

PAF 길항제가 일과성 뇌허혈에 의한 뇌혈류역학 변동에 미치는 효과

이원석* · 고수연
부산대학교 의과대학 약리학교실

Effect of PAF Antagonists on the Alterations in Cerebral Hemodynamics in Transient Cerebral Ischemia

Won Suk LEE* and Su Yeon KO

Department of Pharmacology, College of Medicine, Pusan National University,
Pusan 602-739, Korea

(Received August 2, 1999; accepted September 30, 1999)

Abstract—The present study assessed the cerebroprotective effect of platelet-activating factor (PAF) antagonists in transient cerebral ischemia of rats. Right middle cerebral artery (MCA) of Sprague-Dawley rats was occluded for 2 hours using an intraluminal filament technique, and was reperfused for 6 hours following cerebral ischemia. The infarct area of seven coronal brain slices was measured morphometrically following staining in the 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution. The changes in regional cerebral blood flow (rCBF) and pial arteriolar diameter were measured by laser-Doppler flowmetry and by a videomicroscopy, respectively. The infarct size was significantly reduced by PAF antagonists, BN 52021 and CV-6209, which were administered i.p. 10 min before MCA occlusion. Pretreatment with PAF antagonists significantly restored the changes in pial arterial diameter as well as those in rCBF during the period of cerebral ischemia-reperfusion. PAF antagonists significantly inhibited the inducible nitric oxide synthase activity in the pial arteries ipsilateral to ischemia. These results suggest that PAF antagonists exert a cerebroprotective effect against ischemic brain damage through an improvement of postocclusive cerebral blood flow.

Keywords □ transient cerebral ischemia, PAF antagonists, cerebral hemodynamics

허혈성 신경 손상에는 무수히 많은 생물학적 활성 물질들이 관여한다고 알려져 있는 바, 특히 뇌허혈시에는 phospholipase A₂와 phospholipase C가 활성화됨으로써 많은 유리 지방산과 diacylglycerol이 조직내에 축적되는데 (Panetta 등, 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 등, 1988), 뇌혈관 수축(Kochanek 등, 1988) 및 직접적인 신경 독성(Kornecki와 Ehrlich, 1988) 등을 초래하므로, PAF 길항제들을 뇌혈관 질환에 사용하면 뇌허혈 손상이 유의하게 억제 또는 방지된다는 보고가 많이 나오고 있다.

PAF 길항제들에 의한 뇌허혈 손상 억제제의 기전은 현재로서는 단순히 PAF가 PAF 수용체에 결합하는 것을 방해함으로써 PAF의 작용을 선택적으로 봉쇄한다는 화학구조적 상호 작용에 의하여만 설명되고 있어(Koltai 등, 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; Griffith와 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 있는 중이다.

최근에 들어 PAF 길항제들에 의한 iNOS 유도 억제제가 보고되기 시작하였는데 Arthur 등(1995)은 배양된 대식세포와 혈관 평활근 세포에서의 iNOS 유도 실험에서 PAF

*To whom correspondence should be addressed.

길항제가 iNOS 유도를 봉쇄하였음을 보고하면서 이와 같은 작용 기전에 의하여 PAF 길항제가 내독소성 속으로부터의 보호 작용을 나타낸다고 제시하였다. 이 등(1997)은 PAF 길항제가 허혈성 뇌조직내 백혈구 침윤과 iNOS 활성도를 억제시킴으로써 뇌조직 내에서의 NO 생성을 감소시키고, 그 결과 허혈성 뇌손상의 진행을 차단하게 되어 뇌 보호 작용을 나타낸다고 보고한 바 있다. 그러나 뇌허혈 손상시 초래되는 뇌혈류역학의 변동과 뇌혈관 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 작용 기전을 구명하는 연구의 일환으로서 PAF 길항제가 일과성 뇌허혈을 일으킨 흰쥐의 뇌혈류역학 변동에 미치는 영향을 관찰하고자 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.

