

PAF 길항제가 허혈성 대뇌 피질내 Nitric Oxide 합성에 미치는 영향

이 원 석¹ · 노 순 기² · 박 규 현³

¹부산대학교 의과대학 약리학교실, ²신경과학교실, ³봉생병원 신경과

Effect of PAF Antagonists on the Nitric Oxide Synthesis in Ischemic Cerebral Cortex. Won Suk Lee¹, Soon Kee No², and Kyu Hyun Park³ Departments of ¹Pharmacology and ³Neurology, College of Medicine, Pusan National University, Pusan 602-739; ²Department of Neurology, Bong-Seng Hospital, Pusan 601-051, Korea

This study aimed to investigate the mechanism of cerebroprotection of platelet-activating factor (PAF) antagonists in transient cerebral ischemia of rat. Right middle cerebral artery (MCA) of Sprague-Dawley rat was occluded for 2 hours using an intraluminal filament technique. After 22 hours of reperfusion, morphometrically detectable infarct was developed in the cortex and striatum identical to the territory of MCA. The infarct size was significantly reduced by PAF antagonists, BN 52021 and CV-6209, as well as an inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor aminoguanidine (1 mg/kg, i.p., respectively) administered 5 min after MCA occlusion. PAF antagonists significantly inhibited the enzymatic activities of both myeloperoxidase and iNOS in the cerebral hemisphere ipsilateral to ischemia, whereas aminoguanidine did not inhibit myeloperoxidase activity but significantly inhibited the iNOS activity. These results suggest that PAF antagonists exert a cerebroprotective effect against ischemic brain damage through inhibition of leukocyte infiltration and iNOS activity in the postischemic brain.

Key Words: Cerebral ischemia, PAF antagonists, Nitric oxide

서 론

허혈성 신경 손상에는 무수히 많은 생물학적 활성 물질들이 관여한다고 알려져 있는 바, 특히 뇌허혈시에는 phospholipase A₂와 phospholipase C가 활성화 됨으로써 많은 유리 지방산과 diacylglycerol이 조직내에 축적되는데 (Panetta et al, 1989) 그 중에서도 phospholipase A₂ 산물인 혈소판 활성화 인자 (platelet-activating factor, PAF)가 허혈성 뇌손상에 있어서 중요한 매개물이라고 주목받고 있다. 중추신경계에서 PAF은 혈액-뇌 장벽 손상 (Kumar et al, 1988), 뇌혈관 수축 (Kochanek et al, 1988) 및 직접적인 신경 독성 (Kornecki & Ehrlich, 1988) 등을 초래하므로, PAF 길항제들을 뇌혈관 질환에 사용하면 뇌허혈 손상이 유의하게 억제 또는 방지된다는 보고가 많이 나오고 있다.

PAF 길항제들에 의한 뇌허혈 손상 억제의 기전은 현재로서는 단순히 PAF이 PAF 수용체에 결합하는 것을 방지함으로써 PAF의 작용을 선택적으로 봉쇄한다는 화학 구조적 상호 작용에 의하여만 설명되고 있어 (Koltai et al, 1991), 뇌허혈 손상 진행에 있어서의 제반 병리생리학적 과정에 있어서의 작용 기전을 자세히 설명하기에는 부족한 점이 많다.

오늘날 활발히 연구되고 있는 nitric oxide (NO)는 혈관 내피세포, 혈관 평활근, 염증 세포 및 신경 세포 등 여러 세포내에서 L-arginine으로부터 constitutive NO synthase (cNOS)와 inducible NO synthase (iNOS)에 의하여 생성되는데, iNOS는 lipopolysaccharide나 cytokine들에 의한 자극에 반응하여 많은 유형의 세포들에서 발현되고, 이것에 의하여 대량 생산되는 NO는 세포 독작용을 일으킨다고 알려져 있다 (Moncada, 1992; Griffith & Stuehr, 1995). 특히 허혈성 뇌손상의 병인론에 있어서 iNOS 활성도의 중요성에 대하여는 최근 많은 관심의 대상이 되고 있는 바로서 여러 종류의 iNOS 억제제가 현재 연구 개발되고

책임저자 : 이원석, ☎ 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10
부산대학교 의과대학 약리학교실

있는 중이다.

최근에 들어 PAF 길항제들에 의한 iNOS 유도 억제에 보고되기 시작하였는데 Arthur et al(1995)은 배양된 대식 세포와 혈관 평활근 세포에서의 iNOS 유도 실험에서 PAF 길항제가 iNOS 유도를 봉쇄하였음을 보고하면서 이와 같은 작용 기전에 의하여 PAF 길항제가 내독소성 속으로부터의 보호 작용을 나타낸다고 제시하였다. 그러나 뇌허혈 손상시 뇌조직 내에서 유도되는 iNOS에 대한 PAF 길항제의 효과에 대하여는 아직 보고를 접하지 못하고 있다.

따라서 본 연구에서는 뇌허혈 손상의 병인론에 있어서 매우 중요한 부분을 차지하는 PAF에 대한 PAF 길항제의 항허혈 손상 효과의 작용 기전을 뇌내 iNOS 억제에 초점을 맞추고, PAF 길항제가 허혈-재관류에 의한 뇌조직 손상으로부터 보호하는 기전을 밝히고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험 동물

체중 300~350 g의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사육장(실내 온도, 24~26°C) 내에서 물과 사료를 마음대로 섭취하게 하면서 사육하였다가 실험에 사용하였다.

