백서의 소뇌 Purkinje 신경세포의 in vitro 허혈성 손상에 대한 Vasopressin의 효과

서울대학교 의과대학 마취통증의학교실, *보라매병원 마취통증의학과

전윤석 · 이수영 · 이지원 · 길남수* · 임영진 · 김용철 · 이상철

Effect of vasopressin on survival of Purkinje neurons in rat cerebellar slices after an in vitro simulated ischemia

Yun-Seok Jeon, Soo Young Lee, Jiwon Lee, Nam Su Gil*, Young Jin Lim, Yong Chul Kim, and Sang Chul Lee

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, College of Medicine, Seoul National University,

*Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Boramae Municipal Hospital, Seoul, Korea

Background: Arginine vasopressin (AVP) is frequently used in patients under the risk of brain injury. It has been shown to induce brain injury after ischemia and reperfusion in in vivo animal models. We determined the effect of vasopressin on the brain injury after ischemia-reperfusion using in vitro model.

Methods: Cerebellar brain slices were prepared from adult Sprague-Dawley rats. They were then subjected to simulated ischemia (oxygen-glucose deprivation) for 20 min in the absence (control) or presence of vasopressin (5, 10, 50, 100, 500 pg/ml). After being recovered in oxygenated artificial cerebrospinal fluid for 5 h, they were fixed for morphologic examination to determine the percentage of live Purkinje cells.

Results: There were no differences in the survival rate of Purkinje cells among the control and vasopressin groups.

Conclusions: Vasopressin at concentrations studied has no direct effect on brain ischemia-reperfusion injury. (Korean J Anesthesiol 2009; 56: 181~5)

Key Words: Brain, Ischemia, Rat, Vasopressin.

서 론

흔히 항이뇨 호르몬(antidiuretic hormone)으로 알려진 vasopressin은 항이뇨 작용 외에도 심혈관계 항상성 유지 등과 같은 다양한 기능을 지니고 있어 임상에서 여러 치료 목적으로 사용되고 있다 [1]. 특히 vasopressin의 혈관수축 작용은 기존에 사용되고 있었던 카테콜아민 계통 혈관수축제와 달리 V1, V2 수용체를 통하여 나타나기에 카테콜아민 저항성 혈관확장 저혈압 발생시 혈관수축제로 사용할 수 있는 장점이 있다 [1].

미국심장협회의 심폐소생술 권고안에서는 성인의 심실세

동으로 인한 심폐소생술 시 vasopressin을 epinephrine 대신 사용할 수 있다고 제안하였다 [2]. Surviving Sepsis Campaign 권고안에서도 충분한 수액요법과 고용량의 기존의 승압제에 충분히 반응하지 않는 혈관확장성 속 환자에게 vasopressin을 분당 0.04 units이하로 투여하는 것을 고려할 수 있다고 하였다 [3].

Vasopressin은 이와 같이 뇌손상의 위험이 높은 속과 심정지 등의 상황에서 빈번하게 사용되고 있지만 vasopressin 약제가 뇌손상에 미치는 영향에 대한 연구는 부족하다. 기존의 관련 연구들은 주로 생체 내 상태(in vivo)에서 진행되었으며 그 결과가 일관적이지 않았다 [4-6]. 하지만 생체 내 실험은 vasopressin의 허혈 손상에 대한 간접적인 영향을 배제하기 어렵다. 이런 간접적 영향으로는 뇌 관류압 상승 작용에 의한 허혈 손상 감소를 예상할 수 있고 [7] 반대로는 신장 작용으로 부종 증가에 의한 뇌손상 악화를 생각해 볼 수 있다 [8,9]. 따라서 기존 생체 내 연구 결과들도 이러한 간접적인 영향에 의한 결과일 가능성이 높다.

이에 저자들은 vasopressin이 뇌조직의 허혈-재관류 손상

Received: August 13, 2008.

Accepted: November 19, 2008.

