

급성기 허혈성 뇌졸중에서 혈소판과 백혈구의 상호작용

연세대학교 의과대학 신경과학교실,¹ 국민건강보험공단 일산병원 신경과,² 한림대학교 의과대학 신경과학교실³

송동범¹ · 이준홍^{1,2} · 민양기^{1,3} · 김경환¹

Platelet-Leukocyte Interaction in Acute Ischemic Stroke

Dong Beom Song, MD¹, Jun Hong Lee, MD^{1,2}, Yang Ki Minn, MD^{1,3} and Gyung Whan Kim, MD, PhD¹

¹Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

²Department of Neurology, National Health Insurance Corporation Ilsan Hospital, Goyang, Korea

³Department of Neurology, Hallym University College of Medicine, Chuncheon, Korea

Background: Not only platelet but also leukocyte plays a crucial role in the pathophysiology of atherosclerosis and arterial thrombosis which is major cause of ischemic stroke. Macrophage-1 antigen (Mac-1) is up-regulated on activated leukocytes and has been shown to be a crucial regulator of leukocyte recruitment by promoting leukocyte firm attachment to adherent platelets and fibrinogens in injured artery or atheromatous plaque. To clarify role of leukocyte activation in arterial thrombosis, we observed Mac-1 expression of leukocyte with P-selectin expression of platelet and circulating level monocyte-platelet aggregates, both of which are well known platelet activation markers. **Methods:** Mac-1 expression of leukocyte, P-selectin expression of platelet and circulating level of monocyte-platelet aggregates were analyzed in 28 patients at acute and convalescent phase of stroke, and in 21 control subjects. **Results:** Mac-1 expression of leukocyte was higher in acute phase of stroke than convalescent phase of stroke ($P=0.032$) and control group ($P=0.045$). P-selectin expression of platelet and circulating level of monocyte-platelet aggregates revealed same pattern as Mac-1 expression of leukocyte, and all these three showed a positive correlation. **Conclusion:** These findings support the role of leukocyte activation and platelet-leukocyte interaction in arterial thrombosis. Mac-1 of leukocyte and P-selectin of platelet may be a new therapeutic target of arterial thrombosis including ischemic stroke.

J Neurocrit Care 2008;1:43-49

KEY WORDS: Mac-1 · Leukocyte activation · Inflammation · Stroke.

서 론

허혈성 뇌졸중은 전 세계적으로 사망 및 장애의 주요한 원인 중 하나이며, 고령화와 함께 그 발생빈도가 더욱 증가하고 있어 사회경제적 중요성이 매우 높은 질환이다.¹

허혈성 뇌졸중은 다양한 원인에 의해 발생할 수 있지만, 가장 중요한 원인은 죽상경화반(atherosclerotic plaque)에서 형성된 혈전에 의한 혈관폐색이다.² 죽상경화반의 내피세포 및 섬유 덮개(fibrous cap)가 파열되면 thrombogenic lipid core가 혈액에 노출되어 이 곳에 혈소판이 부착되

고, 이후 혈소판이 활성화되면서 응집반응이 일어나 혈전이 형성된다.³ 이러한 일련의 과정에서 혈소판의 활성화는 핵심적인 역할을 담당하며,⁴ 따라서 혈소판의 활성화를 나타내는 인자들에 대한 연구는 이미 활발히 진행된 상태이다. P-selectin(CD62p)은 혈소판의 활성화에 따라 세포질내의 α granule에서 혈소판의 세포막 표면으로 발현되어 백혈구의 P-selectin glycoprotein ligand-1(PSGL-1)과 결합하는 물질로서 혈소판의 활성도를 나타내는 대표적 인자이다.⁵

하지만, 최근의 연구들에 따르면 죽상경화반의 성장과정과 혈전형성의 첫 단계인 내피세포 및 섬유 덮개의 파열, 그리고 이후 혈소판의 활성화 및 혈전형성에까지 백혈구에 의한 염증반응이 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다.³ 특히 혈전형성과정에서는 활성화된 혈소판에 백혈구가 결합한 후 상호작용에 의해 서로를 더욱 활성화시키며,

Address for correspondence: Gyung Whan Kim, MD, PhD
Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine, 260 Seongsan-no, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82-2-2228-1609, Fax: +82-2-393-0705
E-mail: gyungkim@yuhs.ac.kr

이러한 백혈구-혈소판의 결합 중 말초혈액 내에서 측정된 단핵구-혈소판 응집체는 혈소판의 활성도를 P-selectin 보다 더 민감하게 반영하는 것으로 알려져 있다.⁵