중대뇌동맥 폐색

뇌경색의 실험 동물 모델로서 널리 사용하는 중대뇌동맥(middle cerebral artery, MCA) 폐색은 Zea Longa 등(1989)의 방법에 따라 시행하였다.

실험 동물을 secobarbital sodium(35 mg/kg, i.p.)으로 마취시키고 체온을 37°C로 유지시키기 위하여 전기 방석 위에 놓고 양와위로 고정된 후 복측 정중선을 따라 경부를 절개하고 이복근과 흉골유돌근 사이에 자가보전전인기를 설치하여 전갑설골근을 분리시키고 우측 외경동맥의 분지 중 후두동맥, 상갑상선동맥, 상행인두동맥, 설동맥 및 외악동맥을 각각 분리하여 전기소작시켜 절단하였다. 내경동맥을 미주신경으로부터 조심스레 분리하고 익구개동맥의 기시부를 7-0 나일론 봉합사로 결찰함으로써 총경동맥의 분지 중 두개외에 존재하는 것은 오로지 내경동맥만이 남아 있도록 하였다.

외경동맥의 기부 주위를 6-0 견봉합사로 느슨하게 묶은 다음 총경동맥과 내경동맥에 미세혈관용 클립을 각각 장치하여 혈류를 차단하고, 미세수술용 가위로써 외경동맥에 작은 구멍을 만들어 그 내강을 통하여 말단부를 둥글게 만든 길이 약 2.5 cm의 3-0 단선조 나일론 봉합사를 내경동맥내로 삽입하였다. 출혈을 방지하기 위하여

혈관내의 나일론 봉합사 주위를 외경동맥 기부 주위에 느슨하게 있던 견봉합사로 졸라맨 후 내경동맥에 장치한 미세혈관용 클립을 제거하였다. 단선조 나일론 봉합사를 천천히 진입시켜 그 끝이 MCA의 기시부를 지나 전대뇌동맥의 근위부까지 도달되도록 하였다.

MCA 폐색 2 시간 후 단선조 봉합사를 제거하고 총경동맥에 장치되어 있던 미세혈관용 클립을 제거함으로써 혈액을 재관류시키고, 경부의 절개 부위를 봉합하고 마취로부터 깨 때까지 보온 상자 내에서 회복토록 한 후 일반 사육상자로 옮겨 실온에서 사료와 물을 마음대로 섭취하도록 하였다.

대조군은 나일론 봉합사를 삽입하여 MCA의 기시부를 폐색하는 것을 제외하고는 실험군에서와 동일한 시술을 행하였다.

형태계측학적 경색 크기 측정

MCA 폐색 후 24시간이 경과하였을 때 과량의 secobarbital sodium(100 mg/kg)을 복강내 투여한 후 단독 치사시키고, 전체 뇌를 두개골로부터 적출하여 흰쥐용 뇌 주형(RBM-4000 C, ASI) 위에 놓고 전두엽 말단에서부터 후방으로 2 mm 간격으로 절단하여 7 개의 연속 관상 뇌절편을 만들어 Bederson 등(1986)의 방법에 따라 2% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride(TTC, Sigma) 용액내에 담구고 실온에서 30분간 처치한 후 10% 중성 formalin 완충액으로 고정시켰다.

고정된 뇌 조직 절편의 배측면을 실체현미경(SV6, Zeiss)에 연결된 비디오 칼러 프린터(Model CVP-G7, Sony)로 사진을 찍고 각 절편에 생긴 뇌경색 부위의 면적을 면적계(KP-21, Koizumi)로써 측정하였다.

Nitrite 생성량 측정

NO 합성의 지표로서 뇌조직내에서 생성되는 nitrite의 양을 Green 등(1982)의 방법을 약간 변형시켜 측정하였다. 적출 뇌조직을 320 mM sucrose, 0.1 mM EDTA 및 1 mM d, l-dithiothreitol이 함유된 4°C의 10 mM HEPES 완충액에 담구고 조직마쇄기로 30초간 마쇄하여 얻은 조직 균등질을 액체 질소에 담구어 동결시켰다가 37°C에서 해빙시키는 과정을 3 회 반복한 후 냉장 원심분리기(4°C, RC-5B, DuPont/Sorvall)에서 10,000 xg로 15분간 원심시켰다. 상등액에 4배량의 분석 완충액(30 mM potassium phosphate buffer에 0.7 mM MgCl₂, 7 mM valine 및 0.7 mM NADPH 함유, pH 7.2)을 첨가하여 37°C에서 20 분간 반응시켰다가 0.2 ml을 취하여 1.8 ml의 Griess 용액(2% phosphoric acid에 1% sulfanilamide와 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 함유)과 충분히 혼합하여

