

말초 신경 손상 후 기능 회복에
관한 iNOS 억제 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

신 상 진

말초 신경 손상 후 기능 회복에
관한 iNOS 억제 효과

지도 한 수 봉 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2004 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

신 상 진

신상진의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2004 년 12 월 일

감사의 글

오늘이 있기까지 모든 일을 주관하여 주신 하나님께 영광을 돌리며 감사의 기도를 드립니다. 본 논문을 완성하기까지 세심한 배려와 격려로 지도하여 주신 한수봉 지도 교수님께 진심으로 감사 드리며, 연구 진행 과정에 훌륭한 지도 편달과 자문에 응하여 주신 조재림 선생님, 최중언 선생님, 선우 일남 선생님, 김혜영 선생님께 심심한 사의를 표합니다. 또한 연구 기간 중 끊임없이 격려와 용기를 주시며 기초 지식부터 자상히 지도하여 주신 Duke University Orthopaedic Research Laboratory의 Long-En Chen 부부께 감사의 마음을 드립니다.

아울러 본인이 정형외과 전문의가 되기까지 많은 지도와 조언을 아끼지 않으셨던 연세대학교 의과대학 정형외과학교실의 교수님들과 논문이 완성되기까지 물심양면으로 지원을 아끼지 않으신 이화여자대학교 의과대학 정형외과학교실의 교수님들과 의국원들께도 감사를 드립니다.

항상 크신 사랑으로 물심양면으로 돌보아 주신 양가 부모님과 어려움 속에서도 불평 없이 성원을 보내준 사랑하는 아내와 아들 성환이, 딸 수연에게 이 논문이 작은 기쁨이 되었으면 하는 마음입니다.

저자 씬

<차례>

그림 및 표 차례.	ii
국문요약.	iv
I. 서론.	1
II. 재료 및 방법	4
1. 표본 실험.	4
2. 수술 방법	5
3. 운동 기능 측정 검사.	6
4. 산화질소 생성효소 mRNA 분석을 위한 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응법	8
5. 산화질소 생성효소 단백질 분석을 위한 Western blot 분석법	9
6. 조직학적 검사.	11
7. 통계학적 분석.	11
III. 결과	11
1. 수술 후 신경 관찰.	11
2. 표본 실험 결과.	12
3. 운동 기능 측정 검사 결과.	13
4. 산화질소 생성효소 mRNA 발현 분석 결과.	15
5. 산화질소 생성효소 단백질 발현 분석 결과	17
6. 조직학적 검사 결과.	19
IV. 고찰.	19
V. 결론	27
참고문헌.	28
영문요약.	41

그림 차례

그림 1. 일정 압력이 가해지도록 고안된 기계를 이용한 실험 장면.	6
그림 2. 백서 발자국 측정 방법.	7
그림 3. 각기 다른 농도와 기간의 1400W를 투여한 백서의 2시간 허혈 후 재관류 기간 동안의 좌골 신경 운동 기능 지수.	12
그림 4. 대조군과 실험군의 재관류 기간에 따른 발자국 변화.	13
그림 5. 대조군과 실험군의 재관류 기간에 따른 좌골 신경 운동 기능 지수.	14
그림 6. 백서 좌골 신경에서 2시간 허혈 후 재관류 기간에 따른 세 종류의 산화질소 생성효소 mRNA 발현에 대한 1400W의 효과.	16
그림 7. 백서 좌골 신경에서 2시간 허혈 후 재관류 기간에 따른 세 종류의 산화질소 생성효소 단백질 발현에 대한 1400W의 효과.	17
그림 8: 좌골 신경 중간 부분에서 채취하여 염색한 신경 조직	20

표 차례

표 1. 신경, 유발, 내피 산화질소 생성효소 유전자 증폭을 위한 primer 염기 서열	9
--	---

국문요약

말초 신경 손상 후 기능 회복에 관한 iNOS 억제 효과

말초 신경 허혈-재관류 손상에서 산화질소의 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만 여러 가지 다양한 결과들이 보고되고 있다. 이는 유발, 신경 및 내피 세 종류의 산화질소 생성효소가 허혈-재관류 과정에 각기 반응하여 서로 다른 활동성을 나타내기 때문으로 사료된다.

본 연구는 백서 좌골 신경의 허혈-재관류 손상에서 유발 산화질소 생성효소 억제가 신경 기능 회복에 미치는 영향에 관하여 알아보려고 하였다. 170마리의 백서를 유발 산화질소 생성효소 특이 억제제인 1400W를 투여한 실험군과 증류수를 투여한 대조군으로 나누었다. 각 군 백서의 좌골 신경에 특별히 고안된 기계로 2시간 동안 압박을 가해 허혈을 유발한 후 42일까지의 재관류 기간 동안 운동 기능 회복, 허혈 신경의 조직학적 검사, 세 종류 산화질소 생성효소의 mRNA와 단백질 발현 변화를 관찰하였다.

좌골 신경 운동 기능 지수로 측정된 운동 기능은 재관류 기간 동안 실험군에서 의미 있게 빠르게 회복되었다. 특히 재관류 후 11일부터 28일까지 두 군 사이에 가장 큰 차이를 보였으며 전체 회복 속도는 실험군이 약 일주일 정도 빠른 회복을 나타내었다. 허혈 신경의 조직학적 소견은 실험군에서 대조군보다 빠른 신경 섬유 회복 및 축삭 퇴행 지연이 관찰되었다. 백서 좌골 신경의 허혈-재관류 손상은 세 종류 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질

발현에 각기 다른 영향을 미쳤다. 유발 산화질소 생성효소의 mRNA와 단백질 발현은 재관류 첫 3일 동안 정상 발현량보다 의미 있게 증가하였다가 감소하였다. 신경 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질 발현은 재관류 전 과정 동안 정상 발현보다 감소하였으나 내피 산화질소 생성효소의 mRNA와 단백질 발현은 증가하였다. 1400W는 증가된 유발 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질 발현을 통계학적으로 의미 있게 감소시켰으나 신경 및 내피 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질 발현에는 영향을 미치지 못하였다.

결론적으로 유발 산화질소 생성효소의 재관류 초기 억제가 허혈-재관류 손상 감소 및 예방에 필수 요소임을 알 수 있었다. 또한 재관류 기간 동안 세 종류의 산화질소 생성효소의 정확한 활성과 발현의 균형을 파악하는 것이 말초 신경 허혈-재관류 손상의 병인을 파악하는데 중요 인자라고 할 수 있다.

핵심되는 말: 말초 신경, 허혈-재관류 손상, 산화질소, 산화질소 생성효소

말초 신경 손상 후 기능 회복에 관한 iNOS 억제 효과

<지도교수 한 수 봉>

연세대학교 대학원 의학과

신 상 진

I. 서론

말초 신경의 압박 손상(compression injury)은 신경의 연결성이 유지된 상태에서 신경 기능이 소실되는 손상이다.¹ 이는 주로 급성 압박(폐쇄 골절 및 탈구, 지혈대 손상, crutch palsy, Saturday night palsy, 구획 증후군 등) 및 만성 압박(수근관 증후군, 종양 등)에 의해 발생하며 임상적으로 흔히 볼 수 있는 손상이다. 압박 손상으로 소실된 말초 신경의 기능은 특별한 치료 방법이 없으며, 같은 손상도 이환 기간이 사람마다 다르고, 회복 결과도 완전 회복부터 부분 마비까지 다양한 임상적 결과를 유발한다.²⁻⁴ 이러한 현상은 말초 신경을 이루고 있는 여러 다양한 성분의 조직들 즉 축삭, 수초, 신경 내외의 미세 혈관 및 결합 조직들이 각각 압박 손상을 받고 압력에 대한 반응이 다른 복잡한 병태 생리에서 기인한 것으로 사료된다.^{3,5,6}

말초 신경이 압박을 받으면 외부 압력은 신경 섬유에 직접적인 손상을 줄 뿐 아니라 신경 섬유에 혈액을 공급하는 미세 혈관을 포함한 주변 결합 조직에도 영향을 준다. 즉 외부 압력이

모세 혈관의 관류압보다 높으면 말초 신경에 허혈 손상(ischemia injury)도 가해진다. 이러한 경우 빠른 시간 내에 혈류 공급을 재개하여 허혈 손상을 받은 조직의 피해를 최소화하는 것이 치료 원칙으로 되어 있다. 그러나 때로는 혈류 재공급 자체가 역설적으로 조직 관류에 불가역적 변화를 유발하여 조직 손상을 증가시키는 경우가 있다. 이러한 역설적 현상을 재관류 손상(reperfusion injury)이라 하며 Ames 등에 의해 처음 보고되었다.⁷

허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)은 여러 장기에서 심근 경색증, 뇌혈관 경색, 간 대사 장애 및 말초 혈관 질환 등의 형태로 발생한다.⁸⁻¹¹ 조직 허혈이 생명과 연관되어 있는 심장과 뇌와 같은 중요한 장기와 비교하여 말초 신경의 허혈-재관류 손상은 관심과 연구가 적었다. 말초 신경 허혈-재관류 손상의 원인 인자 규명을 위해 interleukin-1, 싸이토카인, 세포 부착 분자(cell adhesion molecule), cyclooxygenase 등 여러 관여 물질에 대한 활발한 연구가 진행이 되어 왔으며 최근에는 산화질소(nitric oxide)의 관련 여부가 관심의 대상이 되고 있다.¹²⁻¹⁵

산화질소는 전달 물질로서 조직 내의 많은 생리학적 작용에 관여한다.^{11,16-18} 말초 신경에서는 산화질소가 신경 전달 물질,¹⁹ 혈류량 조절,²⁰ 혈관 이완²¹ 등의 작용을 하고 있다. 산화질소는 L-arginine에서 3가지 종류의 산화질소 생성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 생성되는데 말초 신경에는 세 종류 산화질소 생성효소가 모두 존재하는 것으로 알려져 있다.^{17,19,22} Ca²⁺-calmodulin dependent isoform인 구조 산화질소 생성효소(constitutive NOS), 즉 신경 산화질소 생성효소(neuronal NOS)와 내피 산화질소 생성효소(endothelial NOS)는 척수,²³ 후척수

