

백서에서 척수의 허혈/재관류 손상시 neuronal
Nitric Oxide Synthase(nNOS)의 발현

연세대학교 대학원

의 학 과

권 희 욱

백서에서 척수의 허혈/재관류 손상시 neuronal

Nitric Oxide Synthase(nNOS)의 발현

지도 이 광 호 교수

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

권 희 옥

권희욱의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 도와주신 모든 분들께 진심으로 감사를 드립니다. 특히 본 논문을 완성함에 있어 세심하고 자상한 지도로 돌보아주신 이광호 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

아낌없는 도움말과 실험과 논문작성에 많은 도움을 주신 송기학 교수님과 윤대성 교수님, 충남대학교 의과대학 동물실험실에 감사의 마음을 전합니다.

항상 관심을 갖고 큰 힘이 되어주신 건양의대 마취통증의학교실 강포순 교수님과 교실원, 의국 여러분께도 감사드립니다.

묵묵히 성원을 보내주신 모든 분들께 감사드리며 끝으로 오늘에 제가 있기까지 하늘나라에서 지켜주시는 아버님, 곁에서 지켜주시는 어머님과 형제들 저의 소중한 딸 예주, 우주와 함께 이 기쁨을 나누고자 합니다.

2005년 12월

저 자 씀

차 례

그림 차례	ii
국문 요약	iii
제 1 장 서 론	1
제 2 장 재료 및 방법	2
2.1. 실험 대상	2
2.2. 실험 방법	2
2.3. 조직표본의 제작 및 면역형광염색	2
2.4. 공초점 레이저 주사현미경 관찰과 영상 분석 및 통계처리	3
제 3 장 결 과	4
제 4 장 고 찰	7
제 5 장 결 론	10
참고 문헌	11
영문 요약	14

그림 차례

Fig. 1. Immunofluorescent staining of nNOS in spinal cord ischemia/ reperfusion in rat	4
Fig. 2. Optical density of nNOS in immunofluorescent staining	5
Fig. 3. Immunofluorescent analysis of nNOS following ischemia/ injury in rat spinal cord	6

국 문 요 약

백서에서 허혈/재관류 손상시 척수의 neuronal Nitric Oxide Synthase(nNOS)의 발현

하행흉부 대동맥과 흉복부 대동맥 질환의 수술적 치료 후 척수손상은 심각한 합병증 중 하나이며 그 중 대마비(paraplegia)의 유병률은 5-16%까지 보고되고 있다. 이에 따른 척수손상의 기전은 허혈/재관류 손상(ischemia/reperfusion injury)으로 생각하고 있으며 손상의 여러 기전 중 자유라디칼은 미토콘드리아의 전자전달과정의 변화와 lipoxygenase, Xantine oxidase 및 nitric oxide synthase (NOS) 등의 과활성화로 생성되어 척수에 손상을 주는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 백서의 허혈/재관류에 의한 척수손상모델에서 nNOS 발현의 변화를 관찰하여 NOS의 역할에 대하여 알아보고자 하였다. 백서에서 척수의 허혈/재관류 손상모델을 이용하여 실험군(n=5)과 대조군(n=5)으로 나누어 수술 후 7일째 척수조직을 얻은 후 nNOS에 대한 면역형광염색을 시행하였다. 공초점현미경 및 영상분석기(Zeiss LSM 5.0, Jena, Germany)를 이용하여 두 군 간의 형광의 발현 정도를 비교하였다.

nNOS의 발현은 대조군과 실험군에서 모두 관찰되었으며 대조군에서는 척수의 백질과 회백질에서의 발현의 차이는 관찰되지 않았으나 실험군에서는 회백질의 신경세포에서 발현이 증가하였다. 또한 영상분석을 하여 발현정도를 보았을 때 두 군 간의 nNOS의 발현에 통계학적 유의성이 있었다($p < 0.05$).

본 연구의 결과를 바탕으로 허혈/재관류 손상된 척수는 증가된 nNOS가 진행성 신경손상을 유발할 것으로 생각된다.