이렇게 백혈구와 혈소판의 결합 및 상호작용이 혈전의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있지만, 구체적으로 어떤 인자들에 의해 서로간의 결합 및 상호작용이 일어나는 지에 대해서는 현재도 연구가 진행 중이다.⁶ 위에서 언급한 혈소판의 P-selectin은 백혈구의 PSGL-1과 결합하여 백혈구를 활성화시키는 것으로 알려져 있고, 이외에도 백혈구의 CD40이 활성화된 혈소판에서 발현되는 CD40 ligand(CD154)와 결합하여 서로를 더욱 활성화시키는 중요한 인자로 알려져 있다.⁷ 최근에는 활성화된 백혈구에서 발현이 증가되며, intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), ICAM-2 및 fibrinogen, glycosaminoglycan 등에 결합해서 염증반응의 핵심적 역할을 담당하는 macrophage-1 antigen(Mac-1, CD11b/CD18)이 혈소판의 GP1b α 에도 결합하여 혈소판과 백혈구의 상호작용에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.⁸ 현재까지 in vivo에서 말초혈액 내 백혈구의 Mac-1의 발현도에 대한 연구는 관상동맥내 스텐트삽입환자⁹와 급성 관상동맥증후군 환자(acute coronary syndrome)¹⁰를 대상으로 한 연구가 있지만, 아직까지 허혈성 뇌졸중 환자를 대상으로 하는 임상실험은 없는 상태이다. 따라서, 본 실험에서는 이미 널리 알려진 대표적 혈소판 활성인자인 혈소판의 P-selectin 발현도, 단핵구-혈소판 응집체와 함께 백혈구의 Mac-1 발현도를 허혈성 뇌졸중 환자에서 유세포분석기(flow cytometry)를 이용하여 측정했고, 또한 이들 인자의 시간에 따른 변화를 분석했다.

연구대상 및 방법

연구대상

본 연구는 2007년 8월부터 2008년 1월까지 증상 발생 후 72시간 이내에 내원하여 연세대학교 신촌세브란스병원 신경과에 입원한 허혈성 뇌졸중 환자 중 임상연구에 동의하고 아래에 기술한 일정에 따라 채혈이 완료된 28명의 환자를 대상으로 하였다. 증상 발생 후 72시간이 경과한 경우는 허혈성 뇌졸중의 급성기가 지난 것으로 판단되어 연구대상에서 제외했고, 이외에도 최근 3개월 이내 외상이나 수술을 받은 병력이 있는 환자, 만성 간질환환자, 만성 신부전환자, 암환자, 만성 염증성질환자, 그리고 허혈성 뇌졸중 발생 전후에 흡연성 폐렴 등의 염증성 질환을 앓은 환자는 백혈구의 활성도에 영향을 미칠 수 있는 외부요인을

가지고 있는 것으로 판단되어 연구대상에서 제외했다.

대조군은 신경과 외래 및 입원 환자 중에서 최근 1년 이내에 허혈성 뇌졸중이나 급성 관상동맥증후군이 없었던 21명의 환자들을 대상으로 하였다. 대조군은 연령, 성별 및 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 흡연력 등 죽상경화증(atherosclerosis)의 위험인자가 환자군과 비슷하게 구성되도록 했다.

본 연구는 연세대학교 신촌세브란스병원 임상연구위원회의 승인 후에 진행되었다.

임상정보분석

모든 환자들에 대해 자세한 병력청취를 통해 당뇨, 고혈압, 흡연력, 심장병 등의 과거력과 약물복용력을 확인했고, 특징적 병력 및 신경학적 검사, 그리고 MRI 촬영을 통해 허혈성 뇌졸중으로 진단했다. 전혈검사, 지질검사 및 erythrocyte sedimentation rate(ESR)를 측정하고 electrocardiography를 촬영했으며, Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment(TOAST)에서 정한 허혈성 뇌졸중의 원인에 따른 분류(TOAST classification)²를 위해 필요한 경우 echocardiography, 24 hr holter monitoring 등 추가적 검사를 진행했다. 모든 환자는 임상적 판단에 따라 항혈소판제 혹은 항응고제를 투여하였고, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A(HMG Co-A) reductase inhibitor, 즉 statin을 사용했다.

유세포분석

환자군은 입원 3일 이내 한차례(급성기), 그리고 증상 발생 3~4개월 경과 후 외래에서 다시 한차례(회복기) 채혈했고, 대조군은 연구 동의 후 한차례만 채혈했다. 모든 혈액은 3.2% sodium citrate tube에 채취하였다.

혈소판 및 백혈구에 대한 면역염색 및 유세포분석은 기존의 방법¹¹을 약간 변형하여 진행했다. Sodium citrate tube에 채혈된 혈액 1 ml에 9 ml의 RBC lysis solution(8.3 g NH₄Cl, 1.0 g KHCO₃, 1.8 ml of 5% EDTA in 1L of DW)을 첨가한 후 상온에서 10분간 반응시키고 원심분리(3,000 g, 10min)를 통해 상청액을 제거한 다음 침전물을 phosphate buffered saline(PBS)로 세 차례 씻었다. 이 용액을 다시 원심분리(1,500 g, 10min)하여 상청액을 제거한 다음 침전물을 200 ul의 resuspension solution에 희석하였다. 희석한 용액 중 100 ul을 각각의 실험에 따라 적절한 20 ul의 단클론항체에, 나머지 100 ul는 각각의 단클론항체에 대한 음성대조항체에 15분간 상온에서 반응시킨 후 50 ul의 0.37% paraformaldehyde(PFA)을 첨가하여 고정 후 유세포분석 전까지 0~4°C로 보관하였다. 유세포분

석은 FACSCalibur (Becton Dickinson [BD] Biosciences, San Jose, California, USA) 을 이용했다.

