

쥐에서 방광출구 부분폐색으로
유발된 배뇨근과활동성과 소변내
신경성장인자와의 연관성

연세대학교 대학원

의 학 과

이 승 렬

쥐에서 방광출구 부분폐색으로
유발된 배뇨근과활동성과 소변내
신경성장인자와의 연관성

지도교수 최 영 득

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2009 년 12 월

연세대학교 대학원

의 학 과

이 승 렬

이승렬의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 최 영 득 인

심사위원 김 장 환 인

심사위원 박 경 수 인

연세대학교 대학원

2009 년 12 월

감사의 글

군복무를 마치고 비교적 늦게 비뇨기과 석사과정을 시작하였으나 무사히 마칠 수 있도록 많은 분들의 도움과 격려가 있었습니다. 이 모든 분들께 감사의 마음을 전합니다.

먼저 비뇨기과학에 대하여 대학원에서 심도 있는 가르침을 주시며, 논문이 완성될 때까지 지도 편달하여 주신 최영득 교수님께 감사 드립니다. 또한 배뇨장애라는 분야에 폭넓은 시야를 갖게 해주신 김장환 교수님과 논문이 나오기까지 많은 조언을 주신 박경수 교수님께도 깊이 감사 드립니다. 그리고 어려운 실험을 잘 끝마칠 수 있도록 도와준 김매화, 강효진 선생님께 감사 드립니다.

마지막으로 이 논문이 완성되기까지 많은 아쉬움이 남지만 그 동안 도움을 주신 많은 분들께 고개 숙여 감사 드립니다.

이 승 렬 씬

차 례

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	8
1. 실험 동물	8
2. 동물 수술	8
3. 소변 수집	9
4. 방광내압측정술	10
5. ELISA를 이용한 소변내 NGF 측정	11
6. ELISA를 이용한 방광조직에서의 NGF 측정	12
7. 자료 분석	12
III. 결과	14
1. 방광내압측정술	14
2. 소변과 방광 조직의 NGF 측정	17
IV. 고찰	22
V. 결론	26
참고문헌	27
영문요약	29

그림 차례

Fig. 1. Schematic diagram of the experiment in rats
..... 9

Fig. 2. Cystometrogram in a rat with DO on initial
cystometry followed by absence of DO on subsequent
cystometry.....15

Fig. 3. Cystometrogram in a rat with DO on initial
cystometry followed by DO on subsequent
cystometry.....16

Fig. 4. Changes of urinary NGF levels in sham control
and bladder outlet obstructed rats before the onset of
BOO, after the onset of BOO, and after the relief of
BOO.....19

Fig. 5. Correlation between urinary NGF levels after
relief of BOO and bladder tissue NGF levels.....20

표 차례

Table 1. Effects of BOO and relief of BOO on cystometric variables17

Table 2. Urinary NGF levels before BOO, after BOO, and relief of BOO and bladder tissue NGF levels. Urinary NGF levels were normalized using urine creatinine concentration18

국문요약

쥐에서 방광출구 부분폐색으로 유발된 배뇨근과활동성과 소변내 신경성장인자와의 연관성

서론: 전립선비대증으로 인하여 방광출구폐색이 유발된 경우에 일부에서는 전립선비대증과 과민성방광이 함께 동반될 수 있고, 전립선비대증을 치료하더라도 과민성방광이 지속될 수 있다. 과민성방광은 요절박, 빈뇨 및 야간뇨 등의 증상을 토대로 진단되기 때문에 전립선비대증과 동반된 경우에는 환자가 호소하는 하부요로증상이 서로 비슷하여 과민성방광을 객관적으로 구별하는 것이 쉽지 않고, 요역동학검사를 통한 과민성방광의 진단은 위양성 및 위음성이 가능하고 침습적이기 때문에 어려운 점이 있다. 최근 과민성방광을 유발하는 원인 물질로 방광 요상피세포 및 배뇨근에서 생성된 신경성장인자가 주목 받고 있다. 그러나 소변내 신경성장인자가 배뇨근과활동성 여부를 반영할 수 있는지에 대해서는 아직 명확하게 알려진 바는 없다. 따라서 본 연구에서는 동물실험 모델로 쥐를 이용하여 방광출구폐색으로 유발된 배뇨근과활동성과 소변내 신경성장인자에 연관성이 있는지 알아 보고자 하였다.

대상 및 방법: 50마리의 암컷 쥐를 10 마리의 대조군과 40 마리의 방광출구폐색 군으로 나누었다. 방광출구폐색은 요도에 카테터를 삽입하여 실을 묶어서 시행하였고, 대조군에서는 방광요도접합부 주위에 실을 느슨하게 묶어서 시행하였다. 3주 경과 후에 묶은 실을 제거하였다. 소변 수집은 방광출구폐색을 시행하기 전 (T1),

방광출구폐색을 시행하고 3주 후 (T2), 그리고 방광출구폐색을 제거하고 3주 후 (T3)에 시행하였다. 방광내압측정술은 T2 및 T3에 시행하였다. 방광 조직은 T3에 쥐를 희생하여 얻었다. 소변내 신경성장인자와 방광의 신경성장인자는 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용하여 측정하였고, 소변내 creatinine 농도를 이용하여 보정하였다.

결과: 대조군에서는 방광내압측정술 시행 결과 배뇨근과활동성이 관찰되지 않았고, T1, T2 및 T3에서의 신경성장인자의 측정값에 차이가 없었다. 방광출구폐색 군에서는 방광내압측정술 결과 T2에는 배뇨근과활동성이 나타났으나, T3에는 나타나지 않은 쥐들 (16마리, 1군)에서 creatinine으로 보정한 소변내 신경성장인자는 T1에 비하여 T2에서 의미있게 증가하고 ($p=0.001$), T2에 비하여 T3에서는 의미있게 감소하였다 ($p=0.003$). T2 및 T3 모두에서 배뇨근과활동성이 나타난 쥐들 (8마리, 2 군)에서는 creatinine으로 보정한 소변내 신경성장인자가 T1에 비하여 T2에서는 의미있게 증가하였지만 ($p=0.012$), T2에 비하여 T3에서는 의미있는 변화를 보이지 않았다 ($p=0.123$). T2 및 T3 모두에서 배뇨근과활동성이 나타난 경우에는 T1의 소변내 신경성장인자가 대조군 ($p=0.015$) 및 1군 ($p=0.005$)에 비하여 의미있게 높았다. 방광조직의 신경성장인자는 T3에서 수집한 소변내 신경성장인자와 양의 상관관계를 가졌다 ($r=0.417$, $p=0.016$).

