

성숙 Gerbil의 일과성 전뇌 허혈모델에서 해마의 지연성 신경세포 손상에 대한 Calcitriol의 영향

박혜진 · 구혜수 · 한운섭 · 최경규

이화여자대학교 의과대학 병리학교실
신경과

접 수 : 2003년 6월 30일
게재승인 : 2003년 10월 6일

책임저자 : 구 혜 수
우 158-710 서울시 양천구 목6동 911-1
이화여자대학교 의과대학 병리학교실
전화: 02-2650-5732
Fax: 02-2653-8891
E-mail: heasoo@ewha.ac.kr

*이 연구결과는 2002년 미국 신경과학학회 (Society for Neuroscience) 제32차 회의에서 발표하였음.

Effects of Calcitriol on Delayed Neuronal Damage of Hippocampus in Transient Global Ischemia Model of Mature Gerbil

Hye-Jin Park, Heasoo Koo, Woon Sup Han and Kyung Kyu Choi¹

Departments of Pathology and ¹Neurology, Ewha Womans University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : It is well documented that calcium ions perform a major role in neuronal degeneration in cerebrovascular disease and the other degenerative diseases, and that 1,25-dihydroxyvitamin D3 (D3) has the dose-dependent protective effects. This study was performed to examine the effects of different D3 dosages against delayed neuronal damage of the hippocampus. **Methods** : Mature mongolian gerbils were injected with either 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (group 2) for 5 days or 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ for 8 days (group 3) prior to the 10 min ligation of the bilateral common carotid arteries. Immunohistochemical expression for the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), the basic fibroblast growth factor (bFGF) and the platelet-derived neurotrophic factor (PDNF) was observed in the D3-injected (0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ for 5 days) group. **Results** : Group 2 showed a highly significant attenuation of delayed neuronal damage in the lateral CA1 region at 7 days after reperfusion. Group 3 showed unilateral or bilateral hemispheric infarcts 24 h after the onset of reperfusion. The D3-injected group showed a markedly increased bFGF expression level. **Conclusion** : The dose-dependent effect of D3 suggests the importance of determining the appropriate D3 dose for clinical applications. Although the mechanism(s) of neuroprotection by D3 remains unclear, D3 may facilitate a reduction in ischemia-induced oxidative stress via the activation of the neurotrophic factors, including bFGF and GDNF.

Key Words : Calcitriol-Cerebrovascular Disorders-Hypoxic-Ischemic Brain Injury

허혈성 뇌손상은 심각한 마비증상이나 사망을 초래하는 비가역적이고 치명적인 질환으로, 2000년 통계청발표에 의하면 사망 원인 103항목 중 1위로 14.1%를 차지하였다. 허혈성 뇌손상은 혈관이 막혀서 발생하는 국소 병변과 중추신경계로 가는 혈류가 전반적으로 감소되어 발생하는 전뇌 허혈성 병변으로 구분한다. 허혈성 뇌손상에서 발생하는 세포 손상은 허혈의 정도와 다른 여러 가지 요소에 따라서 선택적인 신경세포괴사(selective neuronal necrosis) 혹은 모든 조직의 괴사인 경색(infarct)의 형태로 나타난다. 신경세포는 한번 파괴되면 재생이 불가능한 영구세포이므로, 신경세포의 손상을 억제하는 것은 허혈성 뇌손상에 따른 후유증을 예방하는 데 매우 중요한 의미를 갖는다. 따라서 허혈성 뇌병변에서 신경세포의 손상이 발생하는 기전을

밝혀내어 그 발생과정을 억제함으로써 신경세포 손상을 방지하기 위한 시도가 계속되고 있다. 허혈성 뇌병변에서 세포 손상에 관여하는 기전은 병변의 발생 기전 및 병변 발생 부위에 따라 차이가 있다. Gerbil의 해마에서 볼 수 있는 지연성 신경세포 손상(delayed neuronal damage 혹은 maturation phenomenon)은 5분 내지 10분간의 일과성 전뇌 허혈 후 재관류시키는 경우에 수 시간에서 수 일에 걸쳐 서서히 진행되는 선택적 신경세포 괴사 소견으로, 치서류의 해마에서 처음 관찰되었다. 해마의 subiculum-CA1 부위의 추체세포는 선택적 취약성과 지연성 신경세포 손상이 가장 먼저 발생하고 가장 심한 변화를 보이는 부위이다.¹⁻³ 사람의 허혈성 뇌병변에서도 비슷한 현상이 관찰되므로 지연성 신경세포 손상에 관여하는 요소를 정확하게 파악하는