혈소판의 P-selectin 발현도

혈소판의 P-selectin 발현도를 측정하기 위한 단클론항체는 phycoerythrin (PE) conjugated CD62p (PE-CD62p, BD Bioscience, San Jose, California, USA) 와 이의 음성대조로 PE conjugated IgG₁ (PE-IgG₁, BD Bioscience, San Jose, California, USA) 가 사용되었다. 유세포분석은 CellQuest ver3.3 (BD Biosciences, San Jose, California, USA) 을 사용하여 forward light scatter characteristic (FSC) 와 side scatter characteristic (SSC) 를 log amplification 한 후 진행했다. 혈소판 부위는 특징적인 혈소판의 FSC값과 SSC값을 이용해 gating 했고, 이 부위에서 PE-CD62p의 양성률을 혈소판의 P-selectin 발현도로 정의했다. 혈소판 부위에서 PE-IgG₁의 형광도를 이용해 비특이적 결합을 제외함으로써 PE-CD62p의 양성률을 구할 수 있었다.

단핵구-혈소판 응집체

단핵구-혈소판 응집체를 측정하기 위한 단클론항체로는 fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated CD42b (FITC-CD42b, BD Bioscience, San Jose, California, USA) 와 이의 음성대조로 FITC conjugated IgG₁ (FITC-IgG₁, BD Bioscience, San Jose, California, USA) 가 사용되었고, 단핵구 부분의 gating을 위해 PE conjugated CD14 (PE-CD14, BD Bioscience, San Jose, California, USA) 가 추가로 사용되었다. 유세포분석은 CellQuest ver3.3을 사용하여 FSC와 SSC를 linear acquisition한 후 진행했다. 단핵구 부위는 SSC값과 PE-CD14의 형광도를 이용하여 gating할 수 있었다. 이 부위에서 FITC-CD42b의 양성률을 단핵구-혈소판 응집체로 정의했다. 단핵구 부위에서 FITC-IgG₁의 형광도를 이용해 비특이적 결합을 제외함으로써 FITC-CD42b의 양성률을 구할 수 있었다.

백혈구의 Mac-1 발현도

백혈구의 Mac-1 발현도를 측정하기 위한 단클론항체로는 PE conjugated CD11b (PE-CD11b, BD Bioscience, San Jose, California, USA) 와 이의 음성대조로 PE conjugated IgG₁ (PE-IgG₁, BD Bioscience, San Jose, California, USA) 가 사용되었고, 백혈구 부분의 gating을 위해 FITC conjugated CD45 (FITC-CD45, BD Bioscience, San Jose, California, USA) 가 추가로 사용되었다. 유세포

분석은 CellQuest ver3.3을 사용하여 FSC와 SSC를 linear acquisition한 후 진행했다. 백혈구 부분은 FSC값과 FITC-CD45의 형광도를 이용하여 gating할 수 있었다. 이 부위의 PE-CD11b 발현도를 Mac-1 발현도로 정의했다.

통계분석

본 연구에서 결과는 평균±표준편차 (Mean±SD) 로 표기하였다. 그룹간의 검정은 연속변수의 경우는 Mann-Whitney *U* test 혹은 Kruskal-Wallis test를 사용했고, 비연속변수의 경우는 Fisher's exact test를 사용했다. 그룹 내에서 시간에 따른 변화에 대한 검정은 Wilcoxon signed ranks test를 사용했다. 상관분석은 Spearman's rank correlation coefficient를 사용했다. 모든 통계분석은 SPSS 15.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 을 이용했고, 양측검정을 사용했으며 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

대조군과 환자군의 임상정보

성별, 연령을 비롯해서 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 흡연력 등 죽상경화증 위험인자도 양군간에 유의한 차이가 없었다. 뇌졸중의 과거력, 관상동맥협착증, 말초동맥협착증도 양군간에 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

환자군 내의 일과성 뇌허혈과 뇌경색의 빈도 및 뇌경색의 원인에 따른 TOAST classification은 Table 2에 나타났다. 환자군 내에 일과성 뇌허혈이 5명 (17.9%), 뇌경색은 23명 (82.1%) 였으며, 뇌경색 환자의 TOAST classification상에서는 large-artery atherosclerosis가 7명 (25%), small-vessel occlusion이 5명 (17.9%), cardioembolism이 3명 (10.7%), more than two causes가 1명 (3.6%), 그리고 stroke of undetermined etiology가 7명 (25%) 이었다.