10 분간 실온에서 반응시킨 후 분광광도계(UV-1201, Shimadzu)를 사용하여 550 nm에서 발색단의 흡광도를 측정하였다. 각 시료내의 단백질 농도는 Bradford(1976)의 방법에 따라 Bio-Rad Protein assay kit(Bio-Rad, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

iNOS 활성도 측정

뇌 조직내의 iNOS 활성도는 Bredt 및 Snyder(1989)의 방법을 약간 변형시켜 L-[³H]arginine이 L-[³H]citrulline으로 전환되는 양을 측정함으로써 결정하였다. MCA 폐색 동측의 대뇌를 적출 직후 액화 질소에 담구어 급냉시켜 보관하였다가 조직마쇄용 완충액(50 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4) 2.0 ml에 담구고 조직마쇄기(Polytron, Brinkman)로써 10 초간 마쇄하여 조직 균질액을 구하였다. 조직 균질액을 냉장 원심분리기(4°C, Mega 17R, 한일)에서 10,000 xg로 15분간 원침시킨 후 상등액을 구하여 이 상등액 25 µl와 반응 완충액(HEPES 50 mM, NADPH 1 mM, EGTA 5 mM, tetrahydrobiopterin 50 µM, FAD 1 µM, FMN 1 µM, pH 7.4) 0.1 ml 및 희석 L-[³H]arginine(1 µM) 25 µl를 1.5 ml Eppendorf tube 내에 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다가 미리 차게한 반응 중지용 완충액(HEPES 20 mM, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, pH 5.5) 2 ml에서 반응을 중지시켰다. 이것을 Na⁺ 형으로 미리 전환시킨 AG 50W-X8 resin column을 통과시키고 증류수 2 ml로써 AG 50W-X8 resin column을 세척함으로써 얻게 되는 모든 용출액을 scintillation vial에 수집하였다. 여기에 Opti-fluor scintillant(Packard) 15 ml를 가하여 혼합시킨 후 liquid scintillation counter(Tri-Carb 2100 TR, Packard)로써 방사능을 측정하였다. 각 시료내의 단백질 농도는 Bio-Rad Protein assay kit(Bio-Rad, U.S.A.)를 사용하여 Bradford(1976)의 방법으로 측정하였다.

Myeloperoxidase(MPO) 활성도 측정

MCA 폐색 24시간 후에 과량의 secobarbital sodium(100 mg/kg)을 복강내로 투여하여 치사시키고, 실험 동물의 심장을 통하여 생리적 식염수 100 ml를 100 mmHg로 관류함으로써 체내의 혈액을 모두 제거시키고, 허혈-재관류를 시행한 동측의 대뇌를 얼음판 위에서 적출 즉시 액화 질소에 담구어 보관하였다가 Barone 등(1991)과 Bradley 등(1982)의 방법을 약간 변형시켜 MPO 활성도를 측정하였다.

냉동 뇌조직을 얼음판 위에서 해동시켜 무게를 측정하고, 미리 4°C로 차게한 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) 5배량에서 마쇄하여 조직 균질액을 구하였다. 조직 균질액을 냉장 원심분리기(4°C, Mega 17R, 한일) 내

에서 10,000 xg로 15분 동안 원침시켰다가 상등액을 버리고 침전물만 구한 후 침전물을 세척하기 위하여 위의 과정을 반복하였다가 상등액을 버리고 얻은 세척된 침전물에 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide가 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.0, 25°C)를 원래 무게의 5배량으로 가하여 현탁액을 만들고 약 2분 동안 추출하였다. 액화 질소 내에서의 급속 동결과 해동 과정을 3회 반복하고 초음파 처리를 한 후 4°C에서 20분간 incubation하였다가 10,000 xg로 15분 동안 냉장 원침시켰다. 상등액 0.1 ml를 *o*-dianisidine dihydrochloride(0.167 mg/ml)와 0.0005% hydrogen peroxide가 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.0) 2.5 ml와 혼합한 후 spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu)를 사용하여 400 nm에서 20분 동안에 걸친 흡광도의 변동을 측정하였다. MPO 활성도 1 unit는 1 mol의 peroxide가 25°C에서 20분 동안에 물로 전환되는 것으로서 정의하여 그 단위를 munit/mg/20 min로 표시하였다.

사용 약물

본 연구에 사용된 약물은 BN 52021(Henri Beaufour) 및 CV-6209(Sigma) 등의 PAF 길항제와 대표적인 iNOS 억제제인 aminoguanidine hemisulfate(Sigma) 등이었고, 이들의 stock solution을 0.9% 생리식염수로 희석하여 MCA 폐색 5분 후에 체중 1 kg 당 1 ml를 복강 내로 투여하였다. 실험에 사용된 주요 측정용 시약은 L-[³H]arginine hydrochloride(Amersham)와 AG 50W-X8 resin(Bio-Rad)을 비롯하여 d,l-dithiothreitol, β-NADPH, tetrahydrobiopterin, flavin adenine dinucleotide(FAD), flavin mononucleotide(FMN), sulfanilamide, N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, hexadecyltrimethylammonium bromide, *o*-dianisidine dihydrochloride 및 hydrogen peroxide(이상 Sigma 제품) 등이고, 기타 일반 시약들은 특급 제품을 사용하였다.

통계 처리

모든 실험치는 평균±평균의 표준오차로 표시하였고, 각 군 사이의 유의성은 분산 분석법(ANOVA)으로 분석한 후 Bonferroni의 다중 비교법으로 사후 검정하여 p값이 0.05 미만인 것을 유의하다고 판정하였다.