것이 환자의 치료와 예후의 판정에 중요한 역할을 할 것으로 생각한다. 또한 신경세포의 변성이 이와 같이 천천히 진행되는 것은 허혈 후 일정 기간 동안 신경세포의 괴사가 진행되지 않는 것을 의미하므로, 그 기간을 “therapeutic window”로 사용하여 지연성 신경세포 손상을 억제할 수 있는 가능성이 있다. 이런 지연성 신경세포 손상기전에는 허혈 후 신경세포의 활동 및 예민성 증가, 미토콘드리아에 있는 호흡효소의 손상, 칼슘과 글루탐산의 증가, 세포내 산화질소와 자유 라디칼의 증가, 세포자멸사의 증가 등이 관여하는 것으로 알려졌다.⁴⁻¹⁰ 허혈 및 저산소성 병변에서 다양한 종류의 성장인자와 신경향성 물질이 증가되는 것이 보고되었고, 이들이 신경세포 손상을 억제시키는 보호 효과가 있는 것으로 알려짐에 따라 이런 물질을 이용하여 국소 허혈 혹은 전뇌 허혈성 병변을 감소시키려는 노력이 활발하게 진행되어 왔다.¹¹⁻¹⁶ 지연성 신경세포 손상을 일으킨 실험동물 모델에서도 nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), acidic and basic fibroblast growth factors (FGF), ciliary neurotrophic factors, platelet-derived growth factor (PDGF) 등의 물질이 신경세포 손상을 감소시킨다고 보고되었다.¹⁷⁻²² 그러나 이런 물질은 대부분 분자량이 크고 뇌혈관장벽을 통과하지 못하므로 국소 투여하든지 조직이식을 해야 하는 어려움이 있었다. 1,25-dihydroxy-vitamin D3 (1,25(OH)2D3) (이하 D3)는 비타민 D가 생물학적으로 활성화된 대사산물이며, 말초조직에서 칼슘 이온을 포함한 무기질의 조절, 세포의 성장과 분화, 호르몬의 분비에 관여하는 스테로이드 호르몬이다.^{23,24} 또한 D3는 세포 내의 비타민 D 수용체와 결합하여 ligand-activated 전사인자로 작용한다.²⁵ 중추신경계에서 D3는 미세교세포(microglia)에서 합성되며, D3 수용체는 소뇌, 간뇌, 대뇌피질, 척수, 변연계(limbic system)와 같은 부위에 광범위하게 분포한다.^{25,26} D3를 장기간 피하 투여하면 해마 CA1 부위에서 노화에 의한 세포 손상이 억제되는 것이 보고되었고, 파킨슨병에서 D3의 양이 감소되고, 비타민 D로 치료하면 환자의 증상이 없어진다는 보고가 있으며, 해마와 중뇌 신경세포배양에서 D3가 글루탐산과 반응성 산소종에 의한 신경세포의 손상을 억제하는 것도 알려졌다.²⁷ 또한 D3는 아교세포(glial cell)에 작용하여 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), NGF, transforming growth factor (TGF)- β 2, neurotrophin (NT)3/NT4 등의 각종 신경향성 물질의 분비를 강력하게 유도한다.^{28,29} Wang 등²⁹은 D3를 복강 내로 투여하는 경우 대뇌에서 GDNF의 발현이 현저히 증가하며, 중대뇌동맥의 결찰에 의해 발생한 경색이 감소하는 것을 보고하였다. 본 연구는 복강 내로 투여된 D3가 해마의 추체세포에서 발생하는 지연성 신경세포 손상의 진행에서 어떤 변화를 일으키는지를 보기 위하여 시행되었다. 또한 D3에 의한 혈중 칼슘의 농도 변화를 측정하였고, 뇌조직에서 GDNF, bFGF, PDGF 발현의 변화를 면역조직화학염색을 이용하여 관찰하였다.

재료와 방법

연구 대상

본 연구에서는 57마리의 mongolian gerbil (*Meriones Unguic-tilaus*)을 생후 80일에서 100일 사이에(체중: 50-70 gm) 암수 구분 없이 사용하였고, 사육기간 중 음식과 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 총 57마리 중 44마리는 양측 총경동맥결찰 실험군으로 사용하였고, 13마리는 혈중 칼슘농도 측정 실험군으로 사용하였다.

연구 방법

실험동물 분류

일과성 허혈을 유발시킨 실험 동물을 세 군으로 나누었다 (Table 1). 제1군(n=18)은 대조군으로 5일간 연속하여 식염수 (154 mM NaCl, Sigma, 1 mL/kg/day)를 복강 내로 주사하였다. 제5일에 양측 총경동맥을 10분간 결찰한 후 재관류시켰고, 재관류 시작 후 제1일, 제3일, 제7일에 조직검사를 시행하였다. 제2군(n=19)은 양측 총경동맥 결찰 4일전부터 시작하여 5일간 연속하여 D3 (Calcitriol, Abbott lab)를 0.8 μ g/kg/day (2 μ g/mL \times 0.4 mL/kg/day)의 농도로 복강 내 주사 투여를 하였고, 제5일에 양측 총경동맥을 10분간 결찰한 후 재관류시켰다. 제2군 역시 재관류 시작 후 제1일, 제3일, 제7일에 조직검사를 시행하였다. 제3군(n=7)은 D3를 동맥결찰 7일 전부터 8일간 연속하여 복강 내로 주사하였는데, 주입된 D3의 양은 1.0 μ g/kg/day (2 μ g/mL \times 0.5 mL/kg/day)이었다. 제8일에 양측 총경동맥을 10분간 결찰한 후 재관류시켰고, 재관류 시작 후 24시간 췌에 조직검사를 시행하였다.

말초혈액 채취와 혈중 칼슘농도 측정법

혈중 칼슘농도는 D3 0.8 μ g/kg/day (2 μ g/mL \times 0.4 mL/kg/day)를 5일간 복강 내로 투여한 실험군(n=6)과 식염수를 5일간 투여한 대조군(n=7)에서 측정하였다. 관류고정 전에 심장천자를 통하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 원심분리기

Table 1. Number of animals used in experimental ischemic groups

group	treatment	days following bilateral CCA ligation		
		1	3	7
1 (n=18)	saline (1 mL/kg/day) 5 days	5	5	8
2 (n=19)	D3 (0.8 μ g/kg/day) 5 days	6	6	7
3 (n=7)	D3 (1.0 μ g/kg/day) 8 days	7		

CCA, common carotid artery.

를 사용하여 3,000 rpm의 속도로 10분간 두 번 돌려서 혈청을 분리하였다. 분유한 혈청은 -20°C 냉장고에 냉동보관하였다.

혈청 칼슘농도는 화학분석기를 사용하여 측정하였다. 칼슘이온과 ortho-Cresolphthalein complex one의 반응에 의한 생성물의 흡수도를 Hitachi 7150 (Japan)으로 판독하여 칼슘치를 측정하였다. 혈청 내 자유 칼슘이온은 ion selective electrode (Easylyte Calcium, Medica, USA) 및 Na/K/Ca/PH analyzer solution pack (Medica, USA)을 사용하였다. 각 실험 결과를 Wilcoxon 2-sample test로 통계 처리하였다.

전뇌 허혈의 유도

Gerbil의 마취는 ketamine (10 mg/mL)을 복강 내(0.09 mg/kg)로 주입하였고, 뇌세포의 허혈성 변성에 영향을 미칠 수 있는 체온을 보정하기 위하여 마취 직후부터 시술 후 깨어날 때까지 30분 이상 온도계 소식자(Fruke 52K/J thermocouple, Fruke Inc., USA)를 직각 내에 삽입하고 온열전등(heat lamp)으로 심부체온을 $36-37^{\circ}\text{C}$ 사이로 유지시켰다.