Corresponding author: Young Jin Lim, M.D., Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Seoul National University Hospital, 101, Daehang-no, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea. Tel: 82-2-2072-3539, Fax: 82-2-747-5639, E-mail: limyj@snu.ac.kr

Copyright © Korean Society of Anesthesiologists, 2009

에 미치는 직접적인 영향을 확인하기 위하여 백서의 소뇌 절편을 이용한 시험관내(in vitro) 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

소뇌절편 준비

기존 연구에서 [10,11] 기술된 바와 같이 2-3개월령 250-300 g 수컷 백서(Sprague-Dawley)의 소뇌절편을 실험에 사용하였다. 백서를 직경 15 cm, 길이 30 cm의 플라스틱 통에 넣고 100% 산소와 함께 5% isoflurane을 분당 4 L의 속도로 유입하여 마취를 유도한 후 단두하여 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌에서 소뇌를 신속하게 분리하여 5% CO₂-95% O₂로 포화시킨 4°C 인공뇌척수액(116 mM NaCl, 26.2 mM NaHCO₃, 5.4 mM KCL, 1.8 mM CaCl₂, 0.9 mM MgCl₂, 0.9 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM glucose, pH 7.4)에 보관한 후 4°C 상태에서 조직절편기(tissue slicer)를 이용하여 400 μ m 두께의 소뇌절편으로 박절하였다. 시냅스 기능의 회복을 위해 준비된 소뇌절편을 산소로 포화된 37°C 인공뇌척수액에 1시간 동안 보관한 후 본 실험에 사용하였다(Fig. 1) [12].

허혈과 재관류

소뇌절편의 허혈은 포도당과 산소를 제거한(oxygen glucose deprivation, OGD) 37°C 인공뇌척수액을 이용하여 20분간 실시하였다. OGD 인공뇌척수액은 포도당을 포함하지 않은 인공뇌척수액을 30분간 95% N₂-5% CO₂로 포화시킨 후 산소 제거제로 1 mM dithionite (Sigma Chemical, St. Louis, USA)를 첨가하여 준비하였다 [10-12]. 뇌척수액의 산소 분압은 Clark 산소 전극(Cameron Instrument CO., Port Arnsax, USA)을 이용하여 측정하였으며 0.1 mmHg 이하가 되도록 하였다.

실험은 대조군과 vasopressin군, OGD군으로 나누어 진행하였으며, 대조군을 제외한 vasopressin군과 OGD군에서 20

분간의 허혈을 시행하였다. Vasopressin군의 경우에는 OGD 인공뇌척수액에 vasopressin (Sigma Chemical, St. Louis, USA)을 5, 10, 50, 100, 500 pg/mL의 농도로 혼합하였다. 20분간 허혈 유도 후 소뇌절편들을 산소 포화된 37°C 인공뇌척수액에 5시간 동안 보관한 후 조직학적 검사를 시행하였다.

조직학적 검사

조직학적 검사를 위하여 소뇌절편을 4°C에서 4% 중성(pH 7.4) 포르말린액에 24시간 고정한 후 통상적인 조직표본 제작법에 따라 탈수, 투명, 침투의 과정을 거친 후 파라핀 포매(embedding)하였다. 소뇌절편 박절시 발생하였을 손상 부위를 피하기 위해 소뇌절편 내부(바깥 쪽으로부터 약 120 μ m 내부)에서 파라핀 블록을 5 μ m 두께로 박절한 후 hematoxylin과 eosin 염색(H&E)을 실시하였다. 조직학적 검사는 광학현미경으로 염색 조직이 어떤 군에 속하는지 알지 못하는 연구자가 판독하였다.

분자층(molecular layer)과 과립층(granular layer) 가운데 위치하는 Purkinje 세포를 확인하여 형태학적으로 생존 세포와 죽은 세포를 측정하였다. 생존율은 전체 세포 중에서 생존 세포의 비율로 산정하였다. 정상 세포와 세포부종(cell swelling), 공포화(vacuolization), 새까맣게 주름진 핵(shrunken and darkened nuclei)이 있는 경우는 생존 세포로 판정하였다 [13]. 세포분절(cell fragmentation)이 있는 경우 신경세포가 죽은 것으로 판정하였다(Fig. 2). 각 절편에 존재하는 모든 Purkinje 세포의 수를 세었으며 각 실험당 최소한 2개의 절편을 검사하였다(300-500 Purkinje 세포).

