

국소적 뇌허혈에서
뇌저온 요법 후 Aquaporin의
시간적 변화와 발현

연세대학교 대학원

의 학 과

이 종 윤

국소적 뇌허혈에서
뇌저온 요법 후 Aquaporin의
시간적 변화와 발현

지도교수 허 지 회

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2010년 6월

연세대학교 대학원

의 학 과

이 종 윤

이종윤의 박사학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2010년 6월

감사의 글

시간이 많이 흘렀습니다.

처음 실험실에 왔을 때 그저 열심히 하면 잘 될 줄 알았습니다. 하지만, 무슨 말인지 모르는 낯선 용어들, 왜 쥐들은 그리도 쉽게 죽는지. 하늘도 무심하여 수개월 동안 키운 쥐들이 병에 걸려 3차례나 폐사시키기도 하였습니다. 어렵게 실험은 하였지만, 예상과 다른 결과들에 더 철저하게 준비하지 못한 것을 후회하기도 했습니다. 정말 오랜 시간에 걸쳐 여기까지 왔습니다. 이 과정을 마칠 수 있도록 지도해 주신 허지희 교수님께 진심으로 감사드립니다. 바쁘신 와중에서도 언제나 세심하고 따뜻한 지도와 조언을 해주셨습니다. 그런 것들이 얼마나 힘든 것이고 많은 사랑이 필요한지 저도 레지던트를 지도하면서 조금씩 깨닫고 더욱더 존경하게 됩니다.

이 연구의 실험을 도와준 실험실의 김은희, 권일, 정나영 선생, 선배로서 모범이 되어 주시고, 많은 조언을 주신 김서현, 이경열 선생님. 처음 뵈었지만, 따뜻하게 맞이해 주시고 주옥같은 조언을 주신 남택상, 이종은 선생님께도 깊은 감사를 드립니다. 이분들의 가르침과 조언이 있었기에 이 논문을 마칠 수 있었습니다.

박사를 하는 동안 사랑하는 사람을 만나 결혼도 하고 아들을 낳고 가정을 이루었습니다. 지치고 힘들 때마다 아낌없는 내조로 저를 도와준 아내 변수진, 끊임없는 재원으로 저를 즐겁게 해준 아들 이지호에게 고마움을 전합니다. 끝으로 항상 저를 믿어주시고, 아낌없는 지원을 해주신 부모님께 감사드립니다.

저자 씀

<차례>

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 실험동물	5
2. 중뇌동맥 폐색 및 재관류	6
3. 온도 조절 및 뇌저온 유도	6
4. 조직처리	7
5. 뇌부종 및 뇌경색 크기의 평가	8
6. Western blot	8
7. 면역조직화학염색	9
8. 면역형광염색	10
9. 혈액-뇌장벽 손상의 평가	10
10. 통계	11
III. 결과	11
1. 실험군과 사망률	11
2. 활력 지수와 혈류량의 변화	11
3. 뇌경색 크기	14
4. 뇌부종의 비교	16
5. Western blot	17
가. Aquaporin-4	17
나. Aquaporin-1 및 Aquaporin-9	18
6. 면역조직화학염색	20
7. 면역형광염색	22
8. Immunoglobulin G 염색	23
IV. 고찰	23
V. 결론	26

참고문헌	27
ABSTRACT	32

그림 차례

Figure 1. Infarction sizes determined by staining with 2% 2,3,5- triphenyl tetrazolium chloride.....	15
Figure 2. The percent area of brain edema	16
Figure 3. The levels of aquaporin-4 protein measured by western blot	18
Figure 4. The levels of aquaporin-1 protein measured by western blot	19
Figure 5. The levels of aquaporin-9 protein measured by western blot	20
Figure 6. Immunohistochemistry staining for aquaporin-1 and 4	21
Figure 7. Immunofluorescence staining for aquaporin-4, collagen type IV and glial fibrillary acidic protein of the rat brain in the normothermia sham group.....	22
Figure 8. Immunoglobulin G staining of the rat brain in the 2 hours of middle cerebral artery occlusion and 3 hours of reperfusion groups	23

표 차례

Table 1. Antibodies for immunofluorescence·····10

Table 2. Physiological variables and changes of regional cerebral perfusion ·····12

국문요약

국소적 뇌허혈에서 뇌저온 요법 후 aquaporin 의 시간적 변화와 발현

뇌허혈 후 발생하는 뇌부종은 뇌허혈의 증상을 악화시키고 사망률을 증가시킬 수 있다. Aquaporin (AQP)은 water-channel 단백질로 뇌부종의 생성과 흡수와 연관이 있다. 저체온법은 뇌부종을 효과적으로 감소시킨다. 저체온 효과의 기전으로 혈관 뇌장벽의 보호작용, 산소 유리기의 생성 억제, 항염증 효과, 뇌대사의 억제 등 여러 가지가 제시되어 있지만, 아직 AQP의 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 따라서, 본 연구에서는 흰쥐의 중뇌동맥폐색 모델을 이용하여 뇌경색 후 정상체온 및 저체온에서의 AQP의 시간적 변화와 뇌부종을 관찰함으로써, 뇌저온에서의 뇌부종과 AQP의 연관성을 밝혀내고자 하였다.

