백서의 중증 근무력증 모델에서 TOF 자극에 대한 근 반응의 특성과 아세틸콜린 수용체의 변화

가톨릭대학교 의과대학 마취통증의학교실

전진영 · 이해진

Changes in Acetylcholine Receptors and Functional Characterization in Muscle by TOF Stimulation in Rat Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis (EAMG) Model

Jin Young Chon, M.D., Ph.D., and Hae Jin Lee, M.D., Ph.D.

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Background: The aim of study is to investigate the initial functional changes of muscle in rats induced to have myasthenia gravis, experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG). The authors investigated the functional changes of muscle evaluated by mechanomyography (MMG) and the expression of acetylcholine receptors (AChRs).

Methods: After the institutional approval, 39 male Lewis rats were randomly allocated into study. 26 animals were immunized to induce EAMG by Torpedo AChR (T-AChR) emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA) and phosphate buffer saline (PBS)/bovine serum albumin (BSA) 0.01% at the base of tail, and received booster immunizations twice by T-AChR with incomplete Freund's adjuvant (IFA) and PBS/BSA 0.01% at all different site on the upper back. 13 animals were sham immunized as control group by the same method of EAMG except T-AChR. Clinical EAMG scores were examined. Anti T-AChR and anti rat-AChR (R-AChR) antibodies (Ab) were compared by using ^{125}I - α -bungarotoxin (^{125}I - α -BuTx) radioimmunoassay. Under the anesthesia, neuromuscular functions were monitored by MMG using single twitch (ST) and TOF. AChRs were quantitated using ^{125}I - α -BuTx.

Results: Overall weight gain and final body mass, muscle force (ST), specific muscle force of ST, TOF fade ratio and AChRs were reduced in EAMG score 3 compared to control ($P < 0.0001$). Anti T-AChR Ab and anti R-AChR Ab were increased in score 3 EAMG ($P < 0.0001$).

Conclusions: EAMG score 3 rats showed characteristic neuromuscular functions as depressed initial ST and its specific force, initial TOF fade and increased anti AChR Abs. Those above characteristics had significant correlations with the clinical EAMG scores. AChRs were significantly down-regulated according to their functional characteristics and clinical EAMG scores. (Korean J Anesthesiol 2007; 52: 310~7)

Key Words: myasthenia gravis, neuromuscular function, train of four.

서론

중증 근무력증(myasthenia gravis, MG)은 신경근 접합부

(neuromuscular junction, NMJ)의 질환 중 하나로 골격근의 약화와 피로를 보이는 항체(antibody, Ab)로 매개되는 자가면역질환이다. MG의 유병률은 1만에서 2만명당 한 명으로 보고되고 있다.¹⁾

MG에서의 항체로 매개되는 자가유전적 공격으로 인하여 NMJ에서 아세틸콜린 수용체(acetylcholine receptor, AChR)의 감소(down regulation)가 보고되어 왔다.^{2,3)}

자가면역항체는 NMJ에서 실제 기능적으로 유효한 AChR의 수를 감소시킴으로써 MG의 임상적인 중등도와 연관이 있으며, 감소된 AChR의 수로 인하여 신경근 전달(neuromuscular transmission)에 영향을 미친다.⁴⁾ 기존의 연구에 따르

논문접수일 : 2006년 10월 7일

책임저자 : 이해진, 서울시 영등포구 여의도동 62

여의도성모병원 마취통증의학과, 우편번호: 150-713

Tel: 02-3779-1691, Fax: 02-783-0368

E-mail: lehaji@catholic.ac.kr

본 연구의 일부는 2006년 가톨릭중앙의료원 동문 기금의 지원에 의한 것임.

면 질환의 중등도가 항체의 증감과 직접적으로 연관이 있다는 보고들도 있으나,^{5,6)} 연관이 없다는 보고도 있어⁷⁾ 논쟁의 여지로 남아 있다. 따라서 항아세틸콜린 수용체 항체(anti AChR Ab)의 증감이 주관적인 임상적인 MG의 중등도, 또는 그 중등도를 점수화한 임상점수와 정말 관련이 있는지가 불확실하며 이에 대한 연구가 필요하다.

MG의 진단에 사용되는 검사 중 하나가 말초신경에 연속 최대 극대 자극(repetitive supramaximal stimulation)을 가함으로써 근 반응을 관찰하는 것이다. Train-of four (TOF) 자극을 이용한 신경근 감시는 비탈분극 근이완제의 회복을 평가하기 위하여 흔히 사용되고 있다.⁸⁾ TOF fade는 근이완제를 투여한 후 회복기의 잔류 근이완을 평가하기 위한 검사 지표로 사람에서^{8,9)} 뿐만 아니라 동물실험에서도¹⁰⁾ 이용되는 지표이다. 중증 근무력증 돼지 모델을 사용한 한 실험 연구에는 TOF fade의 중앙값(median value)을 기록하였으나, 이 값과 임상점수와 연관성에 대한 언급이나 분석은 없었다.¹¹⁾

임상에서 최초 근 기능의 평가 없이 근이완제 투여 후 환자의 근 기능 감시 도중 TOF fade 값이 0.9 혹은 그 이하로 근무력(muscle weakness)을 나타냄이 관찰된 경우 신경근 차단에서의 불완전한 회복을 나타내고 있다고 판단하기 쉽다.^{8,12)} 일반 환자에서는 물론이고 MG가 진단되지 않은 MG 환자의 경우라면 더욱 판단이 어려울 수 밖에 없다. 이러한 근 기능 평가의 오해는 임상에서 진단되지 않은 MG 환자의 경우 일반적인 근이완제 용량을 사용하게 되어 상대적으로 과도하게 근이완제를 사용할 수 있다. 따라서 최초 근 기능의 평가가 중요하고 이는 전신마취 시 모든 환자에서 근이완제 사용 전부터 시행되어야 하며, TOF fade를 최초 근 기능 평가에 적용한 근 특성 평가가 필요하다고 사료된다.

