: 2185-92.
11. Hori O, Matsumoto M, Maeda Y, Ueda H, Ohtsuki T, Stern DM et al: Metabolic and biosynthetic alterations in cultured astrocytes exposed to hypoxia/reoxygenation. *J Neurochem* 1994; 62(4): 1489-95.
12. Lanier WL: Cerebral metabolic rate and hypothermia: their relationship with ischemic neurologic injury. *J Neurosurg Anesth* 1995; 7(3): 216-21.
13. Eidelman Y, Glat PM, Pachter HL, Cabrera R, Rosenberg C: The effects of topical hypothermia and steroids on ATP levels in an in vivo liver ischemia model. *J Trauma* 1994; 37(4): 677-81.
14. Ordy JM, Wengenack TM, Bialobok P, Coleman PD, Rodier P, Baggs RB et al: Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. *Experimental Neurology* 1993; 119(1): 128-39.
15. Karibe H, Chen SF, Zarow GJ, Gafni J, Graham SH, Chan PH: Mild intraischemic hypothermia suppresses consumption of endogenous antioxidants after temporary focal ischemia in rats. *Brain Research* 1994; 649 (1-2): 12-8.
16. Hertz E, Shargool M, Hertz L: Effects of barbiturates on energy metabolism by cultured astrocytes and neurons in the presence of normal and elevated concentrations of potassium. *Neuropharmacology* 1986; 25: 533-9.
17. Choi DW: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neuroscience Lett* 1985; 58: 293-7.
18. Goldberg WJ, Kadingo RM, Barrett JN: Effects of ischemia like conditions on cultured neurons: protection by low Na, low Ca solutions. *J Neurosci* 1986; 6: 3144-51.
19. Schroeter M, Schiene K, Kraemer M, Haegemann G, Weigel H, Eysel UT: Astroglial responses in photochemically induced focal ischemia of the rat cortex. *Experimental Brain Research* 1995; 106(1): 1-6.
20. Swanson RA, Farrell K, Simon RP: Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metabolism* 1995; 15(3): 417-24.
21. Nicotera P, Thor H, Orrenius S: Cytosolic free Ca and cell killing in hepatoma 1c1c7 cells exposed to chemical anoxia. *FASEB Journal* 1989; 3(1): 59-64.
22. Trump BF, Berezsky IK, Smith MW, Phelps PC, Elliget KA: The relationship between cellular ion degradation and acute and chronic toxicity. *Toxicol Applied Pharmacol* 1989; 97(1): 6-22.
23. Murphy EJ, Haun SE, Rosenberger TA, Horrocks LA: Altered lipid metabolism in the presence and absence of extracellular Ca during combined oxygen-glucose deprivation in primary astrocyte cultures. *J Neurosci Res* 1995; 42(1): 109-16.
24. Miles G, Ishimaru S, Xie Y, Seo K, Hossmann KA: Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *Cerebral Blood Flow and Metab* 1991; 11: 753-61.
25. Chan PH, Chu L, Chen S: Effects of MK-801 on glutamate-induced swelling of astrocytes in primary cell culture. *J Neurosci Res* 1990; 25: 87-93.
26. Jakubovic DE, Grinstein S, Klip A: Cell swelling following recovery from acidification in C6 glioma cells: an in vitro model of postischemic brain edema. *Brain Research* 1987; 435: 138-46.

27. Ayad M, Verity MA, Rubinstein EH: Lidocaine delays cortical ischemic depolarization: Relationship to electrophysiologic recovery and neuropathology. *J Neurosurg Anesthesiol* 1994; 6(2): 98-110.
 28. Gelb AW: Local anesthetics in cerebral ischemia. *J Neurosurg Anesthesiol* 1989; 1: 383-6.
 29. Boldyrev AA: Does carnosine possess direct antioxidant activity? *Int J Biochem* 1993; 25: 1101-7.
 30. Harris RC, Marlin DJ, Dunnett M: Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thoroughbred horse, greyhound dog and man. *Comp Biochem Physiol* 1990; 97A: 249-51.
 31. Nagai K, Suda T: Immuno-enhancing actions of carnosine and homocarnosine. *J Physiol Soc Jap* 1986; 48: 735-40.
 32. Pontius RG, Brockman HL, Cooley DA, DeBaKey ME: The use of hypothermia in the prevention of brain damage following temporary arrest of cerebral circulation: experimental observations. *Surg Forum* 1954; 5: 224-8.
 33. Rosomoff HL: Hypothermia and cerebrovascular lesions. *AMA Arch Neurol* 1957; 78: 454-64.
 34. Norwood W, Norwood C: Influence of hypothermia on intracellular pH during anoxia. *Am J Physiol* 1982; 243: 63-5.
 35. Lantos J, Temes G, Torok B: Changes during ischemia in extracellular potassium ion concentration of the brain under nitrous oxide or hexobarbital-sodium anesthesia and moderate hypothermia. *Acta Physiol Scand* 1986; 67: 141-53.
 36. Elloy JC, Willis JS: Temperature dependence of membrane function. disparity between active potassium transport and Na/K ATPase activity. *Biochim Biophys Acta* 1976; 443: 301-5.
 37. Lanier WL: Cerebral metabolic rate and hypothermia: their relationship with ischemic neurologic injury. *J Neurosurg Anesth* 1995; 7(3): 216-21.
 38. Colbourne F, Corbett D: Delayed postischemic hypothermia: a six month survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection. *J Neurosci* 1995; 15(11): 7250-60.
 39. Shuaib A, Sochocka E, Code W, Hertz L: Hypothermia protects astrocytes during ischemia in cell culture. *Neurosci Lett* 1992; 146: 69-71.
-