통계

9-14마리 소뇌절편에서 각 실험을 반복하였으며, 결과는 중간값[interquartile range (range)]으로 표시하였다. 통계 분석은 Kruskal-Wallis test를 사용하였으며 P 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

Fig. 1. Study flow diagram. aCSF: artificial CSF, (A) control group, (B) oxygen-glucose deprivation group, (C) vasopressin group, H&E staining: hematoxylin and eosin staining.

Fig. 2. Brain slices under control (A) and oxygen-glucose deprivation (20 minutes, B) are shown. Black and white arrows indicate live and dead Purkinje cells, respectively.

결 과

20분간의 OGD 허혈 후 Purkinje 세포의 생존율이 유의하게 감소하였다(Fig. 3). OGD군의 Purkinje 세포 생존율은 67.3% [54.6–77.6% (46.7–83.3%)]로 허혈을 시행하지 않은 대조군의 Purkinje 세포 생존율 84.9% [82.9–91.0% (77.0–93.3%)]에 비하여 유의하게 낮았다($P < 0.005$).

허혈 기간중 투여한 vasopressin은 Purkinje 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았으며, 실험에 사용한 모든 농도(0, 5, 10, 50, 100, 500 pg/ml)에서 동일하였다. Vasopressin군은 5, 10, 50, 500 pg/ml 농도에서 모두 대조군과는 유의한 차이가 있었지만($P < 0.05$) OGD군과는 모두 차이가 없었다. Vasopressin 군들 전체의 총 생존율은 72.9% [68.1–78.3% (38.1–84.8%)]였다.

고 찰

본 연구에서 백서의 소뇌 절편에서 산소-포도당 제거를 이용한 허혈과 재관류는 Purkinje 세포에 허혈성 손상을 유발하였으며 vasopressin은 이러한 시험관내 허혈-재관류 손상에 영향이 없었다.

Vasopressin은 1954년에 최초로 합성이 가능해진 이후 주로 항이뇨 목적이나 식도 정맥류 출혈의 지혈 목적으로 사용되어 왔으나, 고용량 사용 시 과도한 혈관 수축으로 인한 심부전과 사망 등의 합병증 가능성으로 인해 광범위한 사용이 제한되었다 [14]. 1997년 Landry 등은 [15] 고용량의 카테콜아민에 잘 반응하지 않는 혈관확장성 속 환자들에서 vasopressin이 적은 용량으로도 강력한 효과를 보였다는 증

Fig. 3. Effect of vasopressin on ischemia-reperfusion injury in rat cerebellar slices. Survival rate of Purkinje cells are presented. OGD: oxygen-glucose deprivation group. * $P < 0.05$ compared with control. Data are shown as box and whisker plots: the box boundaries show the 25th to 75th percentiles; a thick line within the box indicates the median; whiskers above and below the box indicate the 10th to 90th percentiles; and dots represent outliers.

례들을 최초로 발표하였다. 이후 관련 연구들이 보고되면서 다양한 혈관 확장성 속 상황에서 vasopressin이 널리 사용되기 시작하였다. 그러나 주요 장기에 미치는 영향이나 대규모 전향적인 연구의 부족은 여전히 문제점으로 지적되고 있다 [16].

Vasopressin은 임상 상황에 따라 다양한 혈중 농도를 보이게 된다. 일상적인 환경에서는 혈중농도가 4 pg/ml 이하로 유지되지만 [17] 개에게 속을 유도한 경우 500 pg/ml까지 상승하고 [18] 속 환자에게 vasopressin을 0.04–0.1 U/min으

로 지속 정주한 경우에는 100–150 pg/ml의 농도에 도달하게 된다 [19,20]. 그러므로 본 연구에서 5–500 pg/ml로 vasopressin 농도를 설정하여 실험한 것은 대부분 임상 상황에서의 농도를 반영한다고 할 수 있다.