흰쥐를 정상체온군과 저체온군으로 나누고 각각의 군을 2시간 중뇌동맥폐색 후 재관류 0, 3, 24, 48, 72시간으로 나누어 실험하였다. 정상체온군은 체온을 37℃로 유지하였으며, 저체온군은 중뇌동맥폐색 동안 체온을 $33\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 뇌경색 및 뇌부종의 크기 평가는 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride 염색을 이용하였으며, western blot을 이용하여 AQP-1, 4과 9를 측정 비교하였다. 면역조직화학염색과 면역형광염색을 시행하여 AQP의 분포양상을 관찰하였다. Immunoglobulin G (IgG) 염색법을 이용하여 혈액-뇌장벽 손상을 관찰하였다.

결과적으로 뇌경색의 크기는 모든 군에서 저체온군이 정상체온군에

비해 의미 있게 감소하였으며, 특히 재관류 48시간 뒤에서 정상체온군과 저체온군과의 차이가 가장 컸다. 뇌부종은 전반적으로 정상체온군에 비해 저체온군에서 감소하는 양상을 보였으며, 특히 재관류 0시간 뒤와 3시간 뒤에서 두군 간에 의미 있는 차이를 보였다. AQP -4는 저체온군에서 유의한 차이를 보였으며, 시간에 따라 점차 감소하는 경향을 보였다. 이중 재관류 3시간, 48시간에서 두군 간의 의미 있는 차이를 보였다. AQP -1은 재관류 0시간 뒤와 24시간 뒤 저체온군에서 의미 있게 증가하였으나, AQP-9는 양군 및 시간에 따른 변화는 관찰되지 않았다. AQP-4는 별아교 세포의 발 부위에 위치하였으며, 허혈 부위에서 발현이 감소하였다. AQP-1은 맥락막 층에서 발현되었다. 정상체온 재관류 3시간군에서 뇌허혈 부위에 IgG 염색이 관찰되었다.

본 연구를 통해 저체온군에서 뇌경색과 뇌부종의 크기가 정상체온군에 비해 감소하고, AQP -4도 감소한 것을 확인하였다. 또한, AQP -1이 저체온군에서 뇌경색 후 0시간, 24시간 뒤에 정상체온군에 비해 의미 있게 증가하여, 저체온군의 뇌부종의 감소는 AQP -1과 4의 발현의 변화와 연관성이 있을 것으로 생각한다.

핵심되는 말 : 뇌허혈, 저체온, Aquaporin, 뇌부종

국소적 뇌허혈에서 뇌저온 요법 후
aquaporin 의 시간적 변화와 발현

<지도교수 허지회>

연세대학교 대학원 의학과

이 종 윤

I. 서론

뇌경색 이후 발생하는 뇌부종은 증상을 악화시킬 뿐 아니라, 심한 경우 뇌탈출증 등을 일으켜 사망에까지 이르게 할 수 있다. 이를 치료하기 위하여 저체온법, 만니톨 등 약물을 이용한 삼투압 치료, 머리뼈절제술을 통한 감압술 등을 시행하지만, 그 효과는 제한적이다.^{1,2} 같은 뇌경색이지만 사람에 따라 생명에 지장을 줄 만큼 심한 악성 뇌부종이 있는가 하면, 아주 경하며 뇌부종이 미미한 때도 있는데, 그 차이에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다.³

최근 water-channel 단백질인 aquaporin (AQP)이 이러한 뇌부종과 연관된 것으로 알려졌다. AQP-1과 4는 수분만 투과시키며, 뇌척수액의 형성과 뇌수분의 항상성에 관여한다.⁴ AQP-9는 aquaglyceroporin으로 수분뿐만 아니라 글리세롤, monocarboxylates와 요소 등을 투과시킨다.⁵ 이중 AQP-4는 뇌의 미세혈관과 뇌실막

세포(ependymal cell)를 둘러싸는 별아교 세포(astrocyte)의 발 부위에 있는 뇌의 주요 water-channel이다.⁶ AQP-4-knock-out 생쥐를 통한 실험에서는 유발 질환에 따라 뇌부종이 악화 또는 호전을 보여, AQP-4가 뇌부종의 형성과 흡수 모두에 작용하는 것으로 생각되나, 그 정확한 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.⁷⁻⁹

뇌부종의 원인으로 몇 가지가 있는데, 그 대표적인 것이 세포독성 뇌부종과 혈관성 뇌부종이다.¹⁰ 세포독성 뇌부종은 세포가 부피를 유지하기 위한 세포의 능력 및 에너지 상실 때문에 세포 내에 물이 축적되어 생기는 것으로 저나트륨 혈증이나 초기 뇌허혈 후 발생한다. 혈관성 뇌부종은 혈관 뇌장벽 손상 때문에 등삼투압성 체액과 혈장 단백질이 수압 차에 따라 혈액에서 간질 공간(interstitial space)으로 이동하여 생기는 것으로, 뇌종양이나 뇌농양, 뇌허혈 후 발생한다. 뇌허혈 시에는 초기에는 세포가 부어서 세포독성 뇌부종이 생기지만, 초기 이후에는 모세혈관의 내피세포와 혈관 뇌장벽 손상이 일어나 혈관성 뇌부종이 발생한다. 이렇게 뇌허혈에서의 뇌부종은 시간에 따라 기전 및 심한 정도에 변화가 있기 때문에, 뇌부종의 악화 또는 호전에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 AQP의 시간적 변화를 알아보는 것은 이들의 역할을 이해하는 데에 기본적으로 필요하다.