일반 수술 조작

실험 동물을 실험 목적에 따라 secobarbital sodium(35 mg/kg, i.p.) 또는 urethane(1 g/kg, i.p.)으로 마취시키고 체온을 37°C로 유지시키기 위하여 항온 전기방식 위에 놓고 양와위로 고정하였다. 기관절개술을 행하여 14G catheter로 기도를 확보하고 gallamine triethiodide(3~5 mg/kg, i.m.)를 투여하여 골격근을 마비시켰다. 동물용 호흡기(Model 683, Harvard Apparatus, USA)를 사용하여 분당 50~60회의 호흡을 유지시켰다. 대뇌동맥에 PE-50 polyethylene 관을 삽관하고 이를 통하여 혈액 gas 및 pH를 측정하고 PaCO₂가 33~45 mmHg가 되도록 호흡을 조절한 후 이를 유지시켰다. 대뇌정맥에도 PE-50 polyethylene 관을 삽관함으로써 약물 투여 경로를 확보하였다.

일과성 뇌허혈

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

실험 동물을 secobarbital sodium(35 mg/kg, i.p.)으로 마취시키고 체온을 37°C로 유지시키기 위하여 전기 방식 위에 놓고 양와위로 고정한 후 복측 정중선을 따라 경부를 절개하고 이복근과 흉골유돌근 사이에 자가보전견인기를 설치하여 견갑설골근을 분리시키고 우측 외경동맥의 분지 중 후두동맥, 상감상선동맥, 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 등글게 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.

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

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

형태계측학적 검색 크기 측정

MCA를 폐쇄하였다가 혈액을 재관류시킨 후 6시간이 경과하였을 때 과량의 secobarbital sodium(100 mg/kg)을 복강내 투여한 후 단두 치사시키고, 전체 뇌를 두개골로부터 적출하여 흰쥐용 뇌 주형(RBM-4000C, ASI) 위에 놓고 전두엽 말단에서부터 후방으로 2 mm 간격으로 절단하여 7개의 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 칼리 프린터(Model CVP-G7, Sony)로 사진을 찍고 각 절편에 생긴 뇌경색 부위의 면적을 면적계(KP-21, Koizumi)로써 측정하였다.

두개창 설치

일반적인 수술 조작이 끝난 후 실험 동물의 체위를 복와위로 변경시키고 두부를 stereotactic frame(DKI, USA)에 고정시켰다. 정중선을 따라 두피를 절개한 후 두개골의 관상 봉합의 미측에 위치한 두정골에 saline-cooled drill(Dremel, USA)을 사용하여 craniotomy(5×5 mm)를 행하고 주위를 dental acrylic으로 둘러 썼다.

폐쇄 두개창의 설치를 위하여 dental acrylic mount 속

에 세 개의 polyethylene tube(두 개는 관류용, 나머지 한 개는 두개내압 측정용)를 심어 놓고, 뇌경막과 지주막을 절개하여 제거함으로써 뇌연막 표면을 노출시켰다. Dental acrylic 위에 직경 12 mm의 cover glass를 놓고 cyanoacrylate를 사용하여 즉시 밀봉시키고 95% O₂와 5% CO₂로 포화시킨 인공 뇌척수액을 관류시켰다. 이때 두개창의 용적은 약 0.8 ml, 그리고 두개내압은 5~8 mmHg로 유지시켰다.

개방 두개창을 설치하는 경우에는 craniotomy만 시행하고 뇌경막과 지주막은 온전하게 보존시킨 채 인공 뇌척수액을 관류시켰다. 사용한 인공 뇌척수액의 조성(mM)은 다음과 같았다: NaCl 132, KCl 2.9, MgCl₂ 1.4, NaHCO₃ 24.6, CaCl₂ 1.2, urea 6.7 및 dextrose 3.7 (pH 7.4).

뇌연막동맥 직경 변동 측정

뇌연막동맥(안정시의 직경 약 35~45 μm)의 직경 변동을 폐쇄 두개창을 통한 videomicroscopy 방법과 width analyzer(Model C3161, Hamamatsu Photonics, Japan)를 사용하여 전 실험 기간 동안 계속 측정하면서 TV monitor에 나타나는 혈관 영상을 video cassette recorder(S-VHS, Mitsubishi, Japan)에 녹화 보존해 두었다가 필요시마다 재생 확인하였다.