저자들은 백서의 중증 근무력증 모델(experimental autoimmune myasthenia gravis [EAMG] model)을 만들어서 기계적 근 수축력 변화 측정 장치(mechanomyography, MMG)를 사용하여 단일 연축(single twitch, ST) 및 TOF 자극에 대한 근 기능을 평가하였다.

대상 및 방법

Torpedo AChR (T-AChR) 및 백서 AChR (rat AChR, R-AChR)의 추출

T-AChR의 추출은 Lindstrom 등이²⁾ 기술하였던 방법에 의하여 시행되었다. T-AChR은 Torpedo Californica (Pacific Bio-marine, Venice, CA)의 전기 기관(electrical organ)에서 α -cobratoxin (Sigma, St. Louis, USA)을 이용한 Sepharose 컬럼 색층분석(sepharose affinity chromatography column, Amersham Biosciences Co., Piscataway, USA)을 통하여 추출하였다. 100 g의 전기 기관을 10배 용적의 균질 완충액(homogenizing buffer,

0.1 M phosphate pH 7.2 with 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)을 혼합하여, 회전 균질기(rotary homogenizer)를 이용하여 약 30초씩 3번 균질화하였다. 균질화된 시료를 4°C에서 12,000 rpm으로 약 30분 동안 고속원심분리를 시행한 다음 부유층을 제외한 가라앉은 응집물(pellet)을 5배 용량의 균질 완충액과 혼합하여 같은 방법으로 재고속원심분리를 시행하였다. 2% Triton X100을 첨가한 균질 완충액을 사용하여 원심 분리된 응집물을 4°C에서 6시간 동안 지속 진동기(constant agitator) 위에서 배양 하였다. 배양 후 다시 4°C에서 60분 동안 같은 방법으로 고속 원심 분리하였고, 이후 추출된 부유층을 Whatman 굴곡성 거름종이(113V Whatman folded filter paper)로 거른 후 4°C에 보관하였다. 보관된 시료를 α -cobratoxin을 접합시킨 CNBr-activated Sepharose 4B (Amersham Biosciences Co., Piscataway, USA) 색층분석 컬럼을 이용하여 T-AChR을 접합시킨 후 분리 완충액(elution buffer, 1 M carbachol in 0.1 M phosphate pH 7.2, 0.1 mM PMSF)을 사용하여 T-AChR 포함 액을 추출하였다. T-AChR의 정량은 Schmidt와 Raftery가¹³⁾ 기술한 ¹²⁵I- α -bungarotoxin (BuTx) binding을 통한 DEAE filter assay법을 사용하였다. 추출액을 100 μ l씩 ¹²⁵I- α -BuTx (2.5–5 nM; specific activity 200–400 cpm/fmol; i.e. about 106 cpm/ml)과 상온에서 2시간 동안 배양시킨 후 Millipore vacuum apparatus 내에 준비된 DE-81 Whatman glass fiber filter에 투과시켰다. 세척 완충액(washing buffer, 10 ml of 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.1% Triton X100, PTX buffer)으로 세척시킨 후 Auto-gamma counter (Tracor Analytic, Elk Grove Village, USA)를 사용하여 T-AChR을 측정하였다. 비특이적인 결합을 예상하고 제외하기 위하여 ¹²⁵I- α -BuTx를 첨가하기 전에 모든 추출액에 지방산 동위원소 α -BuTx (cold BuTx) 1 μ M을 사용하여 충분히 포화 배양하였다. 분리된 T-AChR은 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 사용하여 순도를 측정하였으며 분리된 순수한 T-AChR을 EAMG 모델의 유발 및 in vitro 실험에서 항원으로 사용하였다. R-AChR은 정상 Lewis 백서의 근육으로부터 상기와 같은 방법으로 추출하였으며 anti R-AChR Ab를 측정하는 데 항원으로 사용하였다.

EAMG 모델 및 임상점수 측정

몸무게 100–150 g의 39마리의 수컷 Lewis 쥐(Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, USA)를 무작위로 톱밥이 깔린 사육통에 2마리씩 배치하고 물과 먹이를 자유롭게 취할 수 있도록 하였다. 동물 반입 후 실험실에서 7일간 적응기간을 두었다. 실험 첫날(day 0) 26마리를 무작위로 선택하여 halothane을 이용한 마취하에서 유제화(emulsify)시킨 50 μ g T-AChR (in CFA with 0.01% PBS/ BSA)을 백서의

Table 1. Clinical EAMG Score

AMG score	Clinical symptom
Grade 0	No muscle weakness, rat with normal posture, consisting 20–30 consecutive paw grips on steel grids as normal
Grade 1	Mildly decreased activity, weak grip or cry with fatigability, normal at rest, but after exercise weak with chin on the floor and inability to raise head, consisting of 20–30 paw grips on steel grids
Grade 2	Showed grade 1 symptom at rest
Grade 3	Severe generalized weakness, dehydrated and moribund with grade 2 symptom
Grade 4	Death

꼬리 기저부(base of the tail)에 피하 주사 하였다. 모든 실험동물은 각각 실험 28일 및 54일에 같은 방법으로 50 µg T-AChR (in IFA with 0.01% PBS/BSA)을 상지와 하지 부위와 가깝지 않은 부위를 택하여 등 윗부분의 다른 네 부위에 피하 주사함으로써 부가면역접종(booster immunization)을 시행하였다.