뇌저온 요법은 실험적 뇌경색 모델에서 뇌경색 및 뇌부종의 크기를 감소시키고 신경학적 장애를 호전시키는 것으로 알려져, 임상적으로도 일부에서 유용성이 보고되어 있다.¹¹⁻¹³ 이러한 뇌저온 요법 효과의 기전은 여러 가지가 제시되어 있지만, 그 중 혈관 뇌장벽의 보호작용이 뇌부종 특히 혈관성 뇌부종을 억제하는 것으로 생각된다.^{11, 14, 15} 뇌부종에서 AQP이 이바지하는 바를 생각하면, 뇌저온 요법 시 AQP-4 발현의 변화가 연관되어 있을 것으로 생각되지만, 이에 대한 연구는 거의 없다.^{16, 17}

본 연구의 목적은 뇌경색 후 정상체온 및 저체온에서의 AQP의 시간적 변화와 뇌부종을 관찰함으로써, 뇌저온에서의 뇌부종과 AQP의 연관성을 밝혀내는 데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

200-300g 정도의 수컷 Wistar rat을 사용하였다. 본 연구는 Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care(AAALAC)에서 승인된 실험계획안에 따라 시행하였다. 모든 동물은 플라스틱 우리에서 온도(22.0 ± 2.0 도), 습도($50 \pm 10\%$), 소음(40-50 phon 이하), 조명(12시간 명/암)이 자동으로 유지되고, 무균 음수 및 방사선 멸균 고형 사료가 공급되며 미생물 감시를 실시하는 조건에서 사육하였다. 실험동물은 수술 전날 밤부터 약 12시간 정도 물만 공급하였으며 수술 후에는 물과 사료를 충분히 섭취할 수 있게 하였다.

70%의 N_2O , 30%의 O_2 , 5% 아이소플루레인(isoflurane)으로 흡입마취를 유도하고 2% 아이소플루레인으로 유지한 상태에서 실험하였다. 중뇌동맥 폐색 전후에 활력 지수(폐하, 산소 포화도, 이산화탄소 포화도, 평균 동맥압)와 미세혈관 조직 관류(microvascular tissue perfusion)를 측정하였다. 평균 동맥압은 왼쪽 대퇴동맥에 카테터를 넣고 측정하였으며(Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA), 산도, 산소 포화도, 이산화탄소 포화도는 혈액을 채취해 분석하였다(OPTI critical care analyze, AVL Scientific Corporation, Roswell, Georgia, USA). 미세혈관 조직 관류는

두개골을 드러내어 시상봉합과 관상봉합의 접합점(bregma)을 기준으로 뒤쪽 1 mm, 왼쪽 3 mm 지점에 천공기를 이용하여 구멍을 뚫어 뇌의 피질 부위가 보이게 하고, 레이저 도플러 유량계 (BLF 21 laser Doppler flow meter, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA)를 이용하여 측정하였다.

2. 중뇌동맥 폐색 및 재관류

뇌의 허혈 손상은 기존에 보고된 나일론을 이용한 중뇌동맥 폐색과 재관류법을 일부 변형하여 유발하였다.¹⁸ 즉, 흡입 마취시킨 상태의 실험 쥐의 경부를 정중 절개하여 경동맥을 노출하고 총경동맥을 결찰한 다음, 내경동맥과 외경동맥의 분지들과 외경동맥을 전기소작 또는 결찰하였다. 다음으로 내경동맥을 일시적으로 혈관 clamp를 이용하여 결찰한 뒤 원위부 20 mm에 미리 화염을 이용하여 끝을 둥글게 한 뒤 poly-L lysine (Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 처리한 4-0 나일론 사 (Ethicon, Edinburg, UK)를 넣어서 내경동맥 쪽으로 들어간 것을 확인하고 혈관 clamp를 풀고 나일론 사를 총경동맥 분지부부터 23 mm까지 밀어 넣어 중뇌동맥을 막았다. 이러한 과정이 끝나고 나서 절개된 부분을 봉합하여 나일론 사의 끝 부분이 피부 밖으로 나오도록 하였다. 2시간 동안 중뇌동맥을 막은 후 재관류를 하는데 재관류는 흡입 마취 상태에서 피부 밖에 남겨 있는 나일론 사를 저항이 느껴질 때까지 잡아 빼고 나머지 끝 부분을 가위로 절단함으로써 시행하였다. 재관류 0시간, 3시간, 24시간, 48시간 72시간 후에 심장 관류를 이용하여 희생시켰다.