국소 뇌혈류 변동 측정

실험 동물을 stereotactic frame에 고정시키고 정중선을 따라 두피를 절개하여 두정골을 노출시킨 후 직경 5~6 mm의 craniotomy를 시행하여 개방 두개창을 설치하였다. Laser-Doppler flowmeter(BLF21, Transonic Instrument, USA)용 needle probe(직경 0.8 mm)를 대뇌 피질 표면에 수직이 되도록 stereotactic micromanipulator를 사용하여 뇌연막동맥에 조심스럽게 접근시키고, 일정 시간 동안 안정시킨 후 실험 protocol에 따라 국소 뇌혈류량을 측정하였다. Laser-Doppler flowmeter에 의하여 측정된 국소 뇌혈류량의 변동은 MacLab(4s, AD Instruments, Australia)과 Macintosh computer(Power Macintosh 7500/100)로 구성된 data acquisition system에 기록하였다.

Inducible Nitric Oxide Synthase 활성도 측정

허혈-재관류 시행 동측의 뇌연막동맥내 iNOS 활성도는 Bredt 및 Snyder(1989)의 방법을 약간 변형시켜 단위 면적과 단위 시간당 L-[³H]arginine이 L-[³H]citrulline으로 전환되는 양을 측정하였다. 실험 동물의 두부를 절단한 즉시 뇌를 적출하여 급냉시키고 얼음판 위에서 MCA 폐쇄 동측의 뇌연막동맥을 적출한 직후 액화 질소에 담구어 급속 냉동시켜 보관하였다가 실험에 사용하였다. 적출 뇌연막동맥을 얼음판 위에 놓여 있는 0.5 ml Eppendorf tube 내에 넣고 25 μl의 저장성 용액(hypotonic medium: 5 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4 at 4°C)에서 1~2분 동안 처리하였다가 액화 질소에서의 냉동 및 해동 과정을 2회 반복 처

리하였다. 그 후 냉장 원심분리기(4°C, Mega 17R, 한일)에서 10,000×g로 15분간 원심시킨 후 상등액을 구하여 이 상등액 25 μl를 reaction buffer(50 mM HEPES, 1 mM NADPH, 5 mM EGTA, 50 μM tetrahydrobiopterin, 1 μM flavin adenine dinucleotide, 1 μM flavin mononucleotide, pH 7.4) 0.1 ml 및 희석 L-[³H]arginine(1 μM) 25 μl와 함께 실온에서 10분간 반응시켰다. 미리 차갑게 만든 stop solution(20 mM HEPES, 20 mM EGTA, 2 mM EDTA, pH 5.5) 2 ml를 가하여 반응을 중지시키고, 이것을 Na⁺ form으로 미리 전환시킨 AG 50W-X8 resin column으로 통과시켰다. 증류수 2 ml로써 AG 50W-X8 resin column을 세척하고, 이때 얻은 eluate를 scintillation vial에 수집하여 Optifluor scintillant(Packard) 15 ml를 가하여 혼합시킨 후 liquid scintillation counter(Tri-Carb 2100TR, Packard)에서 radioactivity를 측정하였다. 혈관 영상을 실체현미경(SV6, Zeiss)에 연결된 비디오 칼러 프린터(Model CVP-G7, Sony)로 사진을 찍고 각 혈관 표본의 면적을 면적계(KP-21, Koizumi)로써 측정하여 단위 면적당의 각 NOS 활성도(pmol/mm²/min)를 계산하였다.

사용 약물

본 연구에 사용된 PAF 길항제는 BN 52021(Henri Beaufour)과 CV-6209(Sigma)이었고, 이들의 stock solution을 0.9% 생리식염수로 희석하여 MCA 폐쇄 10분 전에 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 β-NADPH, tetrahydrobiopterin, flavin adenine dinucleotide 및 flavin mononucleotide(이상 Sigma) 등이었고, 기타 일반 시약들은 특급 제품을 사용하였다.

통계 처리

모든 실험치는 평균±평균의 표준오차로 표시하였고, 각 군 사이의 유의성은 반복측정 이원 분산분석법으로 분석한 후 Dunnett의 다중비교법으로 사후 검정하여 P 값이 0.05 미만인 것을 유의하다고 판정하였다.

실험 결과

뇌허혈 동물의 생리학적 변수

뇌허혈-재관류 동안에 실험동물의 생리학적 변수(평균동맥압, 심박동수, pH, 동맥혈의 산소 분압, 동맥혈의 이산화탄소 분압 및 직장내 온도 등)의 변동을 관찰하였을 때 뇌허혈 전과 1시간 후, 그리고 혈액 재관류 6시간 후 등에 있어서 모두 유의한 변동은 초래되지 아니하였다(Table I).