Key words: ischemia/reperfusion injury, nNOS, spinal cord

백서에서 척수의 허혈/재관류 손상시 neuronal Nitric Oxide Synthase(nNOS)의 발현

지도 이광호 교수

연세대학교 대학원 의학과

권 희 욱

제 1 장. 서 론

하행흉부 대동맥(descending thoracic aorta)과 흉복부 대동맥(thoracoabdominal aorta) 질환의 수술적 치료 후 척수손상은 심각한 합병증 중 하나이며 그 중 대마비(paraplegia)의 유병률은 5-16%까지 보고 되고 있다^{1,2)}. 이에 따른 척수손상의 기전은 허혈/재관류 손상(ischemia/reperfusion injury)으로 생각하고 있으며 흥분독성(excitotoxicity), 자유라디칼의 생성, 염증성 반응, 세포고사 등 다양한 기전이 작용하는 것으로 알려져 있다³⁻⁸⁾. 이 중 자유라디칼은 미토콘드리아의 전자전달과정의 변화와 lipoxygenase, Xantine oxidase 및 nitric oxide synthase(NOS) 등의 과활성화로 생성되어 척수에 손상을 주는 것으로 알려져 있다⁹⁻¹⁰⁾.

Nitric Oxide는 매우 불안정한 자유라디칼로 L-arginine의 guanidironitrogen이 Nitric Oxide Synthase(NOS)에 의해 변환되면서 생성이 되며 혈관계, 면역계, 신경계 등에서 다양한 역할을 하게 된다. NOS는 정상적인 생리적인 조건에서 존재하는 Constitutive형(cNOS)과 면역반응에 의해 일어나는 Inducible형(iNOS)으로 나뉘며 다시 cNOS는 혈관에 작용을 하는 endothelial형(eNOS)과 신경에서 주된 전달 물질로 생각되는 neuronal형(nNOS)으로 나뉘게 된다¹¹⁾.

이에 저자는 백서의 허혈/재관류에 의한 척수손상모델에서 nNOS 발현의 변화를 관찰하여 NOS의 역할에 대하여 알아보려고 하였다.

제 2 장. 재료 및 방법

2.1. 실험 대상

Sprague-Dawley 백서는 국립보건안전연구소로부터 분양받아 충남대학교 의과대학 동물실험실에서 동종교배하여 얻은 생후 10주 수컷 (250-300gm)을 사용하였고, 실험동물은 밤낮주기 (12시간 light/ 12시간 dark)가 조절되며 온도는 22-25℃인 동물실에서 사육하였고 사료와 물은 풍부하게 공급하였다. 실험동물은 대조군(n=5) 및 척수의 허혈/재관류 손상을 준 실험군(n=5)으로 나누었다.

2.2. 실험방법

대조군은 thiopental sodium(50 mg/kg)을 복강내로 투여하여 마취한 후 회복하여 걸보기 수술(sham operation)을 시행하였으며 척수의 허혈/재관류 손상을 준 실험군은 동일한 방법으로 마취를 시행한 후 정중복부를 절개하여 백서의 복부 대동맥을 노출시킨 후 주위를 조심스럽게 박리하였다. 좌측 신동맥을 확인한 후 좌측 신동맥의 바로 아래부위의 복부 대동맥을 미세혈관검자를 이용하여 20분간 결찰하여 허혈을 유발시키고 대동맥분지의 바로 윗부분의 대동맥을 미세검자를 이용하여 결찰하여 대퇴동맥에서의 혈액의 역류를 막았으며 미세혈관검자를 풀어 20분간 재관류(reperfusion)함으로써 척수의 허혈-재관류(ischemia/reperfusion) 손상을 유발시켰다. 모든 실험동물은 수술 후 7일간 사육한 다음 척수를 적출하여 실험에 사용하였다.