결론: 소변에서 측정된 신경성장인자는 방광출구폐색을 시행하여 배뇨근과활동성이 유발된 경우에는 증가하고, 방광출구폐색을 제거한 후에 배뇨근과활동성이 사라진 경우에는 감소하며, 배뇨근과활동성이

지속되는 경우에는 감소하지 않았다. 따라서 소변내 신경성장인자를 배뇨근과활동에 대한 생물학적 지표로 이용하는 것이 가능할 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : Nerve growth factor; detrusor overactivity;
bladder outlet obstruction

쥐에서 방광출구 부분폐색으로 유발된 배뇨근과활동성과 소변내 신경성장인자와의 연관성

<지도교수 최 영 득>

연세대학교 대학원 의학과

이 승 렬

I. 서론

하부요로증상 (lower urinary tract symptom)은 소변의 저장 및 배출과정에 관련되어 나타나는 모든 증상을 지칭하며, 남성에서 하부요로증상의 가장 흔한 원인으로는 전립선비대증 (benign prostate hyperplasia)에 의한 요로 폐색이 있다. 전립선비대증은 70대 남성의 4명 중에서 3명에 영향을 미치며 중증도 이상의 전립선비대증의 유병률은 50대에서부터 80대까지 26%, 33%, 41%, 및 46%로 알려져 있다.¹ 전립선비대증은 방광출구폐색 (bladder outlet obstruction)을 유발하여 소변 배출의 장애를 유발할 뿐만 아니라 방광 구조에도 변화를 초래하여 요절박 (urgency) 및 빈뇨 (frequency)를 특징으로 하는 과민성방광 (overactive bladder)이라는 질환을 유발할 수 있다.²⁻³ 게다가 과민성방광의 동반 여부를 간과하고 전립선비대증에 대한 수술적 치료인 경요도전립선절제술

(transurethral resection of prostate)을 진행하는 경우에는 치료 후에 과민성방광증상이 지속될 가능성이 있으며, 이는 전립선비대증으로 인한 폐색증상보다 환자에게 더 큰 불편함을 초래할 수 있다. 이에 대한 수술 전 평가방법으로 요역동학검사 (urodynamic study)를 시행할 수 있으나 이는 침습적이고 게다가 요역동학검사에서 위양성과 위음성의 결과가 가능하기 때문에 제한점이 있다.⁴ 특히 과민성방광은 절박성요실금 (urge incontinence)의 유무에 관계없이 요절박이 있으면서 빈뇨와 야간뇨 (nocturia)가 동반되는 경우로 정의되므로 환자의 증상을 토대로 진단이 내려지게 된다.⁵ 따라서 전립선비대증과 과민성방광이 동반되어 있는 경우에 과민성방광의 진단을 위해서 좀 더 객관적인 검사방법이 요구된다.

최근 과민성방광을 유발하는 원인 물질로 방광 요상피세포 및 배뇨근 (detrusor muscle)에서 합성된 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF)가 주목 받고 있다.⁶ NGF는 특정한 신경세포의 분화와 생존을 유도하기 위하여 분비되는 작은 단백질로서 주로 Trk-A 수용체를 통하여 세포 내에 작용한다.⁷ 방광에 염증, 신경손상 또는 방광출구폐색 등이 유발되면 요상피세포 및 배뇨근에서 NGF가 합성되며 이는 구심성 신경섬유 (afferent sensory nerve fiber)를 통하여 배근신경절 (dorsal root ganglion cell)에 전달되고 이를 비대하게 만든다. 비대해진 배근신경절에서는 Na^+/K^+ 통로 (channel)의 변화가 유발되어 흥분도가 증가하게 되고 결국 척수 반사 (spinal reflex)를 항진 시킨다. 항진된 척수 반사는 원심성

신경섬유 (efferent sensory nerve fiber)를 통해 전달되어 방광을 수축시키고 결국 배뇨근과활동성 (detrusor overactivity, DO)을 유발하게 된다.⁷ Zvara 등은 쥐를 이용한 동물 실험에서 방광출구폐색 시행 후에 비배뇨방광수축 (Non-voiding bladder contraction)을 관찰하여 DO를 확인하였고 방광에서 여러 가지 신경인자들이 증가하였으며, 특히 이 중에서 NGF가 의미 있게 증가하는 것을 보고하였다.⁸

Chai 등은 방광출구폐색을 제거한 이후에도 약 20%에 있어서 과활동성 배뇨가 지속되는 것을 보고하였다.⁹ 즉 DO의 원인인 방광출구폐색을 제거하여도 일부분에 있어서 DO가 지속되었는데 Kim 등 역시 쥐에서 방광출구폐색으로 DO를 유발한 후에 방광출구폐색을 제거하여도 25%에서 DO가 지속되었고 이들에 있어서 방광의 NGF가 증가되어 이것이 DO와 연관이 있을 것으로 보고하였다.¹⁰

지금까지의 연구는 쥐에서 방광출구폐색으로 유발된 DO 와 NGF 의 관계를 연구하거나 또는 방광출구폐색을 제거한 이후에도 DO 가 지속되는 경우에 DO 와 NGF 와의 관계에 대한 것들이었다. 이러한 연구들은 NGF 를 방광 조직으로부터 얻은 결과로 이를 위해서는 쥐를 희생할 수 밖에 없는 한계점이 있다. 그러나 방광의 요상피세포 및 배뇨근에서 합성된 NGF 는 방광의 소변에서도 측정이 가능하기 때문에 소변에서 NGF 를 측정할 경우에 쥐를 희생하지 않아도 된다. 또한 이를 사람의 경우에서 생각한다면 방광 조직검사 같은 침습적