혈소판의 P-selectin 발현도

대조군과 급성기·회복기 환자군의 혈소판의 P-selectin 발현도는 Fig. 1에 나타났다. 급성기 환자군의 P-selectin 발현도 ($12.6 \pm 4.0\%$) 은 회복기 환자군 ($11.0 \pm 3.7\%$) 에 비해 유의하게 증가되어 있었으며 ($P=0.01$), 대조군 ($9.5 \pm 3.8\%$) 에 비해서도 유의하게 높았다 ($P=0.009$). 회복기 환자군과 대조군은 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($P=0.189$).

단핵구-혈소판 응집체

대조군과 급성기·회복기 환자군의 단핵구-혈소판 응집체는 Fig. 2에 나타났다. 급성기 환자군의 단핵구-혈소

TABLE 1. Baseline characteristics of patient and control group

Variables	Control group (n=21)	Patient group (n=28)	P
Age (y)	64.4 ± 9.6	64.7 ± 12.7	0.82
Male % (n)	47.6 (10)	53.6 (15)	0.78
Hypertension % (n)	57.1 (12)	75.0 (21)	0.23
Diabetes mellitus % (n)	14.3 (3)	17.9 (5)	1
Current smoking % (n)	23.8 (5)	28.6 (8)	0.76
Hypercholesterolemia % (n)	14.3 (3)	17.9 (5)	1
Previous stroke % (n)	9.5 (2)	14.3 (4)	0.69
Coronary artery disease % (n)	4.8 (1)	10.7 (3)	0.63
Peripheral artery disease % (n)	0 (0)	10.7 (3)	0.25
Atrial fibrillation % (n)	9.5 (2)	14.3 (4)	0.69
Antiplatelet agent before admission % (n)	9.5 (2)	25.0 (7)	0.27
Anticoagulation before admission % (n)	4.8 (1)	7.1 (2)	1
Leukocyte, × 10 ³ /uL		7.8 ± 2.7	
Platelet count, × 10 ³ /uL		257.0 ± 67.8	
Erythrocyte sedimentation rate		18.0 ± 18.2	
Total cholesterol (mg/dL)		169 ± 28.4	
Triglyceride (mg/dL)		121.5 ± 97.7	
High density lipoprotein (mg/dL)		45.9 ± 11.9	
Low density lipoprotein (mg/dL)		102.2 ± 25.5	
Fasting glucose (mg/dL)		109.9 ± 37.9	

Values are mean ± standard deviation

TABLE 2. Frequency of TIA, stroke, and stroke subtypes by TOAST classification

	Patient group (n=28)
Stroke % (n)	82.1 (23)
Large-artery atherothrombosis % (n)	25.0 (7)
Cardioembolism % (n)	10.7 (3)
Small-vessel occlusion % (n)	17.9 (5)
More than two causes % (n)	3.6 (1)
Stroke of other determined etiology % (n)	0 (0)
Stroke of undetermined etiology % (n)	25.0 (7)
Incomplete evaluation % (n)	0 (0)
TIA % (n)	17.9 (5)

TIA: transient ischemic attack, TOAST: trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

판 응집체(29.6 ± 15.3%)은 회복기 환자군(25.1 ± 15.3%)에 비해 유의하게 증가되어 있었으며(P<0.001), 대조군(19.2 ± 7.8%)에 비해서도 유의하게 높았다(P=0.014). 회복기 환자군과 대조군은 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P=0.18).

백혈구의 Mac-1 발현도

대조군과 급성기·회복기 환자군의 백혈구의 Mac-1 발

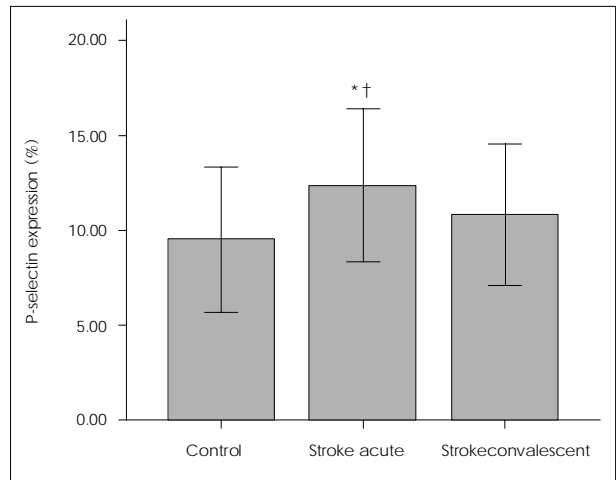


FIGURE 1. P-selectin expression of platelet. Bar represent mean, and the error bar, the standard deviation. *P<0.05 vs control, †P<0.05 vs convalescent phase stroke.