기존의 생체 내 동물 연구들에서 vasopressin의 길항제는 뇌보호 효과를 나타내었다. Dickinson 등의 연구에서는 [21] 중뇌동맥 폐쇄에 의한 국소 허혈 실험에서 vasopressin 결핍 쥐는 뇌부종이 유의하게 감소되었다. 이러한 vasopressin의 허혈성 손상에 따르는 뇌부종과의 관련성은 다른 연구들의 결과들과 일치하는 것이다 [22,23]. Vasopressin의 길항제를 이용한 연구들에서도 유사한 결과가 보고되었는데 동일한 백서의 중뇌동맥 폐쇄를 이용한 국소 허혈 모델에서 V1 혹은 V2 수용체의 길항제 투여는 뇌경색 면적, 뇌부종 정도와 신경학적 검사 등 해부학적과 기능적인 면에서 모두 유의한 보호 효과를 보여 주었다 [4,6].

Vasopressin 유사제인 desmopressin의 경우 임상에서 투여 후 뇌경색이 발생하였다는 보고들이 있었으며 [24,25] 이러한 증례들의 가능한 기전으로는 vasopressin에 의한 뇌혈관 수축 [26] 이나 혈소판 활성화 [27] 등을 들 수 있다. 그 외에도 vasopressin은 기억 작용에 관여하는 등 [28-30] 뇌에서 다양한 작용을 가지고 있는데 Hori 등의 연구에서는 [5] 일시적인 뇌허혈 후 vasopressin 유사제를 투여하였을 때 공간 기억 능력의 저하를 감소시켰다고 하였다.

이와 같이 vasopressin에 의한 뇌기능과 뇌허혈과의 관련성이 제기되어 왔지만 의외로 그 직접적인 영향에 대한 연구는 보고된 바가 없다. 본 연구에서 시험관내 실험에 의해 vasopressin이 뇌허혈에 직접적인 영향이 없다는 사실을 증명하였으며 이는 기존의 vasopressin 관련 연구 결과들이 부종, 혈관 수축, 혈소판 활성화 등에 의한 간접적인 영향에 의하여 주로 결정되었다는 것을 시사한다.

결론적으로 vasopressin은 백서의 소뇌 절편을 이용한 시험관내 허혈-재관류 손상에 영향을 미치지 않았으며, 이는 vasopressin이 뇌조직의 허혈-재관류 손상에 직접적인 영향이 없다는 것을 시사한다.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by a grant from Seoul National University Hospital (04-2005-0550).

REFERENCES

- Holmes CL, Patel BM, Russell JA, Walley KR. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest* 2001; 120: 989-1002.
- American Heart Association in Collaboration with the International Liaison Committee on Resuscitation. Guidelines 2000 for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care: part 6: advanced cardiovascular life support: section 6: pharmacology, II: agents to optimized cardiac output and blood pressure. *Circulation* 2000; 102(Suppl 8): I 129-35.
- Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med* 2008; 34: 17-60.
- Vakili A, Kataoka H, Plesnila N. Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 1012-9.
- Hori E, Uwano T, Tamura R, Miyake N, Nishijo H, Ono T. Effects of a novel arginine-vasopressin derivative, NC-1900, on the spatial memory impairment of rats with transient forebrain ischemia. *Brain Res Cogn Brain Res* 2002; 13: 1-15.
- Shuaib A, Xu Wang C, Yang T, Noor R. Effects of nonpeptide V(1) vasopressin receptor antagonist SR-49059 on infarction volume and recovery of function in a focal embolic stroke model. *Stroke* 2002; 33: 3033-7.
- Liard JF, Deriaz O, Schelling P, Thibonnier M. Cardiac output distribution during vasopressin infusion or dehydration in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1982; 243: H 663-9.
- Franchini KG, Cowley AW Jr. Renal cortical and medullary blood flow responses during water restriction: role of vasopressin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1996; 270: R 1257-64.
- Edwards RM, Trizna W, Kinter LB. Renal microvascular effects of vasopressin and vasopressin antagonists. *Am J Physiol Renal Physiol* 1989; 256: F 274-8.
- Zheng S, Zuo Z. Isoflurane decreases AMPA-induced dark cell degeneration and edematous damage of Purkinje cell death in an in vitro model of rat cerebellar ischemia. *Neuroscience* 2003; 118: 99-106.
- Lim YJ, Zheng S, Zuo Z. Morphine preconditions Purkinje cells against cell death under in vitro simulated ischemia-reperfusion conditions. *Anesthesiology* 2004; 100: 562-8.
- Popovic R, Liniger R, Bickler PE. Anesthetics and mild hypothermia similarly prevent hippocampal neuron death in an in vitro model of cerebral ischemia. *Anesthesiology* 2000; 92: 1343-9.
- Bak IJ, Misgeld U, Weiler M, Morgan E. The preservation of nerve cells in rat neostriatal slices maintained in vitro: a morphological study. *Brain Res* 1980; 197: 341-53.
- Kleemann PP, Jantzen JP, Dick W. Undesirable effects following the local injection of ornipressin during general anesthesia: can the risk be lessened? A prospective study. *Anaesthesist* 1988; 37: 551-7.
- Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Seo S, D'Alessandro D, Oz MC, et al. Vasopressin pressor hypersensitivity in vasodilatory septic shock. *Crit Care Med* 1997; 25: 1279-82.
- Macfie A. Con: vasopressin is not the vasoconstrictor of choice after cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2002; 16: 776-9.