검사를 하지 않아도 소변에서 안전하며 간단하게 NGF 를 측정 할 수 있다.¹¹ 이러한 결과를 임상에 적용하면 과민성방광이 동반된 전립선비대증 환자에서 경요도전립선절제술을 시행하고 나서 과민성방광이 지속될 수 있는 환자를 미리 예측하여, 수술 전에 과민성방광에 대한 치료를 하는 것이 가능할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 방광출구폐색으로 유발된 DO 와 소변내 NGF 의 관계를 연구하여 소변내 NGF 가 DO 의 변화에 대한 지표로서 사용이 가능한지 알아보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

모두 50 마리의 암컷 Sprague-Dawley rats (Oriental Bio Inc., Seongnam, Gyeonggi, Korea)이 실험에 사용되었다 (weight 202-248g). 이들 중에서 10 마리는 sham operation을 시행하였으며, 40 마리에서 방광출구폐색을 시행하였다. 동물과 관련한 모든 처치는 연세대학교 의과대학의 Institutional Animal Care and Use Committee의 승인을 받은 후에 시행하였다.

2. 동물 수술

방광출구폐색 수술은 tiletamine-zolazepam (Virbac, France; 50 mg/kg)과 xylazine (Bayer, Germany; 5 mg/kg)를 복강내로 투여하여 마취한 후에 시행하였다. 방광과 요도를 노출시키기 위하여 치골상부의 중앙 부분에서 수직으로 2 cm 길이의 절개를 시행하였다. 방광출구폐색을 시행하는 쥐에서는 요도 내강으로 50-polyethylene 카테터 (Clay Adams, Parsippany, NJ)를 삽입한 후에 3-0 silk 실을 방광요도접합부에서 묶어주었다. 그 다음에 50-polyethylene 카테터를 요도내강으로부터 제거한 후에 복부 절개를 닫아주었다. 수술 후에는 근육으로 항생제를 주사하였다. 대조군 10 마리에서는 방광요도접합부 주위에 3-0 silk 실을 느슨하게 묶음으로서 sham

operation 을 시행하였다. 3 주 후에 실험군과 대조군에 있어서 모두 silk 실을 제거하였다.

3. 소변 수집

방광출구폐색을 시행하기 전 (T1), 방광출구폐색을 시행하고 3 주 후 (T2), 그리고 요도방광접합부위에 묶은 실을 제거하여 방광출구폐색을 제거하고 3 주 후 (T3)에 각각 쥐의 소변을 수집하였다. (Fig. 1) 소변은 실온 (room temperature)에서 쥐를 metabolic cage 넣어 8 시간 동안 수집하고, NGF 의 변성을 막기 위하여 소변을 모으는 통을 얼음이 담긴 그릇에 넣어 수집한다. 수집된 소변을 원심분리기에서 4°C 3000 rpm 으로 10 분 동안 원심분리 후에 상층부만을 분리하여 1.5 mL tube 에 넣어 -70°C 에서 보관한다. 이에 함께 urinary creatinine 을 측정하기 위하여 여분의 1.5mL tube 에 원심분리한 소변을 보관한다.

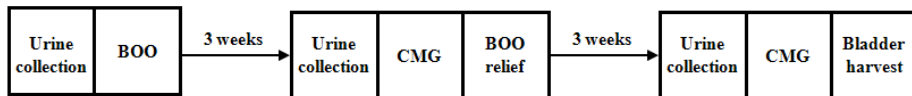


Fig. 1. Schematic diagram of the experiment in rats.

Before BOO, urine was collected for measuring baseline urinary NGF levels. Three weeks after onset and resolution of BOO, urine was collected for measuring NGF levels and CMG was conducted for detecting DO.

Then, BOO was relieved by removal of ligature around the urethrovesical junction. Three weeks later, urine for measuring urinary NGF levels was collected, and CMG for detecting DO was conducted once again. Finally bladders were harvested from the rats to measure tissue NGF levels. All processing progressed over 6 weeks.

BOO: bladder outlet obstruction; NGF: nerve growth factor; CMG: cystometrogram; DO: detrusor overactivity.

4. 방광내압측정술 (Cystometry, CMG)

CMG 는 T2 와 T3 에 시행하였다 (Fig. 1). 복강내 마취를 시행 후에 방광의 천정부위에 50-polyethylene 카테터를 삽입하고 purse-string suture 를 시행하여 카테터를 고정하였다. 카테터를 복부에서 피부하층을 지나도록 한 후에 고정하였다. 수술 후에 쥐를 restraining cage 에 위치하고 2-3 시간 경과하여 마취로부터 회복되도록 하였다. 방광내 위치한 카테터를 3-way stopcock 의 한쪽 끝에 연결하고, 나머지 다른 두 곳에는 방광내 압력을 측정하기 위한 pressure transducer 와 방광내로 생리식염수를 주입하기 위한 syringe pump 를 연결하였다. 상온의 생리식염수를 0.04 ml/min 으로 주입하였다. 방광 기능을 측정하기 위하여 생리식염수를 2 시간 동안 주입하면서 방광압력 및 배뇨횟수 등을 측정하였다. 방광수축은 방광수축 후에 소변이 수집되는지 여부에 따라서 배뇨방광수축 (voiding contraction) 또는 비배뇨방광수축 (non-voiding contraction)으로 정의하였다. 배뇨방광수축의 간격,

비배뇨방광수축의 횟수 및 최대배뇨압력의 크기를 Power-lab system (AD Instruments, Castle Hill, NSW, Australia)을 이용하여 계산하였다. DO 는 방광내압측정술 시행 중에 비배뇨방광수축이 나타나는 경우로 정의하였다. 비배뇨방광수축은 요도로부터 소변이 나오지 않으면서 기저압 (baseline pressure)으로부터 4 cmH₂O 이상의 자발적인 배뇨근 수축이 있는 경우로 정의하였다.

5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 이용한 소변내 NGF 측정

수집된 소변에 4 배 용적의 Dulbecco's phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)을 섞어주었다. 소변에 1N HCl 을 첨가하여 상온에 15 분간 반응시켜 pH 2.0-3.0 으로 산성화 시킨 후에 다시 1N NaOH 를 추가하여 pH 7.5-8.0 으로 중성화시켰다. 소변은 Emax[®] ImmunoAssay System (Promega Corp., Madison, WI)을 이용하여 한 표본당 2 개씩 분석되었다. NGF 의 양은 VersaMax microplate reader (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA)를 이용한 흡광도 측정으로 결정되었다. 모든 NGF 는 소변내 creatinine 농도에 의해서 표준화되었고, pg/ml creatinine 으로 표현되었다.