뇌경색의 크기

MCA를 2시간 동안 폐쇄시켰다가 혈액을 6시간 동안 재관류시켜 주는 일과성 뇌허혈을 흰쥐에게 일으키고 전체

Table I. Changes in physiological parameters

| Groups | MABP (mmHg) | HR(bpm) | pH | PaO ₂ (mmHg) | PaCO ₂ (mmHg) | Rectal temperature(°C) |
|------------------------|-------------|----------|-------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|
| Vehicle (17) | | | | | | |
| Before ischemia | 110 ± 3 | 413 ± 13 | 7.41 ± 0.02 | 80 ± 3 | 44 ± 1 | 36.9 ± 0.1 |
| 1 hr after ischemia | 108 ± 4 | 422 ± 12 | 7.42 ± 0.02 | 81 ± 2 | 45 ± 2 | 37.0 ± 0.2 |
| 6 hr after reperfusion | 107 ± 5 | 411 ± 14 | 7.41 ± 0.02 | 81 ± 3 | 43 ± 1 | 37.4 ± 0.2 |
| BN 52021 (17) | | | | | | |
| Before ischemia | 109 ± 3 | 414 ± 12 | 7.41 ± 0.02 | 80 ± 2 | 43 ± 1 | 37.0 ± 0.1 |
| 1 hr after ischemia | 108 ± 3 | 419 ± 11 | 7.41 ± 0.03 | 81 ± 3 | 43 ± 2 | 37.0 ± 0.2 |
| 6 hr after reperfusion | 108 ± 4 | 415 ± 13 | 7.40 ± 0.03 | 80 ± 3 | 42 ± 2 | 37.1 ± 0.2 |
| CV-6209 (17) | | | | | | |
| Before ischemia | 110 ± 3 | 413 ± 13 | 7.41 ± 0.02 | 80 ± 2 | 43 ± 2 | 37.0 ± 0.1 |
| 1 hr after ischemia | 109 ± 4 | 417 ± 12 | 7.40 ± 0.02 | 80 ± 3 | 43 ± 2 | 37.0 ± 0.2 |
| 6 hr after reperfusion | 108 ± 5 | 414 ± 12 | 7.40 ± 0.03 | 80 ± 3 | 42 ± 2 | 37.1 ± 0.2 |

Data are expressed as mean ± SEM. Numbers in parentheses represent the numbers of animals. BN 52021 and CV-6209 were administered i.p. 10 min before cerebral ischemia at a dose of 1 mg/kg, respectively. MABP, mean arterial blood pressure; HR, heart rate; bpm, beats per minute; PaO₂, partial pressure of oxygen in arterial blood; PaCO₂, partial pressure of carbon dioxide in arterial blood.

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 폐쇄 10분 전에 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 유의

하게 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).

국소 뇌혈류의 변동

뇌허혈-재관류 동안의 국소 뇌혈류의 변동을 laser-Doppler flowmetry 법으로 측정된 결과 대조군의 경우 국소 뇌혈류는 뇌허혈 기간 동안 거의 차단되었고, 혈액 재관류와 함께 일시적인 hyperemia를 보인 후 회복되었다가 시간 경과에 따라 점차 감소되어 재관류 6시간 후에는 기저치의 약 70.6±5.8% 수준을 유지하였다. 그러나 PAF 길항제 전처치군에서는 혈액 재관류 후의 국소 뇌혈류 감소가 대조군에 비하여 유의하게 완만한 감소를 보이며 재관

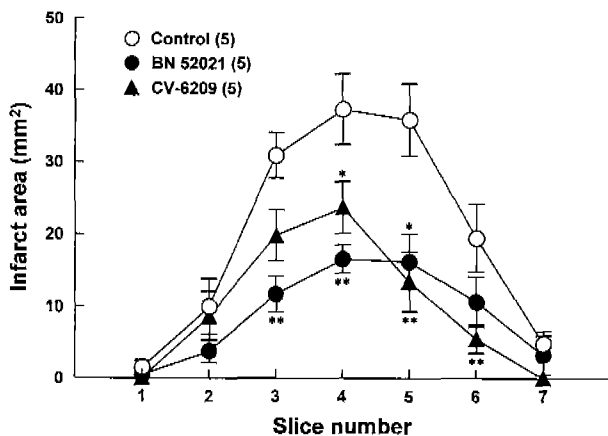


Fig. 1. Effect of PAF antagonists on the infarct area of the ischemic rat brain. Transient cerebral ischemia was induced by 2-hour occlusion of the right middle cerebral artery (MCA) followed by 6-hour reperfusion. BN 52021 and CV-6209 were administered i.p. 10 minutes before MCA occlusion, respectively. Numbers in parentheses represent the numbers of animals. *P<0.05; **P<0.01 vs. corresponding control value.