무작위로 선택한 13마리는 대조군으로 day 0에 T-AChR을 제외한 같은 용량의 CFA with 0.01% PBS/BSA를 같은 꼬리 기저부에 피하 주사하였으며, 실험 28일(day 28) 및 54일(day 54)에도 역시 같은 방법으로 T-AChR을 제외한 같은 용량의 IFA with 0.01% PBS/BSA를 피하 주사하였다.

모든 실험 동물은 매일 관찰되었으며, 몸무게와 EAMG 임상점수는 격일로 측정하였다.

EAMG 임상점수의 측정은 모든 실험동물을 5분 동안 평평한 격자 철망(flat grid platform)에 올려 놓은 후 5분 동안 꼬리를 밀거나 당기어 운동을 시키고, 격자 철망을 90도까지 점진적으로 기울여 가며 실험동물의 행동 반응을 관찰하여 기록하였다. 근 무력의 임상점수와 정도는 Table 1과 같았다.^{6,14)} 실험동물의 몸무게 증가값은 실험 61일(day 61)과 실험 첫날(day 0)의 측정값의 차이로 계산하였으며, 최종 몸무게는 day 61 측정값으로 하였다. 모든 동물실험은 실험실 동물 관리 및 윤리규정을 준수하여 시행되었다.

백서 혈장에서 anti AChR Ab의 측정

실험동물의 혈액은 각각 실험 42일(day 42) 및 실험 61일(day 61)에 채취하였다. 각각 T-AChR 및 R-AChR에 대한 AChR Ab를 ¹²⁵I-α-BuTx를 이용한 면역 방사선 동위 원소법(radioimmunoassay)을 사용하여 측정하였다. 본 방법은 1985년부터 Vincent와 Newsom-Davis에¹⁵⁾ 의하여 기술되고 실험되어 온 널리 사용되는 방법이다. 면역을 시행하기 전에 채취해 놓은 정상 백서의 혈장을 대조혈장으로 사용하였다. 각각의 추출해 놓은 T-AChR 및 R-AChR을 정상 백서 혈장과 ¹²⁵I-α-BuTx (2 nM; Amersham International, > 200 Ci/mmol)을 첨가하여 4°C에서 12시간 동안 흔들며 배양시킨다. 정상 백서 혈장 0.5 µl을 IgG 매개 역할로 첨가하고 면양에서 추

Table 2. Measurement of Anti-AChR Antibodies in Sera by Radioimmunoassay

	Clinical EAMG score	
	Score 0	Score 3
Anti T-AChR Ab 1 (nMol/L)	-0.169 ± 0.032	390.0 ± 5.4*
Anti T-AChR Ab 2 (nMol/L)	-0.143 ± 0.024	413.1 ± 3.6* [†]
Anti R-AChR Ab 1 (nMol/L)	-0.021 ± 0.007	17.01 ± 1.4*
Anti R-AChR Ab 2 (nMol/L)	-0.017 ± 0.007	29.7 ± 1.2* [†]

Anti T-AChR Ab and anti R-AChR Ab values in sera on the day 42 and 61 represented as 1 and 2, respectively. EAMG data shown as mean ± SEM (n = 13 in control and score 3, both). Clinical EAMG score 0: control. *: P < 0.0001 when compared with the respective values of rats with control, [†]: P < 0.001 when compared with values between day 42 and day 61 within group.

출된 anti-rat IgG (Lampire Biological Lab., Pipersville, USA)을 충분한 양을 사용하여 Ab-AChR 결합체가 침전될 수 있게 하였다. 침전물이 생긴 시료를 모두 4°C에서 13,000 rpm으로 5분간 고속 원심 분리하였다. 세척 완충액을 사용하여 각각 2번 이상 세척한 뒤 Auto-gamma counter를 사용하여 측정하였다.

측정한 값들은 침전된 AChR 측정값에서 배경 대조치 값을 제외한 후 각각 측정치대비 nMol/L로 표시하였다. 측정된 혈장의 anti AChR Abs를 day 42에서는 T-AChR Ab1과 anti R-AChR Ab1로, day 61에서는 T-AChR Ab2와 anti R-AChR Ab2로 표시하였다(Table 2).