6. ELISA 를 이용한 방광조직에서의 NGF 측정

T3 에서 마취된 쥐로부터 방광 조직을 얻었다. 이 조직은 단백질 추출을 시행하기 전까지 급속히 얼려서 -80°C 에서 보존되었다. 방광 조직은 PRO-PREP™ lysis buffer (Intron, Seoul, Korea)를 이용하여 균질화된 후에 15 초 동안 3 회씩 초음파를 이용하여 분쇄하였다. 균질화된 조직은 $10,000 \times g$ 에서 4 분 동안 원심분리되었다. 상층액을 따로 얻어 4 배 용적의 DPBS 를 첨가하여 희석하였다. 단백질의 농도는 bovine serum albumin 을 기준으로 하여 Bio-Rad™ kit (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 측정하였다. 표본은 10 N HCl 을 첨가하여 상온에서 15 분 동안 유지하여 pH 2.0-3.0 이 되도록 산성화 시킨 후에 다시 10 N NaOH 를 추가하여 중성화시켰다. 산성화 처리 후에 표본을 분석할 때까지 -80°C 에서 보존되었다. 표본은 ELISA (Promega, Madison, WI)를 이용하여 한 표본당 2 개씩 분석되었다. NGF 는 VersaMax microplate reader 를 이용하여 450 nm 흡광도에서 측정되었다. 방광 조직의 NGF 는 조직의 단백질 양에 따라서 표준화되고, pg/ μg protein 으로 표현되었다.

7. 자료 분석

측정치는 mean \pm SD 로 표현되었다. Mann-Whitney U-test 와 Wilcoxon signed rank test 를 이용하여 소변내 NGF, 방광 조직의 NGF, 배뇨 간격 및 최대배뇨압력의 차이를 비교하였다. ANOVA

(Dunnett' s post-tests)를 이용하여 각 군간의 소변내 NGF 및 방광 조직의 NGF 의 차이를 비교하였다. 또한 Spearman' s correlation 을 이용하여 소변내 NGF 와 방광 조직의 NGF 의 상관 관계를 알아보았다. 모든 측정치는 $p < 0.05$ 인 경우에 통계학적으로 의미 있는 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 결과

1. 방광내압측정술

실험이 끝난 후에 전체 33 마리의 쥐가 남았다 (대조군: 9/10 마리; 실험군: 24/40 마리). 이 쥐들은 연속적으로 두 번 측정된 방광내압측정술의 결과에 따라서 처음 시행한 방광내압측정술에서는 DO 를 보였지만 이후에 시행한 검사에서는 DO 를 보이지 않은 16 마리의 쥐 (1 군, Fig. 2)와 두 번의 검사에서 모두 DO 를 보인 8 마리의 쥐 (2 군, Fig 3)으로 나뉘어 졌다. 방광출구폐색을 제거한 후에도 DO 가 지속되는 경우는 33.3% (8/24 마리)로 관찰되었다. DO 가 나타나는 경우에는 방광이 충만될수록 비배뇨방광수축의 압력이 점차 증가하다가 마지막에 배뇨 수축이 나타나는 것이 관찰되었다. 대조군에서는 DO 가 관찰되지 않았다.

방광출구폐색을 시행한 쥐는 T2 에서 방광내압측정술을 시행하였을 때 대조군에 비하여 최대배뇨압력이 의미 있게 증가하였다 (Table 1). 그러나 배뇨 간격은 의미 있는 차이를 보이지 않았다 (Table 1).

T3 에서 방광내압측정술을 시행하였을 때에는 방광출구폐색을 시행한 쥐는 대조군에 비하여 최대배뇨압력에 의미 있는 차이를 보이지 않았다 (Table 1). 이 때에도 배뇨 간격은 의미 있는 차이를 보이지 않았다 (Table 1).

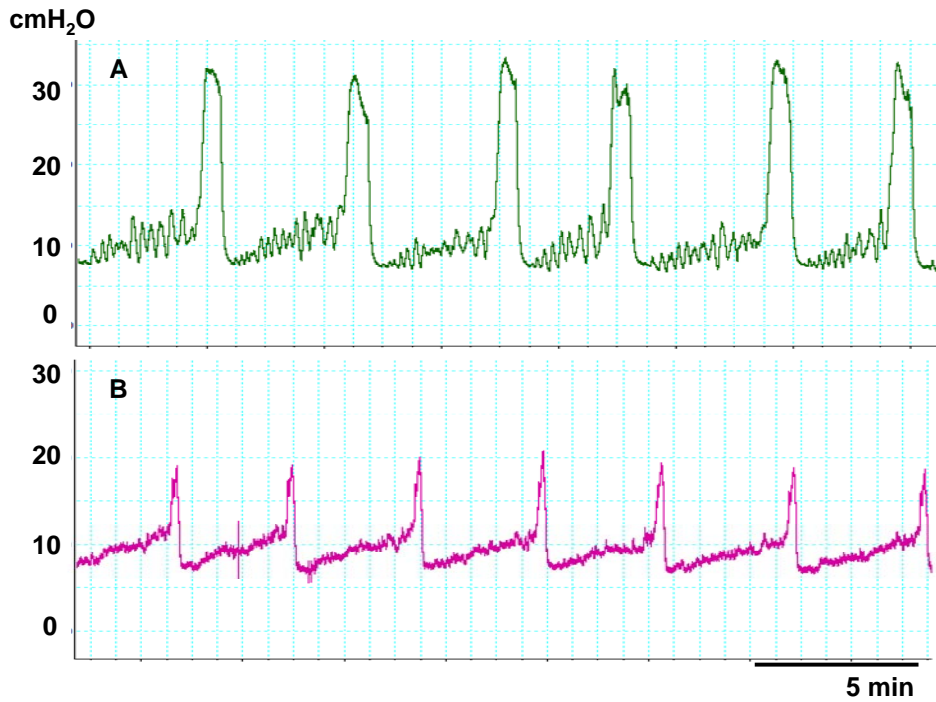


Fig. 2. Cystometrogram in a rat with DO on initial cystometry followed by absence of DO on subsequent cystometry. DO on cystogram 3 weeks after onset of BOO (A) disappeared when measured 3 weeks after relief of BOO (B). The maximal detrusor pressure 3 weeks after relief of BOO (B) was significantly decreased compared to the pressure measured 3 weeks after onset of BOO (A). DO: detrusor overactivity; BOO: bladder outlet obstruction.