양측 전뇌 허혈을 유도하기 위하여 gerbil을 양와위로 고정시키고 경부 정중선을 따라 수직으로 1.5 cm 정도 피부를 절개하였다. 양측 총경동맥에서 주변의 결체조직과 미주신경을 박리한 후 동맥류용 클립(Surgita aneurysmal clip, temporary STD type, Mizuko Ikakoryo Inc., Japan)을 사용하여 혈류를 동시에 10분간 차단하였다. 10분 후 클립을 제거하고, 재관류로 인한 혈관박동이 일어나는 것을 확인하였다.

조직소견 관찰방법

예정된 시간에 ketamine을 복강 내로 주입하여 마취시킨 후 앞가슴을 열고 심장을 거쳐 상행대동맥에 24게이지 케놀러를 삽입한 후 절찰하였다. 먼저 0.1% heparin을 포함한 생리식염수를 2분간 관류시켜 뇌혈관계에서 혈액을 제거한 후, 고정액(0.1 M phosphate buffered, 4% paraformaldehyde solution)을 130 cmH₂O의 압력으로 30분간 관류시켜 뇌를 고정하였다. 관류고정이 끝난 gerbil을 단두하여 두개골을 제거하고 뇌를 꺼내어 4% 중성 포르마린에 하루 이상 고정시킨 후 2 mm 두께로 관찰 절단하였으며, 이들 조직 절편에서 제3뇌실과 해마의 원하는 부위가 포함되었는지를 육안으로 확인하였다. 이후 통상적인 조직처리과정을 거쳐 5 μm 내지 6 μm 의 두께로 연속 절단 표본을 제작하고, 헤마톡실린-에오진 염색으로 해마 추체세포의 변화를 관찰하였다.

신경향성 물질에 대한 면역조직검사

혈중 칼슘농도를 측정하기 위해서 D3 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (2 $\mu\text{g}/\text{mL} \times 0.4 \text{ mL}/\text{kg}/\text{day}$)를 5일간 투여한 실험군(n=6)과 식염수를 5일간 투여한 대조군(n=7)에서 면역조직화학검사를 시행하였다. 신경향성 물질 중에서 GDNF, bFGF, PDNF에 대한 항체를 사용하여 D3의 복강내 투여가 뇌조직의 신경향성 물질

의 발현에 변화를 일으키는지를 관찰하였다.

면역조직화학검사는 Hsu 및 Raine (1984)의 방법을 변형한 peroxidase-antiperoxidase법을 사용하였다. 간단히 기술하면 탈과라핀한 5 μm 절편을 일차 항체인 GDNF (1:50; polyclonal, sc-328, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), bFGF (1:80; polyclonal, Santa Cruz Biotechnology), PDGF (1:50; polyclonal, Santa Cruz Biotechnology)와 90분간 반응시킨 후 LSAB kit (DAKO, Santa Barbara, CA, USA)를 사용하여 peroxidase-antiperoxidase complex와 반응시켰다. Peroxidase 반응은 연결항체와 streptavidin으로 각각 20분 보온한 후 AEC (3-aminoethyl 9-carbasol)와 보온하였다. 세포의 핵을 보기 위하여 Meyer 헤마톡실린으로 염색하였다. 일차 항체를 비면역화 혈청으로 대체하여 음성 대조군으로 사용하였다.

신경세포 손상 평가

재관류 제1일과 제3일에는 해마의 CA1 중에서 subiculum-CA1 부위 및 CA2-3 부위에서 신경세포의 변성을 광학현미경으로 측정하였다. 제7일에는 해마의 CA1과 CA2-3 부위에서 신경세포의 변성을 측정하였는데, CA1 부위를 subiculum-CA1과 lateral CA1로 구분하였다. 이때 관찰자를 달리하여 각 절편을 검사하였다. 각 부위에서 변성을 보이는 세포와 정상세포의 비를 구하였고 신경세포 손상 정도를 다음과 같이 평가하였다. 손상이 관찰되지 않는 경우를 변화없음(0), 각 부위에서 호산성 신경세포변성이나 세포괴사 혹은 세포자멸사가 전체 신경세포의 25% 미만에서 관찰되는 경우를 경도(1+), 25%에서 50% 미만에서 관찰되는 경우를 중등도(2+), 50% 이상의 신경세포가 변성을 보이는 경우를 중증(3+)으로 분류했다. 각 실험군에서 얻은 결과를 Mantel-Haenszel chi-square test를 이용하여 분석하였다.

결 과

Calcitriol에 의한 체중 및 혈중 칼슘치 변화

5일간 D3을 복강 내 주사한 실험군은 식염수를 주사한 대조군에 비해 현저하게 높은 총 칼슘치를 보였다(D3 투여군, $15.3 \pm 1.4 \text{ mg/dL}$, n=6; 대조군, $10.2 \pm 0.7 \text{ mg/dL}$, n=7, Wilcoxon 2-sample test, t-test approx. significance=0.0125). 자유 칼슘치(Ca^{2+}) 역시 실험군이 대조군에 비해 현저하게 높았다(D3 투여군, $1.6 \pm 0.2 \text{ mmol/L}$, n=6; 대조군, $1.2 \pm 0.2 \text{ mmol/L}$, n=7, Wilcoxon 2-sample test, t-test approx. significance=0.0358).

체중의 변화는 실험군과 대조군 사이에 의미 있는 차이가 없었다.