신경근 실험 대상동물과 마취방법

EAMG를 유발했던 실험동물 가운데 임상점수 3인 13마리의 수컷 Lewis 쥐와 대조군 13마리를 대상으로 하였다. 모든 실험동물은 50 mg/kg의 pentobarbital을 복강 내 주입하여 마취를 유도하였다. 쥐의 움직임이 없어진 후 마취의 적정도는 꼬리를 검자로 자극하였을 때 반응이 없음을 가지고 확인하였다. 실험동물을 체온을 유지할 수 있도록 발열 패

드와 발열 전구 아래 위치하여 고정시키고 직장체온계를 사용하여 체온을 감시하여 37°C와 38°C 사이로 유지하였다. 기관 절개를 통하여 기관내 삽관을 하고 백서용 호흡계인 Rodent Ventilator Model 683 (Harvard Apparatus Inc., South Natick, USA)에 연결하여 50% 산소를 공기와 혼합 사용하였으며 호흡회수는 분당 70-80회, 일회 호흡량은 10 ml/kg 을 사용하여 PaCO₂를 30에서 40 mmHg 사이로 유지하였다. 우측 경정맥에 삽관하여 생리식염수를 연결하여 수분공급을 유지하였으며, 우측 경동맥에 삽관하여 침습적 맥압을 감시하고 혈액가스분석을 시행하였다. 마취 유지는 pentobarbital의 간헐적 정주로 하였으며 모든 혈액학적 지표는 정상 범위를 유지하였다.

신경근 연속반응 실험

상기 방법으로 마취 및 준비된 실험동물을 양와위로 수술대에 고정 한 후 양 하지에서 각각 경골근(tibialis muscle)을 노출시켜 경골근 기시건을 고정하고, 종지건(end of tendon)을 절단하여 봉합사를 이용하여 separate force transducer (Grass FT03, Grass Instruments Company, Quincy, USA)에 연결하여 지속적으로 근육 연속의 크기를 기록할 수 있도록 하였다.

양 하지의 좌골신경(sciatic nerve)을 요천신경총(lumbosacral plexus)의 기시부에서 나온 부위에서 노출시켜 근위부를 봉합사로 결찰한 뒤 결찰 원위부의 신경에 전극을 쌍극성으로 연결하였다. 백서의 무릎 부위를 단단한 편형 검자를 사용하여 확실히 고정한 뒤 전부하(preload, baseline tension)로 대조군에는 50 g을, EAMG score 3인 실험군에는 10 g을 적용하였다. S88 square pulse stimulator와 SIU5 stimulus isolation unit (Grass Instruments Company, Quincy, USA)을 이용하여 척골신경에 TOF 자극(0.2 msec, 2 Hz for 2 secs every 12 secs)과 최대 극대(supramaximal) ST 자극을 가하였다. 좌골신경 자극에 의하여 나타나는 간접근육 연속은 Grass P122 amplifier (Grass Instruments Company, Quincy, USA)에 의하여 증폭되고 기록되어 Grass Polyview Software를 사용하여 컴퓨터에 저장하였다. 연속 반응 실험이 끝난 후 양측 경골근을 적출하여 무게를 측정한 뒤 즉시 액체질소(isopentane precooled in liquid nitrogen)에 냉동시켜 추후 생화학적 검사를 위하여 -80°C에 냉동보관하였다. 실험이 끝난 동물은 과량의 마취제로 안락사시켰다.

ST (gram force)과 각 근육 질량에 따른 특수 ST치 (specific force of ST, gram/gram force) 및 TOF fade ratio, 즉 TOF 반응에서 첫번째 연속(T1)에 대한 네번째 연속(T4)의 비를 각각 기록하여 계산하였다.

AChR 수치 측정(Membrane AChR Assay)

근육 시료에서 AChR의 수치는 ¹²⁵I- α -BuTx를 사용하여

방사선 동위원소를 이용한 감마수치 측정법을 사용하였다.¹⁵⁾ 간단히 요약하면 4°C 환경에서 -80°C로 보관된 근육 시료를 액체 질소를 사용하여 잘게 부수어 가루로 만든 후 1분 동안 균질화 완충액(homogenized buffer, 4 volume 0.01M sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 1 mM edetic acid [EDTA], 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mg/ml bacitracin, 2 mM benzamidine hydrochloride, and 0.02% [wt/vol] sodium azide)을 사용하여 균질화한 후 4°C에서 30 분간 중력의 20,000배(12,350 rpm)로 고속 원심 분리하였다. 상기 균질화 완충액에 2% (vol/vol) Triton X-100를 첨가한 완충액을 사용하여 침전물을 다시 재부유시킨 후 1분간 균질화시켰다. 균질화된 시료를 4°C에서 12시간 동안 흔들며 배양시킨 후 같은 온도에서 45분간 중력의 30,000배(16,500 rpm)으로 고속 원심 분리시킨 후 부유액을 -80°C로 보관시켰다. 각각 -80°C에 보관된 시료를 시료마다 100 μ l씩 3번 중복되게 나누어 답아 2.5 nM ¹²⁵I- α -BuTx (specific activity 19.0 μ Ci μ g-1, DuPont NEN, Wilmington, USA) in the 2% Triton X-100 buffer를 첨가하여 상온에서 90분간 배양하였다. ¹²⁵I- α -BuTx의 비특이적 결합을 제거하기 위하여 각각 1 μ M의 cold α -BuTx를 사용하여 포화 배양하였다. Millipore vacuum apparatus 내에 0.33% polyethylenimine로 전처리하여 준비된 DE-81 Whatman glass fiber filter에 투과시킨 후 Auto-gamma counter (Tracor Analytic, Elk Grove Village, USA)를 사용하여 측정하였다. 근육 시료의 단백질 농도 측정은 Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)를 사용하였으며, AChR의 용량은 각각 femtomoles per milligrams of protein으로 기술하였다.¹⁶⁾