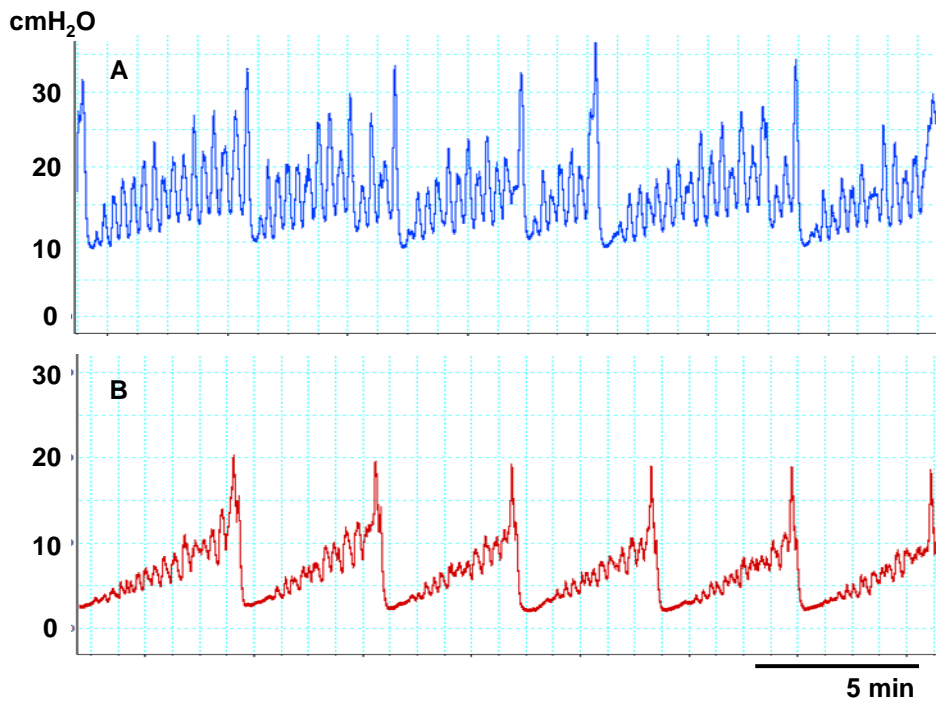


Fig. 3. Cystometrogram in a rat with DO on initial cystometry followed by DO on subsequent cystometry. There was persistent DO on the cystometrogram 3 weeks after relief of BOO (B) compared with the cystometrogram 3 weeks after onset of BOO (A). The maximal detrusor pressure 3 weeks after relief of BOO (B) was significantly decreased compared to the pressure measured 3 weeks after the onset of BOO (A).

DO: detrusor overactivity; BOO: bladder outlet obstruction.

Table 1. Effects of BOO and relief of BOO on cystometric variables.

Variable, mean±SD	Sham control	Group I	p	Group II	p
N	9	16		8	
Cystometric measurement 3 weeks after bladder outlet obstruction					
Voiding contraction:					
VI (sec)	320.2±109.7	353.0±111.0	0.648	334.0±58.1	0.942
MVP (cmH ₂ O)	18.6±2.0	38.5±12.1	0.001	36.2±6.9	0.001
Nonvoiding contraction:					
NVC	0	8.9±1.8		8.0±4.9	
Cystometric measurement 3 weeks after removal of bladder outlet obstruction					
Voiding contraction:					
VI (sec)	302.2±126.5	325.8±83.8	0.774	371.1±75.8	0.247
MVP (cmH ₂ O)	19.8±1.5	22.3±7.6	0.455	20.2±3.3	0.982
Nonvoiding contraction:					
NVC	0	0		5.6±2.3	

Group I: rats with DO on initial cystometry followed by no DO on subsequent cystometry.

Group II: rats with DO on initial and subsequent cystometry.

BOO: bladder outlet obstruction; DO: detrusor overactivity.; VI: voiding interval; MVP: maximal voiding pressure; NVC: number per voiding cycle.

2. 소변과 방광 조직의 NGF 측정

방광출구폐색을 시행하기 전의 2 군의 소변내 NGF 는 대조군에 비하여 의미 있게 높았지만, 1 군의 소변내 NGF 는 대조군과 의미있는 차이를 보이지 않았다 (Table 2).

Table 2. Urinary NGF levels before BOO, after BOO, and relief of BOO and bladder tissue NGF levels. Urinary NGF levels were normalized using urine creatinine concentration.

Variable, mean±SD	Sham controls	Group I	p	Group II	p
N	9	16		8	
uNGF1 (pg/ml)	32.1±18.8	23.6±23.4	0.821	87.4±71.5	0.013
uNGF2 (pg/ml)	32.5±20.2	210.0±174.3	0.005	173.2±75.8	0.058
uNGF3 (pg/ml)	35.6±25.0	145.0±111.6	0.018	196.3±106.9	0.003
uNGF1/Cr (pg/ml creatinine)	17.2±11.8	11.8±8.9	0.797	49.4±44.3	0.014
uNGF2/Cr (pg/ml creatinine)	18.9±12.5	100.9±82.9	0.006	92.9±38.5	0.036
uNGF3/Cr (pg/ml creatinine)	22.8±12.5	61.1±43.4	0.022	100.3±28.6	0.001
Bladder NGF (pg/μg protein)	122.9±33.0	160.9±34.9	0.023	194.6±33.9	0.001

uNGF1: urinary NGF before BOO

uNGF2: urinary NGF 3 weeks after onset of BOO

uNGF3: urinary NGF 3 weeks after relief of BOO

Group I: rats with DO on initial cystometry followed by no DO on subsequent cystometry.