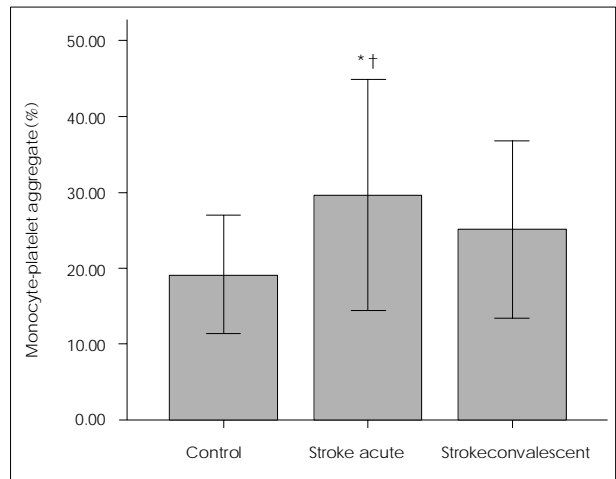


FIGURE 2. Circulating level of monocyte-platelet aggregates. Bar represent mean, and the error bar, the standard deviation. *P<0.05 vs control, †P<0.05 vs convalescent phase stroke.

현도는 Fig. 3에 나타냈다. 급성기 환자군의 백혈구의 Mac-1 발현도(427.0 ± 134.4)는 회복기 환자군(383.5 ± 126.7)에 비해 유의하게 증가되어 있었으며(P=0.032), 대조군(348.8 ± 113.8)에 비해서도 유의하게 높았다(P=0.045). 회복기 환자군과 대조군은 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P=0.467).

상관분석

허혈성 뇌졸중 급성기의 혈소판의 P-selectin 발현도와 백혈구의 Mac-1 발현도, 단핵구-혈소판 응집체의 상관관계는 Table 3에 나타냈다. 단핵구-혈소판 응집체는 P-selectin 발현도, Mac-1 발현도와 모두 유의수준 0.01에서 상관관계가 있는 것으로 나타났으나, P-selectin 발현

도와 Mac-1의 발현도는 유의수준 0.05에서 상관관계가 있는 것으로 나타났다.

발현도, 단핵구-혈소판 응집체, Mac-1 발현도는 모두 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 5).

Subgroup analysis

- 1) 일과성 뇌허혈군과 뇌경색군의 급성기 P-selectin 발현도, 단핵구-혈소판 응집체, Mac-1 발현도는 모두 유의한 차이가 없는 것으로 분석되었다(Table 4).
- 2) TOAST classification에 따른 급성기 P-selectin

고찰

본 연구에서 혈소판의 P-selectin 발현도는 급성기에 증가했다가 회복기에 통계적으로 유의한 수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 급성기의 P-selectin 발현도는 대조군에 비해 유의하게 증가했지만, 회복기의 P-selectin 발현도는 연령 및 죽상경화증의 위험인자가 비슷하게 구성된 대조군과 유의한 차이가 없었다. Cha 등이 발표한 연구¹²나 McCabe 등이 발표한 연구¹³에서는 허혈성 뇌졸중 회복기에도 P-selectin의 발현도가 대조군에 비해 유의하게 증가되어 있다고 보고되어 있지만, 이러한 결과는 대조군의 죽상경화증 위험인자 빈도가 환자군과 다르기 때문으로 생각된다. 죽상경화증 위험인자가 전혀 없는 정상군에 비해 죽상경화증의 위험인자를 가지고 있는 군의 P-selectin의 발현이 유의하게 높다는 연구결과를 고려하면,¹⁴ 허혈성 뇌졸중 회복기 환자는 죽상경화증 위험인자를 가지고 있는 군과 유사하고, 위험인자가 전혀 없는 정상군보다는 높은 정도의 P-selectin 발현도를 가지고 있을 것이라고 유추할 수 있다. 혈전 형성이 일어나는 급성기 수준은 아니겠지만, 죽상경화증이 있을 경우 혈관의 협착에 의한 shear stress에 수반되는 혈소판 활성화와 죽상경화증 자체의 진행에

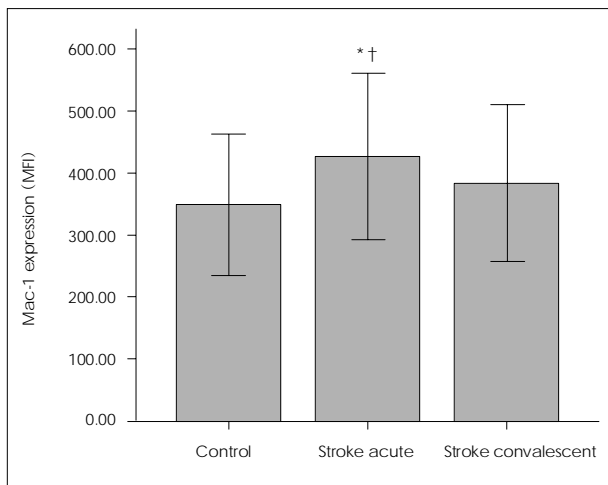


FIGURE 3. Mac-1 expression of leukocyte. Bar represent mean, and the error bar, the standard deviation. * $P < 0.05$ vs control, † $P < 0.05$ vs convalescent phase stroke.