통계 분석

모든 자료는 평균 $\pm$ 표준오차(SEM)로 표시하였으며, 통계적 분석은 Sigma Stat 2.3 프로그램을 이용하였다. 군 간 비교는 Mann-Whitney 검정과 일원배치 분산분석으로 하였으며 시간에 따르는 군 내비교는 반복측정 분산분석으로 검증하여 의미가 있는 경우 사후검정으로 Turkey method를 통하여 비교하였고, EAMG 임상점수와와의 상관관계는 Pearson 상관관계분석을 이용하였다. 모든 분석에서 P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

EAMG를 유발한 26마리의 수컷 Lewis 쥐에서 모두 MG가 유발되었으며, 13마리는 score 3, 6마리와 7마리가 각각 score 2와 score 1으로 판정되었다. 대조군은 모두 EAMG 임상점수로 score 0로 판정되었다. EAMG 유발 실험 동안에 죽은 score 4는 없었다. 신경근실험을 실시한 EAMG score 3

군과 대조군 모두에서 혈액학적 변수는 안정되게 유지하여 평균동맥압(mmHg), 심박수(beats/min), 동맥혈 pH, 염기초과량(base excess, mM) 및 체온($^{\circ}\text{C}$)은 score 3군 및 대조군에서 각각 101 ± 12 vs. 102 ± 11 , 348 ± 30 vs. 350 ± 33 , 7.35 ± 0.2 vs. 7.39 ± 0.1 , -2.1 ± 1.2 vs. -2.2 ± 1.1 및 37.1 ± 0.2 vs. 37.3 ± 0.2 로 두 군 간에 차이가 없었다.

EAMG score 3군에서는 체중증감(g) 및 최종체중(g)이 각각 71.5 ± 2.2 및 197.0 ± 3.0 로 대조군의 263.5 ± 6.0 과 383.3 ± 7.8 에 비하여 감소하였다($P < 0.0001$)(Fig. 1). EAMG score 3 쥐와 대조군의 모습은 다음과 같았다(Fig. 2)(Table 1).

^{125}I - α -BuTx를 이용한 면역 방사선 동위 원소법으로 측정 한 anti AChR Ab 수치는 anti T-AChR Ab와 anti R-AChR Ab 모두에 있어서 day 42와 day 61 간 비교에서 대조군에서는 차이가 없었으나 score 3군에서는 증가하였으며($P < 0.001$), 군 간 비교에는 score 3군에서 대조군에 비하여 증가하였다($P < 0.0001$)(Table 2).

ST로 비교한 최대 유발 연축력 절대치(the peak absolute evoked twitch tension)와 ST값을 경골근의 무게로 나눈 특수 ST치는 EAMG score 3군에서 감소하였다($P < 0.0001$)(Table 3). TOF fade ratio도 EAMG score 3군에서 감소하였다($P < 0.0001$)(Table 3).

Fig. 1. Comparison of final body mass (A) and weight gain (B) between EAMG score 3 and control. There were significantly decreased weight gain and final body mass in EAMG score 3 compared to control. Values are mean $\pm$ SEM ($n = 13$, each). Clinical EAMG score 0: control. *: $P < 0.0001$ versus control.

Fig. 2. Representative findings of rat with clinical EAMG score 3 (A) and 0 (B). The rat with EAMG score 0 shows active movement and normal posture without muscle weakness after 20–30 consecutive paw grips on steel grids. The rat with EAMG score 3 shows severe generalized weakness, markedly decreased activity, weak grip or cry with fatigability, and weak with chin down on the floor and inability to raise head at rest.

Table 3. Characteristics of Muscle Forces

	Clinical EAMG score	
	Score 0	Score 3
Muscle force, ST (gm)	323.9 ± 8.2	66.8 ± 3.3*
Specific muscle force of ST (gm/gm)	523.9 ± 8.7	225.2 ± 11.9*
TOF fade ratio	0.998 ± 0.001	0.752 ± 0.007*

EAMG data shown as mean ± SEM (n = 13 in control and score 3, both). ST: single twitch response. Clinical EAMG score 0: control. *: P < 0.0001 when compared with the respective values of rats with control, score 0.

¹²⁵I- α -BuTx을 사용하여 방사선 동위원소를 이용한 감마 수치 측정법으로 측정한 AChR의 수치(AChR count)는 EAMG score 3 및 대조군에서 각각 7.94 ± 0.29 , 29.42 ± 0.73 으로 EAMG score 3군에서 감소하였다(P < 0.0001).

EAMG 임상점수들과 체중증감, 최종체중, ST, 특수 ST치, TOF fade, anti T-AChR Ab 1, anti T-AChR Ab 2, anti R-AChR Ab1, anti R-AChR Ab 2 및 AChR count를 상관관계분석을 통한 결과 모두에서 r값이 각각 -0.97, -0.96, -0.95, -0.95, -0.96, 0.91, 0.92, 0.88, 0.97 및 -0.92로 좋은 상관관계가 있었다(P < 0.001).