실험 결과

뇌경색의 크기

나일론 봉합사를 내경동맥내로 삽입하여 MCA를 2시간 동안 폐색시켰다가 혈액을 재관류시켜 주는 일과성

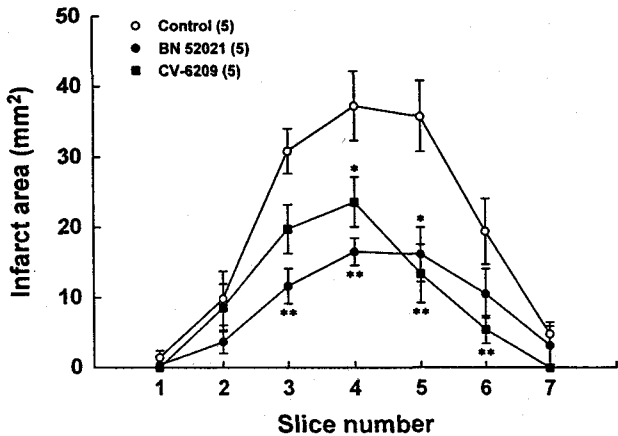


Fig. 1. Effect of PAF antagonists on the infarct area of the ischemic rat brain. Brain ischemia was induced by occluding right middle cerebral artery for 2 hours followed by 22 hours of reperfusion. PAF antagonist(BN 52021 or CV-6209, 1 mg/kg, respectively) was administered i.p. 5 min after right middle cerebral artery occlusion. The brain was sliced coronally into 7 pieces and the infarct area was measured morphometrically after staining with 2% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride solution. Numbers in parentheses represent the numbers of animals. *P < 0.05; **P < 0.01 vs. corresponding control value.

뇌허혈을 흰쥐에게 일으키고 24시간 후에 전체 뇌를 적출하여 2% TTC 용액으로 염색을 해 본 결과 허혈 동측에 MCA로부터 혈액 공급을 받는 영역과 일치하는 MCA 분포 영역에 육안적으로 뚜렷이 구별되는 뇌경색이 형성되었다.

뇌경색의 크기를 측정하기 위하여 전뇌를 2 mm 간격으로 절단하여 얻은 7개의 연속 관상 절편 각각의 경색 면적을 형태계측학적으로 측정하였다. MCA 폐색 5분 후에 PAF 길항제인 BN 52021 및 CV-6209 1 mg/kg을 각각 복강내로 투여한 경우 Fig. 1에서 보는 바와 같이 BN 52021은 3, 4 및 5 번 절편의 경색 면적을 유의하게 감소시켰고(각각 p < 0.01, p < 0.01 및 p < 0.05), CV-6209는 4, 5 및 6 번 절편의 경색 면적을 유의하게 감소시켰다(각각 p < 0.05, p < 0.01 및 p < 0.05).

뇌 전체에 형성된 뇌경색의 크기를 비교하였을 때 PAF 길항제 처치군의 뇌경색 크기는 대조군에 비하여 현저히 감소되었고(대조군, 279.1 ± 26.7 mm³; BN 52021, 134.1 ± 26.3 mm³, p < 0.01; CV-6209, 135.7 ± 29.7 mm³, p < 0.01), 그 효과는 iNOS 억제제인 aminoguanidine 1 mg/kg 처치에 의한 결과(140.2 ± 27.1 mm³, p < 0.01)와 유사하였다(Fig. 2).

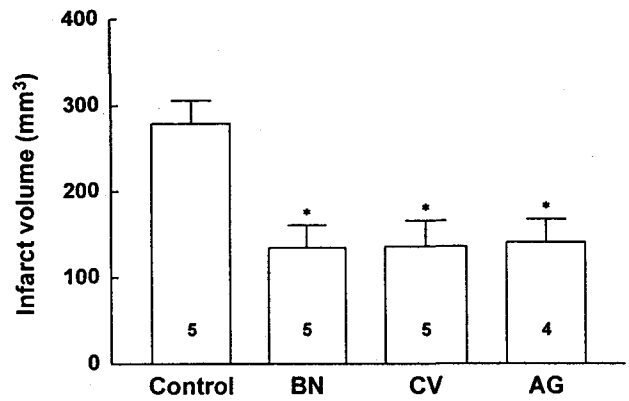


Fig. 2. Effect of PAF antagonists and aminoguanidine on the cerebral infarct volume of ischemic rat brain. BN 52021(BN), CV-6209(CV) or aminoguanidine(AG)(1 mg/kg, respectively) was administered i.p. 5 min after right middle cerebral artery occlusion. Numbers in columns represent the numbers of animals. *P < 0.01 vs. control group.

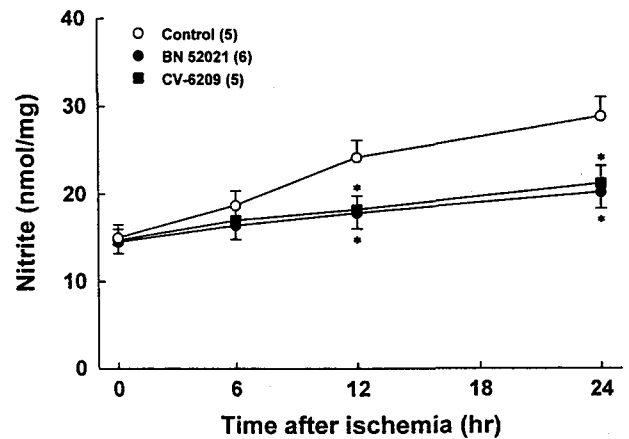


Fig. 3. Effect of PAF antagonists on the time-dependent nitrite formation in rat cerebral cortex following ischemia-reperfusion. *P < 0.05 vs. corresponding control value.