신경절,²⁴ 축삭, Schwann 세포,²² 내피 세포,²⁵ 및 신경 종관²⁶ 등에 존재한다. 이와 달리 유발 산화질소 생성효소(inducible NOS)는 Ca²⁺-calmodulin independent isoform으로서 싸이토카인과 내독소에 의해 유도되며 많은 양의 산화질소를 생성한다.²⁷⁻³⁰

Qi 등은 말초 신경 허혈 후 3시간 동안의 재관류 기간 동안 세 가지 산화질소 생성효소의 농도가 다르게 변화되는 것을 증명하였다.²² 비록 짧은 재관류 기간 동안의 관찰이지만 유발 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 증가하였고 구조 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 감소하였다. 이러한 결과는 백서의 좌골 신경,³¹ 중추 신경계의 허혈-재관류 손상에서의 산화질소 생성효소 변화와 일치하지만³² 유발 산화질소 생성효소 유전자를 결여 시킨 백서(iNOS knockout mouse)의 말초 신경 허혈-재관류 손상과는 상반된 결과를 나타내었다.^{33,34} 그러므로 말초 신경 허혈-재관류 손상에서 산화질소 생성효소 변화와 산화질소의 역할은 규명할 필요가 있을 것으로 사료된다.

세 가지 산화질소 생성효소 중 유발 산화질소 생성효소의 증가와 그로 인해 생성된 과도한 산화질소는 세포 독성 작용을 나타내며 여러 장기에서 허혈 및 허혈-재관류 손상 등 병인에 관여한다는 연구들이 있다. 즉 골격근,³⁵ 배양된 심근 세포,³⁶ 심장 조직,³⁷ 뇌조직,^{38,39} 간조직,⁴⁰ 신장,⁴¹ 비장⁴²의 허혈-재관류 손상에 증가된 유발 산화질소 생성효소의 연관성이 보고되었다. Chen 등은 골격근에서 허혈 후 증가된 유발 산화질소 생성효소의 억제제는 근육의 미세 순환과 수축력을 향상시켜 허혈-재관류 손상을 개선시킴을 증명한 바 있다.⁴³⁻⁴⁵ 유발 산화질소 생성효소 유전자를 결여 시킨 백서도 신장,⁴⁶ 골격근,^{47,48} 및 뇌조직⁴⁹에서 허혈-재관류 손상을 감소시킨 바 있다. 그러나 유발 산화질소 생성효소 증가로 인해 심근 경색 및 뇌조직 허혈 손상이

감소되었다는 연구도 있어 허혈-재관류 손상에서 유발 산화질소 생성효소의 정확한 역할은 아직 이론이 있다.⁵⁰⁻⁵²

본 연구는 백서 좌골 신경에서 압박에 의해서 발생한 허혈-재관류 손상 후 운동 기능 회복을 재관류 기간에 따라 관찰하고 그와 관련된 조직학적 소견과 세 종류 산화질소 생성효소의 mRNA와 단백질 발현의 역동적 변화를 관찰하는 것을 목적으로 하였다. 또한 유발 산화질소 생성효소가 재관류된 좌골 신경의 운동 기능 변화와 구조 산화질소 생성효소에 미치는 영향을 유발 산화질소 생성효소 특이 억제제인 1400W를 이용하여 관찰함으로써 말초 신경 허혈-재관류 손상의 관련 인자를 밝혀내고 치료에 도움이 되고자 하였다.

II. 재료 및 방법

본 실험은 170마리의 Sprague-Dawley 백서(몸무게 175-200g) 암컷을 사용하였으며, 모든 백서는 우측 좌골 신경에 압박 손상을 주어 허혈을 유발하였다. 허혈 손상을 받은 백서들은 재관류시 1400W를 투여하는 실험군과 같은 양의 증류수를 투여하는 대조군으로 임의로 나누어 비교 분석하였다. 압박 압력과 기간은 Chen 등의 연구에 따라 100g(1N, 13mmHg/mm²)를 2시간 동안 특별히 고안된 기계를 이용하여 적용하였다.^{53,54}

1. 표본 실험(Pilot study)

18마리의 백서를 1400W의 용량과 투여 기간을 정하기 위해 사용하였다. 1400W 투여 용량을 결정하기 위해 3mg/kg의 저농도와 10mg/kg의 고농도를 각 3마리 백서에 재관류 10분 전에 1회 피하 주사로 투여한 후 재관류 1, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 35,

42일에 운동 기능 회복을 관찰하였다. 또한 1400W 투여 기간에 따른 운동 기능 변화를 알아보기 위해 3mg/kg 농도의 피하 주사를 허혈 후 1, 3, 7, 14일 동안 12시간 간격으로 각각 3마리의 백서에 시행하였다. 그 후 재관류 기간 동안 좌골 신경 운동 기능 지수를 측정하였다. 표본 실험 결과에서 정해진 용량과 투여 기간을 본 실험에서 이용하였다.

2. 수술적 처치

모든 백서를 100mg/kg Nembutal(Abbott laboratories, North Chicago, IL, USA) 복강내 주사로 마취를 하였다. 우측 둔부를 면도한 후 베타딘 용액으로 무균 피부 소독을 하였다. 둔부 분할 절개 방식으로 좌골 신경을 2cm 정도 노출 시킨 후 미세 현미경을 이용하여 주변 조직으로부터 분리하였다. 좌골 신경이 경골 및 비골 신경으로 분리되기 전 10mm 부분을 특별히 고안된 압박 기계의 같은 크기의 모루(anvil) 위에 장력이 가해지지 않으며, 신경 주행 방향이 바뀌지 않게 자연스러운 위치로 놓고 압력을 가하였다.(그림 1.) 압박 기계는 마이크로미터 스피들(micrometer spindle)로 압력을 조절하고, 내부 부하 약실(integral load cell)에 의하여 유지되며 정확한 압력을 디지털 모니터로 감시하도록 고안되었다. 압력이 가해지는 동안 노출된 좌골 신경은 건조해지지 않게 37℃의 식염수로 수분을 유지해 주었다. 일정 기간의 압박이 끝나면 기계를 좌골 신경에서 제거한 후 미세 현미경을 이용하여 좌골 신경의 압박 부위와 정상 부위의 경계를 10-0 나일론 봉합사(Ethicon, Somerville, NJ, USA)를 이용하여 표시 하였다. 표시가 끝난 백서 피부는 4-0 실크 봉합사를 이용하여 봉합하였다. 백서는 마취에서 깨어난 후 정상 먹이를 먹으며 자신의 우리 안에서 자연스럽게 돌아다니게 하였다.

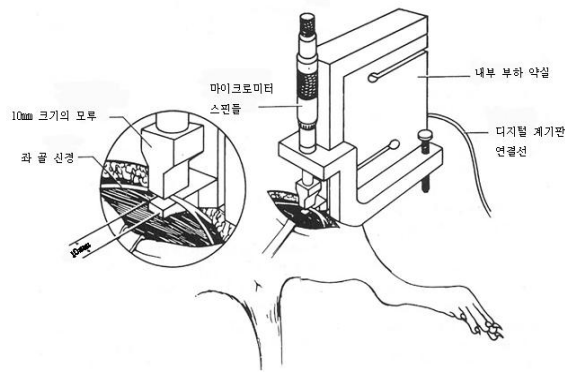


그림 1. 일정 압력이 가해지도록 고안된 기계를 이용한 실험 장면. 좌골 신경 중간 10mm 부분을 압박 기계의 같은 크기의 모루(anvil) 위에 장력이 가해지지 않으며, 신경 주행 방향이 바뀌지 않게 자연스러운 위치로 놓고 압력을 가한다.

3. 운동 기능 측정 검사

실험군과 대조군 백서 각 10마리를 좌골 신경 운동 기능 회복 측정에 이용하였다. 운동 기능 회복 검사는 수술 후 1, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 35, 42일에 각각 시행하였다. 운동 기능 측정은 발광 종이 위에 찍힌 백서들의 발자국 분석으로 하였다.^{53,54} 백서들이 운동하는 통로는 폭 8cm 길이 42cm로 고안된 나무 통로로서 한쪽 끝에는 백서 우리가 위치하여 통로를 따라 걸으면 자동으로 우리로 돌아가게 하였다. 이 통로 위에 같은 크기의 발광 종이를 깔아둔다. 이 종이는 0.5% bromphenol blue(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 아세톤에 용해 시켜 만든 용액에 적신 종이로서 수분과 접촉하면 발광하는 성질을 가지고 있다. 실험하려는 백서의 양쪽 뒷다리를 물에 묻힌 후 발광 종이가 깔린 나무 통로 위로 걸게 놓아둔다. 백서가 지나간 발광 종이 위에는

운동 기능 회복 정도에 따라 다른 모양의 발자국이 남게 된다. 백서 발자국 측정은 de Medinaceli의 방법을 따라서 첫번째와 다섯번째 발가락 사이의 길이(Toe spreading, TS), 두번째와 네번째 발가락 사이의 길이(intermediary toes, IT), 발자국 전체 길이(print length, PL)를 측정하였다.⁵⁵ 이들 측정치를 이용하여 좌골 신경 운동 기능 지수(sciatic functional index, SFI)를 다음 공식으로 계산하였다.⁵⁶(그림 2.)

$$SFI = -38.3 \frac{(EPL - NPL)}{NPL} + 109.5 \frac{(ETS - NTS)}{NTS} + 13.3 \frac{(EIT - NIT)}{NIT} - 8.8$$

E는 우측 압박된 신경 발자국을, N은 좌측 정상 발자국을 의미한다. 수치가 0은 정상을 의미하며 - 100은 완전 마비를 의미한다.