고 찰

생쥐(mice)의 EAMG 모델에서는 MG의 중증도를 밝히는 데 어려움이 있고 최초의 근 기능과 임상점수와는 연관관계가 불확실하다.⁷⁾ 면역학적 방법으로 유발시킨 EAMG에서 근 무력의 정도인 임상점수와 항체의 발현 정도를 연관시킴에 있어서도 그 결과가 다양하게 알려져 왔다.⁵⁻⁷⁾

본 연구에서의 EAMG 모델은 anti T-AChR Ab뿐만 아니라 anti R-AChR Ab도 day 61에 현저히 증가하였다(Table 2). 이 결과로 본 EAMG모델에서 적용한 면역학적 유발 방법이 백서에서 EAMG를 유발시키는 데 유효하였다. 최근의 면역학적으로 MG이 잘 발생하는 계보(strain)의 생쥐 EAMG 모델을 이용한 연구에서도 T-AChR 주사 후 50일에 anti AChR IgG Ab가 현저히 높아졌으며,⁶⁾ 이는 본 실험에서 day 61에 anti T-AChR Ab가 증가된 결과와 비슷하였다.

생쥐의 EAMG 모델에 비하여 쥐의 모델은 T-AChR의 주사 후 더욱 전형적인 근 무력을 나타내는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ Lewis 쥐를 이용한 EAMG 모델이 사람의 MG에 대한 면역병리학적 연구와 치료방법 연구에 널리 이용되는 이유 중 하나도 이러한 근 무력 증상의 발현이 확실하기

때문이다.¹⁷⁾

그러나 백서의 EAMG 모델은 그 질환의 정도가 성별, 나이 및 계보에 따라 다르게 발현된다는 보고도 있다.¹⁸⁻²⁰⁾ 따라서 본 연구에서는 모두 수컷 Lewis 쥐를 사용하였는데 이는 암컷 쥐에서 발생할 가능성이 있는 난소 주기와 생리의 영향을²¹⁾ 배제시키기 위함이었다. 본 연구에서는 EAMG를 유도한 모든 쥐에서 MG가 발생하였다. 본 연구에서의 질환의 중증도가 이전에 보고된 연구들과 차이를 보인다면 이는 보조면역 피하주사의 횟수와 주사시기, T-AChR의 용량과 유화하여 주사된 보조매개체, 다른 주사 부위의 위치 등 면역학적 유도 방법의 차이와 면역을 유발할 당시의 쥐의 연령에 따른 차이점으로 생각된다. 따라서 본 실험에서 저자들이 사용한 방법이 Lewis 쥐를 이용한 EAMG 모델로서 질환의 중증도를 나타내는 가장 좋은 모델이었으며 향후 이와 같은 연구에 도움을 줄 수 있을 것이다.

TOF 자극 방법은 말초신경자극 방법 중에서 마취의 혹은 근 이완제를 사용하는 의사에게 가장 친숙하고 널리 사용되는 방법이다. ST도 신경근 전도를 감시하는 데 많이 쓰이는 말초신경자극 방법이나 항상 대조 연축을 측정해야 하며 그 진폭의 정도를 잘 결정해야 한다. TOF 자극은 대조치를 따로 측정할 필요가 없으며, fade를 관찰하여 분석하기가 용이하며, 근전도(electromyography, EMG), 기계적 근수축력 변화 측정 장치(mechanomyography, MMG), 유발전기반응 근수축력 측정장치(evoked electrical measurement myography, EEMG), 근수축력 가속도 변화 측정 장치(acceleromyography, AMG) 또는 성문근전도(phonomyography, PMG)^{22,23)} 등의 신경근 전달 감시장치를 사용 기록하여 분석할 수 있다. 본 연구에서는 기계적 근수축력 변화 측정장치를 사용하였다.

일반적으로 TOF fade ratio가 0.9 이하에서 근 무력이 나타날 수 있고,¹²⁾ 0.9 이상에서는 수술 후 충분히 신경근 전달이 회복되어 기도 내관을 탈관해도 됨을 나타내는 지표로 사용되므로⁸⁾ 임상에서 낮은 값의 TOF fade ratio를 관찰한 경우에는 근이완제 투여 후 회복이 완전히 이루어지지 않은 상태로 오해할 우려가 있다. Kopman 등은²⁴⁾ 마취 회복기의 연구에서 TOF fade와 ST depression 간에 양성 상관관계가 있지만 그 상관관계수 값이 $r^2 = 0.89$ 로 크게 높지는 않다고 보고하였다. 또한 임상에서 지원자를 통한 실험에서 잔류 근이완의 증상이나 징후가 TOF fade와 직접적인 연관을 찾기는 어렵기 때문에⁸⁾ 현재까지 어떠한 연구에서도 TOF fade를 초기 근 기능의 정도를 판별하기 위한 척도로 생각하지 않았다.

본 실험에서 초기 TOF fade는 EAMG score 3와 대조군에서 각각 0.75 ± 0.02 , 1.0 ± 0.01 로서 대조군에 비하여 EAMG score 3군이 25% 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 돼지를 이용한 EAMG 모델에서 보고한 44% 감소와는 차이

를 보인다.¹¹⁾ 이는 종 간의 차이나 실험 개체수에 따른 제약과 AChR의 수치 차이에 기인한 것으로 생각된다. AChR 수치의 감소는 EAMG에서 76-81% 감소되었다고 하였으며,¹¹⁾ 본 연구에서는 EAMG score 3군에서 73% 수용체 감소를 나타내었다.