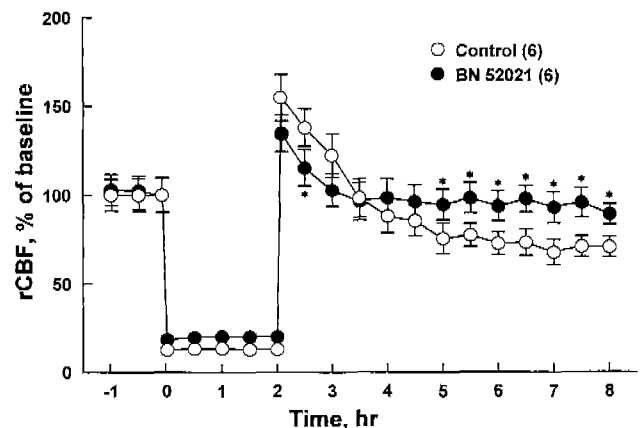


Fig. 2. Effect of BN 52021 (1 mg/kg, i.p.) on the changes in regional cerebral blood flow (rCBF) induced by cerebral ischemia-reperfusion. Numbers in parentheses represent the numbers of animals. *P<0.05 vs. corresponding control value.

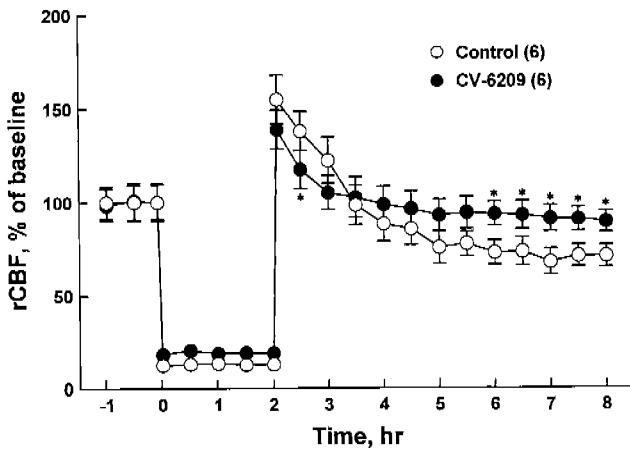


Fig. 3. Effect of CV-6209 (1 mg/kg, i.p.) on the changes in rCBF induced by cerebral ischemia-reperfusion. Numbers in parentheses represent the numbers of animals. *P<0.05 vs. corresponding control value.

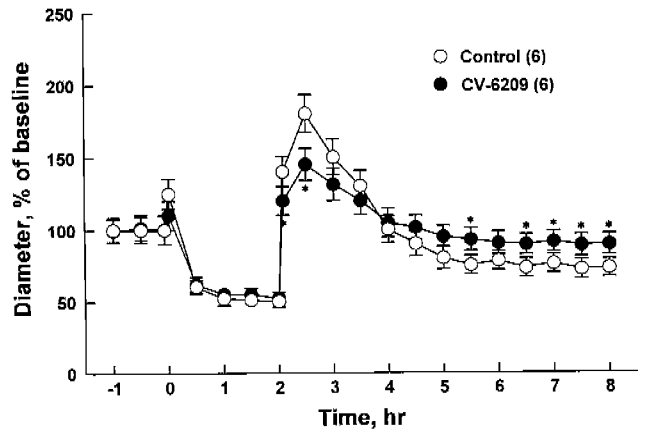


Fig. 5. Effect of CV-6209 (1 mg/kg, i.p.) on the changes in rat pial arterial diameter induced by cerebral ischemia-reperfusion. Numbers in parentheses represent the numbers of animals. *P<0.05 vs. corresponding control value.