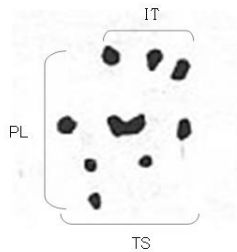


그림 2. 백서 발자국 측정 방법. TS:toe spreading, IT: intermediary toes, PL:print length. 이들 측정치를 이용하여 좌골 신경 운동 기능 지수(sciatic functional index)를 계산한다.

4. 산화질소 생성효소 mRNA 분석을 위한 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응법

세 종류의 산화질소 생성효소 mRNA 발현 분석을 위하여 두 군에서 6마리씩 압박 후 채관류 3시간, 1, 3, 7일에 각각 희생하였다. 모든 백서는 우측 좌골 신경의 압박되었던 부분과 함께 좌측 정상 좌골 신경의 동일한 부위, 동일한 길이를 내부 대조군으로 채취하였다. 세 종류의 산화질소 생성효소 mRNA 발현량은 내부 대조군으로 보정하여 비교 백분율로 표현하였다. 압박 후 채취한 좌골 신경은 RNA later(Ambion, Austin, TX, USA) 용액에 넣고 4°C에서 24시간 보관한 후 -20°C에서 분석할 때까지 보관하였다. 좌골 신경으로부터 Total RNA는 RNeasy mini kit(Qiagen, Valencia, USA)를 이용하여 분리하고 37°C에서 1시간 동안 DNase I을 처리한 후 RiboGreen(Molecular Probes inc, Eugene, OR, USA)을 이용하여 정량하였다. cDNA는 0.4µg의 total RNA로부터 최종 부피 20µl이 되도록 하여 SuperScript™II reverse transcriptase kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 42°C에서 90분간 반응시켜 합성하였다. 정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응은 iQ™ SYBR Green Supermix real-time PCR kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 iCycler thermal cycler(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 실행하였다. 산화질소 생성효소 유전자 증폭을 위한 primer 염기서열은 Primer express software(Applied Biosystems)를 이용하여 제작하였으며 (표 1.), 유전자 발현의 정량적인 분석을 위해 18S rRNA 유전자 발현을 대조군으로 하여 comparative CT(threshold cycle) 방법으로 정량하였다.

Gene	Sense	Antisense	Size (bp)
mNOS	5' GGCAAACATGACTTCCGAG TGT	5' CCCCAAGGTAGAGCCA TCTG	81
iNOS	5' CACGACACCCTTCACCACA AG	5' TTGAGGCAGAAGCTCC TCCA	138
eNOS	5' TTCTGGCAAGACCGATTAC ACGACAT	5' AAAGGCGGTGAGGACT TGTCCTAAA	162
18S	5' GAGGTGAAATTCTTGGACC GG	5' CGAACCTCCGACTTTC GTTCT	93

표 1. 신경, 유발, 내피 산화질소 생성효소 유전자 증폭을 위한 primer 염기 서열.

5. 산화질소 생성효소 단백질 분석을 위한 Western blot 분석법

세 종류의 산화질소 생성효소 단백질 분석을 위하여 두 군에서 6마리씩 우측 좌골 신경의 압박 부분을 재관류 후 3시간, 1, 3, 7, 14, 21일에 각각 채취하였다. 재관류 42일째 산화질소 생성효소 단백질 발현 분석은 운동 기능 측정 검사에 사용되었던 백서를 희생하였다. mRNA 발현 분석과 동일하게 좌측 정상 좌골 신경을 내부 대조군으로 채취하였으며 세 종류의 산화질소 생성효소 단백질 발현량을 내부 대조군으로 보정하여 비교 백분율로 표현하였다. 채취한 좌골 신경 조직은 즉시 액화 질소에 넣고 -80℃에서 분석할 때까지 보관하였다. 냉동된 좌골 신경을 lysis buffer 용액(1% SDS, 1.0 mM sodium ortho-vanadate, 10 mM Tris pH7.4), (BD Biosciences San Diego, CA, USA)에 넣고 10-15초 정도 가열하며 균질화시켰다. 용해되지 않은 조직은 4℃, 13,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액만 분리해서 제거하였다. 단백질 정량은 BCA kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 실행하였다. 총 30µg의 단백질을 취하여 6X

SDS-loading buffer와 혼합하여 100°C에서 3분간 끓인 후, NuPAGE 3-8% Tris-acetate gel(Invitrogen)에서 100V, 2시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝나면, 25mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.4% glycine, 20% methanol이 포함된 용액을 이용하여 50V, 2시간 동안 PVDF membrane으로 단백질을 이동시켰다. PVDF membrane으로 단백질을 5% 무지방 우유를 포함한 1X TBST용액(10mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 0.05% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking하였다. Membrane을 1X TBST로 3회 세척하고, 1% 무지방 우유가 포함된 1X TBST 용액에서 신경 산화질소 생성효소에 대한 monoclonal 1차 항체(1:1,500, BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), 내피 산화질소 생성효소에 대한 monoclonal 1차 항체(1:750, BD Transduction Laboratories), 유발 산화질소 생성효소에 대한 polyclonal 1차 항체(1:750, upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY, USA)를 4°C, 12시간씩 각각 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후, 1X TBST 용액으로 3회 세척하고 1% 무지방 우유가 포함된 1X TBST 용액에서 구조 산화질소 생성효소 2차 항체로서 horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG(Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 1:5,000 비율로, 유발 산화질소 생성효소 2차 항체로서 horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (Calbiochem)를 1:12,000 비율로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 단백질 발현은 SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate detection kit(Pierce)를 이용하여 발색시키고, X-ray 필름에 노출시킨 후 현상하여 관찰하였다. 단백질 정량을 위한 대조군으로는 actin 항체를 반응시켜 비교하였다.

6. 조직학적 검사

실험군과 대조군 각 2마리씩으로부터 좌골 신경 압박 부위를 재관류 7, 14, 21일에 각각 적출하였다. 재관류 42일째의 신경 조직은 운동 기능 측정 검사에 사용되었던 백서를 희생하였다. 적출한 좌골 신경은 나무 막대에 고정하여 조직 수축을 막고 즉시 4% glutaraldehyde 용액에 넣어 4℃에서 최소 24시간 이상 보관하였다. 그 후 고정한 좌골 신경을 1% osmium tetroxide 용액에 옮긴 후 조직학적 검사 전에 에탄올로 탈수시키고, Epon 812에 보관하였다. 모든 신경 조직은 동일한 부위(압박 부위의 정중앙)를 toluidine blue로 염색하여 관찰하였다. 축삭의 퇴행성 정도는 두 군의 같은 날 조직 표본에서 정상 축삭과 퇴행성 축삭 숫자의 비율로 비교하였다.

7. 통계학적 분석

실험군과 대조군의 좌골 신경 운동 기능 지수 비교는 Student's t-test를 이용하였다. 재관류 기간 동안의 세 종류 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질 발현은 일원 배치 분산 분석(One-way ANOVA)을 이용하여 비교하였으며 유의성 검증은 post hoc analysis를 이용하였다. 모든 수치는 평균 ± 표준 평균 오차(standard error of the mean)로 나타내었으며 통계학적 유의성은 95% 신뢰구간을 택하였다. 모든 통계 처리는 SPSS(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하였다.

III. 결과

1. 수술 후 신경 관찰

압박 직후 모든 신경의 압박 부분은 연결성은 유지되었으나

미세 혈관 및 신경 주위 조직이 파괴된 상태로 납작하고 얇아짐이 관찰되었다. 모든 백서들은 수술 후 감염이나 자가 절단의 징후는 보이지 않았다. 수술 후 1일째 운동 기능 측정 검사에서 실험군과 대조군 모두 측정할만한 발자국이 없는 것을 관찰함으로써 좌골 신경이 일시적으로 마비될만한 충분한 압박이 가해졌다는 것을 확인하였다.

2. 표본 실험 결과

표본 실험 결과 1400W를 투여한 모든 실험군이 운동 기능 측정 검사에서 대조군보다 높은 좌골 신경 운동 기능 지수를 나타내었다. 그러나 운동 기능 회복 양상은 3mg/kg과 10mg/kg 1400W 투여 받은 백서에서 통계학적으로 의미 있는 차이를 나타내지 않았다.(그림 3.)

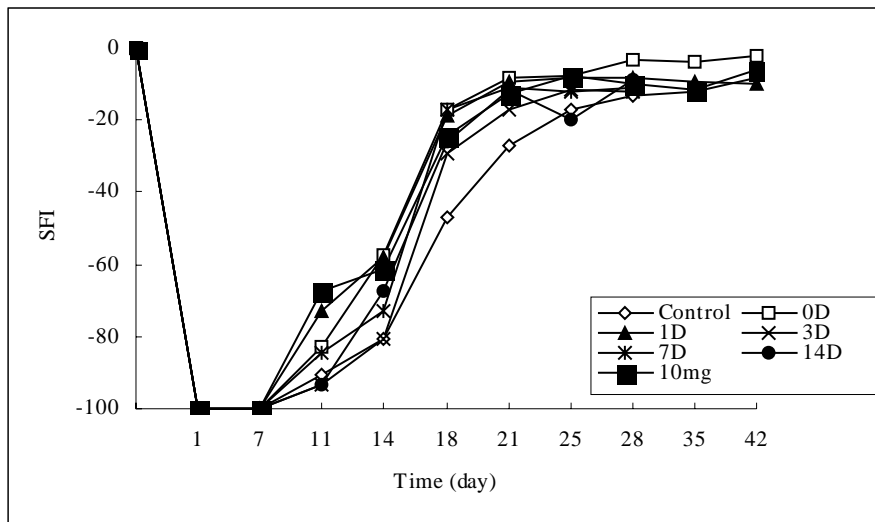


그림 3. 각기 다른 농도와 기간의 1400W를 투여한 백서의 2시간 허혈 후 재관류 기간 동안의 좌골 신경 운동 기능 지수(SFI). 1400W 농도와 투여 기간에 따른 운동 기능 회복 차이는 없었다.