TABLE 3. Correlation between P-selectin expression of platelet, circulating level of monocyte-platelet aggregates, and Mac-1 expression of leukocyte

	P-selectin (%)	MPA (%)	Mac-1 (MFI)
P-selectin (%)	1.000	0.635 [†]	0.404*
MPA (%)	0.635 [†]	1.000	0.592 [†]
Mac-1 (MFI)	0.404*	0.592 [†]	1.000

Values are Spearman's rank correlation coefficient. *correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed), †correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). MPA: monocyte-platelet aggregates, MFI: mean fluorescence intensity

TABLE 4. P-selectin expression of platelet, circulation level of monocyte-platelet aggregates, and Mac-1 expression of leukocyte in stroke and TIA

	P-selectin (%)	MPA (%)	Mac-1 (MFI)
TIA	11.2 ± 3.3	23.5 ± 5.6	457.1 ± 218.4
Stroke	13.0 ± 4.2	31.0 ± 16.4	420.4 ± 115.1
<i>P</i>	0.215	0.560	0.954

Values are mean ± standard deviation. TIA: transient ischemic attack, MPA: monocyte-platelet aggregates, MFI: mean fluorescence intensity

TABLE 5. P-selectin expression of platelet, circulation level of monocyte-platelet aggregates, and Mac-1 expression of leukocyte in stroke subtype by TOAST classification

	P-selectin (%)	MPA (%)	Mac-1 (MFI)
Large-artery atherothrombosis	14.7 ± 5.6	30.4 ± 21.9	430.7 ± 126.4
Cardioembolism	14.6 ± 5.0	46.2 ± 27.5	514.3 ± 181.4
Small-vessel occlusion	12.2 ± 1.7	24.8 ± 4.7	374.8 ± 98.4
More than two causes	12.6	30.0	320.9
Stroke of other determined etiology	0	0	0
Stroke of undetermined etiology	11.1 ± 3.6	30.0 ± 9.5	417.0 ± 134.4
Incomplete evaluation	0	0	0
<i>P</i>	0.637	0.798	0.604

Values are mean ± standard deviation. TOAST: trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, MPA: monocyte-platelet aggregates, MFI: mean fluorescence intensity

중요한 역할을 하는 염증성 반응 및 이에 따른 혈소판 활성화로, 정상군에 비해서는 P-selectin의 발현이 증가할 것이라고 생각할 수 있다. 하지만 본 연구에서는 죽상경화증의 위험인자가 없는 정상 대조군을 포함시키지 않아 이러한 사실을 직접 증명할 수 없었다.

단핵구-혈소판 응집체도 혈소판의 P-selectin 발현도와 마찬가지로 급성기 동안 증가했다가 회복기에 통계적으로 유의한 수준으로 감소했으며, 회복기의 단핵구-혈소판 응집체는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. Michelson 등의 연구¹⁵에 따르면 단핵구-혈소판 응집체는 P-selectin에 비해 혈소판의 활성화를 민감하게 나타내는 것으로 보고되었지만, 본 연구에서는 P-selectin 발현도도 단핵구-혈소판 응집체와 마찬가지로 급성기에는 회복기나 대조군에 비해 증가하고, 회복기에는 대조군과 유사한 정도로 감소하여 이를 확인할 수는 없었다.

백혈구의 Mac-1 발현도 역시 급성기 동안 증가했다가 회복기에 통계적으로 유의한 수준으로 감소했으며, 회복기의 Mac-1 발현도는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.

Mac-1은 lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, CD11a/CD18), p150,95 (CD11c/CD18) 등 다른 $\beta 2$ integrin family와 함께 응집반응이나 혈전 형성 시 내피세포나 혈소판과의 강한 부착(firm attachment)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁸ 특히 Mac-1은 혈소판의 P-selectin과 백혈구의 PSGL-1의 결합에 의해 발현이 증가하고, 이에 의해 혈소판에 강한 부착을 한 백혈구는 내피세포가 없는 곳에서도 혈소판을 관통하는 이동(trans platelet migration)을 통해 조직 내로 이동할 수 있다는 사실이 밝혀지면서 Mac-1은 죽상경화증의 진행이나 혈전형성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.¹⁶ Inoue 등은 관상동맥내 스텐트 삽입 환자의 말초혈액에서 호중구의 Mac-1 발현도가 증가함과 Mac-1의 발현도가 신생내막증식 및 스텐트내 재협착의 예측인자로서 이용될 수 있음을 보고하였고,⁹ Hillis 등은 비록 적은 수의 환자를 대상으로 했지만 급성관상동맥중후군 환자에서 단핵구의 Mac-1의 발현도가 정상군에 비해 증가함을 보고하였다.¹⁰ 본 연구는 급성기 허혈성 뇌졸중 환자의 말초혈액에서도 백혈구내의 Mac-1의 발현이 증가함을 밝혔을 뿐만 아니라 회복기에는 다시 감소한다는 사실을 보여줬다.