3. 온도 조절 및 뇌저온 유도¹⁹

수술 및 뇌저온 요법 동안에 지속적으로 체온을 측정하여 일정

온도를 유지하였다. 체온은 직장 체온과 뇌온(brain temperature)을 동시에 측정하였다. 직장 체온은 체온계를 직장 내로 삽입하여 측정하였으며, 뇌온은 비허혈 대뇌반구의 측두근에 체온계 (Precision 4000A Thermometer, Yellow Springs Instrument, Japan)를 삽입하는 방법으로 측정하였다. 수술 동안에 체온은 직장 체온과 연계된 자동온도조절장치 (Homeothermic blanket control unit, Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA)를 이용하여 섭씨 37도로 일정하게 유지하였다. 중뇌동맥 폐색 2시간 동안 실험동물의 전신에 분무기로 알코올을 뿌리고 팬을 이용하는 방법으로 섭씨 33도±0.5까지 감온하며 뇌저온 상태를 유지 하였으며, 뇌저온 요법이 끝나고 나서는 마취를 중단하고 자동온도조절장치와 온열 전등을 이용하여 복온하였다.

4. 조직처리

실험동물 희생은 우레탄(urethane)을 복강 내로 주사하여 마취한 상태에서 peristaltic pump 를 이용하여 헤파린이 섞인 차가운 생리 식염수를 우심방을 절개한 상태에서 좌심실을 통해 관류하고 즉시 뇌를 끄집어 냈다. 끄집어 낸 뇌는 brain matrix 를 이용하여 관상면으로 전두부부터 2 mm 두께로 잘라 7 개로 관상 절편화 하였다. 절편화한 조직 중 1, 3, 5, 7 번째 조직은 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)에 담가 섭씨 37 도에서 30 분간 배양하여 염색하였으며, 후에 뇌경색 및 뇌부종 측정 시 사용하였다. 2, 4, 6 번째 조직은 Tissue-Tek OCT compound (Miles Inc., Elkhart, IN, USA)와 함께 cryomol 에 넣어 섭씨 영하 80 도에 냉동상태로 보관하였다가 western blot, 면역조직화학과 면역형광염색, Immunoglobulin G (IgG) 면역염색을 위해 사용하였다.

5. 뇌부종 및 뇌경색 크기의 평가

뇌부종의 크기는 기존에 보고된 분석방법을 이용하였다.²⁰ TTC 염색을 한 후 3 번째 절편의 뒷면과 5 번째 절편의 앞면을 평판 스캐너를 이용하여 600dpi 로 스캔하고 반구별 면적을 Scion Image program 을 이용하여 측정하고 그 비율을 분석하였다. [(경색부위의 반구 크기)-(정상부위의 반구 크기)/(정상부위의 반구 크기)x100]

뇌경색의 크기는 3 번째 절편의 뒷면과 5 번째 절편 앞면에서 전체 면적과 뇌경색 부위 면적의 비율을 구하여 분석하였다.

6. Western blot

정상체온군과 저체온군 사이의 시간에 따라 발현되는 AQP의 양상을 알아보기 위해 western blot을 이용하였다. 냉동 절편조직에서 lysis buffer (10 mM Tris Cl pH 7.4, 1 mM ethylenediamine-tetraacetic acid, 100 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.01 mM phenylmethane-sulfonyl fluoride, 1% nonyl phenoxy polyethoxy ethanol 40, protease inhibitor cocktail)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 단백질은 Bradford법을 이용하여 bovine gamma globulin을 기준으로 정량하였다. 단백질 5 μ g을 12% SDS-PAGE로 분리하고, polyvinylidene difluoride membrane (PVDF)로 옮기고 항체의 비특이적 반응을 막기 위하여 tris buffered saline (TBS, 50 mM Tris Cl pH 7.5, 150 mM NaCl)에 5% 탈지분유로 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. AQP에 대한 1차 항체(AQP1; 1:1000, Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA, AQP4; 1:1000, Chemicon, Temecula, CA, USA, AQP9; 1:500, Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA)로 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 반응시키고 biotinylated anti-rabbit IgG (1:200, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)를 2차 항체로 사용하여 1

시간 30분간 반응시켰다. TTBS (0.5% Tween 20 in TBS)로 5분간 네 번 씻은 후 enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)로 반응시켜 X-ray 필름에 노출해 감광시켰다. 발현수준의 평가는 densitometry (Genetools, Syngene, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였고, 각 표본의 흡광도는 β -actin (1:20000, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)으로 보정하여 나타내었다.