또한 1400W 투여 기간도 재관류 10분전 1회 투여한 백서와 재관류 후 14일 동안 1일 2회씩 투여한 백서가 운동 기능 회복에서 의미 있는 차이가 없었다. 그래서 1400W의 용량 및 투여 기간을 3mg/kg, 재관류 10분 전 1회 투여로 결정하고 본 실험에 적용하였다.

3. 운동 기능 측정 검사 결과

수술 후 첫 날 시행한 운동 기능 회복 측정에서는 양 군 모두 측정할 수 있는 발자국이 나타나지 않았다. 수술 후 7일에 시행한 운동 기능 회복 검사에서도 회복의 발자국은 관찰할 수 없었으나 수술 후 11일째 양 군 모두 측정할 수 있는 발자국이 관찰되기 시작하였다.(그림 4.) 운동 기능 회복 중인 발자국은 정상보다 폭이 좁고 길이가 길게 나타났다.

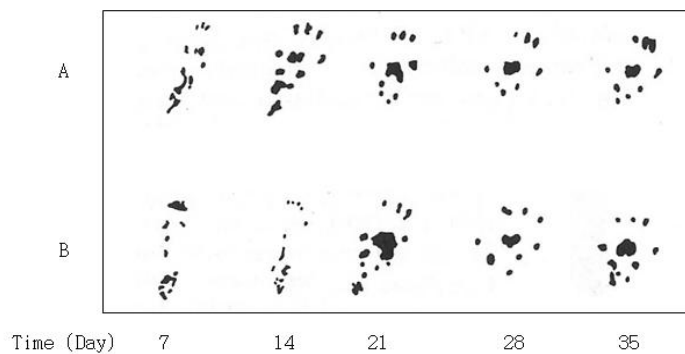


그림 4. 대조군과 실험군의 재관류 기간에 따른 발자국 변화. 운동 기능 회복 중인 발자국은 정상 발자국보다 폭이 좁고 길이가 길게 나타났다. 실험군의 발자국이 대조군보다 빠르게 정상으로 회복되고 있다. A. 실험군, B. 대조군.

측정할 수 있는 발자국은 실험군이 대조군보다 많았으며 좌골 신경 기능 회복 기능 지수도 의미 있게 높게 나타났다. 수술 후 2주부터 대조군의 발자국도 모두 측정할 수 있었지만 좌골 신경 기능 회복 기능 지수가 실험군이 의미 있게 높았다. 좌골 신경 기능 회복 기능 지수의 의미 있는 차이는 수술 후 11일째부터 28일까지 관찰되었으며 14일 측정이 가장 큰 차이를 보였다(실험군 -62.5, 대조군 -80.8). 실험군은 재관류 25일 측정시 대부분의 백서가 정상 발자국을 보인 반면 대조군은 35일 측정에서 대부분 정상 발자국 모양을 나타내었다. 전반적으로 실험군의 신경 기능 회복 속도가 대조군에 비하여 일주일 정도 빠르게 관찰되었다.(그림 5.)

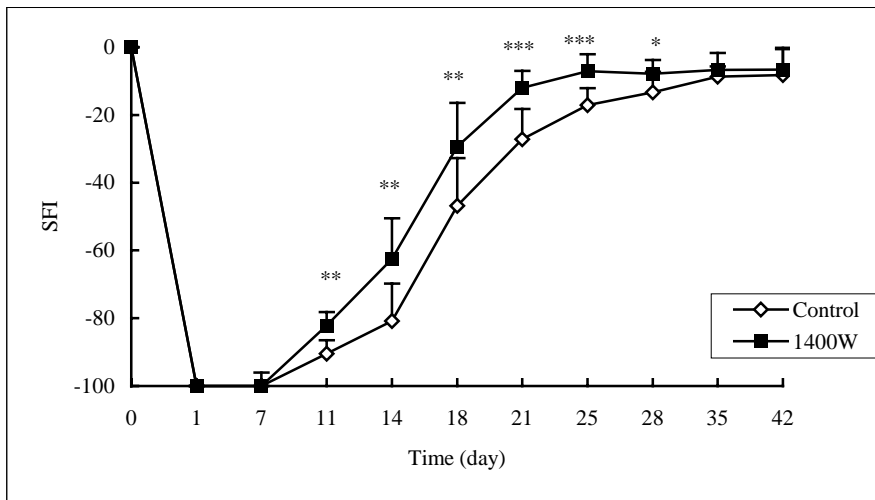


그림 5. 대조군과 실험군의 재관류 기간에 따른 좌골 신경 운동 기능 지수(SFI). 재관류 11일과 28일 사이에서 두 군의 통계학적으로 의미 있는 차이를 보인다. 오차 막대는 표준 평균 오차를 나타낸다.

대조군에 비하여 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4. 산화질소 생성효소 mRNA 발현 분석 결과

세 가지 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 재관류 3시간, 1, 3, 7일에 각각 측정하였다. 압박 후 식염수를 투여 받은 대조군 좌골 신경의 유발 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 재관류 3시간, 1일 및 3일 측정시 정상 좌골 신경 mRNA 발현량보다 각각 43배, 13배 및 6배 이상 증가한 값을 나타내었다. 1400W를 투여한 실험군의 허혈로 증가된 유발 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 각각 13배, 4배 및 3배로 감소하였다.(그림 6A.) 재관류 3일까지 두 군의 mRNA 발현은 의미 있는 차이를 나타냈으나 재관류 7일에는 유발 산화질소 생성효소 mRNA 발현이 두 군 모두 거의 정상 수준으로 돌아와 의미 있는 차이는 관찰되지 않았다.

신경 산화질소 생성효소 mRNA 발현량은 재관류 3시간에 정상 발현보다 대조군이 77%, 실험군이 51% 각각 감소하였다.(그림 6B.) 신경 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 재관류 1일 측정시 두 군 모두 더욱 감소하였다가 그 후 서서히 증가하는 양상을 보여주었다. 실험군의 신경 산화질소 생성효소 mRNA 발현이 재관류 7일 측정만 제외하고 대조군보다 감소되었으나 재관류 전 과정을 통해 통계학적으로 두 군의 의미 있는 차이는 없었다.

내피 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 두 군 모두 재관류 첫 3일 동안 정상 발현량보다 평균 4배 정도 증가하였다.(그림 6C.) 그러나 내피 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 재관류 7일 측정시 큰 폭으로 감소하여 두 군 모두 정상 발현보다 감소하였다. 그러나 대조군과 실험군의 내피 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 재관류 기간 동안 의미 있는 차이를 나타내지 않았다. 세 종류의 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 재관류 7일 이후 정상 발현을 나타내어 더 이상 측정하지 않았다.

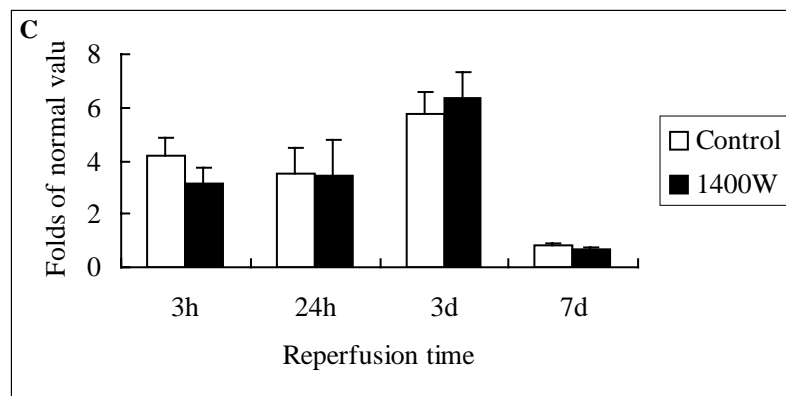
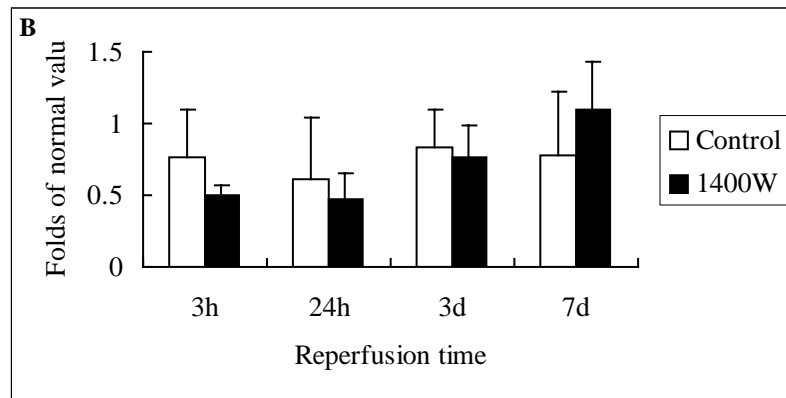
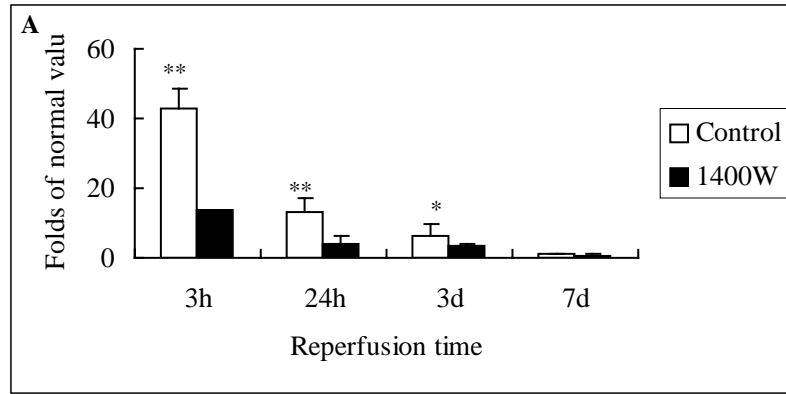