본 연구에서 회복기 환자들의 Mac-1 발현도는 대조군과 차이가 없었지만, Htun 등이 활성화된 백혈구에서는 발현이 감소하는 L-selectin의 발현도를 측정하여 발표한 연구결과에 따르면 L-selectin의 발현도는 허혈성 뇌졸중 급성기뿐만 아니라 회복기에도 대조군에 비해 감소되어 있었

다.¹¹ 하지만, Htun 등의 연구와 본 연구는 백혈구의 활성도를 측정한 인자가 달라 단순비교는 어려울 것으로 생각된다. 이러한 상반된 결과와 L-selectin 및 Mac-1의 역할에 대해서는 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

백혈구의 Mac-1 발현도가 혈소판의 P-selectin 발현도 및 단핵구-혈소판 응집체와 상관관계에 있음을 보여줬다. 이는 죽상경화반이 파열되어 혈소판이 부착되고 혈소판이 활성화되어 P-selectin의 발현이 증가하면, 이에 의해 백혈구의 동원(recruitment) 및 부착이 일어나고, 이후 백혈구가 활성화되면서 Mac-1의 발현이 증가하여 부착이 견고해진다는 일련의 사실¹⁶을 뒷받침하는 증거로 생각된다.

허혈성 뇌졸중은 급성 관상동맥중후군과는 달리 죽상경화반에서 발생한 혈전 이외에도 심인성 색전이나 지방초자질성 변성(lipohyalinosis) 등 다양한 원인에 의해 발생할 수 있는데, 이러한 원인에 따른 뇌경색을 분류 체계 중 현재 전 세계적으로 가장 널리 쓰이고 있는 것이 TOAST classification이다.² 본 연구의 뇌경색 환자군에서 TOAST classification의 각군에 따른 P-selectin 발현도, 단핵구-혈소판 응집체, Mac-1 발현도의 차이는 없었다. 죽상경화반에서 발생한 혈전에 의해 뇌경색이 발생한 것으로 생각되는 large-artery atherosclerosis군이 다른 군에 비해서 혈소판이나 백혈구의 활성도가 높지 않은 것은 기대와 다른 결과였다. 이러한 결과는 환자군의 표본수가 너무 적었던 것이 가장 중요한 원인으로 생각된다. 또한 TOAST classification이 뇌경색의 정확한 원인에 의한 분류가 아니라 영상학적 검사 및 임상정보에 의해 추론한 원인에 따른 분류이므로, TOAST classification에 의한 원인 분류 자체가 틀릴 가능성도 기대와 다른 결과가 나온 원인으로 판단된다. 마지막으로 cardioembolism이나 small-vessel occlusion에 의한 뇌경색이라도 뇌실질 파괴에 따른 염증반응에 의해 백혈구와 혈소판이 활성화될 수 있다는 사실¹⁷도 이러한 결과를 설명할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 측정한 혈소판의 P-selectin과 백혈구의 Mac-1과 같이 혈소판과 백혈구의 상호작용에 관련된 인자들은 허혈성 뇌졸중 환자에서 진단적 목적의 검사로 개발이 가능할 뿐만 아니라 새로운 치료의 표적이 될 수 있으므로 그 의미가 높다. 실제로 죽상경화증의 진행을 막는 새로운 치료제로서 P-selectin 억제제의 가능성을 동물 모델에서 실험 중이다.¹⁸ 현재까지 Mac-1 억제는 허혈성 뇌졸중 동물모델에서 경색된 조직의 재관류 손상시 백혈구의 침윤을 막는 인자로서 연구되고 있지만,¹⁹ P-selectin 억제와 마찬가지로 관점에서 죽상경화증의 진행을 막기 위한 치료 표적으로도 연구가 가능할 것으로 생각된다.

현재 널리 사용되고 있는 statin은 지질감소효과 이외에 독립적으로 항염증작용에 의해 죽상경화증의 진행 및 혈전 형성에 의한 합병증을 예방하는 것으로 알려져 있다.²⁰ 이러한 항염증작용은 염증세포의 다양한 인자의 발현을 억제함으로써 이루어지는데, 이런 작용의 하나로써 혈소판의 P-selectin 발현이 감소한다는 보고가 있다.²¹ 따라서, statin에 의한 백혈구의 Mac-1 발현도 변화에 대해서도 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 제한된 시간 동안 진행되어 표본수가 작은 한계점을 가지고 있다. 특히 이번 연구의 주된 측정인자인 Mac-1의 경우 급성기 환자군과 대조군의 비교 및 급성기 환자군과 회복기 환자군에서의 비교에서 모두 P value가 비교적 높고 비모수적 검정을 사용하여 보다 정확한 검정을 위해서는 표본 수를 더 모으는 과정이 필요할 것으로 생각된다. 또한 표본 수가 작아 일과성 뇌허혈과 뇌경색군, 그리고 뇌경색군 내에서 TOAST classification에 따른 차이에 의미를 부여하기 힘들었다.