7. 면역조직화학염색

면역조직화학염색은 10 μm 로 절삭된 냉동 절편조직을 이용하였다. 사용한 항체는 AQP-1 (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA)와 AQP-4 (Chemicon, Temecula, CA, USA)이었다. 냉동 절편을 메탄올에 10분간 고정된 후, 비특이적 항체 반응을 제거하기 위해 Blotto (0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 5% skim milk, 1% horse serum, 0.02% sodium azide)로 실온에서 20분간 처리하였다. 그다음, 1차 항체를 37°C에서 2시간 동안 배양하고 0.01M phosphate buffer saline (PBS)로 15분간 씻었다. Biotinylated anti-rabbit IgG (1:200, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)를 2차 항체로 사용하여 37°C에서 30분간 배양하고 다시 PBS로 씻은 후 endogenous peroxidase를 제거하기 위해 30% H_2O_2 /MeOH를 실온에서 20분간 반응시키고 나서 2분간 수돗물로 씻고 다시 PBS로 10분간 씻었다. 그다음 ABC 용액(Vectastatin Elite ABC reagent solution)을 이용하여 37°C에서 30분간 배양하고, PBS로 씻은 후 DAB solution (PBS 10 ml, 2,3 diaminobenzidine 5 mg, 30% H_2O_2 10 μl)으로 염색하였으며, hematoxylin으로 대조염색 하였다. 평가는 광학현미경(Carl Zeiss, Gottingen, Germany)하에서 실시하였다.

8. 면역형광염색

면역형광염색은 10 μm 로 절삭된 냉동 절편조직을 이용하였다. 10분간 methanol로 고정하고, 1차 항체는 Table 1과 같이 두 개의 항체를 섞어 4°C에서 밤새 반응시켰다. 0.01 M PBS로 5분씩 3회 씻은 다음 2차 항체는 cyanine 3 donkey anti-rabbit와 fluorescein isothiocyanate donkey anti-mouse를 37°C에서 1시간 동안 배양하고 PBS로 5분씩 3회 씻었다. DAPI가 포함된 mounting medium (Vectashield, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)을 사용하여 cover glass를 덮고, confocal microscope (LSM510, Carl Zeiss, Gottingen, Germany)을 통해 관찰하였다.

Table 1. Antibodies for immunofluorescence

Mixture of primary antibodies	Mixture of secondary antibodies
AQP-4 (1/200, rabbit, Chemicon)	CY3 donkey anti-rabbit (1/100, Jackson)
Collagen type IV (1/400, mouse, Stanford)	FITC donkey anti-mouse (1/100, Jackson)
AQP-4 (1/200, rabbit, Chemicon)	CY3 donkey anti-rabbit (1/100, Jackson)
GFAP (1/1000, mouse, Abcam)	FITC donkey anti-mouse (1/100, Jackson)

AQP, Aquaporin; CY3, Cyanine 3; FITC, Fluorescein isothiocyanate; GFAP, Glial fibrillary acidic protein

9. 혈액-뇌장벽 손상의 평가

혈액-뇌장벽의 손상은 IgG 면역 염색법을 이용하여 평가하였다.²¹ 면역조직화학염색법과 같게 실시하였으나, hematoxylin 대조염색은 제외하였다. biotinylated anti-rat IgG (1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 항체로 사용하였다.

10. 통계

통계분석으로 SPSS ver. 17.0 (SPSS Korea, Seoul, Korea)을 이용하였다. 사망률은 카이제곱 검정을, 활력 지수와 혈류량 변화의 비교는 paired t-test 를 사용하였으며, 각 군의 비교를 위해서 비모수검정인 Mann-Whitney U test 와 Kruskal Wallis test 를 사용하였다. 실험결과 값은 평균±표준오차로 표시하였으며, 각각의 검정에서 P 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 의의가 있는 것으로 하였다.

III. 결과

1. 실험군과 사망률

정상체온군과 저체온군으로 나누었으며, 각군은 중뇌동맥 폐색 2 시간 후 재관류 0, 3, 24, 48, 72 시간군과 대조군으로 나누어 실험하였다. 총 65 마리를 실험하였으며, 이중 실험 중에 사망한 정상체온군 2마리와 저체온군 3마리를 제외한 60 마리를 분석하였다. 사망률은 각각 7.4%, 10.7%로 양군 간 사망률에 대한 차이는 없었다($P=0.67$).

2. 활력 지수와 혈류량의 변화

실험 시 활력 지수 및 혈류량은 table 2 와 같았다. 전군에서 중뇌동맥 폐색 후 뇌혈류량이 의미 있게 감소하였으며($P<0.0001$), 저체온군에서 저체온 유도 후 체온이 의미 있게 감소하였다($P<0.0001$).