2.3. 조직표본의 제작 및 면역형광염색

대조군을 포함해서 백서는 수술 후 7일에 척추후궁 절제술(laminectomy) 후 척수를 적출하였다. 적출된 척수는 10% 중성 포르말린에 하루 동안 고정시키고 흐르는 물에 수세하여 고정제를 제거하고, 투명화과정 후에 파라핀(paraffin)에 포매하였으며 조직블럭은 slide glass에 4 μ m두께로 절편을 제작하여 부착시켰다. 조직

은 Xylene에서 10분씩 3회 처리하여 파라핀을 제거한 후 100% alcohol에서 2회, 95%, 90%, 80% alcohol에서 각각 5분씩 처리한 후 흡수시킨 후 면역형광염색을 시행하였다. 흡수된 slide는 항원의 노출을 증가시키기 위하여 0.01M sodium citrate buffer (pH 6.0) 용액에 담가 15분간 극초단파오븐 (microwave oven)으로 전처리하였다. 0.02M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에서 10분씩 3회 세척한 후 비특이적인 반응을 억제하기 위해 20% goat 혈청 (RBI, MA, USA)을 처리한 후 각각의 slide에 일차 항체는 anti-nNOS mouse monoclonal IgG1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 처리한 후 4℃에서 overnight 처리하였다. PBS로 30분간 3회 세척한 후 이차항체는 mouse IgG-FITC (1:400, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였고, 핵의 염색을 위해 4'-6-Diamidino-2-Phenylindole(DAPI, 1:400, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)가 함유된 0.02M PBS로 30분씩 2회 세척한 후 PBS로 1시간 세척하였다. 이차항체를 반응시킬 때는 어두운 곳에서 실험을 하였다. 염색이 끝난 슬라이드는 mounting media (Dako, Carpinteria, CA, USA)를 이용하여 봉입하였다.

2.4. 공초점 레이저 주사현미경 관찰과 영상 분석 및 통계처리

염색의 강도는 공초점 레이저 주사현미경 및 영상분석기 (Zeiss LSM 5.0, Jena, Germany)를 이용하여 형광의 발현 정도를 평가하였다. 흰색을 0으로, 검은색을 255로 판정하여 염색정도(intensity)를 gray scale에 따라 점수화하였다. 각 조직 당 적어도 5 field를 관찰하였고 각각의 조직 간의 염색강도는 비모수 검정 (Mann-Whitney법)을 이용하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다. 통계분석에는 SPSS for Windows (Version 11.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다.

제 3 장. 결 과

nNOS의 발현은 대조군과 실험군에서 모두 관찰되었으며 대조군에서는 척수의 백질과 회백질에서의 발현의 차이는 관찰되지 않았으나 실험군에서는 회백질의 신경세포에서 발현이 증가하였다(Fig. 1). 또한 영상분석을 하여 발현정도를 보았을 때 대조군의 발현은 128.0 ± 2.4 였으며, 실험군에서는 151.3 ± 2.2 로 두군 간의 nNOS의 발현에 통계학적 유의성이 있었다(Fig. 2, 3, $p < 0.05$).

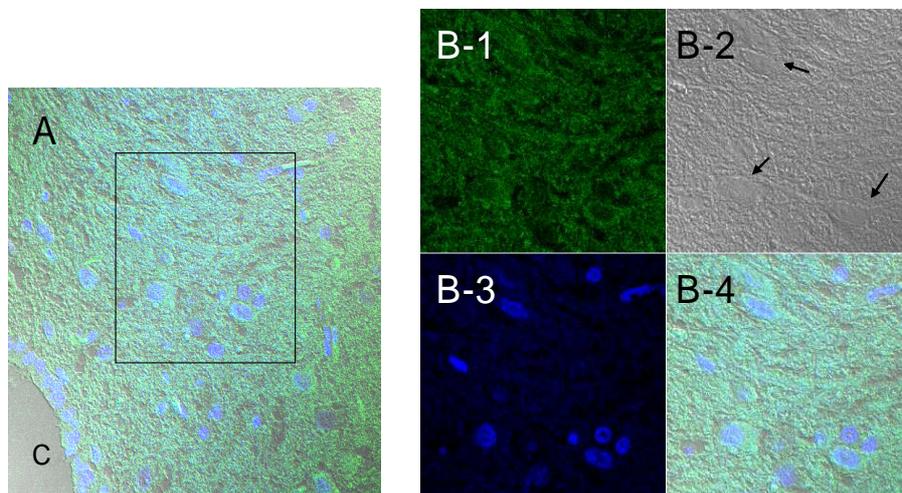


Fig. 1. Immunofluorescent staining of nNOS in spinal cord ischemia/reperfusion in rat(x400) A: control group shows no different expression of nNOS between grey matter and white matter B: split views(x600) 1) expression of nNOS in grey matter of spinal cord 2) neuron cell in DIC view (black arrows) 3) nucleus of neurons in DAPI staining 4) magnified view of black box in control group C: central canal