백혈구의 Mac-1의 발현을 측정할 때 백혈구의 각 분획에 따른 Mac-1의 발현을 측정하지 않은 것도 이번 연구의 한계점으로 생각된다. 관상동맥내 스텐트 삽입환자를 대상으로 한 Inoue 등의 연구⁹에서는 호중구의 Mac-1의 발현의 의미있게 증가했지만 단핵구의 Mac-1의 발현은 증가하지 않았고, 급성관상동맥 증후군 환자를 대상으로 한 Hillis 등의 연구¹⁰에서는 단핵구의 Mac-1의 발현은 증가했지만 호중구의 Mac-1 발현은 증가하지 않았다. 이러한 상반된 결과에 대한 정확한 이유는 아직 모르는 상태이지만, 허혈성 뇌졸중 환자에서 백혈구의 Mac-1 발현의 증가가 어떤 분획이 의한 것인지 분석하는 것은 추후 추가적 연구를 위해 필요할 것이라고 생각된다. 결론적으로 본 연구에서는 혈소판의 P-selectin 발현, 단핵구-혈소판 응집체와 마찬가지로 백혈구의 Mac-1의 발현이 급성기 허혈성 뇌졸중 환자의 말초혈액에서 증가했다가, 회복기에는 다시 감소하는 것을 확인했다. 또한 백혈구의 Mac-1의 발현은 혈소판의 P-selectin 발현, 단핵구-혈소판 응집체와 상관관계를 보였다. 이러한 사실은 허혈성 뇌졸중의 병인에 혈소판의 활성화뿐만 아니라 백혈구의 활성화 및 염증작용이 중요한 역할을 담당한다는 것을 시사한다. 혈소판의 P-selectin과 백혈구의 Mac-1은 허혈성 뇌졸중과 같은 죽상경화증의 합병증에 대한 새로운 치료 표적이 될 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Warlow CP. Epidemiology of stroke. *Lancet* 1998;352 Suppl 3:SIII1-4.
- Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993;24:35-41.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1227-34.
- Michelson AD. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006;35:67-82.
- Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007; 21:99-111.
- Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, Handschu R, Tomandl B, Stumpf C, et al. Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* 2003;34:1412-8.
- Wang Y, Sakuma M, Chen Z, Ustinov V, Shi C, Croce K, et al. Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Ibalpha via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation* 2005;112:2993-3000.
- Inoue T, Uchida T, Yaguchi I, Sakai Y, Takayanagi K, Morooka S. Stent-induced expression and activation of the leukocyte integrin Mac-1 is associated with neointimal thickening and restenosis. *Circulation* 2003;107:1757-63.
- Hillis GS, Dalsey WC, Terregino CA, Daskal I, Nangione A. Altered CD18 leukocyte integrin expression and adhesive function in patients with an acute coronary syndrome. *Heart* 2001;85:702-4.
- Htun P, Fateh-Moghadam S, Tomandl B, Handschu R, Klinger K, Stellos K, et al. Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia. *Stroke* 2006;37:2283-7.
- Cha JK, Jo WS, Shin HC, Bae HR, Ho JM, Kim JW. Increased platelet CD63 and P-selectin expression persist in atherosclerotic ischemic stroke. *Platelets* 2004;15:3-7.
- McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, et al. Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Br J Haematol* 2004;125: 777-87.
- Yngen M, Ostenson CG, Hu H, Li N, Hjendahl P, Wallen NH. Enhanced P-selectin expression and increased soluble CD40 Ligand in patients with Type 1 diabetes mellitus and microangiopathy: evidence for platelet hyperactivity and chronic inflammation. *Diabetologia* 2004;47:537-40.
- Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;104:1533-7.
- Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996;88:146-57.
- Love S, Barber R. Expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in human brain after focal infarction or cardiac arrest. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001;27:465-73.
- Bedard PW, Clerin V, Sushkova N, Tchernychev B, Antrilli T, Resmini C, et al. Characterization of the novel P-selectin inhibitor PSI-697 [2-(4-chlorobenzyl)-3-hydroxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo [h] quinoline-4-carboxylic acid] in vitro and in rodent models of vascular inflammation and thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324:497-506.
- Zhang L, Zhang ZG, Zhang RL, Lu M, Krams M, Chopp M. Effects of a selective CD11b/CD18 antagonist and recombinant human tissue plasminogen activator treatment alone and in combination in a rat embolic model of stroke. *Stroke* 2003;34:1790-5.
- Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol* 2006;6:358-70.
- Cha JK, Jeong MH, Kim JW. Statin reduces the platelet P-selectin expression in atherosclerotic ischemic stroke. *J Thromb Thrombolysis* 2004;18:39-42.