Table 2. Physiological variables and changes of regional cerebral perfusion

	Group	Baseline	MCAO	Reperfusion	
pH	Normothermia	2hO0hR	7.42±0.03	7.42±0.06	7.40±0.03
		2hO3hR	7.40±0.06	7.42±0.02	7.38±0.10
		2hO24hR	7.39±0.05	7.42±0.07	7.38±0.06
		2hO48hR	7.39±0.04	7.40±0.02	7.39±0.06
		2hO72hR	7.41±0.03	7.43±0.10	7.38±0.11
	Hypothermia	2hO0hR	7.41±0.07	7.41±0.09	7.30±0.09
		2hO3hR	7.36±0.10	7.32±0.07	7.19±0.11
		2hO24hR	7.34±0.12	7.39±0.06	7.26±0.13
		2hO48hR	7.42±0.03	7.34±0.05	7.36±0.06
		2hO72hR	7.41±0.05	7.37±0.05	7.30±0.10
PaO ₂ (mmHg)	Normothermia	2hO0hR	170.40±34.24	150.40±10.69	156.50±17.82
		2hO3hR	151.00±34.34	160.40±17.54	141.33±9.29
		2hO24hR	158.20±16.48	151.40±17.83	142.40±10.64
		2hO48hR	146.20±11.28	141.00±8.86	122.00±30.58
		2hO72hR	167.60±14.78	164.20±12.83	152.60±28.73
	Hypothermia	2hO0hR	161.60±41.17	179.80±13.08	172.20±16.77
		2hO3hR	162.40±62.61	155.20±38.83	113.00±17.82
		2hO24hR	149.20±33.89	155.40±15.32	135.40±33.28
		2hO48hR	166.60±23.07	162.00±42.79	139.40±13.42
		2hO72hR	155.60±36.03	153.20±39.15	137.75±50.98
PaCO ₂ (mmHg)	Normothermia	2hO0hR	47.40±6.58	48.20±8.08	50.00±2.94
		2hO3hR	48.80±8.44	46.40±5.46	49.67±12.90
		2hO24hR	50.80±6.38	47.60±9.69	52.40±9.71
		2hO48hR	47.60±4.88	46.00±4.69	47.50±8.39
		2hO72hR	46.20±6.61	45.20±10.06	52.80±12.36
	Hypothermia	2hO0hR	48.00±12.83	51.40±12.18	63.60±14.98
		2hO3hR	54.20±18.84	60.00±10.30	87.80±24.83
		2hO24hR	62.00±24.11	51.60±12.76	75.20±27.87
		2hO48hR	45.60±2.88	56.60±7.99	54.80±8.04

		2hO72hR	47.20±6.69	50.80±5.31	66.00±16.83
MABP (mmHg)	Normothermia	2hO0hR	104.58±19.88	89.36±11.87	96.51±16.11
		2hO3hR	106.13±23.77	102.06±12.09	95.56±26.09
		2hO24hR	108.74±9.94	102.55±8.71	97.67±11.87
		2hO48hR	93.24±12.4	78.78±35.53	78.59±25.53
		2hO72hR	107.82±7.58	103.85±18.34	111.17±20.73
	Hypothermia	2hO0hR	111.24±4.98	100.61±11.69	83.45±11.34
		2hO3hR	105.28±5.34	91.82±8.82	95.16±7.57
		2hO24hR	119.87±7.09	109.32±13.76	113.53±24.50
		2hO48hR	104.15±11.66	100.84±8.14	100.86±6.17
		2hO72hR	107.91±7.27	104.93±18.28	101.19±17.29
rCP* (%)	Normothermia	2hO0hR	100.00	18.83±11.52	
		2hO3hR	100.00	30.10±20.36	29.02±19.51
		2hO24hR	100.00	18.15±7.25	37.08±19.76
		2hO48hR	100.00	37.18±31.76	33.07±25.83
		2hO72hR	100.00	30.87±17.77	46.53±26.62
	Hypothermia	2hO0hR	100.00	30.54±10.00	
		2hO3hR	100.00	30.25±13.19	55.66±17.44
		2hO24hR	100.00	29.86±14.41	57.85±21.38
		2hO48hR	100.00	27.03±14.80	61.85±29.53
		2hO72hR	100.00	36.57±14.04	59.89±17.21
BT (°C)	Normothermia	2hO0hR	36.4±0.5	36.7±0.3	36.9±0.3
		2hO3hR	36.6±0.5	37.2±0.4	37.3±0.4
		2hO24hR	36.9±0.3	37.3±0.3	37.0±0.3
		2hO48hR	36.6±0.3	36.6±0.2	36.7±0.2
		2hO72hR	36.9±0.4	37.1±0.4	37.2±0.2
	Hypothermia**	2hO0hR	36.7±0.4	33.2±0.1	
		2hO3hR	36.7±0.4	32.9±0.2	
		2hO24hR	36.4±0.2	33.0±0.1	
		2hO48hR	36.7±0.3	32.8±0.6	
		2hO72hR	36.8±0.5	33.1±0.1	

