

신생백서의 뇌조직에서 반복적 저산소상태가 지질 과산화물의 생성에 미치는 영향

아주대학교 의과대학 소아과학교실, 연세대학교 의과대학 소아과학교실*

김인성 · 석효정 · 박정서 · 박문성 · 박민수*

= Abstract =

The Effect of Repetitive Hypoxia on Production of Lipid Peroxidation in Newborn Rat Brain

In Sung Kim, M.D., Hyo Jung Suk, M.D., Jung Suh Park, M.D.
Moon Sung Park, M.D., and Min Soo Park, M.D.*

Department of Pediatrics, Ajou University School of Medicine, Suwon

**Department of Pediatrics, Yonsei University School of Medicine, Seoul, Korea*

Purpose : Among many pathophysiologic mechanisms of hypoxic-ischemic brain injury, reactive oxygen species (ROS) cause or contribute to brain damage relates to their ability to attack the fatty acid moiety of plasma and subcellular membranes. Because ROS are generated by hypoxia-ischemia especially during reperfusion period of recovery, repetitive hypoxia-reoxygenation in newborn brain may result in more severe damage than a similar single insult. It is to determine whether repetitive hypoxia-reoxygenation may produce more ROS than a similar single insult in newborn rat brain.

Methods : We compared the production of lipid peroxidation in 3 days old rat brain following normoxia, repetitive hypoxia-reoxygenation and an equal duration of sustained hypoxia-reoxygenation by measuring 8-isoprostane-F_{2α}. 8-isoprostane-F_{2α} is free radical catalyzed metabolites of arachidonic acid, which is produced independent of cyclooxygenase.

Results : Compared to a single duration hypoxia-reoxygenation, repetitive hypoxia-reoxygenation produce more ROS (8-isoprostane-F_{2α}) in newborn rat brain ($P < 0.005$).

Conclusion : It can be speculated that repetitive hypoxia is more detrimental than equal duration of single insult in new born rat brain. Relations between increased ROS production and brain injury following repetitive hypoxia-reoxygenation should be evaluated. (*J Korean Soc Neonatol* 2003;10:235-240)

Key Words : Hypoxic-ischemic brain damage, Reactive oxygen species, 8-isoprostane-F_{2α}, Hypoxia-reoxygenation, Lipid peroxidation

서 론

책임저자 : 박민수, 서울특별시 강남구 도곡동 146-92
영동세브란스병원 소아과
Tel : 02)3497-3351, Fax : 02)3461-9473
E-mail : minspark@yumc.yonsei.ac.kr

신생아에서의 저산소성 허혈성 뇌병증(이하 HIE)은 주로 주산기 가사에 의해 야기되며 광범위한 비가역적 뇌손상에 의한 신생아 사망, 뇌성마비, 학습장애,

간질 등의 심각한 신경학적 후유증을 남기게 되는 병적 상태이다¹⁾. 최근 HIE의 예방 및 치료에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나 아직까지 뇌중의 대중적 치료 이외에 특별한 대안이 없어 병태생리 기전에 대한 연구와 이에 근거한 진단 및 치료방법의 개발이 절실한 상황이다.

HIE에서 산소자유기에 의한 지질과산화는 중요한 병태생리 중 하나로 알려져 있으며²⁾, 또한 산소자유기는 저산소 상태에서보다 재관류 시에 더욱 많이 유리되는 것으로 보고되고 있다. 임상적으로 신생아에게 발생하는 저산소성 뇌병증은 지속적으로 유지되는 경우보다는 저산소 상태와 유산소 상태가 교대로 반복되면서 그 유해한 영향을 끼치게 되는 경우가 더 많다. 예를 들면 태내에서 반복되는 태출의 압박, 출생 후 미숙아시기에 무호흡 상태가 반복적으로 나타날 때, 기도 삽관을 이용한 호흡기 치료 시 가래 제거 과정 등은 저산소 상태와 유산소 상태를 매우 강력하게 반복하게 되는 실제 상황들로 이러한 지속적 저산소 상태와 반복적 저산소 상태의 뇌손상 기전 및 정도의 차이는 오랫동안 연구의 대상이 되어왔다^{3,4)}.

이에 저자들은 신생백서의 뇌조직을 이용하여 산소 유리 이온기에 의해 생성되는 지질과산화물의 일종인 8-isoprostane- $F_{2\alpha}$ 를 측정함으로써 저산소성 뇌손상의 평가 방법을 연구하고 동물 실험 모델에서 지속적 저산소 손상과 반복적 저산소 손상을 조작하여 손상의 차이를 비교 분석하고자 한다.