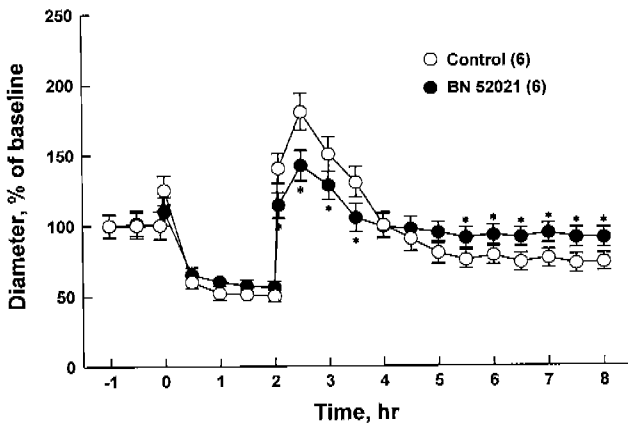


Fig. 4. Effect of BN 52021 (1 mg/kg, i.p.) on the changes in rat pial arterial diameter induced by cerebral ischemia-reperfusion. Numbers in parentheses represent the numbers of animals. *P<0.05 vs. corresponding control value.

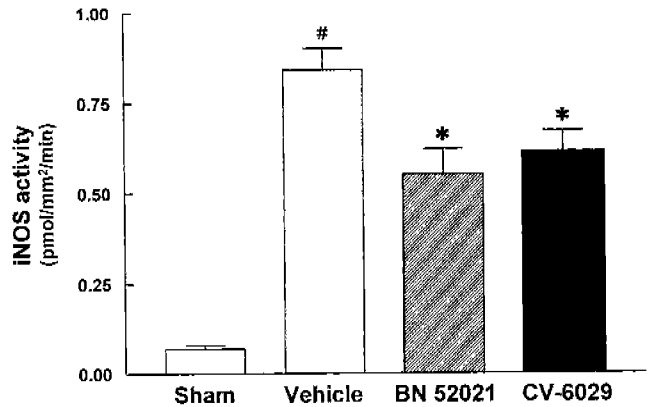


Fig. 6. Effect of PAF antagonists on iNOS activity in pial arteries of rats that were subjected to transient cerebral ischemia. Animals were pretreated with BN 52021 or CV-6209 (1 mg/kg, i.p., respectively) 10 min before MCA occlusion. The number of experiments in each group was 5. #P<0.001 vs. sham group. *P<0.05 vs. vehicle group.

류 6시간 후에는 기저치의 약 90% 수준을 유지하였다(Fig. 2 및 3).

뇌연막동맥의 직경 변동

뇌허혈-재관류에 의한 뇌연막동맥의 직경 변동은 Fig. 4 및 5에서 보는 바와 같이 대조군(안정시의 직경, 42.3±5.6 μm)의 경우 뇌허혈 유도시 일시적인 증가를 보인 후 감소하였고, 혈액 재관류시 현저히 증가하였다가 시간 경과와 함께 급격히 감소하여 재관류 6시간 후에는 기저치의 73.0±6.2%를 유지하였다. 그러나 PAF 길항제 전처치군(안정시의 직경, 42.5±5.5 μm)에서는 대조군에 비하여 뇌허혈 동안의 뇌연막동맥의 직경 감소가 유의하게 적었고(BN 52021 군: F_(1,40)=5.88, P=0.0199; CV-6209 군: F_(1,40)=5.41, P=0.0252), 재관류 초기의 직경 증가 반응도 약하였으며

(P<0.05), 그 이후의 직경 감소 속도도 완만하여 (P<0.01) 재관류 6시간 후에는 기저치의 약 90% 수준(BN 52021군, 90.3±7.1%; CV-6209군, 89.4±7.5%)을 유지하였다.

Inducible Nitric Oxide Synthase 활성도

일과성 뇌허혈에 의한 뇌연막동맥내 iNOS의 활성화에 대한 PAF 길항제들의 효과를 관찰하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 일과성 뇌허혈에 의한 뇌연막동맥내의 iNOS 활성도(0.84±0.06 pmol/mm²/min)는 sham군(0.07±0.01 pmol/mm²/min)에 비하여 현저히 증가되었다(P<0.001). 그러나 PAF 길항제인 BN 52021이나 CV-6209(각각 1 mg/kg, 복강내 투여) 처치군에서는 허혈-재관류에 의하여 증가되었던 iNOS 활성도가 각각 0.55±0.07 및 0.61±0.06 pmol/

mm²/min로 유의하게 억제되었다(각각 P<0.05).