Nitrite 생성량

허혈성 대뇌 피질내 nitrite의 생성량은 뇌허혈-재관류 후의 시간 경과에 따라 유의하게 증가되었고(p < 0.05), 이러한 경향은 PAF 길항제 전처치에 의하여 유의하게 약화되었다(p < 0.05, Fig. 3).

iNOS 활성화도

일과성 뇌허혈에 의한 뇌내 iNOS의 활성화에 대한 PAF 길항제들의 효과를 관찰하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 허혈-재관류를 시행한 대뇌 조직내의 iNOS 활성화도

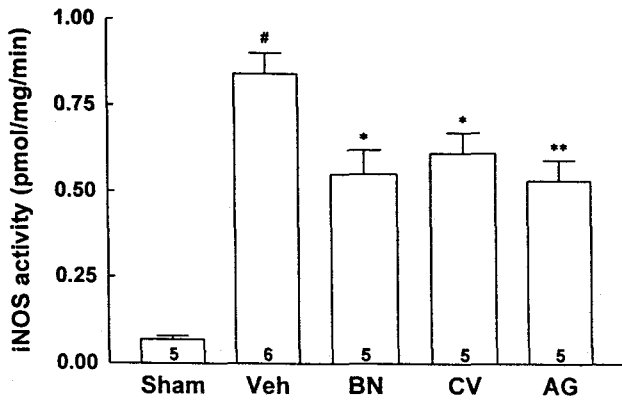


Fig. 4. Effect of PAF antagonists and aminoguanidine on iNOS activity in the ischemic rat brain 24 hours after transient ischemic insult. BN 52021, CV-6209 or aminoguanidine(1 mg/kg, respectively) was administered i.p. 5 min after right middle cerebral artery occlusion. Numbers in columns represent the numbers of animals. # P < 0.001 vs. sham group. * P < 0.05; ** P < 0.01 vs. vehicle group.

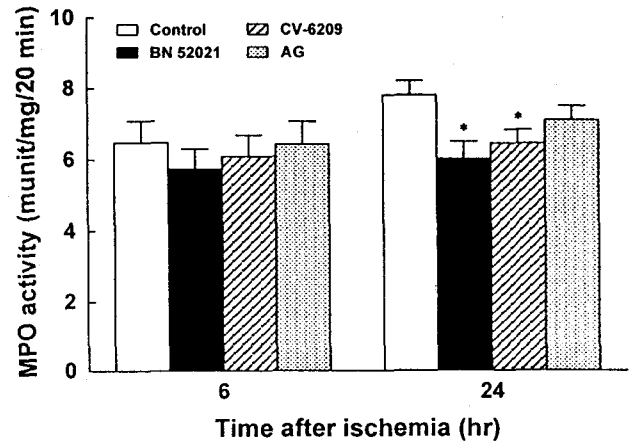


Fig. 5. Effect of PAF antagonists and aminoguanidine on the myeloperoxidase(MPO) activity in the ischemic rat brain 6 and 24 hours after transient ischemic insult. Animals were administered i.p. with BN 52021, CV-6209 or aminoguanidine(AG)(1 mg/kg, respectively) 5 min after right middle cerebral artery occlusion. n = 5~6 in each group. *P < 0.05 vs. corresponding control group.

(0.84 ± 0.06 pmol/mg/min)는 sham군(0.07 ± 0.01 pmol/mg/min)에 비하여 현저히 증가되었다(p < 0.001). PAF 길항제인 BN 52021 및 CV-6209 혹은 iNOS 억제제인 aminoguanidine(각각 1 mg/kg)을 복강내 투여하였을 경우 허혈-재관류에 의하여 증가되었던 iNOS 활성도는 각각 0.55 ± 0.07(p < 0.05), 0.61 ± 0.06(p < 0.05) 및 0.53 ± 0.06 pmol/mg/min(p < 0.01)로 유의하게 억제되었다.

MPO 활성화

허혈성 뇌조직내 iNOS의 유도 및 활성이 내인성 PAF에 의하여 유인된 호중구의 침윤에 의한 것인지 또는 이미 침윤된 호중구에 의하여 생성된 PAF에 의한 것인지를 구명하기 위하여 허혈성 대뇌 조직내 MPO 활성도를 측정하였다.

허혈-재관류를 시행한 반대측 대뇌 조직내 MPO 활동은 5.60 ± 0.45 munit/mg/20 min이었으나 허혈-재관류 동측에서는 7.79 ± 0.41 munit/mg/20 min로서 유의하게 증가하였다(p < 0.01). Fig. 5에서 보는 바와 같이 허혈성 대뇌 조직내에 증가되었던 MPO 활성도는 BN 52021 및 CV-6209(각각 1 mg/kg, i.p.) 처치에 의하여 각각 6.01 ± 0.48(p < 0.05) 및 6.44 ± 0.37 munit/mg/20 min(p < 0.05)로 유의하게 억제되었다. 한편 iNOS 억제제인 aminoguanidine 1 mg/kg을 복강내 처치하였을 경우 허혈 동측 대뇌 조직의 MPO 활성도는 7.09 ± 0.40 munit/mg/20 min로서 대조군에 비하여 차이가 없었다.

고 찰

본 연구는 뇌허혈-재관류를 시행한 흰쥐에서 PAF 길항제인 BN 52021과 CV-6209가 뇌경색의 크기를 감소시키고 대뇌 조직내에 증가된 iNOS 활성도와 MPO 활성도를 유의하게 억제시킴을 관찰하였다.