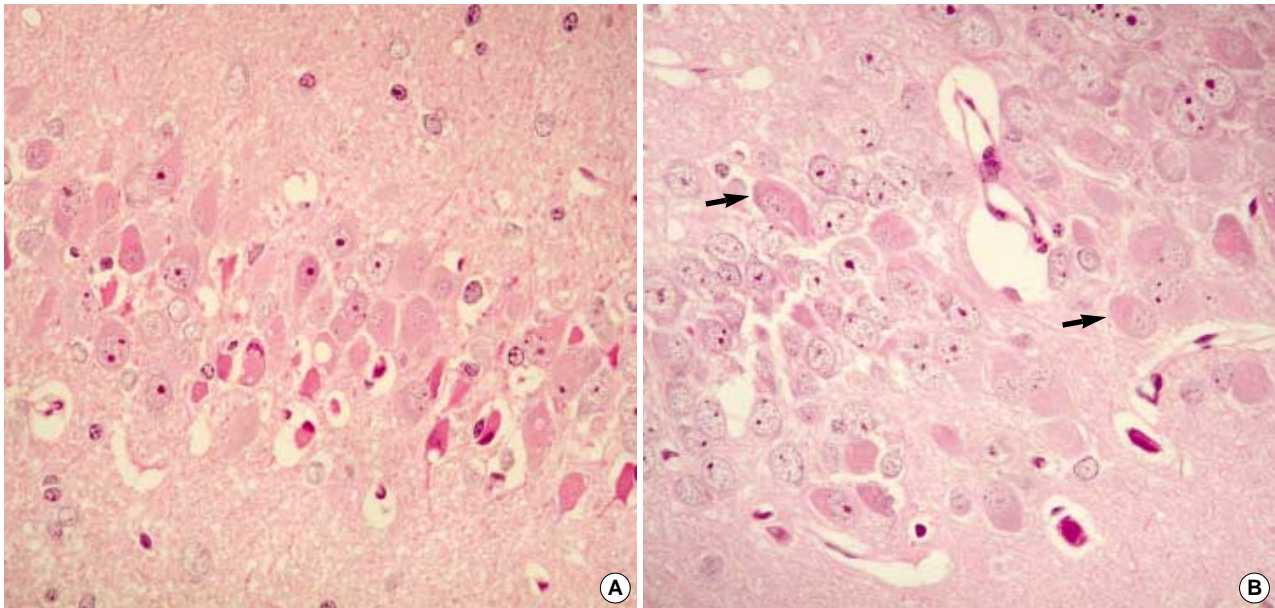


Fig. 1. Neuronal changes seen in 10-min bilateral global ischemia with reperfusion for 24 hour in D3 injected experimental group. (A) Neurons in subiculum-CA1 show fragmentation, clumping, and pyknosis of nucleus. (B) Neurons in CA2-3 show eosinophilic inclusion bodies (arrows).

Table 2. Number of animals with histological grading of the damage in hippocampal neurons at 1 day following bilateral common carotid artery ligation

	None (0)	Mild (1+)	Moderate (2+)	Severe (3+)
Saline (n=5)				
Sub-CA1*	0	0	3	2
CA2-3**	0	2	3	0
D3 (n=6)				
Sub-CA1*	1	0	0	5
CA2-3**	0	1	1	4

Sub-CA1: subiculum-CA1.

*: $p=0.065$, **: $p=0.074$.

조직소견

대조군(제1군)과 5일간 D3를 주사한 실험군(제2군)

재관류 제1일에 subiculum-CA1 부위의 추체세포가 호산성 세포변화나 분절과 응집과 같은 변성을 보이거나 호산성 봉입체를 갖고 있었고, CA2-3 부위의 신경세포에서는 호산성 봉입체가 관찰되었다(Fig. 1). Subiculum-CA1 부위의 신경세포 손상과 CA2-3 부위에서 호산성 봉입체를 보이는 세포의 빈도는 D3을 5일간 주사한 실험군과 5일간 식염수를 주사한 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다(Table 2).

재관류 제3일에 실험군과 대조군에서 신경세포괴사 및 세포 자멸사가 subiculum-CA1 및 CA2-3 부위에서 관찰되었고, lateral CA1 부위에는 변성된 세포가 드물게 보였지만 비교적 잘 보존되었다(Fig. 2). Subiculum-CA1 및 CA2-3 부위의 신경세포변화는 실험군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다

Table 3. Number of animals with histological grading of damage in hippocampal neurons at 3 days following bilateral common carotid artery ligation

	None (0)	Mild (1+)	Moderate (2+)	Severe (3+)
Saline (n=5)				
Sub-CA1*	0	0	2	3
CA2-3**	0	2	2	1
D3 (n=6)				
Sub-CA1*	1	2	1	2
CA2-3**	1	2	3	0

Sub-CA1: subiculum-CA1.

*: $p=0.102$, **: $p=0.726$.

(Table 3).

재관류 제7일에 CA1 부위에서 점차 진행되는 지연성 신경세포괴사가 대조군 8마리 중 5마리에서 관찰된 반면(Fig. 3), 실험군에서는 지연성 신경세포괴사가 7마리 모두에서 관찰되지 않았다($p=0.013$). 신경세포의 변성을 해마의 부위별로 따로 비교했을 때, lateral CA1 부위의 신경세포의 손상은 대조군에 비해 실험군에서 유의하게 감소된 반면, subiculum-CA1 및 CA2-3 부위의 신경세포 손상의 빈도는 대조군과 실험군 사이에 유의한 차이가 없었다(Table 4).

8일간 D3 주사한 실험군(제3군)

제3군은 제1군이나 제2군과 다르게 재관류 후 24시간에 심한 허혈성 경색을 보였다. 전체 7마리 중 세 마리에서 좌측 대뇌반구 전 부위 경색과 함께 우측 대뇌반구의 부분 경색이 발생했고, 한 마리에서 양측 대뇌반구를 광범위하게 침범하는 경색이 발생