근 기능의 실험은 지배되는 신경과 함께 적출된 근에서도 연구되었는데 EAMG 쥐에서 일부는 근이완제의 투여 전에는 최초 근 기능의 명백한 감소를 보이고 있지 않았다.²⁵⁾ EAMG 모델에서의 근 수축력의 감소는 실험동물의 하지가 아닌 상지의 적출된 일부 근육에서 연구되었다.²⁶⁾ 적출된 근육으로 시행한 실험은 in vitro 실험으로 in vivo 실험과는 그 결과가 같을 수 없다. 본 실험은 적출하지 않은 생리적인 상태에서 수행되어 최초 근 기능의 감소가 더 명확하였다. 특수 ST치는 신경근 실험 시 최대 유발 연축력 절대치로 구한 ST값을 연축이 적용되는 해당 근의 무게로 나눈 값으로 적용된 근육의 질량에 따라 달라질 수 있는 차이를 배제시키기 위한 계산 값이다. 본 연구에서는 EAMG score 3군에서 대조군에 비하여 최초 ST 뿐만 아니라 특수 ST치도 감소하였는데($P < 0.0001$, Table 3) 이는 근 질량 차이를 배제한 근 자체의 수축력이 감소되었음을 나타내는 결과이다.

Satyamurti 등은²⁷⁾ 정상 Lewis 쥐에 α -cobratoxin을 근주하고 중첩신경자극(repetitive nerve stimulation)을 사용하여 최초 근 수축력의 감소를 보고하면서 일종의 MG에 가까운 모델로 사용할 수 있다 하였으나, 이들의 모델은 진정한 EAMG 모델이 아니며 실험동물 자체가 근무력을 보이는 것과는 다르므로 본 실험의 결과와는 직접 비교할 수 없다고 생각된다. 생쥐의 EAMG 모델을 사용하여 근육 자체에 직접 자극을 가함으로써 최초 근 수축력 감소를 보고한 연구도 있었으나,²⁸⁾ 역시 직접적인 근육 내 자극과 완전한 신경근 모델과는 다른 방법이라 할 수 있다.

실제 사람에서는 MG환자의 약 80%에서 AChR에 대한 항체가 검출되나 그 역가가 매우 다양하여 임상 질환의 중등도와는 상관관계가 명확치 않다.²⁹⁻³¹⁾ 본 연구에서 사용한 EAMG의 임상점수는 근육의 기능적 수치들과 상관관계가 높았으며 임상점수를 나타내는 측정방법이 미국 MG재단의 의학적 조언(Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America, MGFA)의 내용을 포함하였다.³²⁾

본 실험의 결과로 보아 수컷 Lewis 쥐를 사용한 EAMG 모델에서 임상점수가 증가함에 따라 항체가 증가하였다. 본 연구 모델에서 신경근 기능의 특징은 최초 ST과 특수 ST치의 감소 및 TOF fade로 요약된다. 이러한 신경근 기능의 특징이 EAMG모델의 임상점수와 상관관계가 잘 이루어졌으며, 임상점수가 높은 경우에 anti T-AChR Ab와 anti R-

AChR Ab의 수치가 높았다.

임상에서 환자의 최초 근 기능을 평가할 때에 특히 MG환자와 같이 신경근 접합부 질환이 있는 환자의 경우 더욱 주의를 기울여야 하며 흔히 접할 수 있는 말초 신경 자극기의 자극 양상을 이용한 본 연구의 결과가 수술실 및 중환자실뿐만 아니라 신경근 감시장치가 있는 곳에서 유용한 지표로 적용할 수 있을 것으로 사료된다. 임상에서 실제 MG환자의 경우 anti AChR Ab가 검출되지 않는 경우 anti MuSK Ab (antibody to muscle-specific tyrosine kinase)가 최근에 검출되었다.³³⁾ 그러나 이 anti MuSK Ab가 MG를 야기하는지는 아직 명확히 알려져 있지 않다. 본 실험에서는 anti MuSK Ab를 측정하지 않아서, 이 항체가 anti AChR Ab와 함께 혹은 각각 작용하여 EAMG 모델에서 어떤 영향을 미치며 임상점수와 상관관계가 있는지는 알 수 없었다. 향후 이러한 항체에 관련된 연구가 더 이루어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Vincent A, Palace J, Hilton-Jones D: Myasthenia gravis. *Lancet* 2001; 357: 2122-8.
2. Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD: Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology* 1976; 26: 1054-9.
3. Toyka KV, Drachman DB, Griffin DE, Pestronk A, Winkelstein JA, Fishbeck KH, et al: Myasthenia gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N Engl J Med* 1977; 296: 125-31.
4. Drachman DB, Adams RN, Josifek LF, Self SG: Functional activities of autoantibodies to acetylcholine receptors and the clinical severity of myasthenia gravis: *N Engl J Med* 1982; 307: 769-75.
5. Deng C, Wu B, Yang H, Hussain RZ, Lovett-Racke AE, Christadoss P, et al: Decreased expression of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 reduces T cell activation threshold but not the severity of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2003; 138: 76-82.
6. Tuzun E, Scott BG, Yang H, Wu B, Goluszko E, Guigneaux M, et al: Circulating immune complexes augment severity of antibody-mediated myasthenia gravis in hypogammaglobulinemic RIIS/J mice. *J Immunol* 2004; 172: 5743-52.
7. Lobito AA, Yang B, Lopes MF, Miagkov A, Adams RN, Palardy GR, et al: T cell receptor transgenic mice recognizing the immunodominant epitope of the Torpedo californica acetylcholine receptor. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2055-67.
8. Kopman AF, Yee PS, Neuman GG: Relationship of the train-of-four fade ratio to clinical signs and symptoms of residual paralysis in awake volunteers. *Anesthesiology* 1997; 86: 765-71.
9. Kim SY, Lee JS, Kim SC, Park W: Twitch augmentation and train-of-four fade during onset of neuromuscular block after subclinical doses of suxamethonium. *Br J Anaesth* 1997; 79: 379-81.