PAF은 여러 조직에서의 염증 전구 물질로서의 역할을 한다고 알려진 일종의 acetyl glyceryl ether phosphorylcholine으로서 여러 세포 성분(대식세포, 단핵구, 다형핵 백혈구, 혈소판, 내피세포 및 뉴런 등)에서 생성되고, 세포내 뿐만 아니라 세포간의 활성을 야기함으로써 매우 다양한 작용을 하는 화학 주성 물질로 알려져 있다(Stewart 등, 1990). PAF은 혈전을 일으키고 허혈성 조직 손상을 심하게 초래하는데, 특히 중추 신경계에서는 혈액-뇌 장벽 손상(Kumar et al, 1988)과 뇌혈관 수축(Kochanek et al, 1988)을 야기할 뿐만 아니라 직접적인 신경 독성(Kornecki와 Ehrlich, 1988)을 초래할 수도 있다고 한다. Francescangeli & Goracci(1989)는 흰쥐의 뇌에서도 효소학적으로 PAF이 신생되어 유리될 수 있다고 보고하였고, Snyder(1989)와 Braquet 등(1988)은 뇌손상과 같은 병적 상태에서는 phospholipase A₂가 활성화된다고 보고하였다. 최근에 Nishida와 Markey(1996)는 10분간의 일과성 뇌허혈을 야기시킨 gerbil의 뇌 조직내 PAF 농도를 직접 측정하였을 때 혈액 재관류 1 시간 후에 해마에서 210%, 대뇌 피질에서 168%, 시상에서 169% 증가하였다가, 6시

간 이후부터는 정상 수준으로 회복되었다고 보고하였다. 이러한 보고들로 미루어 볼 때 뇌허혈 손상의 발생 및 진행에 있어서 PAF이 매우 중요하게 관여한다는 추측을 가능케 해 준다.

최근 여러 장기내에서의 많은 생물학적 현상에 관여하는 매개물질로서 NO가 주목받고 있다(Moncada, 1992). NO는 혈관 내피세포, 염증 세포 및 혈관 평활근 등 여러 세포에서 L-arginine으로부터 cNOS와 iNOS에 의하여 생성되는데, 신경성 NOS와 혈관 내피세포성 NOS는 calmodulin-의존성으로 세포내 Ca^{2+} 농도에 의해서 활성화되어 NO를 단계적으로 생산하지만, iNOS는 cNOS와는 달리 세포내 Ca^{2+} 농도에 의존하지 않고 안정시에는 소량으로 존재하다가 endotoxin이나 cytokines, 즉 lipopolysaccharide나 interferon- γ 에 의해서 유도되어 일단 발현되면 NO를 지속적이고도 폭발적으로 생산함으로써 세포 독작용을 나타낸다. 최근 Iadecola 등(1995; 1996)에 의하여 뇌허혈이 초래된 이후에 뇌조직내에서 iNOS의 발현이 현저히 증가한다는 것이 증명되었고, 따라서 iNOS의 유도와 그 효소 활성도를 억제시켜 줌으로써 뇌허혈 손상을 감소시키고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다(김 et al 1996; Zhang et al 1996). 본 연구에서도 iNOS 억제제인 aminoguanidine이 뇌경색의 크기를 유의하게 감소시켰고, 뇌허혈 부위에서의 iNOS 활성도를 유의하게 억제시켰다. 흥미있는 것은 PAF 길항제에 의하여 뇌경색의 크기가 유의하게 감소되었을 뿐만 아니라 허혈성 뇌조직내의 NO 생성량 및 iNOS 활성도가 유의하게 억제되었다는 사실로서 현재까지의 여러 보고들에서는 찾아 보기 힘든 새로운 결과이다. 이러한 결과는 뇌허혈이 초래되면 뇌허혈 동안에 생성 유리된 내인성 PAF에 의하여 iNOS가 유도되고 이것에 의하여 대량으로 생성되는 NO에 의하여 허혈성 뇌손상이 진행된다는 것을 시사해 준다. 그러나 이와 같이 PAF 길항제들에 의하여 iNOS 활성도가 감소되는 기전이 iNOS에 대한 직접적인 억제 작용에 의한 것인지 혹은 iNOS mRNA의 발현을 억제하거나 또는 기타 다른 경로를 경유함으로써 얻어지는 간접적인 작용에 의한 것인지 본 실험만으로는 알 수 없고 앞으로 더욱 심도 깊은 연구를 계속해 보아야 할 필요가 있다.

기존의 대부분의 NOS 억제제들이 여러 형태의 NOS를 무분별하게 억제시킴으로써 뇌허혈 손상 치료에 사용시 많은 부작용과 단점을 가지고 있어 임상 적용이 쉽지 않다(Carreau et al, 1994; Niu et al, 1994). 그러나 PAF 길항제들은 세포내와 세포외에 모두 존재하는 PAF 수용체 중에서 세포내 PAF 수용체로의 접근 능력을 가지고 있기 때문에(Koltai et al, 1991) PAF 길항제에 의하여 세포내에서의 iNOS의 유도가 억제될 것으로 추론되므로

cNOS에 의하여 생성되는 NO의 유익성(내피세포 의존성 혈관 확장과 항분열유발 작용 등)을 완전히 없애지는 않으면서 iNOS에 의하여 조절할 수 없을 정도로 대량 생산되는 NO의 유해성을 약화시키는 좋은 수단으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 현재의 PAF 길항제 개발 수준은 아직까지는 초기 단계라고 볼 수 있으므로 앞으로 보다 깊이 있는 연구를 통하여 PAF 길항제의 작용 기전이 자세히 밝혀지고, 이러한 기초 지식을 토대로 뇌허혈 손상 과정에 대하여 보다 선택적이면서 특이적인 PAF 길항제를 개발하여 뇌혈관장애 질환에 적절한 치료적 응용을 하게 된다면 이는 매우 고무적인 것으로 기대된다.