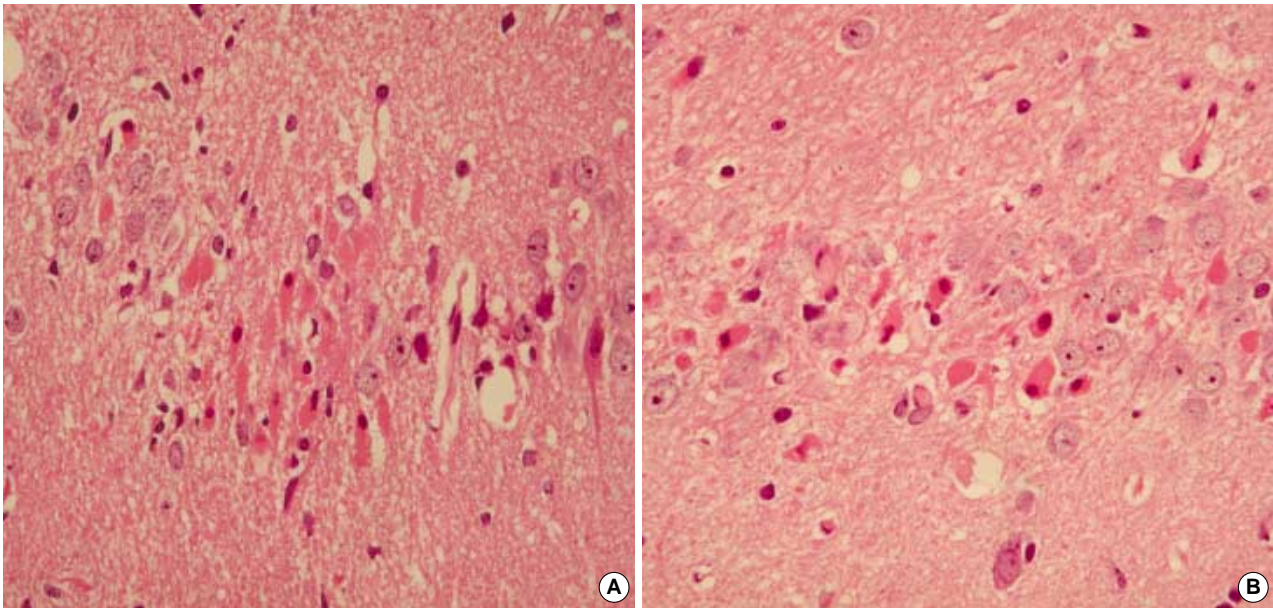


Fig. 2. Neuronal changes seen in 10-min bilateral global ischemia with reperfusion for 3 days in D3 injected experimental group. Neurons in subiculum CA1 (A) and CA2-3 (B) show pyknosis and karyorrhexis of nuclei.

Table 4. Number of animals with histological grading of damage in hippocampal neurons at 7 days following bilateral common carotid artery ligation

	None (0)	Mild (1+)	Moderate (2+)	Severe (3+)
Saline (n=8)				
Sub-CA1*	0	1	0	7
Lateral CA1**	0	3	0	5
CA2-3***	0	2	3	3
D3 (n=7)				
Sub-CA1*	0	5	2	0
Lateral CA1**	5	1	1	0
CA2-3***	2	0	5	0

Sub-CA1: subiculum-CA1.

*: p=0.405, **: p=0.011, ***: p=0.338.

하였다. 두 마리에서 좌측 대뇌반구에 국한된 경색이 발생했다. 나머지 한 마리는 특기할 뇌병변이 없었다.

신경항성 물질에 대한 면역조직화학검사 소견

대조군에 비하여 D3 투여군에서 bFGF 발현이 전 부위에서 심하게 증가되었다. 별세포의 세포질과 신경망이 강한 bFGF 양성 반응을 보였다(Fig. 4). GDNF와 PDGF의 발현은 D3 투여군과 대조군 사이에 의미 있는 차이가 없었다.

고찰

허혈성 뇌병변에서 발생하는 신경세포 손상의 기전을 밝히기

위해 실험동물을 이용한 다양한 연구가 시도되어 왔는데, gerbil은 경동맥과 후대뇌동맥을 연결하는 후교통동맥이 발달되어 있지 않기 때문에 전신 저혈압의 유발이나 추골동맥 폐쇄술 등의 복잡한 시술 없이 양측 총경동맥의 결찰에 의해 전뇌 허혈성 병변을 만들 수 있다. 본 연구의 대조군과 같이 생리식염수를 주사한 gerbil에서 10분간 양측 총경동맥을 결찰 후 재관류시키면 해마의 추체세포가 점점 진행되는 지연성 신경세포 손상을 보였다. 해마의 subiculum-CA1에 있는 추체세포는 재관류 6시간에 이미 분절화, 응집과 같은 소견을 보이면서 파괴되기 시작하고 재관류 후 3일에는 대부분의 추체세포가 없어지는 반면, lateral CA1 부위에서는 추체세포가 비교적 잘 유지되었다.³ 그러나, 재관류 후 5일 이후에는 CA1에 있는 모든 추체세포가 파괴되고 반응성 별세포가 증식하였으므로, subiculum-CA1 부위에 있는 추체세포가 비교적 빨리 파괴되는 반면, lateral CA1 부위의 추체세포는 천천히 파괴되어 특징적인 지연성 세포 손상을 보이는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서 제2실험군과 대조군에서 발생하는 해마의 신경세포 손상을 비교하였을 때 재관류 후 제1일 및 제3일에는 비슷한 정도의 신경세포 변성을 보였다. 제7일에는 대조군이 CA1 전 부위를 침범하는 전형적인 지연성 신경세포변성을 보인 반면, D3를 투여한 제2실험군의 경우 7일에도 lateral CA1 부위에 있는 추체세포는 전형적인 지연성 신경세포변성을 보이지 않았다. 해마의 각 부위에서 발생하는 신경세포의 변성을 부위별로 비교했을 때, subiculum-CA1 부위와 CA2-3 부위의 변화는 1일, 3일, 7일에 모두 실험군과 대조군 사이에 차이가 없었고, lateral CA1 부위에 있는 신경세포의 변성은 7일에 실험군