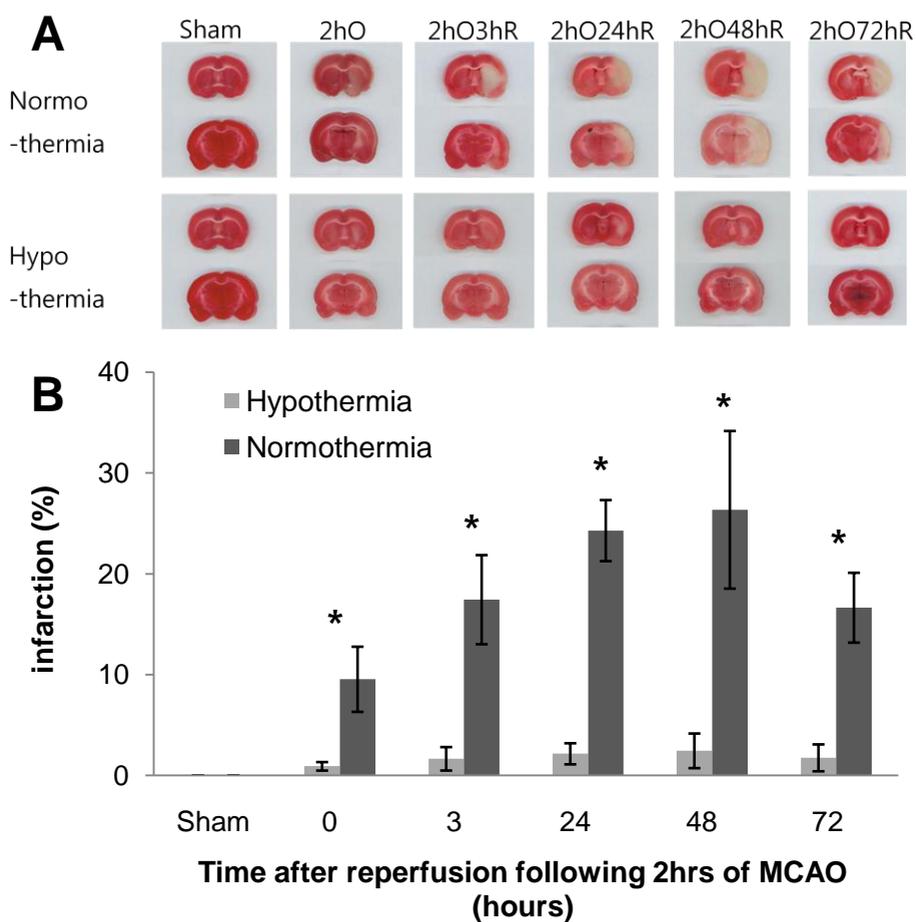
Values are means \pm standard deviation. h, hour; O, occlusion; R, reperfusion; MABP, mean arterial blood pressure; rCP, regional cerebral perfusion; BT, body temperature; MCAO, middle cerebral artery occlusion. *rCP before MCAO vs. after MCAO ($p < 0.0001$), **BT before hypothermia vs. after hypothermia ($p < 0.0001$)

3. 뇌경색 크기

뇌경색의 크기는 모든 군에서 저체온군이 정상체온군에 비해 의미 있게 감소하였다. 정상체온군의 뇌경색의 크기는 재관류 시간이 지남에 따라 점점 커지다가 72 시간 뒤에는 감소하였다. 평균 뇌경색 크기는 재관류 48 시간 뒤 정상체온군이 26.34% 저체온군이 2.44%로 그 차이가 가장 컸다($P < 0.05$)(Figure 1A and B).

Figure 1. Infarction sizes determined by staining with 2% 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride. A. Representative photographs show that infarcted areas (unstained, white) in the hypothermia group are much smaller than those in the normothermia group. B. The percent area of infarction was significantly smaller in the hypothermia group. *P<0.05

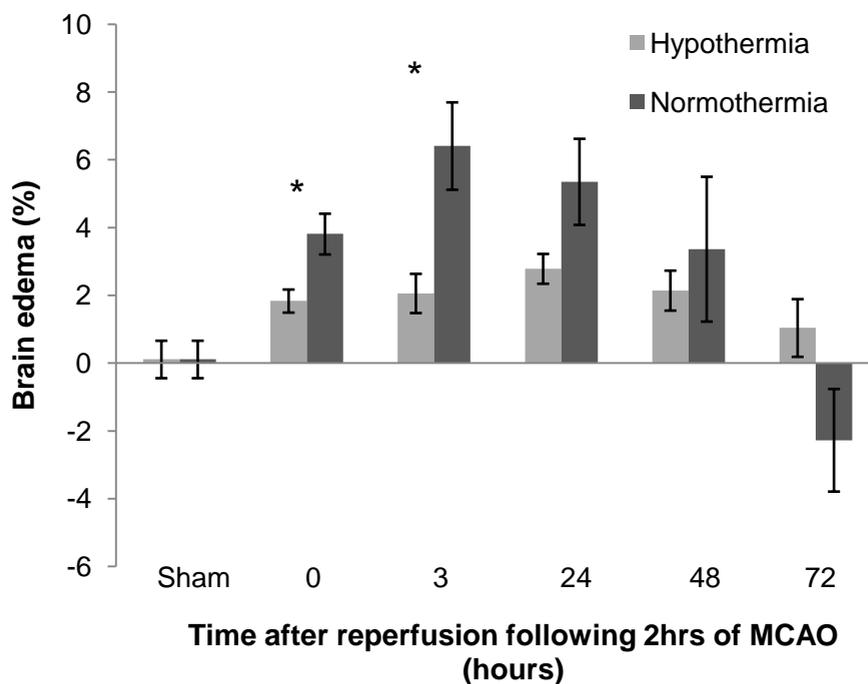
MCAO; middle cerebral artery occlusion



4. 뇌부종의 비교

TTC 염색을 이용하여 측정한 뇌부종의 정도는 전반적으로 정상체온군에 비해 저체온군이 더 작은 경향을 보였다. 정상체온군에서 재관류 3 시간까지 점점 증가하다가 다시 감소하면서, 재관류 72 시간 뒤에는 저체온군에 비해 작았다. 특히 재관류 0 시간 뒤와 3 시간 뒤에서 두군 간에 의미 있는 차이를 보였다($P=0.032$, 0.032)(Figure 2).