혈전 형성과 허혈성 조직 손상에 있어서 호중구의 역할이 중요하다고 인정되고 있는 바로서(Barone et al, 1991; Matsuo et al, 1994) 체내 호중구를 결핍시키거나 호중구 항혈청을 투여함으로써 뇌허혈 손상이 억제되었다는 보고가 많이 나오고 있다(Clark et al, 1991; Shiga et al, 1991; Chen et al, 1992; Bowes et al, 1995). 뇌허혈이 일어나면 혈액 중의 다형 백혈구가 혈관 내벽에 부착하여 뇌조직 내로 침윤을 하게 되고, 조직 내에 축적된 호중구로부터의 여러 물질들이 유리되면서 이와 함께 동반되는 염증 반응에 의하여 허혈성 뇌조직 손상은 더욱 진행하게 된다(Hallenbeck et al, 1986; Barone et al, 1991; Clark et al, 1993; Garcia et al, 1994). 그러므로 본 연구에서는 뇌허혈이 있는 후에 호중구가 뇌조직 내로 얼마나 침윤되었는지 정량적으로 조사하기 위하여 뇌조직내 MPO 활성도를 측정해 보았다. 흰쥐에게 일과성 뇌허혈을 일으키고 24시간 후에 허혈 동측의 뇌조직내 MPO 활성도를 측정할 결과 MPO 활성도는 정상 조직에 비하여 현저히 증가되었고, PAF 길항제인 BN 52021과 CV-6209 처치에 의하여 유의하게 억제되었음을 관찰할 수 있었다. 그러나 iNOS 억제제인 aminoguanidine을 처치하였을 때 뇌조직내에 증가되었던 MPO 활성도는 아무런 변동을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 매우 흥미있는 것으로서 뇌허혈이 일어남으로써 뇌조직내에서 유도되는 iNOS의 작용에 의하여 호중구가 침윤하는 것이 아니라 내인성 PAF에 의하여 유인 침윤된 호중구에 의하여 iNOS가 허혈성 뇌조직내에 유도되는 것임을 증명하는 것으로서 뇌허혈 손상의 병리생리학적 기전 규명에 많은 도움을 줄 것으로 사료된다.

한편, 뇌 허혈-재관류 손상에 있어서 산소 유리기가 중요하게 관여한다는 것도 널리 알려져 있다. 뇌허혈 동안에 뇌세포막 성분인 인지질의 파괴로 인한 유리 지방산들의 축적과 에너지 저장의 감소로 인한 adenine nucleotides의 축적이 일어나고, 혈액 재관류시 이들이 각각 cyclooxygenase와 xanthine oxidase에 의하여 대사됨으로

써 생성되는 여러 산소 유리기들에 의하여 뇌조직 손상이 초래된다(Armstead et al, 1988; Traystman, 1991). 최근에 Nelson 등(1992)과 Dugan 등(1995)은 뇌 허혈-재관류 실험에서 혈액 재관류 초기에 superoxide 생성이 증가함을 직접 측정 보고하였고, Chan(1994)은 뇌세포에서 CuZn-superoxide dismutase를 대량 생산해 낼 수 있는 transgenic mouse를 사용한 실험에서 뇌 허혈-재관류 손상에 의한 뉴런 손상이 유의하게 감소되었음을 보고하였다. PAF 길항제가 호중구에서의 superoxide 생성을 억제하는 능력도 가지고 있다는 Fldes-Filep 등(1987)과 Filep 및 Fldes-Filep(1988)의 보고를 참조해 보면 본 실험에서 PAF 길항제가 뇌경색의 크기를 유의하게 감소시킨 기전을 PAF 길항제에 의한 허혈성 뇌조직에서의 산소 유리기 생성 억제 때문으로도 생각할 수 있다. 그러나 이러한 기전은 본 연구의 결과만으로는 설명하기 힘들고 계속적인 연구의 필요성을 남기고 있다.

이상을 종합해 보면 뇌허혈이 초래되면 초기에 뇌조직 세포에서 PAF의 생성 유리가 증가되고 이어서 혈액내의 호중구가 뇌조직 내로 침윤 축적되며, 이와 함께 동반되는 염증 반응에 의한 염증성 cytokine들에 의하여 뇌조직 내 iNOS의 발현이 유도됨으로써 대량으로 생성되는 NO에 의하여 허혈성 뇌조직 손상이 진행된다는 일련의 과정이 성립되는 것으로 추측되는데, 이 과정에 있어서 PAF 길항제는 허혈성 뇌조직내 백혈구 침윤과 iNOS 활성도를 억제시킴으로써 뇌조직 내에서의 NO 생성을 감소시키고, 그 결과 허혈성 뇌손상의 진행을 차단하게 되어 뇌 보호 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 교육부 지원 기초의학 학술연구조성비(081)와 1996년도 보건 의료기술연구개발사업(HMP-96-M-2-1043)의 지원에 의하여 이루어졌음.