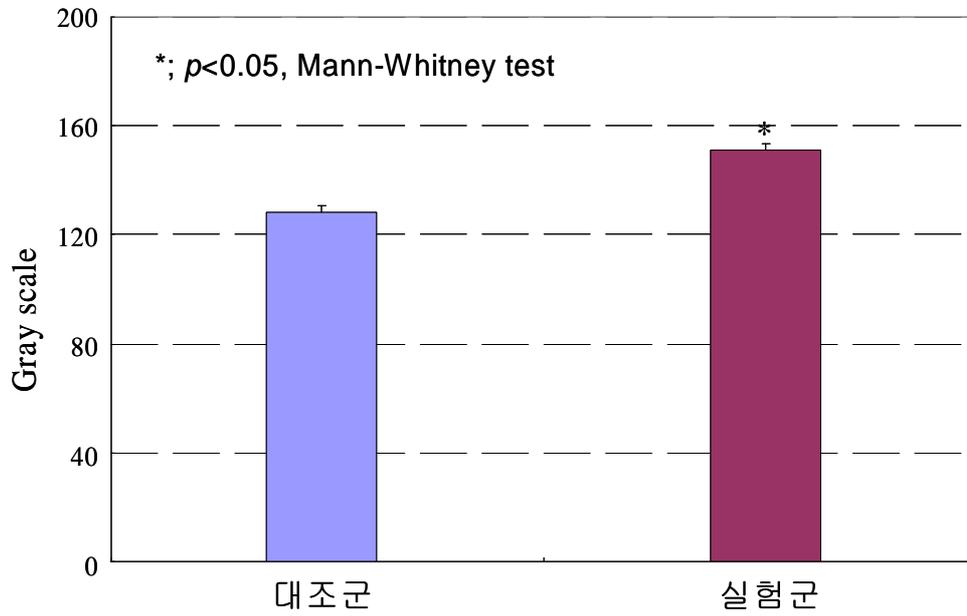


Fig. 2. Optical density of nNOS in immunofluorescent staining

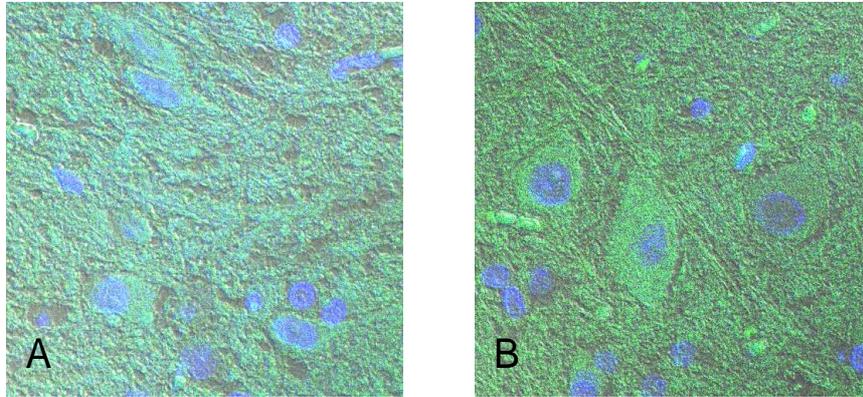


Fig. 3. Immunofluorescent analysis of nNOS following ischemia/ reperfusion injury in rat spinal cord(x600). A: control group B: experimental group shows more strong expression of nNOS comparing to control group