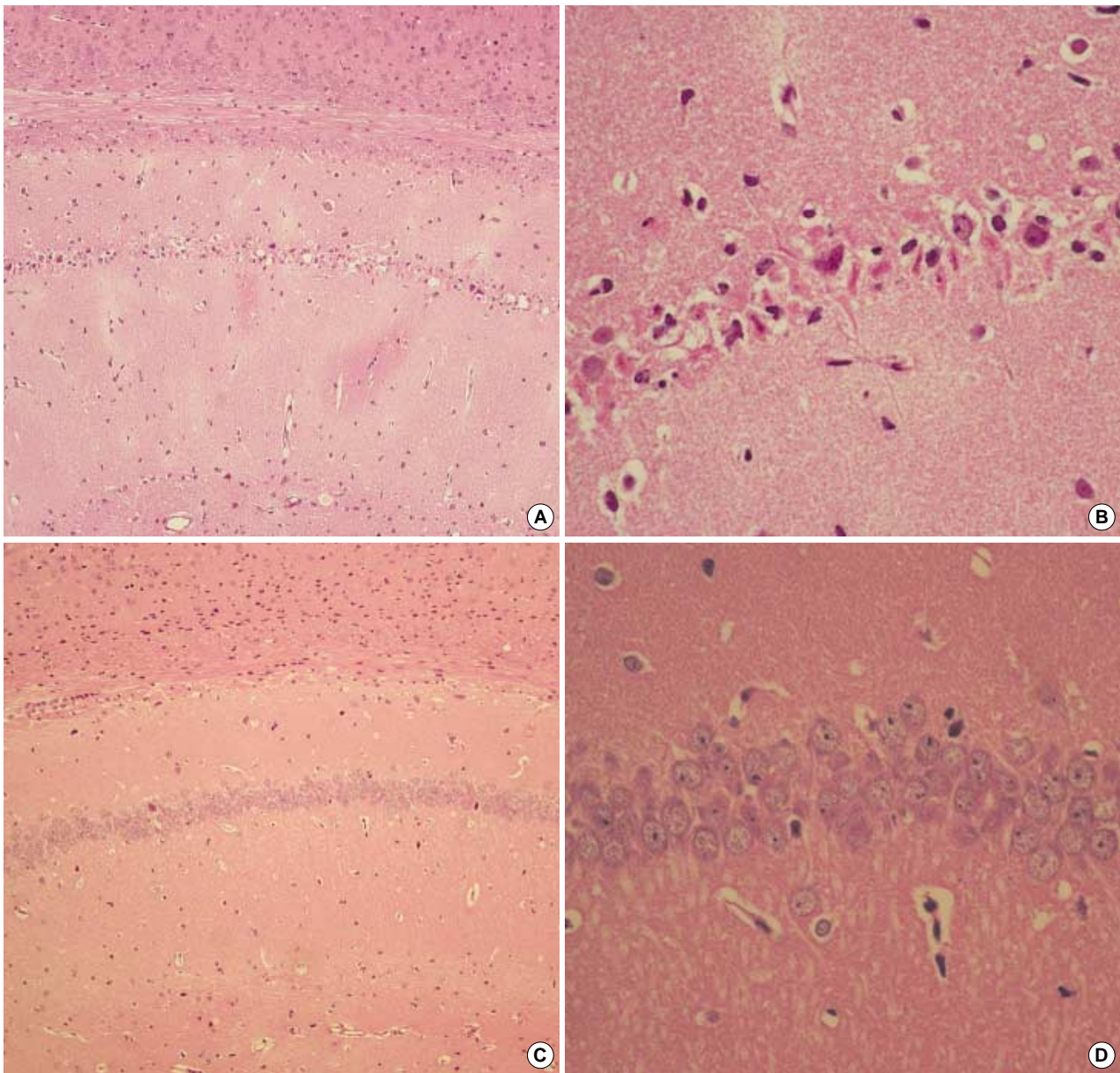


Fig. 3. Neuronal changes seen in 10-min bilateral global ischemia with reperfusion for 7 days in control group (A, B) and D3 injected experimental group (C, D). (A) Control group shows diffuse degeneration of neurons in CA1. (B) Higher magnification shows necrotic or apoptotic neurons. (C, D) D3 injected experimental group shows well preserved neurons in CA1 and CA2-3 area.

에서 유의하게 감소되었다. 이런 소견은 해마에서 발생하는 허혈성 신경세포의 변성에서 D3에 의한 신경세포의 보호 기전이 3일 이후에 진행되는 lateral CA1 부위에 있는 추체세포의 손상을 억제하는 데 주로 작용하는 것을 의미한다.

본 연구에서 D3를 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 의 농도로 5일간 전처치한 경우에 혈중 칼슘과 칼슘이온의 농도는 대조군에 비해 의미 있게 증가되었다. 예비실험에서 Wang 등²⁹이 사용했던 같은 농도 (1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, 본 연구의 제3군에 해당)로 8일간 D3를 주입한 결과 대부분의 gerbil이 심한 증상을 보였고, 재관류 후 24시

간에 시행한 조직검사에서 한 마리를 제외한 나머지 6마리가 한 쪽 혹은 양쪽 대뇌반구를 광범위하게 침범하는 경색의 소견을 보였다. 이와 같이 동량의 D3를 투여했을 때 결과가 다른 것은 사용한 동물의 종류와 실험 방법이 다르기 때문으로 해석하였다. 제3군에서는 혈중 칼슘농도를 측정하지 않아서 정확한 수치는 알 수 없지만 제2군보다는 많이 올라갔을 것으로 추정할 수 있다. 이와 같이 D3 투여량에 따라서 신경세포의 변성이 억제되거나 오히려 더 심한 세포 손상을 초래하므로, D3에 의한 신경세포 보호효과는 D3 투여량에 따라 다르게 나타나는 것을 알