고 찰

본 연구는 뇌허혈-재관류를 시행한 흰쥐에서 PAF 길항제인 BN 52021과 CV-6209가 뇌경색의 크기를 감소시키고, 허혈-재관류 동안에 초래되는 뇌연막동맥의 직경 변동 및 국소 뇌혈류의 변동을 유의하게 개선시키며, 뇌연막동맥내에 증가된 iNOS 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 등, 1988)과 뇌혈관 수축(Kochaneck 등, 1988)을 야기할 뿐만 아니라 직접적인 신경 독성(Komecki와 Ehrlich, 1988)을 초래할 수도 있다고 한다. Francescangeli와 Goracci(1989)는 흰쥐의 뇌에서도 효소학적으로 PAF가 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 1시간 후에 해마에서 210%, 대뇌 피질에서 168%, 시상에서 169% 증가하였다가, 6시간 이후부터는 정상 수준으로 회복되었다고 보고하였다. 이러한 보고들로 미루어 볼 때 뇌허혈 손상의 발생 및 진행에 있어서 PAF가 매우 중요하게 관여한다는 추측을 가능케 해 준다.

최근 여러 장기 내에서의 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 Ca²⁺ 농도에 의해서 활성화되어 NO를 단계적으로 생산하지만, iNOS는 cNOS와는 달리 세포내 Ca²⁺ 농도에 의존하지 않고 안정시에는 소량으로 존재하다가 endotoxin이나 cytokines, 즉 lipopolysaccharide나 interferon- γ 에 의해서 유도되어 일단 발현되면 NO를 지속적으로도 폭발적으로 생산함으로써 세포 독작용을 나타낸다. 최근 Iadecola 등(1995; 1996)에 의하여 뇌허혈이 초래된 이후에 뇌조직내에서 iNOS의 발현이 현저히 증가한다는 것이 증명되었고, 따라서 iNOS의 유도

그 효소 활성도를 억제시켜 줌으로써 뇌허혈 손상을 감소시키고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다(김 등 1996; Zhang 등 1996). 본 연구에서 흥미있는 것은 PAF 길항제에 의하여 뇌경색의 크기가 유의하게 감소되었을 뿐만 아니라 허혈성 뇌연막동맥내의 iNOS 활성도가 유의하게 억제되었다는 사실로서 현재까지의 여러 보고들에서는 찾아보기 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 부분별하게 억제시킴으로써 뇌허혈 손상 치료에 사용시 많은 부작용과 단점을 가지고 있어 임상 적용이 쉽지 않다(Carreau 등, 1994; Niu 등, 1994). 그러나 PAF 길항제들은 세포내와 세포외에 모두 존재하는 PAF 수용체 중에서 세포내 PAF 수용체로의 접근 능력을 가지고 있기 때문에(Koltai 등, 1991) PAF 길항제에 의하여 세포 내에서의 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.

한편, 뇌허혈-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 대사됨으로써 생성되는 여러 산소 유리기들에 의하여 뇌조직 손상이 초래된다(Armstead 등, 1988; Traystman, 1991). 최근에 Nelson 등(1992)과 Dugan 등(1995)은 뇌허혈-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 뇌허혈-재관류 손상에 의한 신경세포의 손상이 유의하게 감소되었음을 보고하였다. PAF 길항제가 호중구에서의 superoxide 생성을 억제하는 능력도 가지고 있다는 Földes-Filep 등(1987)과 Filep 및 Földes-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 지속적인 연구의 필요성을 남기고 있다.

이상을 종합해 보면 PAF 길항제는 허혈성 뇌혈관내 iNOS 활성도를 억제시킴으로써 NO 생성을 감소시키고, 뇌허혈 후의 뇌혈류역학을 개선시켜 줌으로써 허혈성 뇌손상의 진행을 차단하게 되어 뇌보호 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(기초의학 BM 97-021-F00090)와 1996년도 보건 의료기술연구개발사업(HMP-96-M-2-1043) 및 부산대학교 기성회 재원 학술연구조성비 (95)의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