Group II: rats with DO on initial and subsequent cystometry.

NGF: nerve growth factor; BOO: bladder outlet obstruction; DO: detrusor overactivity.

T2에서 1군과 2군의 소변내 NGF 값은 대조군에 비하여 의미 있게 증가하였다 (Table 2). 또한 T2에서 1군과 2군의 소변내 NGF 값은 T1에 비하여 의미 있게 증가하였다 ($p=0.001$, $p=0.012$, Fig. 4).

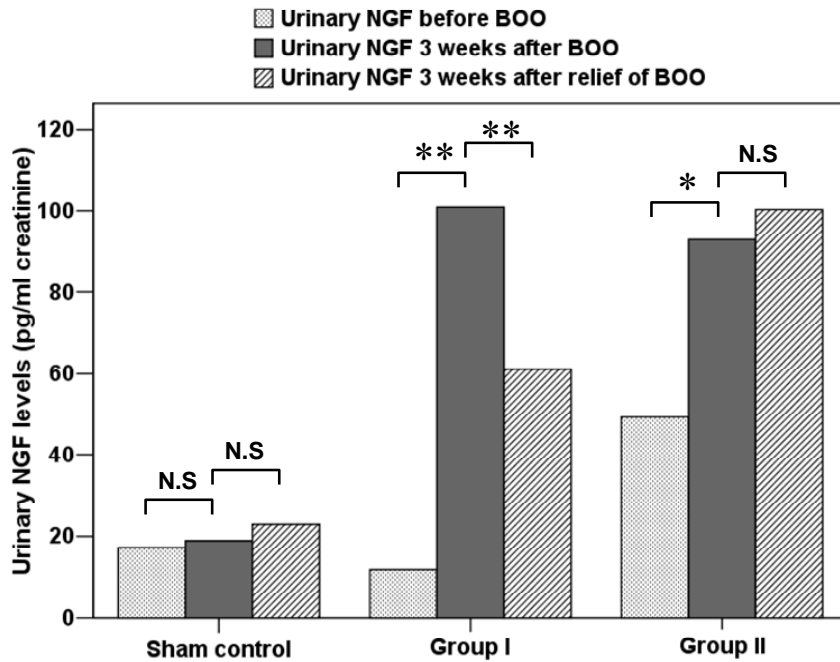


Fig. 4. Changes of urinary NGF levels in sham control and bladder outlet obstructed rats before the onset of BOO, after the onset of BOO, and after the relief of BOO. Urinary NGF levels were normalized using creatinine concentration. (Group I: rats with DO on initial cystometry followed by no DO on subsequent cystometry; Group II: rats with DO on initial and subsequent cystometry.)

NGF: nerve growth factor; BOO: bladder outlet obstruction; DO: detrusor overactivity.

** $p < 0.01$

* $p < 0.05$

T3 에서 1 군과 2 군의 소변내 NGF 값은 대조군에 비하여 의미 있게 높았다 (Table 2). 그러나 1 군에서는 T3 에서 소변내 NGF 값은 T2 의 소변내 NGF 값에 비하여 의미 있게 감소하였다 ($p=0.003$, Fig. 4). 2 군에서는 T3 에서의 소변내 NGF 값은 T2 에서의 소변내 NGF 값과 비교하였을 때 의미 있는 변화가 관찰되지 않았다 ($p=0.123$, Fig. 4). 1 군 과 2 군의 방광 조직의 NGF 값은 대조군에 비하여 의미 있게 높았다 (Table 2).

방광 조직의 NGF 는 T3 에서의 소변내 NGF 값과 양의 관계에 있었다 ($r=0.417$, $p=0.016$, Fig. 5).

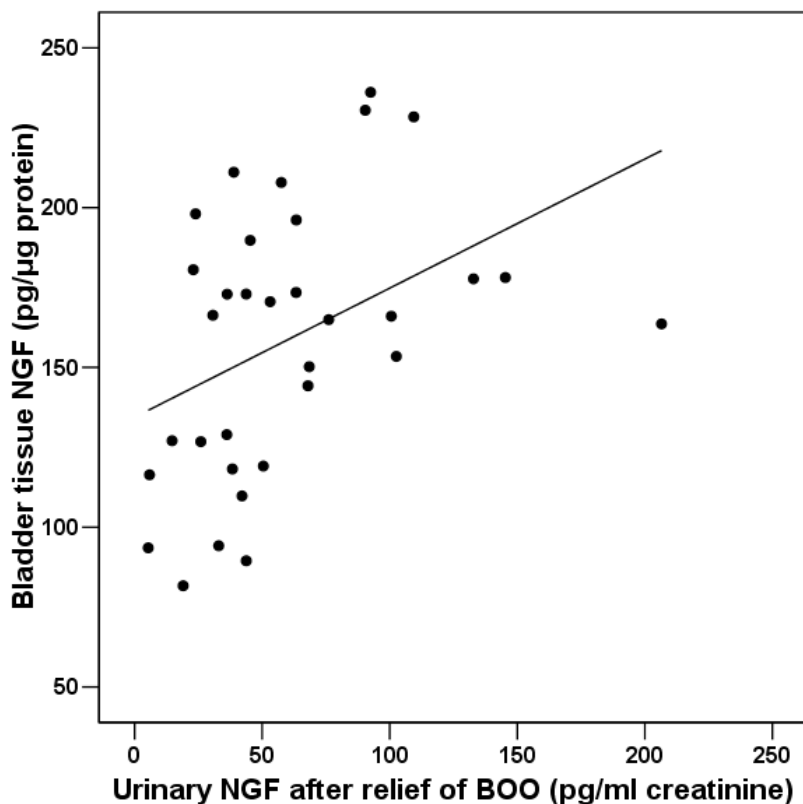


Fig. 5. Correlation between urinary NGF levels after relief of BOO and bladder tissue NGF levels. The urinary NGF levels after relief of BOO were positively correlated with bladder tissue NGF levels. (correlation coefficient = 0.417, $p=0.016$). Tissue NGF levels were normalized by tissue protein levels.

NGF: nerve growth factor; BOO: bladder outlet obstruction.