대상과 방법

1. 대상

성장한 Sprague-Dawley Rat 암수를 합방시켜 임신시킨 후 자연분만으로 출생된 신생백서를 3일간 어미와 한우리에 두어 적절한 성장을 하게 한 후 실험에 사용하였다.

2. 저산소성 뇌손상 유발

37℃의 인공 보육기 안에 아크릴 통을 넣고 그 안에 어미 쥐와 함께 실험 대상을 넣은 뒤 실험군을 대조군, 지속적 저산소군, 반복적 저산소군으로(각각 8

마리) 분류하여 조작하였다.

대조군은 대기중의 공기를 유입시켜 통 안의 산소 분획이 0.21임을 확인하고 통 안의 산소 분획을 지속적으로 확인하면서 3시간 동안 실험대상을 통 안에 놓아두었으며, 지속적 저산소군은 밀폐시킨 통 안에 산소 분획이 0.08 포함된 질소 가스를 유입시켜 통 안의 산소 분획이 0.08이 되도록 하여 그 상태를 유지하면서 3시간 동안 실험대상을 통 안에 놓아두었다. 또한, 반복적 저산소군은 밀폐시킨 통 안에 대기중의 공기와 산소 분획이 0.08 포함된 질소 가스가 번갈아 유입되도록 장치한 후 50분간은 산소 분획 0.08 상태가 되도록 하여 실험대상을 노출시키고 이어 10분간은 산소 분획 0.21 상태에 노출시키는 방법을 3회 반복하여 3시간 동안 반복적인 저산소-대기중 산소농도에 노출되도록 한다.

3. 지질과산화물(8-isoprostane- $F_{2\alpha}$) 측정

1) 조직 준비

3시간 동안 조작된 각 군은 조작이 끝난 뒤 플라스틱 통에서 꺼내어 대기 중에서 30분간 안정시킨 후 두개골과 경추사이를 절단하여 희생한 뒤 육안상에서 대뇌, 소뇌와 뇌간의 일부를 포함하고 안구는 제외시켜 뇌조직을 적출하여 무게를 측정한 후 -70℃에 보관한다.

2) 8-isoprostane- $F_{2\alpha}$ 추출 및 정화

8-isoprostane- $F_{2\alpha}$ 추출 및 정화는 Hoffman 등⁵⁾의 방법을 이용하였다. 간단히 요약하면, 백서의 뇌조직을 2 mL의 차가운 에타놀에 넣고 분쇄하고, [³H]-8-isoprostane- $F_{2\alpha}$ 10,000 cpm을 넣고 vortex한다. 4℃에서 5분간 세워둔 후 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리한다. 5% KOH 2 mL와 40℃에서 1시간 동안 배양한 후 이를 vortex한 뒤 원심분리하여 상층액을 분리하고 증류수로 검체의 총 부피가 10 mL 되게 한 후 HCl로 pH 3이 되도록 적정한다. 각각의 검체는 5 mL 에타놀과 5 mL 탈이온화된 증류수를 통과시켜 활성화된 C-18 SPE cartridge (Sep Pak, Millipore, MA U.S.A.)에 통과시킨다. 이를 다시 5 mL의 탈이온화된 증류수와 5 mL의 HPLC 급의 헥산(hexane)으로 씻어낸 후 1% 메타놀이 포함된 5 mL ethyl acetate로 추출한다. 동결 건조 시킨 뒤 20×20 cm의 thin layer chromatography를 이용

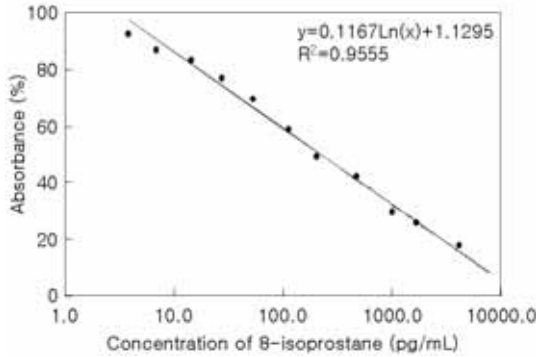


Fig. 1. Typical standard curve demonstrating the sensitivity and accuracy of the assay.

하여 다시 한번 8-isoprostane-F_{2α}를 정화한다.

3) EIA assay

8-isoprostane-F_{2α}는 효소면역반응법(8-isoprostane-F_{2α} EIA kit, Cayman chemical, MI, U.S.A.)을 이용하여 주어진 방법에 의거 각각의 검체에서 8-isoprostane-F_{2α}를 측정 후 베타 counter를 이용, 초기 10,000 cpm의 [³H]-8-isoprostane-F_{2α} 중 남은 양으로 잔류 비율을 산정하여 총량을 계산한다.