제 4 장. 고 찰

허혈/재관류 신경세포 손상의 기전은 흥분독성, 자유라디칼의 생성, 염증성 반응, 세포고사 등이 있으며 이 기전들은 하나의 독립적인 기전이 아니라 서로 연관성이 있는 기전이며 복합적인 작용으로 신경세포 손상이 오는 것으로 알려져 있다. 최근 Young 등¹²⁾은 흥분독성기전이 세포고사를 유도하는 것이 아니라 흥분독성기전 후 세포고사가 진행되는 것으로 주장하였다. 따라서 허혈성 신경세포손상은 괴사와 세포고사라는 평행적 구조 속에서 연속적으로 작용하는 연쇄반응으로 생각되어지고 있다¹³⁻¹⁵⁾.

척수의 허혈/재관류 손상에서 신경세포의 손상은 허혈시의 손상기전과 재관류시의 손상기전이 다른 것으로 알려져 있다. 즉 허혈시 손상의 기전은 미토콘드리아에서 허혈로 인하여 산화적 인산화(mitochondrial oxidative phosphorylation)가 멈추게 되고 아데노신삼인산이 고갈되어 아데노신삼인산 의존성 세포막 펌프들이 기능을 잃게 되는 것이다. 이에 따른 이온의 항상성이 파괴되고 특히 칼슘의 세포내로 유입되어 단백질과 DNA에 손상을 입히고, 재관류시 자유라디칼을 생성하는 젠틴산화효소 합성을 촉진시킨다. 또한 칼슘은 신경세포독성이 있는 aspartate, glutamate와 같은 흥분성 아미노산의 분비를 증가 시킨다¹⁶⁻¹⁷⁾. 반면 재관류시 손상기전은 NADPH(nicotine amide-adenine dinucleotide phosphate)와 젠틴(xanthine)의 존재 하에서 허혈 손상 때 만들어진 젠틴산화효소에 의해 산소 분자가 과산화 래디칼(superoxide radical)로 전환됨으로써 대부분의 자유라디칼이 생성 된다^{11,18)}. 그리고 아라키돈산(arachidonic acid) 대사물질인 키닌(kinin), 트롬복세인(thromboxane) 등이 활성화되어 염증 반응을 일으키고, 염증성 반응에 의한 국소성 혈관 수축을 유발하여 세포 허혈을 더욱 가중시키게 되며 단백질분해효소의 분비를 촉진시켜 혈관과 세포의 투과성을 높이고 세포 부종을 악화 시킨다¹⁹⁾. 또한 Jacobs 등²⁰⁾은 재관류시 혈류 증가(hyperemia) 및 척수와 혈액장벽(spinal cord -blood barrier)의 투과성 증가가 척수 신경손상기전으로 보고하였다.

위 기전들 중 산소자유라디칼에 의한 신경세포손상은 가장 인정받고 있는 것 중의 하나이다. Nitric oxide(NO)는 혈관내피세포에서 생성되는 혈관이완인자(endothelial derive relaxation factor)의 일종으로 1980년 Furchgott와 Zawadzki 등²¹⁾에 의해 처음 밝혀졌으며 자유라디칼 가스이며 세포막을 확산에 의하여 이동하며 NOS에 의해 생성된다. eNOS는 순환계에 주로 있으며 혈관확장, 신혈관생성 및 내피세포에 작용하며²²⁾ 중추신경계에 있는 NO는 주로 신경매개물질로 작용하며 신경성장인자(nerve growth factor)에 의한 신경세포의 분화에 관여하며²³⁾ iNOS는 면역계에서 세균을 파괴시키는 세포독성으로 작용하며 중추신경계에서는 미세아교세포(microglial cell), 별아교세포(astrocyte)의 대응물질로 세균이나 손상세포를 제거하는 작용을 한다²⁴⁾. Nagafuji 등²⁵⁾은 백서의 중간대뇌동맥(middle cerebral artery)을 결찰하여 대뇌의 허혈성 손상을 유발하였을 때 15분 경과 후 Ca^{++} -dependant cNOS의 증가를 관찰하였으며 NOS를 허혈성 뇌손상의 기전으로 생각하였다. 본 연구에서도 척수의 허혈성 손상을 유발하였을 때 nNOS가 회백질의 신경세포에서 허혈재관류 손상 전에는 128.0 ± 2.4 , 후에는 151.3 ± 2.2 로 증가하는 것을 관찰하였으며(Fig. 2, 3) 이는 Lewen 등⁴⁾이 보고한 중추신경계의 외상 및 허혈성 손상이 있을 때 손상기전으로 생각되는 흥분독성, calcium의 유입, 미토콘드리아의 손상, caspase의 과활성 및 세포고사 등과 함께 oxidative stress의 작용기전 중 NOS의 역할을 입증한 것으로 생각된다.