IV. 고찰

본 실험의 결과에서 2군의 쥐는 방광출구폐색을 제거한 이후에도 지속되는 DO를 보였으며 이 때의 소변내 NGF 역시 대조군에 비하여 의미 있게 증가되었는데, 이러한 결과는 김 등이 보고한 결과와 같다.¹⁰ 방광출구폐색을 시행하기 전에 2군에서의 NGF 값은 대조군 또는 1군에 비하여 의미 있게 높았다. 2군을 1군과 비교하여 보았을 때, 방광출구폐색을 시행한 후의 NGF값은 방광출구폐색을 시행하기 전에 비하여 의미 있게 증가하였다. 그러나 방광출구폐색을 제거한 이후에 1군의 NGF값은 감소하였음에도 불구하고 2군에서는 변화가 없었다. 이러한 결과는 소변내 NGF값의 변화가 방광에서 DO의 변화를 반영하는 것이라고 할 수 있다. 1군에서 방광출구폐색 시행 전의 NGF값이 대조군과 비교하여 차이가 없었지만, II군은 대조군에 비하여 의미 있게 높았다. 따라서 지속적으로 DO가 지속되는 경우에는 NGF가 처음부터 증가되어 있었다는 사실을 알 수 있다.

비록 명확한 기전이 밝혀진 것은 아니지만, NGF 생산이 증가되는 것이 구심성 감각신경의 ion channel의 표현을 변화하여 신경을 흥분시켜 DO를 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다. Yoshimura 등은 대부분의 방광의 구심성 신경원은 tetrodotoxin-resistant Na⁺ channel과 높은 전류 역치를 가진 slow-inactivating A-type K⁺ channels을 가지고 있다.¹² 방광의 구심성 신경에 장기간 NGF를 투여한 경우에 A-type K⁺ current density의 감소를 유발할 수 있고,

이로 인하여 방광의 DO를 유발하는 C-fiber 감각신경의 과흥분을 유발할 수 있다.

지속되는 배뇨근과활동성 (persistent DO)은 방광출구폐색에 의해 유발된 DO가 방광출구폐색이 제거된 이후에도 지속적으로 존재하는 것으로 정의된다. 그렇다면 지속되는 DO를 확인하기 위해서는 DO가 방광출구폐색 후에 있는 것을 확인해야 할 뿐 아니라 또한 방광출구폐색 전에도 존재하는 것을 확인하는 것이 필요하다. 따라서 방광내압측정술이 연속적으로 시행되어야 한다. 게다가 NGF 값이 DO의 변화를 반영하는 것을 평가하기 위해서는 NGF 역시 연속적으로 측정되어야 한다. 지금까지 몇몇의 연구들이 쥐에서 방광출구폐색을 시행하고 나서 일정 기간이 지나고 다시 이를 제거하여 방광조직의 NGF 또는 방광내압측정술에서의 DO에 대하여 평가하였으나, 이는 모두 방광출구폐색을 제거한 이후에 시행된 것이었다.⁹⁻¹⁰ 그러나 이러한 연구들은 방광출구폐색 시행 전의 NGF 또는 DO는 측정하지 않았다. 이러한 동물 연구의 대부분이 쥐를 희생하고 방광 조직을 얻어서 NGF를 측정하였기 때문에 연속적인 NGF를 측정할 수 없었다. 하지만 본 연구에서는 방광출구폐색 시행 전, 시행 후, 그리고 방광출구폐색을 제거한 후에 소변에서의 NGF를 ELISA 방법을 이용하여 측정할 수 있었다. 소변에서 측정된 NGF를 사용하여 비교를 하는 것이 정당하기 위해서는 이것이 방광 조직에서 얻어진 NGF 값을 반영할 수 있어야 한다. 따라서 저자들은 소변에서 측정된 NGF와 방광 조직에서 측정된 NGF의 관계를 조사한 결과,

서로 양의 관계에 있음을 확인하였다 ($r=0.417$, $p=0.016$). 따라서 소변의 NGF를 방광 조직의 NGF 대신에 사용하는 것이 가능하였다.

DO가 지속되는 쥐에서 왜 처음부터 소변의 NGF가 증가하였는지에 대한 이유는 명확하지 않다. 이러한 쥐들에 대해서는 방광출구폐색으로 인하여 NGF가 증가하는 것 이외에 다른 원인이 작용했을 것이라고 추측된다. 최근 NGF가 신경면역-내분비 기능에 있어서 항상성을 조절하는 조정자로서의 역할을 한다는 것이 보고된 바 있다.¹³ NGF의 농도는 방광의 염증에 의해서도 증가될 수 있다.¹⁴ 비록 실험에 사용된 쥐들이 같은 유전적인 배경을 가지고 있다 하더라도 일부의 쥐들은 NGF의 기준치가 증가될 수 있는 어떠한 원인에 노출이 되었을 수 있다. 이러한 가능한 정상 유전적 변이에 대해서 추가적인 연구가 필요할 것이다.

많은 연구들이 NGF의 DO 또는 과민성방광증상의 생물학적 표지로 사용이 가능한가에 대하여 연구하였다.¹⁵⁻¹⁷ 그러나 소변내 NGF를 지속되는 DO에 대한 예측인자로서 평가해본 연구는 보고된바 없다. 정말 중요한 것 중의 하나는 이러한 연구 결과를 실제 사람에서 어떻게 적용할 것인지에 대한 것이다. 방광출구폐색에 대해서 약물치료 또는 경요도전립선절제술과 같은 수술 치료를 필요로 하는 환자는 이미 초기라고는 볼 수 없기 때문에 이러한 경우에 NGF를 측정하는 것이 의미가 없을 수 있다. 하지만 사람에서는 방광출구폐색의 증상이 비교적 수 년 동안에 걸쳐서 나타나기 때문에 전립선비대증으로 방광출구폐색이 있는 환자에서 DO 및 과민성방광

증상이 새롭게 나타나는 경우에 소변내 NGF가 증가되어 있으면, 이러한 환자에서는 전립선비대증을 치료하더라도 DO 또는 과민성방광 증상이 지속될 가능성이 높다.