4. 통계 처리

Unpaired T-test를 이용, 각 군의 평균 8-isoprostane F_{2α}의 값을 비교하고 P<0.05일 때 유의한 것으로 판정했다.

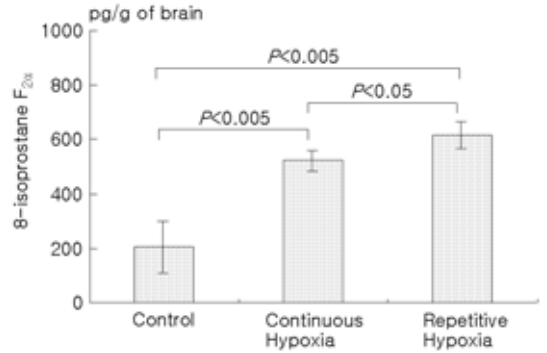


Fig. 2. Mean levels of 8-isoprostane-F_{2α} in control, continuous hypoxia, and repetitive hypoxia group.

2. 대조군과 지속적 저산소군 및 반복적 저산소군의 비교

뇌조직 무게(그램) 당 평균 8-isoprostane F_{2α} 값은 대조군에서 205.2±93.9 pg, 지속적 저산소군에서 522.7±37.5 pg, 그리고 반복적 저산소군에서 616.6±50.0 pg으로 대조군과 지속적 저산소군 및 대조군과 반복적 저산소군에서 각각 P값 0.005 이하로 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Fig. 2).

3. 지속적 저산소군과 반복적 저산소군간의 비교 (Fig. 2)

두 군의 평균값을 비교하였을 때 P값 0.05 이하로 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

결 과

1. EIA에 의한 8-isoprostane-F_{2α}의 표준곡선

연구에 이용된 EIA kit를 이용하여 8-isoprostane F_{2α}를 순차적으로 희석하여 그 흡수도를 구한 뒤 본 분석의 민감도와 정확도를 평가하였다. mL당 1.0 pg에서부터 10,000 pg까지 희석한 결과 흡수도와와의 관계는 $y = -0.1167 \ln(X) + 1.1295$, $R_2 = 0.9555$ 로 상관 관계가 매우 높은 것으로 확인되어 그 정확도 및 민감도가 매우 우수함을 증명하였다(Fig. 1).

고 찰

유산기 가사와 연관된 HIE는 만삭아의 경우 0.2-0.4%, 극소 저출생체중 미숙아인 경우에는 60%까지도 발생하며, 향후 뇌성마비, 지능발달 지연, 학습장애, 간질 등의 비가역적이고 심각한 신경학적 후유증을 남긴다⁶⁾. 따라서 이에 대한 적극적인 예방 및 치료, 그리고 후유증의 경감에 많은 노력이 기울여져 왔고 현재도 계속되고 있으나 아직까지 보존적 치료, 즉 적당한 산소공급, 관류 상태 유지, 간질의 예방 및 치료, 뇌부종의 조절 등의 대처법 이외에 특별한 방법이 제시되지 못하고 있는 실정이다⁷⁾.

HIE의 손상기전에 대한 병태생리는 많은 연구가

되어져 있는데, 저산소와 허혈에 의한 일차 손상과, 재산소 및 재관류 이후에 유발되는 이차 손상으로 설명하고 있다^{8, 9)}. 일차 손상은 저산소에 의한 일차적인 에너지의 결핍¹⁰⁾, 세포 내 칼슘이온 등의 상승¹¹⁾, 흥분성 신경전달물질의 증가^{12, 13)} 등에 의해 세포의 부종 및 괴사로 일어나며, 이차 손상은 산소자유기와 여러 가지 cytokine 등에 의한 세포자멸사로 일어난다 생각되고 있다¹⁴⁾.