참고문헌

- Armstead, W. M., Mirro, R., Busija, D. W. and Leffler, C. W. (1988). Postischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain. *Am. J. Physiol.* **255**, H401-403.
- Arthur, J. F., Shahin, S. and Dusting, G. J. (1995). PAF antagonists block induction of nitric oxide synthase in cultured macrophages and vascular smooth muscle cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **22**, 452-454.
- Bederson, J. B., Pitts, L. H., Germano, S. M., Nishimura, M. C., Davis, R. L. and Bartkowski, H. M. (1986). Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* **17**, 1304-1308.
- Braquet, P., Spinnewyn, B., Blavet, N., Marcheselli, V., Rosawska, M. and Bazan, N. G. (1988). Platelet activating factor as a mediator in cerebral ischemia and related disorders. *Biochem. Biomed. Acta* **47**, 195-218.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 9030-9033.
- Carreau, A., Duval, D., Poignet, H., Scatton, B., Vige, X. and Nowicki, J. P. (1994). Neuroprotective efficacy of N⁰-nitro-L-arginine after focal cerebral ischemia in the mouse and inhibition of cortical nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* **256**, 241-249.
- Chan, P. H. (1994). Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol.* **4**, 59-65.
- Dugan, L. L., Lin, T. S., He, Y. Y., Hsu, C. Y. and Choi, D. W. (1995). 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.
- Filep, J. and Földes-Filep, E. (1988). Platelet-activating factors, neutrophil granulocyte function and BN 52021. In *Ginkgolides-Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives* (P. Braquet, Ed.), pp. 151-159. JR Prous Science Publishers, Barcelona.
- Földes-Filep, E., Braquet, P. and Filep, J. (1987). 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.
- Francescangeli, E. and Goracci, G. (1989). The de novo biosynthesis of platelet-activating factor in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 107-112.
- Griffith, O. W. and Stuehr, D. J. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 707-736.
- Iadecola, C., Xu, X., Zhang, F., El-Fakahany, E. E. and Ross, M. E. (1995). Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**, 52-59.
- Iadecola, C., Zhang, F., Casey, R., Clark, H. B. and Ross, M. E. (1996). Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* **27**, 1373-1380.
- Kochanek, P. M., Nemoto, E. M., Melick, J. A., Evans, R. W., Burke, D. F. (1988). Cerebrovascular and cerebrometabolic effects of intracarotid infused platelet activating factor in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **8**, 546-551.
- Koltai, M., Hosford, D., Guinot, P., Esanu, A. and Braquet, P. (1991). Platelet-activating factor (PAF): a review of its effects, antagonists and future clinical implications. *Drugs* **42**, 9-29.
- Kornecki, E. and Ehrlich, Y. H. (1988). Neuroregulatory and neuropathological actions of the ether-phospholipid platelet-activating factor. *Science* **240**, 1792-1794.
- Kumar, R., Harvey, S. A. K., Kester, M. K., Hanahan, D. J. and Olson, M. S. (1988). Production and effects of platelet-activating factor in the rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* **963**, 375-383.
- Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S. and Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84-91.
- Moncada, S. (1992). The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* **145**, 201-227.
- Nelson, C. W., Wei, E. P., Povlishock, J. T., Kontos, H. A. and Moskowitz, M. A. (1992). Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am. J. Physiol.* **263**, H1356-H1362.
- Nishida, K. and Markey, S. P. (1996). Platelet-activating factor in brain regions after transient ischemia in gerbils. *Stroke* **27**, 514-519.

- Niu, X. F., Smith, C. W. and Kubes, P. (1994). Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ. Res.* **74**, 1133-1140.
- Panetta, T., Marcheselli, V. L., Braquet, T. and Bazan, N. G. (1989). 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. N. Y. Acad. Sci.* **559**, 340-351.
- Snyder, F. (1989). Biochemistry of platelet-activating factor: a unique class of biologically active phospholipids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **190**, 125-135.
- Stewart, A. G., Dubbin, P. N., Harris, T. and Dusting, G. J. (1990). 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. U.S.A.* **87**, 3215-3219.
- Traystman, R. J., Kirsch, J. R. and Koehler, R. C. (1991). Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol.* **71**, 1185-1195.
- Zhang, F., Casey, R. M., Ross, M. E. and Iadecola, C. (1996). Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke* **27**, 317-323.
- 김상호, 이원석, 박규현. (1996). 국소 뇌허혈 손상에 대한 유도성 Nitric Oxide 합성 효소 억제제의 보호 효과에 관한 연구. *부산의대학술지* **36**, 225-236.
- 이원석, 노순기, 박규현. (1997). PAF 길항제가 허혈성 대뇌 피질내 Nitric Oxide 합성에 미치는 영향. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **1**, 665-672.