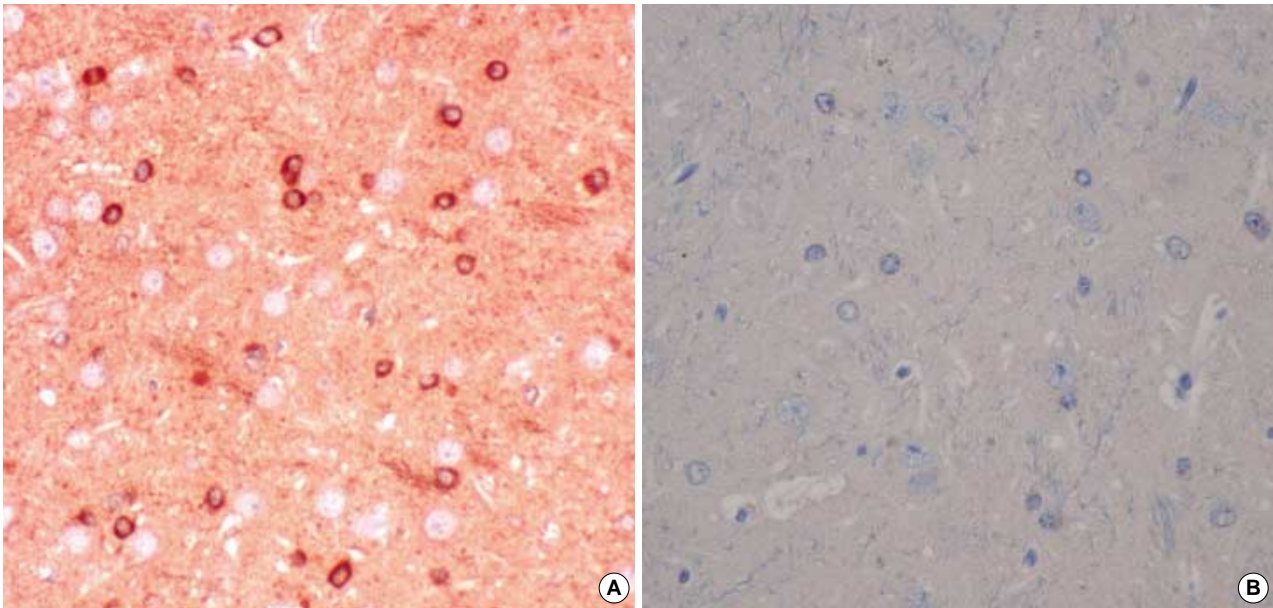


Fig. 4. Immunohistochemical findings with bFGF antibody in D3 injected gerbil (A) and the control (B). The bFGF expression was markedly increased in cytoplasm of thalamic astrocytes as well as in background in D3 injected gerbil compared with the control.

수 있다. 이와 같은 연구 결과는 Brewer 등⁹이 흰쥐 해마 신경세포의 배양에서 1-100 nM의 낮은 농도의 비타민 D가 NMDA와 글루탐산에 의한 신경흥분성 손상(excitotoxic insults)에서 신경세포를 보호하는 반면, 500-1,000 nM의 높은 농도의 비타민 D는 보호작용이 없는 것을 관찰하여 비타민 D의 보호효과가 농도에 따라 달라지는 것을 보고한 바와 같았다. 또한 글루탐산에 의한 세포변성을 일으킨 중뇌세포배양에서 D3를 전처치하는 경우에도 저농도에서는 농도에 따라 보호효과가 증가하지만, 1,000 nM의 다량을 투여하는 경우에는 보호효과가 감소되었다는 연구 보고가 있었다.³⁰ 이런 소견은 다량의 D3가 보호작용을 오히려 억제하든지 아니면 신경독성을 일으킨다는 것을 의미한다. 따라서 D3를 사용할 때 적당한 투여량을 결정하는 것이 매우 중요하다.

D3에 의한 신경세포보호작용의 기전은 아직 확실하게 밝혀지지 않는 것이다. 그러나 D3를 투여한 후에 일정 시간이 지난 후에만 보호효과가 있는 것과 단백질합성을 방해하는 물질인 cycloheximide를 같이 투여하면 D3의 보호효과가 억제되는 소견으로 보아, D3 투여에 의해 보호효과를 갖는 어떤 종류의 단백질이 합성되는 것으로 생각할 수 있다.³⁰ D3로 전처치하면 칼슘 ionophore인 A23187에 10분간 노출해서 발생한 세포독성이나 반응성 산소종에 의한 세포독성도 억제할 수 있다.³⁰ 또한 해마 신경세포 배양에서 D3는 말초조직에서와 마찬가지로 L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels (L-VSCCs)를 억제함으로써 신경세포를 보호하는 소견을 보였다.⁹ L-VSCCs는 노화된 해마에서 증가되며 신경세포의 취약성과 관련이 있는 것으로 알려졌다.⁹ 그러나 이런 D3의 보호작용과 반대로 D3가 세포자멸사를

일으키는 단백질을 증가시켜서 세포자멸사를 증가시키는 것도 보고되었다.¹⁰

허혈 및 저산소성 상태에서 세포 밖에 증가되는 글루탐산과 다른 종류의 신경흥분성아미노산은 그들의 수용체에 결합하여 세포 내에 Ca^{2+} , Na^+ , inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), diacylglycerol (DAG) 등의 물질을 증가시켜서 세포의 손상을 일으키게 된다. 그 중에서 칼슘이온은 가장 많이 증가하며 세포의 변성에서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 실험적으로 혈중 칼슘이온이 증가되면 대뇌의 허혈-저산소성 병변에서 세포자멸사가 증가되는 것이 보고된 반면, 심장근에서 허혈성 병변을 일으키기 전에 칼슘이온을 투여하는 경우에 병변이 감소되는 것도 보고되었다.⁶⁻⁸ 이런 보호효과는 칼슘이온에 의한 전처치 효과(preconditioning effect)로 해석되었다.