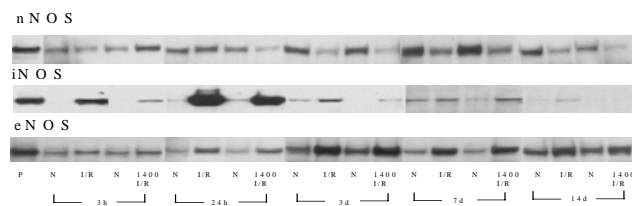
그림 6. 백서 좌골 신경에서 2시간 허혈 후 재관류 기간에 따른 세 종류의 산화질소 생성효소 mRNA 발현에 대한 1400W의 효과. A. 유발 산화질소 생성효소 mRNA, B. 신경 산화질소 생성효소 mRNA, C. 내피 산화질소 생성효소 mRNA. 오차 막대는 표준 평균 오차를 나타낸다. 대조군에 비하여 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

5. 산화질소 생성효소 단백질 발현 분석 결과

세 가지 산화질소 생성효소 단백질 발현은 재관류 3시간, 1, 3, 7, 14, 21, 42일에 각각 측정하였다.(그림 7A.) 허혈-재관류 손상 후 유발 산화질소 생성효소 단백질 발현은 재관류 3시간부터 7일까지 뚜렷하게 나타났으며 1일째 최고 수준을 보여 정량적 분석 결과 식염수를 투여 받은 대조군의 좌골 신경 유발 산화질소 생성효소 단백질 발현은 정상 좌골 신경 단백질 발현량보다 12배, 실험군은 6배의 증가를 나타내었다.(그림 7B.) 대조군과 비교하여 1400W를 투여 받은 실험군의 단백질 발현은 재관류 3시간과 ($p<0.05$) 1일 ($P<0.01$)에 통계학적으로 의미 있게 감소되었다. 재관류 14일에 유발 산화질소 생성효소 단백질 발현은 두 군 모두 정상 수준으로 돌아왔으며 그 이후는 발현되지 않았다.

신경 및 내피 산화질소 생성효소 단백질 발현은 재관류 3시간 측정시 대조군과 실험군 모두 정상 발현보다 약간 감소한 양상을 보여 주었다.(그림 7C, D.) 그 후 대조군의 신경 산화질소 생성효소 단백질 발현은 재관류 전 과정을 통하여 정상 보다 약간 낮은 발현량을 유지하였으며, 대조군의 내피 산화질소 생성효소 단백질 발현은 정상 보다 높은 발현량을 유지하였다. 그러나 1400W를 투여한 실험군도 두 산화질소 생성효소 단백질 발현에서 42일까지의 재관류 기간 동안 대조군과 비슷한 양상을 나타내어 의미 있는 차이가 없었다.

A



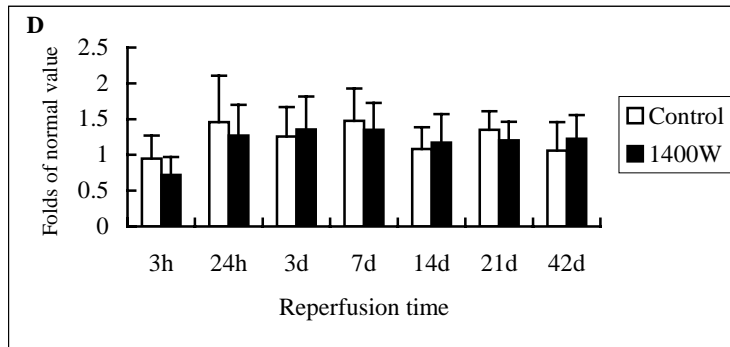
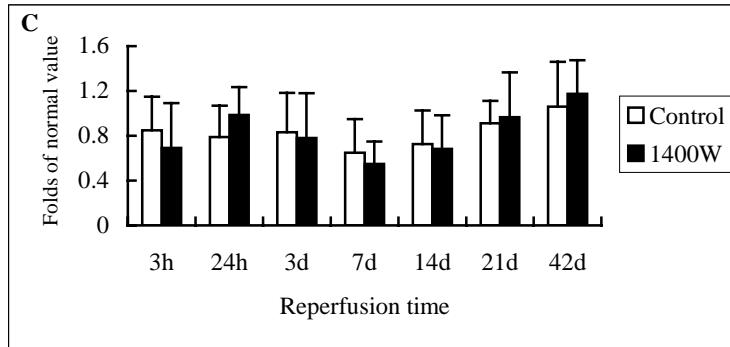
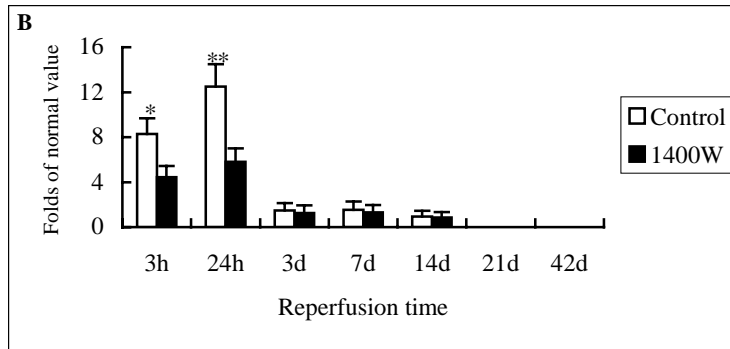


그림 7. 백서 좌골 신경에서 2시간 허혈 후 재관류 기간에 따른 세 종류의 산화질소 생성효소 단백질 발현에 대한 1400W의 효과. A. 세 종류 산화질소 생성효소 단백질 발현, B.유발 산화질소 생성효소 단백질, C.신경 산화질소 생성효소 단백질, D.내피 산화질소 생성효소 단백질. P: positive control, N: 대조군, I/R: 실험군, 오차 막대는 표준 평균 오차를 나타낸다. 대조군에 비하여 * p<0.05, ** p<0.01

6. 조직학적 검사 결과

재관류 7일에 채취한 신경 조직에서는 수초의 파괴 및 부종, 축삭의 수축 및 공포 형성, 혈관벽의 비후와 혈관내강 출혈 등의 퇴행성 변화가 실험군과 대조군 모두에서 관찰되었다. 두 군 모두 크기가 큰 축삭의 퇴행성 변화가 뚜렷하였으며 파괴된 수초를 거식 작용하고 있는 대식세포들도 관찰되었다. 재관류 14일에 채취한 신경에서는 통계학적으로 의미는 없지만 대조군의 퇴행성 축삭 숫자가 1400W를 투여한 실험군보다 평균 2.5배 정도 많이 측정되었다.(그림 8A, B.) 실험군에서는 비록 미미한 숫자이지만 Schwann 세포에 둘러싸여 얇은 수초를 가진 재생 축삭이 관찰되기 시작하였다. 재관류 21일에 관찰한 실험군 신경 조직은 대조군과 비교하여 대식세포의 숫자가 감소하였고 재생 축삭의 숫자가 증가하였으며 더 조밀한 모양을 나타내었다. 또한 실험군 재생 축삭의 지름이 좀 더 컸으며 수초가 굵게 형성되었다.(그림 8C,D.) 이 시기에 대조군의 신경 조직에서도 재생 신경 섬유가 관찰되기 시작하였다. 재관류 42일에 관찰한 신경 조직에서는 대부분의 축삭이 재생된 상태였으며 재생 축삭의 양이나 모양에서 두 군의 차이는 없었고 거의 정상 신경 섬유 조직의 형태를 보였다.

IV. 고찰

본 연구 결과 백서 좌골 신경의 2시간 허혈 후 42일까지의 재관류 기간 동안 유발 산화질소 생성효소 특이 억제제인 1400W의 재관류 초기 투여가 손상된 좌골 신경 운동 기능 회복을 의미 있게 촉진시켰다.

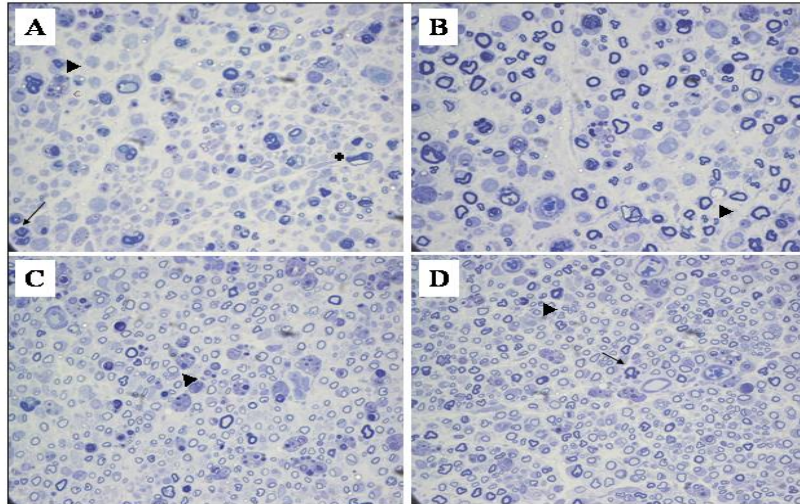


그림 8: 좌골 신경 중간 부분에서 채취하여 염색한 신경 조직 (toluidine blue, x400). A. 재관류 14일, 대조군 신경 조직, ▶: 파괴된 수초를 거식 작용을 하는 대식세포, →: 수초의 부종, *: 축삭의 퇴행성 변화로 형성된 공포 B. 재관류 14일, 실험군 신경 조직, ▶: 재생 축삭 C. 재관류 21일, 대조군 신경 조직, 퇴행성 축삭과 재생 축삭이 (▶) 동시에 관찰되고 있다. D. 재관류 21일, 실험군 신경 조직. 대식세포의 숫자가 감소하였으며 지름이 크고 굽은 수초에 (→) 둘러싸인 재생 축삭의 숫자가 증가하였으며 더 조밀한 모양을 보여준다 (▶)

조직학적 검사 결과도 1400W를 투여한 실험군에서 빠른 축삭 재생이 관찰되어 운동 기능 회복 결과와 일치하였다. 또한 말초 신경의 허혈-재관류 손상은 세 종류의 산화질소 생성효소 활성화에 모두 영향을 주어 각기 다른 mRNA와 단백질 발현 양상을 나타냄으로써 세 종류 모두 허혈-재관류 손상에 관여함을 알 수 있었다. 즉 유발 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질 발현은 재관류 초기 3일 동안 증가된 후 감소하였으며 신경 산화질소 생성효소는

재관류 42일까지 정상 좌골 신경 발현량보다 감소된 소견을 보여 주었고 내피 산화질소 생성효소는 정상 발현보다 증가되었다. 1400W는 허혈-재관류 손상으로 증가된 유발 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질 발현을 재관류 3시간부터 감소시켰으나 신경 및 내피 산화질소 생성효소에는 영향을 주지 못하였다. 그러므로 본 연구는 산화질소 및 산화질소 생성효소가 허혈-재관류 손상에 관여하며, 유발 산화질소 생성효소의 재관류 초기 억제는 mRNA와 단백질 발현을 감소시켜 말초 신경의 허혈-재관류 손상 전 과정에 영향을 미쳐 운동 기능을 빠르게 회복시키는데 중요한 역할을 하는 것을 증명하였다.