10. Kim KS, Jeon JW, Koh MS, Shim JH, Cho SY, Suh JK: The duration of immobilization causes the changing pharmacodynamics of mivacurium and rocuronium in rabbits. *Anesth Analg* 2003; 96: 438-42.
11. De Haes A, Proost JH, De Baets MH, Stassen MH, Houwertjes MC, Wierda JM: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of rocuronium in case of a decreased number of acetylcholine receptors: a study in myasthenic pigs. *Anesthesiology* 2003; 98: 133-42.
12. Eriksson LI, Sundman E, Olsson R, Nilsson L, Witt H, Ekberg O, et al: Functional assessment of the pharynx at rest and during swallowing in partially paralyzed humans: simultaneous videomanometry and mechanomyography of awake human volunteers. *Anesthesiology* 1997; 87: 1035-43.
13. Schmidt J, Raftery MA: A simple assay for the study of solubilized acetylcholine receptors. *Anal Biochem* 1973; 52: 349-54.
14. Wu B, Goluszko E, Christadoss P: Experimental autoimmune myasthenia gravis in the mouse. In: *Current protocols of immunology*. Edited by Coligan JE: New York, John Wiley and Sons. 1997, pp 15.8.1-16.
15. Vincent A, Newsom-Davis J: Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985; 48: 1246-52.
16. Ward JM, Martyn JA: Burn injury-induced nicotinic acetylcholine receptor changes on muscle membrane. *Muscle Nerve* 1993; 16: 348-54.
17. Link H, Xiao BG: Rat models as tool to develop new immunotherapies. *Immunol Rev* 2001; 184: 117-28.
18. Duan RS, Link H, Xiao BG: Dehydroepiandrosterone therapy ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis in Lewis rats. *J Clin Immunol* 2003; 23: 100-6.
19. Saoudi A, Bernard I, Hoedemaekers A, Cautain B, Martinez K, Druet P, et al: Experimental autoimmune myasthenia gravis may occur in the context of a polarized Th1- or Th2-type immune response in rats. *J Immunol* 1999; 162: 7189-97.
20. Hoedemaekers A, Graus Y, van Breda Vriesman P, de Baets M: Age- and sex-related resistance to chronic experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) in Brown Norway rats. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 189-97.
21. Tate CA, Holtz RW: Gender and fat metabolism during exercise: a review. *Can J Appl Physiol* 1998; 23: 570-82.
22. Hemmerling TM, Michaud G, Trager G, Deschamps S, Babin D, Donati F: Phonomyography and mechanomyography can be used interchangeably to measure neuromuscular block at the adductor pollicis muscle. *Anesth Analg* 2004; 98: 377-81.
23. Hemmerling TM, Donati F, Babin D, Beaulieu P: Duration of control stimulation does not affect onset and offset of neuromuscular blockade at the corrugator supercilii muscle measured with phonomyography or acceleromyography. *Can J Anaesth* 2002; 49: 913-7.
24. Kopman AF, Klewicka MM, Neuman GG: The relationship between acceleromyographic train-of-four fade and single twitch depression. *Anesthesiology* 2002; 96: 583-7.
25. Thompson PA, Barohn RA, Krolick KA: Repetitive nerve stimulation vs. twitch tension in rats with EAMG. *Muscle Nerve* 1992; 15: 94-100.
26. Olsberg CA, Maxwell LC, Mikiten TM, Krolick KA: Analysis of contractile properties of muscles from rats immunized with purified acetylcholine receptor. *J Neuroimmunol* 1987; 14: 253-66.
27. Satyamurti S, Drachman DB, Slone F: Blockade of acetylcholine receptors: a model of myasthenia gravis. *Science* 1975; 187: 955-7.
28. Pachner AR, Kantor FS: Nerve stimulation test in murine experimental autoimmune myasthenia gravis. *Ann Neurol* 1982; 11: 48-52.
29. Drachman DB: Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 1978; 298: 136-42.
30. Martyn JA, White DA, Gronert GA, Jaffe RS, Ward JM: Up-and-down regulation of skeletal muscle acetylcholine receptors. Effects on neuromuscular blockers. *Anesthesiology* 1992; 76: 822-43.
31. Vincent A: Neuroimmunology of myasthenia gravis. *Brain Behav Immun* 1988; 2: 346-51.
32. Bedlack RS, Simel DL, Bosworth H, Samsa G, Tucker-Lipscomb B, Sanders DB: Quantitative myasthenia gravis score: assessment of responsiveness and longitudinal validity. *Neurology* 2005; 64: 1968-70.
33. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A: Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001; 7: 365-8.