17. Cowley AW Jr, Cushman WC, Quillen EW Jr, Skelton MM, Langford HG. Vasopressin elevation in essential hypertension and increased responsiveness to sodium intake. *Hypertension* 1981; 3: I 93-100.
18. Wilson MF, Brackett DJ, Tompkins P, Benjamin B, Archer LT, Hinshaw LB. Elevated plasma vasopressin concentrations during endotoxin and E. coli shock. *Adv Shock Res* 1981; 6: 15-26.
19. Kam PC, Williams S, Yoong FF. Vasopressin and terlipressin: pharmacology and its clinical relevance. *Anaesthesia* 2004; 59: 993-1001.
20. Argenzano M, Choudhri AF, Oz MC, Rose EA, Smith CR, Landry DW. A prospective randomized trial of arginine vasopressin in the treatment of vasodilatory shock after left ventricular assist device placement. *Circulation* 1997; 96: 286-90.
21. Dickinson LD, Betz AL. Attenuated development of ischemic brain edema in vasopressin-deficient rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992; 12: 681-90.
22. Doczi T, Laszlo FA, Szerdahelyi P, Joo F. Involvement of vasopressin in brain edema formation. *Neurosurgery* 1984; 14: 436-41.
23. Pearlmutter AF, Szkrybalo M, Kim Y, Harik SI. Arginine vasopressin receptors in pig cerebral microvessels, cerebral cortex and hippocampus. *Neurosci Lett* 1988; 87: 121-6.
24. Byrnes JJ, Larcada a, Moake JL. Thrombosis following desmopressin for uremic bleeding. *Am J Hematol* 1988; 28: 63-5.
25. Grunwald Z, Sather SD. Intraoperative cerebral infarction after desmopressin administration in infant with end-stage renal disease. *Lancet* 1995; 27; 345: 1364-5.
26. Katori E, Ohta T, Nakazato Y, Ito S. Vasopressin-induced contraction in the rat basilar artery in vitro. *Eur J Pharmacol* 2001; 23; 416: 113-21.
27. Pedersen OS, Reichelt KL. The effect of arginine vasopressin, lysine vasopressin or oxytocin on ADP or arginine vasopressin-induced Ca^{2+} increase in human platelets. *Clin Physiol* 1999; 19: 305-10.
28. Bohus B, Urban I, van Wimersma Greidanus TB, de Wied D. Opposite effects of oxytocin and vasopressin on avoidance behaviour and hippocampal theta rhythm in the rat. *Neuropharmacology* 1978; 17: 239-47.
29. van Wimersma Greidanus TB, de Wied D. Modulation of passive-avoidance behavior of rats by intracerebroventricular administration of antivasopressin serum. *Behav Biol* 1976; 18: 325-33.
30. Leshner AI, Hofstein R, Samuel D, van Wimersma Greidanus TB. Intraventricular injection of antivasopressin serum blocks learned helplessness in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1978; 9: 889-92.