산소자유기는 주로 미토콘드리아의 전자 전달계에서 전자의 수용이 저하되면서 발생되며 이외에도 세포막의 인지질로부터 유래한 아라키돈산(arachidonic acid)이 cyclooxygenase 또는 lipooxygenase에 의해 분해될 때, 또한 ATP의 대사 산물인 xanthine이나 hypoxanthine이 저산소와 재산소화에 의해 발생된 xanthine oxidase에 의해 대사될 때, catecholamine이 산화될 때 많이 생성된다¹⁵⁾. 생성된 산소자유기는 세포막 인지질의 주성분인 다중불포화지방산을 과산화시키고, 세포 내 단백질이나 DNA를 변화 시킴으로써 세포의 손상을 야기하는데, 특히 신생아의 뇌조직은 성인에 비하여 다중불포화지방산의 농도가 높고 체내 항산화효소의 농도가 낮아 산소자유기의 생성이 다른 시기보다 많으며 이에 의한 손상도 더욱 쉽게 일어난다고 알려져 있다^{2, 8)}. 이에 지질과산화의 정도가 산화 손상의 지표로 이용되고 있지만 측정방법에는 많은 제한을 갖고 있다. 예를 들면, 가장 많이 시행하는 지질과산화물 측정의 방법 중 하나인 thiobarbituric (TBA) test는 아미노산이나 당과의 교차 반응이 있을 뿐 아니라, 산 가열단계에서 지질과산화물이 생성된다는 단점이 있다. 이렇듯 알데히드 측정 방법은 주변물질의 분열과 대사에 의해 측정이 혼란스러워져 정확도가 감소할 수 있다¹⁶⁾. 지질 과산화 과정 중 발생하는 탄화수소 가스의 측정은 결과가 일정하지 않고 금속이온의 존재에 의해 영향을 받을 수 있고¹⁷⁾, 알데히드의 형광물질을 자극하는 자외선을 이용하는 방법은 생체검사가 어렵다는 제한이 있다¹⁶⁾. 또한 gas chromatography/mass spectroscopy는 과산화물 측정에 매우 민감한 검사이지만 많은 비싼 장비가 필요하다. 이에 비해 1990년 알려진 8-isoprostane-F_{2α}는 생체 내에서 cyclooxygenase나 lipooxygenase와는 무관하게 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 산소자유기에 의해 생성되므로 지질과산화의 정량적 측정

에 최근 많은 관심을 보이는 물질이다^{18, 19)}. 또한 동물 실험 모델에서 산소자유기에 의한 조직손상의 상관관계가 뛰어난 것으로 확인된 바 있고¹⁸⁾ 각종 체액 내에 존재하여 정상범주를 규정지을 수 있으며^{18, 20)}, 각종 조직액과 혈액에서 각기 반응하기 때문에 국소적 손상 평가에 이용할 수 있는 장점이 있다²⁰⁾.

이에 본 연구는 8-isoprostane-F_{2α}의 측정을 통해 지질 과산화반응에 근거한 저산소성 뇌 손상의 평가 방법을 연구함으로써 지속적 저산소 손상과 반복적 저산소 손상간의 차이를 비교, 분석하였다. 정상 산소분압에 노출되어 있던 대조군에 비해 지속적 저산소군 및 반복적 저산소군에서 8-isoprostane-F_{2α}의 값이 유의하게 높은 결과를 보이는 것으로 어떤 형태든지 저산소 뇌손상을 받은 군에서는 받지 않은 군에 비해 산소자유기에 의한 지질과산화 반응이 많이 일어났음을 의미하고 있으며, 또한 지속적 저산소군과 반복적 저산소군간의 비교에서 볼 때 반복적 저산소군에서 더 높은 8-isoprostane-F_{2α}를 보임으로 저산소에 의한 뇌손상의 경우 같은 농도의 산소분압이라면 반복적 저산소상태가 더 큰 손상을 야기시킬 가능성을 시사한다. 이와 같은 결과는 지속적 저산소 상태 시에 비해 반복적인 저산소 상태 시에 재산소화에 의한 산소자유기가 증가하기 때문에 생긴 결과로 생각된다. Waters 등²¹⁾은 신생 자돈에서 반복적 저산소상태가 같은 기간의 지속적인 저산소 상태에 비해 비정상적 뇌파가 많다는 보고를 하였고, 신생 가토의 뇌를 이용한 연구에서도²²⁾ 지속적 저산소 상태 시에 비해 반복적인 저산소 상태 시에 산소자유기가 증가하는 것을 보고하여 본 연구와 일치된 결과를 보였다. 그러나 뇌조직이 반복적인 저산소 상태에 의해 점차 저항력이 생긴다는 보고도 있어^{23, 24)} 산소농도, 노출 기간, 및 실험동물의 종류 등 이에 대한 더 많은 이해가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 같은 기간, 같은 농도의 저산소 상태 일 때, 지속적 저산소 상태에 비해 반복적 저산소 상태 시 더 많은 산소자유기를 생성함으로써 더 큰 뇌손상을 유발할 것임을 시사하며 앞으로 뇌 조직검사를 통한 검증이 필요할 것으로 사료된다