지금까지의 연구 문헌을 조사해 보면 허혈-재관류 손상에서 산화질소의 작용은 이점과 독성을 모두 가지고 있는 이중적 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 역설적 역할은 허혈-재관류 손상에 대하여 각기 다르게 반응하는 세 종류의 산화질소 생성효소로부터 생성된 산화질소의 불균형으로 기인한 것으로 사료된다. 구조 산화질소 생성효소의 활동성은 세포내 Ca 농도 증가에 의존한다. 그러므로 허혈로 인한 세포내 Ca 농도 증가는 구조 산화질소 생성효소로부터 산화질소를 일시적으로 증가시켜 혈관 확장, 혈소판 침착 방지, 염증 세포 유착 방지 등 재관류 손상 억제 역할을 한다.^{57,58} 그러나 허혈된 조직으로의 재관류는 chemoattractant mediator 유출, 염증세포 유입과 유착 증가, 혈관 단백질 방출 등을 유발한다.⁵⁹⁻⁶¹ 이러한 환경은 유발 산화질소 생성효소 활동성을 증가시켜 구조 산화질소 생성효소에서 생산되는 농도보다 최대 1000배 높은 산화질소를 생성하는 것으로 알려져 있다.^{18,21} 과다한 농도의 산화질소는 생성 즉시 과산소 음이온과 반응하여 peroxynitrite 같은 독성 물질을 생성하여 지방 과산화, tyrosine nitration, sulfhydryl

oxidation, DNA 손상 그리고 mitochondria의 oxidative phosphorylation을 방해하여 세포 독성 작용을 나타낸다.^{16,62,63} 그러므로 유발 산화질소 생성효소에서 생성되는 과도한 농도의 산화질소가 재관류 손상의 주범으로 사료된다.⁶⁴

신경 계통에서 산화질소의 독성 작용은 축삭과 수초 파괴,⁶⁵ 성장 원뿔 허탈,⁶⁶ 신경 돌기 증식 방해⁶⁷ 등의 결과를 초래한다. Conti 등은 유발 산화질소 생성효소에서 생성된 산화질소는 Schwann 세포-축삭 관계에 영향을 주어 축삭 퇴행과 신경 섬유막 세포 운명을 조절한다고 보고하였다.⁶⁸ 유발 산화질소 생성효소 억제제가 재관류 기간 동안 축삭 퇴행을 억제하고 재생을 촉진하여 운동 기능 회복을 증가시킨 본 연구의 결과도 이러한 논문들과 일치하였다. 1400W를 섭취한 백서의 운동 기능은 대조군보다 약 일주일 정도 빠른 회복을 보여 주었으며 좌골 신경 축삭의 재생에 소요되는 시간을 25% 정도 감소시켰다. 본 연구는 비록 다른 방법으로 유발된 백서 좌골 신경의 허혈-재생 손상이지만 재생 신경 섬유가 재관류 28일부터 관찰된 Iida 등의 연구보다 빠른 재생을 나타내었다.⁶⁹ 이러한 결과는 산화질소 생성효소 억제제가 허혈-재관류 손상과 관련된 지방 과산화 감소와 superoxide dismutase 활동을 유지시켰으며 이로 인하여 백서 좌골 신경의 허혈-재관류 손상으로 인한 신경 섬유 손상을 보호할 수 있었다는 Sazan 등의 연구 결과와 일치하였다.³¹ 또한 소뇌 허혈-재관류 손상은 유발 산화질소 생성효소에서 생성된 과다한 산화질소에 의하여 악화되고⁴⁹ 녹차잎 카테킨을 통한 유발 산화질소 생성효소 억제로 호전되었다는 보고가 있다.⁷⁰ 골격근 허혈-재관류 손상에서도 1400W 투여 백서와 유발 산화질소 생성효소 유전자를 결여 시킨 백서에서 혈류량이 증가하고 근육 수축력 회복이 빠르게 진행되어 손상 회복이 개선되었다는 연구가 보고

되었다.^{44,45,48} 그러므로 유발 산화질소 생성효소로부터 생성된 과도한 산화질소는 말초 신경 허혈-재관류 손상에 결정적인 역할을 하며 유발 산화질소 생성효소 억제제는 말초 신경 허혈-재관류 손상 치료의 한 방법으로 고려해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

허혈-재관류 손상이 유발 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질 발현을 증가시킨 결과는 말초 신경²² 뿐 아니라 뇌조직,⁷⁰ 후척수 신경절,⁷¹ 골격근^{22,44} 등 여러 장기에서 보고되었다. 허혈-재관류 손상으로 인한 유발 산화질소 생성효소 증가 시기는 조직마다 약간씩 다르게 나타난다. 뇌조직에서는 유발 산화질소 생성효소 mRNA 발현이 재관류 12시간에 최고조에 이르렀다가 4일에는 발견할 수 없었다.⁷² 유발 산화질소 생성효소 활동성도 재관류 12-24시간에 증가되었다가 4일에는 감소 소견을 보였다. 심장 허혈-재관류 손상에서 Takimoto 등은 유발 산화질소 생성효소 mRNA 발현이 재관류 1일째 나타나기 시작하여 3일에 최고에 이르렀다가 그 후 감소한다고 하였으며, 유발 산화질소 생성효소 단백질 발현은 7일에 가장 증가함을 보고한 바 있다.³⁷ 골격근에서는 유발 산화질소 생성 효소 활동성이 재관류 3시간부터 증가하였다는 보고도 있으나,⁷³ Stewart 등은 재관류 10분 후부터 구조 산화질소 생성효소 활동성의 감소와 함께 유발 산화질소 생성효소 활동성이 증가하기 시작하였다고 발표하였다.⁷⁴ 본 연구에 따르면 재관류된 말초 신경에서 유발 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 재관류 후 3시간째 증가하였다가 그 후 감소 하였으며, 단백질 발현은 3시간부터 증가하여 1일째 최고 수준에 이른 후 감소하는 결과를 나타내었다. 여러 조직에서 공통으로 유발 산화질소 생성효소는 재관류 초기에 증가하였다. 그러므로 증가된 유발 산화질소 생성효소의 초기 억제는 말초

신경 허혈-재관류 손상 방지에 있어서 가장 중요한 요소 중 하나로 사료된다. Levy 등은 말초 신경에 일시적 마비가 발생하지 않을 정도의 압박을 지속적으로 가하였을 때는 유발 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질 발현이 재관류 5일째 최고에 이르러 14일까지 유지되었음을 보고한 바 있다.⁷⁵ 이는 좀 더 강한 압박이 대식세포와 Schwann 세포를 자극하여 재관류 초기에 고농도의 유발 산화질소 생성효소를 생성하는 것으로 해석된다.

유발 산화질소 생성효소와는 다르게 신경 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질 발현은 재관류 첫 3일 동안 정상보다 감소되었다가 재관류 7일과 21일에 각각 거의 정상 수준으로 회복되었다. 이는 각각의 산화질소 생성효소가 말초 신경 허혈 후 재관류에 다르게 반응한다는 Qi 등의 연구와 일치하는 결과다.²² 망막 허혈-재관류 손상에서 신경 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 거의 탐지할 수 없을 정도로 감소하였다는 보고가 있다.⁷⁶ 배양된 대뇌 세포에서 허혈 후 재관류 기간 동안 신경 산화질소 생성효소 mRNA 발현이 감소되었을 뿐 아니라 면역 반응력도 저하되었다.⁷⁷ 최근 Park 등은 백서 좌골 신경 허혈-재관류 손상에서 산화질소 공여 물질이 의미 있게 운동 기능을 회복시키며 근육 수축을 증가시키는 것을 밝혀냈다.⁷⁸ 이는 신경 산화질소 생성효소가 여러 장기의 허혈-재관류 손상에 긍정적인 역할을 한다는 것을 의미한다. 그러나 중추 신경계에서는 신경 산화질소 생성효소 역할의 상반된 연구 결과들이 보고되었다.^{32,63,79} Niwa 등은 대뇌 허혈-재관류 손상에서 신경 산화질소 생성효소가 재관류 초기에 증가하여 허혈 기간 동안 신경 세포 독성 작용을 한다고 보고하였다. 또한 백서의 일과성 대뇌 허혈 후 신경 산화질소 생성효소의 억제제 투여는 신경 손상을 감소시키며,⁸⁰ 허혈로 유발된 glutamate를 감소시켜 해마의 기능 장애를 개선시켰다는 연구가 있다.⁸¹ 본 논문에서는