D3가 신경항성 물질을 증가시키는 기전은 아직 확실하게 알려지지 않았다. 칼슘이온에 영향을 별로 주지 않는 종류의 D3를 투여하는 경우에도 GDNF 분비가 증가하며, 칼슘 ionophore 인 A23187이 인간의 U-87 교모세포종 세포주에서 GDNF 발현을 증가시키지 않는 소견으로 보아, D3 투여에서 신경항성 물질이 증가하는 기전에 칼슘이온이 관여하지 않는 다른 기전이 작용하는 것을 알 수 있다.¹³⁻¹⁵ 근래에 TGF- β 와 비타민 D 신호전달 체계 사이에 밀접한 관계가 있는 것이 밝혀졌다.²⁸ 이와 같이 D3 투여는 신경세포 보호작용을 갖는 동시에 신경세포의 손상을 일으키는 상반된 두 가지 영향을 주게 된다. 따라서 칼슘이온을 많이 증가시키지 않고 신경항성 물질의 분비를 촉진하는 D3 혹은 다른 종류의 물질을 적당한 시간에 적당한량을 사용하는 것이 중요하다. 또한 D3의 기능을 선택적으로 향진시키는 물질을 D3

와 같이 투여하면 적은 양의 D3를 투여해도 신경세포를 보호하는 효과를 얻을 수 있으리라 생각한다.

본 실험에서 면역조직화학검사 방법으로 관찰한 GDNF, bFGF, PDGF 발현에서 D3 투여가 bFGF를 전반적으로 현저히 증가시키는 것을 알 수 있었다. bFGF는 superoxide dismutase와 glutathione reductase와 같은 자유기를 제거하는 효소의 역할을 촉진하여 반응성 산소종이 관여하는 세포 손상을 억제한다. GDNF와 PDGF의 발현은 대조군과 차이가 없었다.

참고문헌

- Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982; 239: 57-69.
- Nitatori T, Sato N, Waguri S, *et al.* Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 1995; 15: 1001-11.
- Koo H. Immunohistochemical expression of phospholipase C in global and focal ischemic encephalopathy in gerbil: Relationship with morphological changes. *J Korean Med Sci* 1996; 11: 44-54.
- Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 1988; 11: 465-9.
- Abe K, Aoki M, Kawagoe J, *et al.* Ischemic delayed neuronal death. A mitochondrial hypothesis. *Stroke* 1995; 26: 1478-89.
- Przyklenk K, Hata K, Kloner R. Is calcium a mediator of infarct size reduction with preconditioning in canine myocardium? *Circulation* 1997; 96: 1305-12.
- Yang CS, Lin NN, Tsai PJ, Liu L, Kuo JS. In vivo evidence of hydroxyl radical formation induced by elevation of extracellular glutamate after cerebral ischemia in the cortex of anesthetized rats. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 245-50.
- Budd SL. Mechanism of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol Ther* 1998; 80: 203-29.
- Brewer L, Thibault V, Chen K-C, Langub M, Landfield P, Porter N. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with down-regulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2001; 21: 98-108.
- Baudet C, Chevalier G, Chassevent A, *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces programmed cell death in a rat glioma cell line. *J Neuroscience Research* 1996; 46: 540-50.
- Iihara K, Sasahara M, Hashimoto N, Hazama F. Induction of platelet-derived growth factor β -receptor in focal ischemia of rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 941-9.
- Abe K, Hayashi T, Itoyama Y. Amerlioration of brain edema by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor in reperfused rat brain. *Neurosci Lett* 1997; 231: 37-40.
- Wang Y, Lin SZ, Chiou AL, Williams LR, Hoffer BJ. Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia-induced injury in the cerebral cortex. *J Neurosci* 1997; 17: 4341-8.
- Kitagawa H, Hayashi T, Mitsmoto Y, Koga N, Itoyama Y, Abe K. Reduction of ischemic brain injury by topical application of GDNF after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1998; 29: 1417-22.
- Verity A, Wyatt T, Lee W, Hajos B, Baecker P, Eglen R. Differential regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in human neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neurosci Res* 1999; 55: 187-97.
- Chiang YH, Lin SZ, Borlongan CV, Hoffer BJ, Morales MF, Wang Y. Transplantation of fetal kidney tissue reduces cerebral infarction induced by middle cerebral artery ligation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 1329-35.
- Shigeno T, Mima T, Takakura K, *et al.* Amerioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J Neurosci* 1991; 11: 2914-9.
- Sasaki K, Oomura Y, Suzuki K, Hanai K, Yagi H. Acidic fibroblast growth factor prevents death of hippocampal CA1 pyramidal cells following ischemia. *Neurochem Int* 1992; 21: 397-402.
- Nakata N, Kato H, Kogure K. Protective effects of basic fibroblast growth factor against hippocampal neuronal damage following cerebral ischemia in the gerbil. *Brain Res* 1993; 605: 354-6.
- Tsukahara T, Yonekawa Y, Tanaka K, *et al.* The role of brain-derived neurotrophic factor in transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurosurgery* 1994; 34: 323-31.
- Wen TC, Matsuda S, Yoshimura H, Kawabe T, Sakanaka M. Ciliary neurotrophic factor prevents ischemia-induced learning disability and neuronal loss in gerbils. *Neurosci Lett* 1995; 191: 55-8.
- Iihara K, Hashimoto N, Tsukahara T, Sakata M, Yanamoto H, Taniguchi T. Platelet-derived growth factor-BB, but not -AA, prevents delayed neuronal death after forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metabolism* 1997; 17: 1097-106.
- DeLuca HF, Zierold C. Mechanisms and functions of vitamin D. *Nutr Rev* 1998; 56: S4-10.
- Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol* 1999; 277: F157-75.
- Prüfer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. Distribution of 1,25(OH)₂D₃ receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanatomy* 1999; 16: 135-45.
- Veenstra TD, Prüfer K, Koenigsberger C, Brimijoin SW, Kumar R. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptor in the central nervous system of the rat embryo. *Brain Res* 1998; 804: 193-205.

27. Landfield PW, Cadwallader-Neal L. Long-term treatment with calcitriol retards a biomarker of hippocampal aging in rats. *Neurobiology of Aging* 1998; 19: 469-77.
28. Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, *et al.* Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science* 1999; 283: 1317-21.
29. Wang Y, Chiang YH, Su TP, Hayashi T, Morales M, Hoffer BJ, Lin SZ. Vitamin D attenuates cortical infarction induced by middle cerebral arterial ligation in rats. *Neuropharmacology* 2000; 39: 873-80.
30. Ibi M, Sawada H, Nakanishi M, *et al.* Protective effects of $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture. *Neuropharmacology* 2001; 40: 761-71.