요 약

목적 : 주산기 가사는 신생아기의 저산소성 허혈성 뇌병증의 가장 중요한 원인이다. 또한 이에 의한 뇌세포 손상의 발생기전 중 산소자유기에 의한 뇌손상은 잘 알려져 있으며 특히 신생아기의 뇌는 이에 의한 손상을 더 받기 쉬운 것으로도 알려져 있다. 이에 저자들은 신생 백서를 통해 지속적 저산소증 보다 반복적 저산소증에서 산소자유기가 더 많이 생성됨을 연구하고 이를 통해 저산소성 뇌병증의 병태생리를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

방법 : 생후 3일된 신생 백서를 이용하여 지속적 저산소군과 반복적 저산소군으로 구분하여 뇌손상을 일으킨 후 희생한 뇌조직에서 지질 과산화물인 8-isoprostane-F_{2α}를 추출하여 비교 분석하였다.

결과 : 8-isoprostane-F_{2α}는 대조군에 비해 지속적 저산소군과 반복적 저산소군에서 유의하게 높은 결과를 보였으며, 지속적 저산소군에 비해서는 반복적 저산소군에서 유의하게 높은 결과를 보였다.

결론 : 신생 백서를 이용한 연구에서 반복적 저산소 상태가 더 많은 산소자유기를 생성함을 보임으로 더 큰 뇌 손상을 유발할 것임을 시사하며 앞으로 뇌조직검사 등을 통한 검증이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci* 1997;835:234-49.
- 2) Cao W, Carney JM, Duchon A, Floyd RA, Chevion M. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neurosci Lett* 1988;88:233-8.
- 3) Waters KA, Gozal D. Responses to hypoxia during early development. *Respir Physiol Neurobiol* 2003;136:115-29.
- 4) Keunen H, Vles JS, Van Reempts JL, Gavilanes D, Hasaart TH. Effect of repetitive umbilical cord occlusions on neuronal brain activity measured by the cerebral function analyzing monitor

and histologic outcome in immature fetal sheep. *J Soc Gynecol Investig* 2000;7:218-23.

- 5) Hoffman SW, Roof RL, Stein DG. A reliable and sensitive enzyme immunoassay method for measuring 8-isoprostaglandin F₂ alpha: a marker for lipid peroxidation after experimental brain injury. *J Neurosci Methods* 1996;68:133-6.
- 6) Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997;100:1004-14.
- 7) Vannucci RC. Current and potentially new management strategies for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1990;85:961-8.
- 8) Fellman V, Raivio KO. Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatr Res* 1997;41:599-606.
- 9) Hallenbeck JM, Dutka AJ. Background review and current concepts of reperfusion injury. *Arch Neurol* 1990;47:1245-54.
- 10) Lees GJ. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res Brain Res Rev* 1991;16:283-300.
- 11) Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:127-40.
- 12) Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nystrom B, Jacobson I, Hamberger A. Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J Cereb Blood Flow Metab* 1985;5:413-9.
- 13) Clark GD. Role of excitatory amino acids in brain injury caused by hypoxia-ischemia, status epilepticus, and hypoglycemia. *Clin Perinatol* 1989;16:459-74.
- 14) Waring P, Kos FJ, Mullbacher A. Apoptosis or programmed cell death. *Med Res Rev* 1991;11:219-36.
- 15) McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312:159-63.
- 16) Slater TF. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984;105:283-93.
- 17) Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990;15:129-35.
- 18) Morrow JD, Roberts LJ, 2nd. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future re-

- search. *Biochem Pharmacol* 1996;51:1-9.
- 19) Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, Campbell MD, Zackert WE, Daniel VC, et al. Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *J Biol Chem* 1994;269:4317-26.
- 20) Morrow JD, Roberts LJ, 2nd. Mass spectrometry of prostanoids: F2-isoprostanes produced by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism. *Methods Enzymol* 1994;233:163-74.
- 21) Waters KA, Beardsmore CS, Paquette J, Turner GA, Moss IR. Electrocorticographic activity during repeated vs continuous hypoxia in piglets. *Brain Res Bull* 1996;41:185-92.
- 22) Tan S, Zhou F, Nielsen VG, Wang Z, Gladson CL, Parks DA. Increased injury following intermittent fetal hypoxia-reoxygenation is associated with increased free radical production in fetal rabbit brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:972-81.
- 23) Laferriere A, Moss IR. Age-related electrocorticographic and respiratory adaptation to repeated hypoxia. *Brain Res Bull* 1994;35:97-9.
- 24) Schurr A, Reid KH, Tseng MT, West C, Rigor BM. Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro. *Brain Res* 1986;374:244-8.
-