본 연구는 동물에서 방광요도 접합부의 폐색을 유발한 것으로 사람에서의 전립선비대증으로 인한 전립선 폐색과는 차이가 있다. 따라서 향후 사람에서 본 연구의 결과를 확인할 수 있는 연구가 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

쥐에서 방광출구폐색을 시행하고 DO 가 유발된 경우에 소변의 NGF 는 의미 있게 증가하였다. 또한 방광출구폐색을 제거하고 난 후에 DO 가 없어진 경우에는 소변내 NGF 가 의미 있게 감소하였고, DO 가 지속되는 경우에는 소변내 NGF 의 변화가 없었다. 따라서 소변내 NGF 는 방광출구폐색으로 유발된 DO 의 변화를 반영하는 지표로 사용이 가능할 것이다.

참고문헌

1. Wei JT, Calhoun E, Jacobsen SJ. Urologic diseases in America project: benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2005;173:1256-61.
2. Steers WD. Pathophysiology of overactive bladder and urge urinary incontinence. *Rev Urol* 2002;4 Suppl 4:S7-S18.
3. Chu FM, Dmochowski R. Pathophysiology of overactive bladder. *Am J Med* 2006;119:3-8.
4. Hashim H, Abrams P. Is the bladder a reliable witness for predicting detrusor overactivity? *J Urol* 2006;175:191-4; discussion 4.
5. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology* 2003;61:37-49.
6. Tanner R, Chambers P, Khadra MH, Gillespie JI. The production of nerve growth factor by human bladder smooth muscle cells in vivo and in vitro. *BJU Int* 2000;85:1115-9.
7. Steers WD, Tuttle JB. Mechanisms of Disease: the role of nerve growth factor in the pathophysiology of bladder disorders. *Nat Clin Pract Urol* 2006;3:101-10.
8. Zvara P, Kliment J, DeRoss AL, Irwin BH, Malley SE, Plante MK, et al. Differential expression of bladder neurotrophic factor mRNA in male and female rats after bladder outflow obstruction. *J Urol* 2002;168:2682-8.
9. Chai TC, Gemalmaz H, Andersson KE, Tuttle JB, Steers WD. Persistently increased voiding frequency despite relief of bladder outlet

- obstruction. *J Urol* 1999;161:1689-93.
10. Kim JC, Kim DB, Seo SI, Park YH, Hwang TK. Nerve growth factor and vanilloid receptor expression, and detrusor instability, after relieving bladder outlet obstruction in rats. *BJU Int* 2004;94:915-8.
 11. Yokoyama T, Kumon H, Nagai A. Correlation of urinary nerve growth factor level with pathogenesis of overactive bladder. *Neurourol Urodynam* 2008;27:417-20.
 12. Yoshimura N, White G, Weight FF, de Groat WC. Different types of Na⁺ and A-type K⁺ currents in dorsal root ganglion neurones innervating the rat urinary bladder. *J Physiol* 1996;494 (Pt 1):1-16.
 13. Leon A, Skaper SD, della Valle F, Toso RD, Levi-Montalcini R. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci* 1995;130:119-27.
 14. Vizzard MA. Changes in urinary bladder neurotrophic factor mRNA and NGF protein following urinary bladder dysfunction. *Exp Neurol* 2000;161:273-84.
 15. Kuo H, Liu H. Urinary nerve growth factor levels are increased in patients with bladder outlet obstruction with overactive bladder symptoms and reduced after successful medical treatment. *Urology* 2008;72:104-8; discussion 8.
 16. Kim JC, Park EY, Seo SI, Park YH, Hwang TK. Nerve growth factor and prostaglandins in the urine of female patients with overactive bladder. *J Urol* 2006;175:1773-6; discussion 6.
 17. Liu HT, Chancellor MB, Kuo HC. Urinary nerve growth factor level could be a biomarker in the differential diagnosis of mixed urinary incontinence in women. *BJU Int* 2008;102:1440-4.

Abstract

Elevated urinary nerve growth factor as a predictor of persistent detrusor overactivity after relief of bladder outlet obstruction in a rat model

Seung Ryeol Lee

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Young Deuk Choi)

Introduction: In case with bladder outlet obstruction (BOO) due to benign prostate hyperplasia (BPH), overactive bladder (OAB) may go together, and may persist after relief of BOO. Because OAB is diagnosed by the symptom complex of urgency, frequency, and nocturia, in case of OAB with BPH, objective differential diagnosis of OAB is difficult. Urodynamic study for diagnosis of OAB is invasive. Recently, as a causative agent for OAB, nerve growth factor (NGF) from bladder urothelial cell and detrusor muscle is focused on. But it has not been clearly known that NGF can represent DO. Therefore we evaluated urinary NGF as a biomarker for DO in a rat model of BOO.

Materials and Methods: Fifty female Sprague-Dawley rats

were divided into two groups: 10 sham control rats and 40 BOO rats. BOO was induced by partial urethral ligation and was relieved by removal of ligation after 3 weeks. The sham operation was done by loosely tying silk ligature around a dissected urethra. Voided urine was collected before BOO (T1), 3 weeks after onset of BOO (T2), and 3 weeks after relief of BOO (T3). Cystometry was performed on awake rats at T2 and T3. Bladder tissue was harvested at T3. uNGF and bladder tissue NGF were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay and the results were adjusted based on creatinine concentration.

Results: There was no DO and no difference of uNGF/Cr in sham control group. In 16 rats with DO only on initial cystometry (group 1), uNGF/creatinine(Cr) levels significantly increased from T1 to T2 ($p=0.001$), and significantly decreased from T2 to T3 ($p=0.003$). In 8 rats with DO initial and subsequent cystometry (group 2), uNGF/Cr levels significantly increased from T1 to T2 ($p=0.012$), but did not change from T2 to T3 ($p=0.123$). The uNGF/Cr levels of rats with persistent DO at T1 were significantly higher than those of control group ($p=0.015$) and group 1 ($p=0.005$). Bladder tissue NGF was positively correlated with the uNGF/Cr at T3 ($\gamma= 0.417$, $p=0.016$).

Conclusions: The uNGF levels increased with DO after BOO. When BOO was relieved, the uNGF decreased after disappearance of DO, and increased with persistent DO. Therefore, uNGF can be used as a biomarker for DO.

Key Words: Nerve growth factor; Detrusor overactivity; Bladder outlet obstruction