참 고 문 헌

- 김상호, 이원석, 박규현. 국소 뇌허혈 손상에 대한 유도성 Nitric Oxide 합성 효소 억제제의 보호 효과에 관한 연구. 부산의대 학술지 36: 225-236, 1996
- Armstead WM, Mirro R, Busija DW, Leffler CW. Postischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain. *Am J Physiol* 255: H401-403, 1988
- Arthur JF, Shahin S, Dusting GJ. PAF antagonists block induction of nitric oxide synthase in cultured macrophages and vascular smooth muscle cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22: 452-454, 1995
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17: 1304-1308, 1985
- Barone FC, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Lee EV, Feuerstein GZ, Sarau HM, Clark RK, Griswold DE. Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification. *J Neurosci Res* 29: 336-345, 1991
- Bowes MP, Rothlein R, Fagan SC, Zivin JA. Monoclonal antibodies preventing leukocyte activation reduce experimental neurologic injury and enhance efficacy of thrombolytic therapy. *Neurology* 45: 815-819, 1995
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78: 206-209, 1982
- Braquet P, Spinnewyn B, Blavet N, Marcheselli V, Rossawska M, Bazan NG. Platelet activating factor as a mediator in cerebral ischemia and related disorders. *Biochem Biomed Acta* 47: 195-218, 1988
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9030-9033, 1989
- Carreau A, Duval D, Poignet H, Scatton B, Vige X, Nowicki JP. Neuroprotective efficacy of N^o-nitro-L-arginine after focal cerebral ischemia in the mouse and inhibition of cortical nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 256: 241-249, 1994
- Chan PH. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol* 4: 59-65, 1994
- Chen M, Chopp M, Bodzin G. Neutropenia reduces the volume of cerebral infarct after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurosci Res Commun* 11: 93-99, 1992
- Clark RK, Lee EV, Fish CJ, White RF, Price WJ, Jonak ZL, Feuerstein GZ. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull* 31: 565-572, 1993
- Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA. Reduction of central nervous system ischemic injury using leukocyte

- adhesion antibody treatment. *Stroke* 22: 877–883, 1991
- Dugan LL, Lin TS, He YY, Hsu CY, Choi DW. Detection of free radicals by microdialysis/spin trapping EPR following focal cerebral ischemia-reperfusion and a cautionary note on the stability of 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO). *Free Radic Res* 23: 27–32, 1995
- Filep J, Fldes-Filep E. Platelet-activating factors, neutrophil granulocyte function and BN 52021. In: Braquet P ed, Ginkgolides-Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives. JR Prous Science Publishers, Barcelona, p151–159, 1988
- Fldes-Filep E, Braquet P, Filep J. Inhibition by BN 52021 (ginkgolide B) of the binding of [³H]-platelet-activating factor to human neutrophil granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 1412–1417, 1987
- Francescangeli E, Goracci G. The de novo biosynthesis of platelet-activating factor in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 107–112, 1989
- Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct(Wistar rat). *Am J Pathol* 144: 188–199, 1994
- Green L, Wagner D, Glogowski J, Skipper P, Wishnork J, Tannenbaum S. Analysis of nitrate, nitrite and ¹⁵N- nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131–138, 1982
- Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57: 707–736, 1995
- Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB, Obrenovich TP, Contreras TJ. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain region with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 17: 246–253, 1986
- Iadecola C, Xu X, Zhang F, El-Fakahany EE, Ross ME. Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 52–59, 1995
- Iadecola C, Zhang F, Casey R, Clark HB, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 27: 1373–1380, 1996
- Kochanek PM, Nemoto EM, Melick JA, Evans RW, Burke DF. Cerebrovascular and cerebrometabolic effects of intracarotid infused platelet activating factor in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 546–551, 1988
- Koltai M, Hosford D, Guinot P, Esanu A, Braquet P. Platelet-activating factor(PAF): a review of its effects, antagonists and future clinical implications. *Drugs* 42: 9–29, 1991
- Kornecki E, Ehrlich YH. Neuroregulatory and neuropathological actions of the ether-phospholipid platelet-activating factor. *Science* 240: 1792–1794, 1988
- Kumar R, Harvey SAK, Kester MK, Hanahan DJ, Olson MS. Production and effects of platelet-activating factor in the rat brain. *Biochim Biophys Acta* 963: 375–383, 1988
- Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. *Stroke* 25: 1469–1475, 1994
- Moncada S. The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 145: 201–227, 1992
- Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J Physiol* 263: H1356–H1362, 1992
- Nishida K, Markey SP. Platelet-activating factor in brain regions after transient ischemia in gerbils. *Stroke* 27: 514–519, 1996
- Niu XF, Smith CW, Kubes P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ Res* 74: 1133–1140, 1994
- Panetta T, Marcheselli VL, Braquet T, Bazan NG. Arachidonic acid metabolism and cerebral blood flow in the normal, ischemic, and reperfused gerbil brain. Inhibition of ischemia-reperfusion-induced cerebral injury by a platelet-activating factor antagonist(BN 52021). *Ann NY Acad Sci* 559: 340–351, 1989
- Shiga Y, Onodera H, Kogure K, Yamasaki Y, Yashima Y, Shozuhara H, Sendo F. Neutrophil as a mediator of ischemic edema formation in the brain. *Neurosci Lett* 125: 110–112, 1991
- Snyder F. Biochemistry of platelet-activating factor: a unique class of biologically active phospholipids. *Proc Soc Exp Biol Med* 190: 125–135, 1989
- Stewart AG, Dubbin PN, Harris T, Dusting GJ. Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of eicosanoids and superoxide anions from leukocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3215–3219, 1990
- Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 71: 1185–1195, 1991
- Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Summins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84–91, 1989
- Zhang F, Casey RM, Ross ME, Iadecola C. Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 27: 317–323, 1996