재관류 기간 동안 신경 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질 발현이 감소하여 재관류 손상에 관여한 것으로 판단하나 1400W 사용시 농도 변화가 대조군과 비교하여 거의 없어 운동 기능 회복과의 연관성을 밝히기는 어려웠다. 신경 산화질소 생성효소 조절 기전은 복잡하므로 말초 신경 허혈-재관류 손상의 생화학적 연관성은 추후 특히 억제제 등을 통한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구는 재관류 기간 동안 내피 산화질소 생성효소 증가를 보여 주었다. 내피 산화질소 생성효소 mRNA 발현은 재관류 첫 3일 동안 정상 발현량보다 6배 정도 증가하였다가 7일째 정상 수준으로 돌아왔다. 내피 산화질소 생성효소 단백질 발현은 재관류 3시간에 약간 감소하였다가 나머지 재관류 기간 동안 약간 증가된 양상을 유지하였다. 말초 신경 허혈-재관류 손상에서 혈관 확장제인 trapidil과 alprostadil이 의미 있게 내피 산화질소 생성효소 최종 산물 생성을 증가시켜 수초 손상과 축삭 부종을 감소시켰다는 연구 보고들이 있다.^{15,82} 또한 대뇌 허혈 후 혈관 내피 성장 인자의 증가와 함께 내피 산화질소 생성효소 단백질 발현이 증가됨은 보고된 바가 있다.^{79,83,84} 대뇌 허혈-재관류 손상시 내피 산화질소 생성효소 억제제 투여는 혈관 수축과 혈압 증가를 유발하여 해마의 기능 장애를 악화시켰다는 연구 결과도 있다.⁸¹ 이러한 내피 산화질소 생성효소의 증가는 중추 신경계 허혈에서 대뇌 혈류를 유지하는데 필수적인 것으로 간주되며, 혈소판 활성을 감소시키고 뇌경색 범위를 축소시키는 중요한 역할을 하였다.^{32,85} 내피 산화질소 생성효소의 과다 발현은 좌골 신경 결찰 후 결찰 부위와 말단의 신경내 혈관 주변에서 발견되었다.⁸⁶ 이러한 연구 결과들은 신경계 허혈-재관류 손상에서 내피 산화질소 생성효소는 혈류를 유지하며 혈관 경련을

감소시키는 등 신경 보호 역할을 하는 것으로 이해된다. 그러나 본 연구에서 증가된 내피 산화질소 생성효소에서 생성된 산화질소의 역할은 말초 신경 허혈-재관류 손상에서의 유발 산화질소 생성효소에서 발생한 고농도의 산화질소에 의해 상쇄되어 신경 보호 역할을 하지 못하는 것으로 추론된다. 허혈-재관류 손상시 세 종류 산화질소 생성효소의 역할과 상호간의 관계는 좀 더 자세한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

1400W는 유발 산화질소 생성효소에 특이한 억제제로서 내피 산화질소 생성효소에 대한 작용보다 5000배, 신경 산화질소 생성효소에 대한 작용보다 200배 이상의 억제 능력이 있다.⁸⁹ 1400W는 체내에서도 변성 없이 오랜 반감기를 유지하며 유발 산화질소 생성효소에 강하고 불가역적으로 결합하여 작용한다. 본 실험에서도 1400W는 재관류 첫 3일 동안 유발 산화질소 생성효소 발현을 대조군보다 50% 이하로 억제하였으나 내피 및 신경 산화질소 생성효소 발현에 대하여는 영향을 주지 못한 것이 특이 억제제임을 나타내었다. 본 연구 결과 실험군과 대조군의 유발 산화질소 생성효소 발현이 재관류 3일 후에는 차이가 없는 것으로 미루어 1400W는 유발 산화질소 생성효소 농도가 고농도일 경우에만 억제작용을 하는 것으로 사료된다. 본 연구 결과 1400W가 말초 신경의 허혈-재관류 손상의 치료제로서 충분한 가치가 있는 것을 보여 주었다.

본 연구를 통해 유발 산화질소 생성효소 증가와 신경 산화질소 생성효소 활동성 감소는 말초 신경 허혈-재관류 손상에 중요한 역할을 하는 것을 밝혀냈다. 그러나 그와 동시에 내피 산화질소 생성효소의 활동성이 증가하여 재관류된 조직에서 혈관 확장, 염증 세포 유착 및 혈소판 침착 감소와 같은 신경 보호 작용도 발생하였음을 알 수 있었다. 산화질소의 세포 및 조직에

대한 작용은 산화질소 공급원, 세포 주변 농도, 산화질소 생성 시기 등의 중요한 미세 환경들에 의해 결정된다.^{17,87,88} 각 산화질소 생성효소가 구별된 발생원, 분포, 작용을 가지고 있는 것을 고려하면, 각 산화질소 생성효소의 역동적 발현과 그들 사이에서의 균형은 허혈-재관류 손상의 신경 재생과 퇴행 과정에서 정확하게 규명되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

결론적으로 산화질소 및 산화질소 생성효소는 말초 신경 허혈-재관류 손상 기전에 관여하며 세 종류의 산화질소 생성효소는 각각 다른 활성을 나타내는 것으로 판명되었다. 그 중에서 유발 산화질소 생성효소는 말초 신경 허혈-재관류 손상에서 재관류 초기에 증가하여 신경 재생 지연 작용을 한다. 유발 산화질소 생성효소 특이 억제제인 1400W는 백서 좌골 신경에서 허혈 후 재관류 기간 동안 유발 산화질소 생성효소 mRNA와 단백질 발현을 감소 시켜 운동 기능 회복과 축삭 재생을 의미 있게 증가시켰다. 본 연구 결과 재관류 손상 초기의 1400W 투여는 말초 신경 허혈-재관류 손상을 개선시키는 가능성 있는 치료 방법이며 재관류 기간 동안 각 산화질소 생성효소의 발현 변화와 균형을 이해하는 것이 말초 신경 허혈-재관류 손상 기전을 이해하는데 필수 요소라고 사료된다.

참고문헌

1. Kline DG, Hackett ER. Reappraisal of timing for exploration of civilian peripheral nerve injuries. *Surgery* 1975;78:54-65.
2. Bassett FH, 3rd, Nunley JA. Compression of the musculocutaneous nerve at the elbow. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64:1050-1052.
3. Happel L, Kline D. Nerve lesions in continuity. Philadelphia (PA): JB Lippincott; 1991.
4. Davidson JJ, Bassett FH, 3rd, Nunley JA, 2nd. Musculocutaneous nerve entrapment revisited. *J Shoulder Elbow Surg* 1998;7:250-255.
5. Friedman AH, Nunley JA, 2nd, Goldner RD, Oakes WJ, Goldner JL, Urbaniak JR. Nerve transposition for the restoration of elbow flexion following brachial plexus avulsion injuries. *Journal of Neurosurgery* 1990;72:59-64.
6. Stoll G, Muller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 1999;9:313-325.
7. Ames A, 3rd, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 1968;52:437-453.
8. Liu P, Hock CE, Nagele R, Wong PY. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol*

1997;272:H2327-2336.

9. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999;6:167-178.
10. Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:378-384.
11. Allen DM, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Pathophysiology and related studies of the no reflow phenomenon in skeletal muscle. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 1995;314:122-133.
12. Chen LE, Liu K, Seaber AV, Katragadda S, Kirk C, Urbaniak JR. Recombinant human glial growth factor 2 (rhGGF2) improves functional recovery of crushed peripheral nerve (a double-blind study). *Neurochemistry International* 1998;33:341-351.
13. Korompilias AV, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Interleukin-1 beta promotes functional recovery of crushed peripheral nerve. *Journal of Orthopaedic Research* 1999;17:714-719.
14. Mitsui Y, Okamoto K, Martin DP, Schmelzer JD, Low PA. The expression of proinflammatory cytokine mRNA in the sciatic-tibial nerve of ischemia-reperfusion injury. *Brain Res* 1999;844:192-195.
15. Bagdatoglu C, Saray A, Surucu HS, Ozturk H, Tamer L.

- Effect of trapidil in ischemia/reperfusion injury of peripheral nerves. *Neurosurgery* 2002;51:212-219; discussion 219-220.
16. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424-1437.
 17. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 1999;31:577-596.
 18. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:203-236.
 19. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994;63:175-195.
 20. Iadecola C. Does nitric oxide mediate the increase in cerebral blood flow elicited by hypercapnia? *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3913-3916.
 21. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 14 1994;343:1199-1206.
 22. Qi WN, Yan ZQ, Whang PG, Zhou Q, Chen LE, Seaber AV, et al. Gene and protein expressions of nitric oxide synthases in ischemia-reperfused peripheral nerve of the rat. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2001;281:C849-856.
 23. Hoheisel U, Kaske A, Reinert A, Mense S. Frequency-dependent expression of diaphorase staining and nNOS-immunoreactivity in rat dorsal horn neurones following

- C-fibre stimulation. *Neurosci Lett* 1997;227:181-184.
24. Aoki E, Takeuchi IK, Shoji R, Semba R. Localization of nitric oxide-related substances in the peripheral nervous tissues. *Brain Res* 1993;620:142-145.
 25. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4214-4218.
 26. Chao DS, Silvagno F, Xia H, Cornwell TL, Lincoln TM, Brecht DS. Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience* 1997;76:665-672.
 27. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994;120:227-237.
 28. North AJ, Star RA, Brannon TS, Ujiie K, Wells LB, Lowenstein CJ, et al. Nitric oxide synthase type I and type III gene expression are developmentally regulated in rat lung. *Am J Physiol* 1994;266:L635-641.
 29. Vallance P, Moncada S. Nitric oxide--from mediator to medicines. *J R Coll Physicians Lond* 1994;28:209-219.
 30. Eu JP, Liu L, Zeng M, Stamler JS. An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry* 2000;39:1040-1047.
 31. Sayan H, Ugurlu B, Babul A, Take G, Erdogan D. Effects of L-arginine and NG-nitro L-arginine methyl ester on lipid peroxide, superoxide dismutase and nitrate levels after experimental sciatic nerve ischemia-reperfusion in rats. *Int J Neurosci* 2004;114:349-364.

32. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997;28:1283-1288.
33. Levy D, Kubes P, Zochodne DW. Delayed peripheral nerve degeneration, regeneration, and pain in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:411-421.
34. Siebert H, Bruck W. The role of cytokines and adhesion molecules in axon degeneration after peripheral nerve axotomy: a study in different knockout mice. *Brain Res* 2003;960:152-156.
35. Messina A, Knight KR, Dowsing BJ, Zhang B, Phan LH, Hurley JV, et al. Localization of inducible nitric oxide synthase to mast cells during ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle. *Laboratory Investigation* 2000;80:423-431.
36. Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. TGF-beta(1) modulates NOS expression and phosphorylation of Akt/PKB in rat myocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1035-1039.
37. Takimoto Y, Aoyama T, Keyamura R, Shinoda E, Hattori R, Yui Y, et al. Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat. *Int J Cardiol* 2000;76:135-145.
38. Cardenas A, De Alba J, Moro MA, Leza JC, Lorenzo P,

- Lizasoain I. Protective effect of N-(3-(aminomethyl)benzyl) acetamidine, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, in brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Eur J Pharmacol* 1998;354:161-165.
39. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 2000;179:1-33.
40. Isobe M, Katsuramaki T, Hirata K, Kimura H, Nagayama M, Matsuno T. Beneficial effects of inducible nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury in the pig liver. *Transplantation* 1999;68:803-813.
41. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2002;61:862-871.
42. Ayub K, Serracino-Inglott F, Williamson RC, Mathie RT. Expression of inducible nitric oxide synthase contributes to the development of pancreatitis following pancreatic ischaemia and reperfusion. *Br J Surg* 2001;88:1189-1193.
43. Zhang L, Looney CG, Qi WN, Chen LE, Seaber AV, Stamler JS, et al. Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Appl Physiol* 2003;94:1473-1478.
44. Patel P, Qi WN, Allen DM, Chen LE, Seaber AV, Stamler

- JS, et al. Inhibition of iNOS with 1400W improves contractile function and alters nos gene and protein expression in reperfused skeletal muscle. *Microsurgery* 2004;24:324-331.
45. Qi WN, Zhang L, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Nitric oxide involvement in reperfusion injury of denervated muscle. *J Hand Surg [Am]* 2004;29:638-645.
46. Ling H, Edelstein C, Gengaro P, Meng X, Lucia S, Knotek M, et al. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol* 1999;277:F383-390.
47. Barker JE, Knight KR, Romeo R, Hurley JV, Morrison WA, Stewart AG. Targeted disruption of the nitric oxide synthase 2 gene protects against ischaemia/reperfusion injury to skeletal muscle. *J Pathol* 2001;194:109-115.
48. Qi WN, Chen LE, Zhang L, Eu JP, Seaber AV, Urbaniak JR. Reperfusion injury in skeletal muscle is reduced in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *J Appl Physiol* 2004;97:1323-1328.
49. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 1997;17:9157-9164.
50. Sinz EH, Kochanek PM, Dixon CE, Clark RS, Carcillo JA, Schiding JK, et al. Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain

- injury in rats and mice. *J Clin Invest* 1999;104:647-656.
51. Kanno S, Lee PC, Zhang Y, Ho C, Griffith BP, Shears LL 2nd, et al. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation* 2000;101:2742-2748.
 52. Kroncke KD, Fehsel K, Suschek C, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1407-1420.
 53. Chen LE, Seaber AV, Glisson RR, Davies H, Murrell GA, Anthony DC, et al. The functional recovery of peripheral nerves following defined acute crush injuries. *Journal of Orthopaedic Research* 1992;10:657-664.
 54. Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. The influence of magnitude and duration of crush load on functional recovery of the peripheral nerve. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 1993;9:299-306; discussion 306-297.
 55. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982;77:634-643.
 56. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast*

- Reconstr Surg 1989;83:129-138.
57. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997;20:132-139.
 58. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C227-241.
 59. Eu JP, Xu L, Stamler JS, Meissner G. Regulation of ryanodine receptors by reactive nitrogen species. *Biochem Pharmacol* 1999;57:1079-1084.
 60. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-605.
 61. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399:597-601.
 62. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery*. 1993;14:165-175.
 63. Moro MA, Cardenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I. Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium* 2004;36:265-275.
 64. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide neurotoxicity. *J Chem Neuroanat* 1996;10:179-190.
 65. Hess DT, Patterson SI, Smith DS, Skene JH. Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature* 1993;366:562-565.

66. Renteria RC, Constantine-Paton M. Exogenous nitric oxide causes collapse of retinal ganglion cell axonal growth cones in vitro. *J Neurobiol* 1996;29:415-428.
67. Beal MF. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:661-666.
68. Conti G, Rostami A, Scarpini E, Baron P, Galimberti D, Bresolin N, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. *Exp Neurol* 2004;187:350-358.
69. Iida H, Schmelzer JD, Schmeichel AM, Wang Y, Low PA. Peripheral nerve ischemia: reperfusion injury and fiber regeneration. *Exp Neurol* 2003;184:997-1002.
70. Suzuki M, Tabuchi M, Ikeda M, Umegaki K, Tomita T. Protective effects of green tea catechins on cerebral ischemic damage. *Med Sci Monit* 2004;10:BR166-174.
71. Abe S, Mizusawa I, Kanno K, Yabashi A, Suto M, Kuraya M, et al. Nitric oxide synthase expressions in rat dorsal root ganglion after a hind limb tourniquet. *Neuroreport* 2003;14:2267-2270.
72. 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* 1996;27:1373-1380.
73. Hickey MJ, Hurley JV, Angel MF, O'Brien BM. The response of the rabbit rectus femoris muscle to ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 1992;53:369-377.

74. Stewart AG, Phan LH, Grigoriadis G. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide. *Microsurgery* 1994;15:693-702.
75. Levy D, Hoke A, Zochodne DW. Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 1999;260:207-209.
76. Hangai M, Miyamoto K, Hiroi K, Tujikawa A, Ogura Y, Honda Y, et al. Roles of constitutive nitric oxide synthase in postischemic rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:450-458.
77. Huang HM, Shen CC, Ou HC, Yu JY, Chen HL, Kuo JS, et al. Neuroprotective MK801 is associated with nitric oxide synthase during hypoxia/reoxygenation in rat cortical cell cultures. *J Cell Biochem* 2002;84:367-376.
78. Park JW, Qi WN, Chen LE, Nunley JA, Urbaniak JR. The Effects of Exogenous NO Donor on Motor Functional Recovery of Reperfused Peripheral Nerve. *J Hand Surg [Am]*. In press 2004.
79. Niwa M, Inao S, Takayasu M, Kawai T, Kajita Y, Nihashi T, et al. Time course of expression of three nitric oxide synthase isoforms after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2001;41:63-72; discussion 72-63.
80. Nanri K, Montecot C, Springhetti V, Seylaz J, Pinard E. The selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, 7-nitroindazole, reduces the delayed neuronal damage due to forebrain ischemia in rats.

Stroke 1998;29:1248-1253; discussion 1253-1244.

81. Jiang MH, Kaku T, Hada J, Hayashi Y. Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. *Brain Res* 2002;946:139-147.
82. Milcan A, Arslan E, Bagdatoglu OT, Bagdatoglu C, Polat G, Kanik A, et al. The effect of alprostadil on ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve in rats. *Pharmacol Res* 2004;49:67-72.
83. Leker RR, Teichner A, Ovadia H, Keshet E, Reinherz E, Ben-Hur T. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ischemic penumbra: relationship to expression of neuronal nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor. *Brain Res* 2001;909:1-7.
84. Veltkamp R, Rajapakse N, Robins G, Puskar M, Shimizu K, Busija D. Transient focal ischemia increases endothelial nitric oxide synthase in cerebral blood vessels. *Stroke* 2002;33:2704-2710.
85. Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, et al. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 2000;31:2442-2449.
86. Gonzalez-Hernandez T, Rustioni A. Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Res* 1999;55:198-207.
87. Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric oxide and apoptosis:

another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide*. 1997;1:275-281.

88. Zochodne DW. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Suppl* 2000;9:S33-38.
89. Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff, RJ, Laszlo F, Whittle BJ et al. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1997;272:4959-4963.

Abstract

EFFECTS OF INDUCIBLE NOS INHIBITION ON MOTOR FUNCTION
RECOVERY AFTER SCIATIC NERVE ISCHEMIA AND REPERFUSION
IN RATS

Sang-Jin Shin

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Soo Bong Hahn)

This study investigated the effects of inhibition of iNOS on the recovery of motor function in the rat sciatic nerve following ischemia-reperfusion(I/R) injury. The rats underwent 2 hours of ischemia followed by up to 42 days of reperfusion. The animals were randomly divided into two groups that received either iNOS inhibitor 1400W or the same volume of sterile water subcutaneously. Results showed that rats received iNOS inhibitor had earlier motor functional recovery than control rats, with statistical significance showing improved sciatic functional index between days 11 and 28. Histological observation revealed less axonal degeneration and earlier regeneration of nerve fibers in the rats received iNOS inhibitor than in control rats. The I/R

affected 3 NOS isoforms: iNOS mRNA and protein were upregulated during the first 3 days of reperfusion, and downregulation of nNOS and upregulation of eNOS were documented to the end of 42 days of reperfusion in control rats. iNOS inhibitor significantly attenuated the increase of iNOS, but had no effect on nNOS and eNOS. Our results indicate that precise characterization of the dynamics of each NOS isoform and the balance between them during reperfusion is essential to understand the mechanisms of I/R injury in the peripheral nervous system, and that early inhibition of iNOS appears to be critical for reducing or preventing the I/R injury in this model.

Key Words: peripheral nerve, ischemia–reperfusion injury, nitric oxide, nitric oxide synthase