세포고사는 세포형태학적으로 괴사와 구별되며 내인성 유전자의 발현과 효소활성화에 기인하는 것이 특징이며 괴사가 세포 타살(cell homicide)이라고 한다면 아포프토시스는 세포 자살(cell suicide)이라 할 수 있다. 세포형태학소견은 핵분절(nuclear fragmentation), 염색질 농축(chromatin condensation), 세포막의 보존, 세포 부피 감소, 아포프토시스체(apoptotic body)의 생성이 특징이다. 또한 DAPI를 이용한 면역형광염색으로도 세포고사를 어느 정도 확인 될 수 있는데 본 실험에서는 대조군과 실험군 사이에 핵의 모양의 차이를 관찰 할 수 없었다(Fig. 2). 이러한 결과에 대하여 이유를 생각해 볼 때 세포고사가 진행 중인 세포는 괴사에 의해 사망하는 세포보다 손상의 강도가 약하고, 세포고사의 과정은 많은 경우에서 새로운 유전자의 발현과 단백질 생성을 포함하는 분자 연쇄 반응을 거쳐

야하므로 시간이 걸린다는 것이다. 따라서 세포고사에 의한 세포 사멸은 괴사에 의한 세포 사멸보다 늦게 나타나며 Young 등¹²⁾도 처음에는 신경독성에 의한 세포손상과 다음에는 세포고사의 순으로 허혈성 신경 손상의 기전을 두 개의 순서적 기전을 주장하였다. 따라서 본 연구에서 손상의 시간에 따른 신경세포 핵모양의 세포형태학적 변화를 DAPI염색을 통하여 분석하였다면 세포고사의 현상을 확인할 수도 있을 것으로 생각된다. 또한 아포프토시스를 확인할 수 있는 TUNEL assay를 이용한 면역염색을 한다면 좀 더 정확한 세포고사를 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

제 5 장. 결 론

백서에서 허혈/재관류 손상된 척수는 nNOS의 양이 변화하며 특히 회백질의 신경세포에서 발현이 증가한다. 이는 허혈성 손상으로 인한 nNOS발현이 증가된 것으로 생각된다. 그러나 세포고사에 의한 핵의 변화는 DAPI 염색만으로는 알 수 없었으며 아포프토시스체에 대한 다른 방법의 염색이 필요할 것으로 생각되며, 이후 척수의 허혈/재관류 손상이 시간이 경과함에 따라 어떤 변화가 발생하는 것과 이에 따른 nNOS의 변화에 대해 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료되는 바이다.

참고 문헌

1. Svensson LG, Crawford ES, Hess KR, Coselli JS, Safi HJ: Experience with 1509 patients undergoing thoracoabdominal aortic operations. *J Vasc Surg* 1993; 17: 357-68; discussion 368-70.
2. Hollier LH, Symmonds JB, Pairolero PC, Cherry KJ, Hallett JW, Gloviczki P: Thoracoabdominal aortic aneurysm repair. Analysis of postoperative morbidity. *Arch Surg* 1988; 123: 871-5.
3. Marsala M, Sorkin LS, Yaksh TL: Transient spinal ischemia in rat: characterization of spinal cord blood flow, extracellular amino acid release, and concurrent histopathological damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14: 604-14.
4. Lewen A, Matz P, Chan PH: Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 2000; 17: 871-90.
5. Barone FC, Feuerstein GZ: Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 819-34.
6. Matsushita K, Wu Y, Qiu J, Lang-Lazdunski L, Hirt L, Waeber C, et al: Fas receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. *J Neurosci* 2000; 20: 6879-87.
7. Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos DG, Nishimura RN, Yang F, et al: Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke* 1998; 29: 2622-30.
8. Velier JJ, Ellison JA, Kikly KK, Spera PA, Barone FC, Feuerstein GZ: Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci* 1999; 19: 5932-41.

9. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC: Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1991; 71: 1185-95.
10. Moore LE, Traystman RJ: Role of oxygen free radicals and lipid peroxidation in cerebral reperfusion injury. *Adv Pharmacol* 1994; 31: 565-76.
11. Bishop A, Anderson JE: NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology* 2005; 208: 193-205.
12. Young C, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW: Excitotoxic versus apoptotic mechanisms of neuronal cell death in perinatal hypoxia/ischemia. *Curr Mol Med* 2004; 4: 77-85.
13. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C: Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 1998; 46: 281-309.
14. Ishimaru MJ, Ikonomidou C, Tenkova TI, Der TC, Dikranian K, Sesma MA, et al: Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 1999; 408: 461-76.
15. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG: Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 2000; 62: 215-49.
16. Arundine M, Tymianski M: Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003; 34: 325-37.
17. Bondarenko A, Svichar N, Chesler M: Role of Na⁺-H⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange in hypoxia-related acute astrocyte death. *Glia* 2005; 49: 143-52.
18. Bishop A, Cashman NR: Induced adaptive resistance to oxidative stress in the CNS: a discussion on possible mechanisms and their therapeutic potential. *Curr Drug Metab* 2003; 4: 171-84.

19. Walker K, Perkins M, Dray A: Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int* 1995; 26: 1-16; discussion 17-26.
20. Jacobs TP, Kempinski O, McKinley D, Dutka AJ, Hallenbeck JM, Feuerstein G: Blood flow and vascular permeability during motor dysfunction in a rabbit model of spinal cord ischemia. *Stroke* 1992; 23: 367-73.
21. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
22. Kiefer FN, Misteli H, Kalak N, Tschudin K, Fingerle J, Van der Kooij M, et al: Inhibition of NO biosynthesis, but not elevated blood pressure, reduces angiogenesis in rat models of secondary hypertension. *Blood Press* 2002; 11: 116-24.
23. Nakaya N, Lowe SW, Taya Y, Chenchik A, Enikolopov G: Specific pattern of p53 phosphorylation during nitric oxide-induced cell cycle arrest. *Oncogene* 2000; 19: 6369-75.
24. Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressa A, Beckman JS, et al: Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J Neurosci Res* 2002; 67: 21-9.
25. Nagafuji T, Sugiyama M, Matsui T, Muto A, Naito S: Nitric oxide synthase in cerebral ischemia: Possible contribution of nitric oxide synthase activation in brain microvessels to cerebral ischemic injury. *Mol Chem Neuropathol* 1995; 26: 107-57.

ABSTRACT

Expression of neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) on Ischemia/ Reperfusion Injury in Rat Spinal Cord

Kwon, Hee Uk

Department. of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kwang Ho Lee)

Background: The aim of this experimental study was to investigate the expression of nNOS following ischemia/ reperfusion injury in rat spinal cord.

Methods: Sprague-Dawley rats (250-300 gm) were classified into two groups according to experimental methods. Control group(n=5) underwent sham operation. Experimental group(n=5) underwent ischemia by clamping the abdominal aorta just below the left renal artery and the abdominal aorta just above the aortic bifurcation for 20 minutes followed by 20 minutes reperfusion.

The spinal cord was obtained 7 days after operation. The expression of nNOS was examined in gray and white matter using confocal microscope and Image Analyzer.

Results: There is no difference in nNOS expression of nNOS between gray and white matter in control group. Experimental group showed higher

levels of nNOS expression compared to the control group ($p < 0.05$).

Conclusions: In this study, we show that nNOS expression increases in the rat spinal cord after ischemia/reperfusion injury and these results suggest that overproduction of NO may play a role in progressive nerve cell damage.

Key words: ischemia/reperfusion injury, nNOS, spinal cord