Figure 2. The percent area of brain edema. A significant difference was noted at reperfusion 0 hour and 3 hours. $*P<0.05$
MCAO; middle cerebral artery occlusion



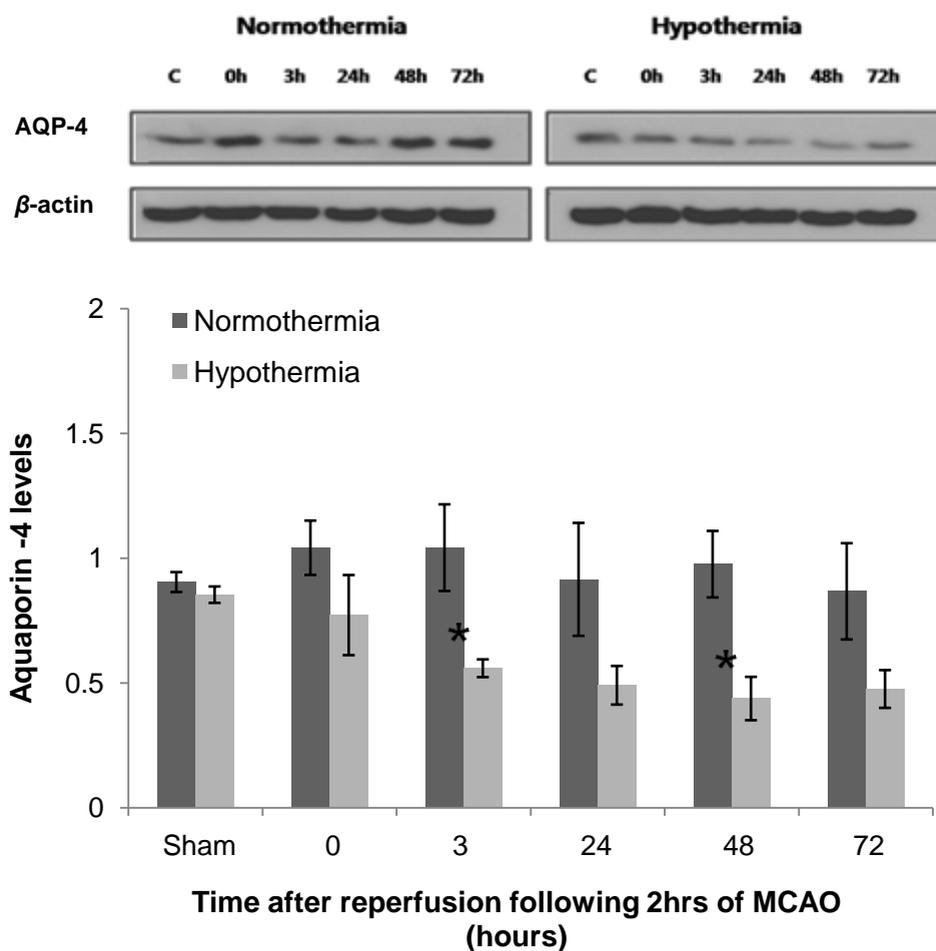
5. Western blot

가. AQP-4

재관류 시간에 따른 AQP-4의 변화는 정상체온군 간에는 유의한 변화는 관찰되지 않았으나, 저체온군 간에서는 유의한 차이를 보였으며($P=0.017$), 시간에 따라 점차 감소하는 양상이었다. 재관류 3시간, 48시간에는 정상체온군에 비해 저체온군 간에서 의미 있게 감소하여 있었다($P=0.008, 0.008$)(Figure 3).

Figure 3. The levels of aquaporin-4 protein measured by western blot. In the hypothermia group, aquaporin-4 levels are decreased according to the reperfusion time. In the reperfusion 3 hours and 48 hours, aquaporin-4 levels are significantly different between the hypothermia and normothermia groups. *P<0.05

MCAO; middle cerebral artery occlusion



나. AQP-1 및 AQP-9

AQP-1은 재관류 0시간 뒤 (P=0.032) 와 24시간 뒤 (P=0.008)에서 저체온군이 정상체온군에 비해 의미 있게 증가하였다(Figure 4).

그러나 AQP-9은 정상체온군 및 저체온군 간에 의미 있는 차이는 관찰되지 않았다(Figure 5, P>0.05). ,

Figure 4. The levels of aquaporin-1 protein measured by western blot. In the reperfusion 0 hour and 24 hours, aquaporin-1 levels are significantly different between hypothermia and normothermia groups. *P<0.05.

MCAO; middle cerebral artery occlusion

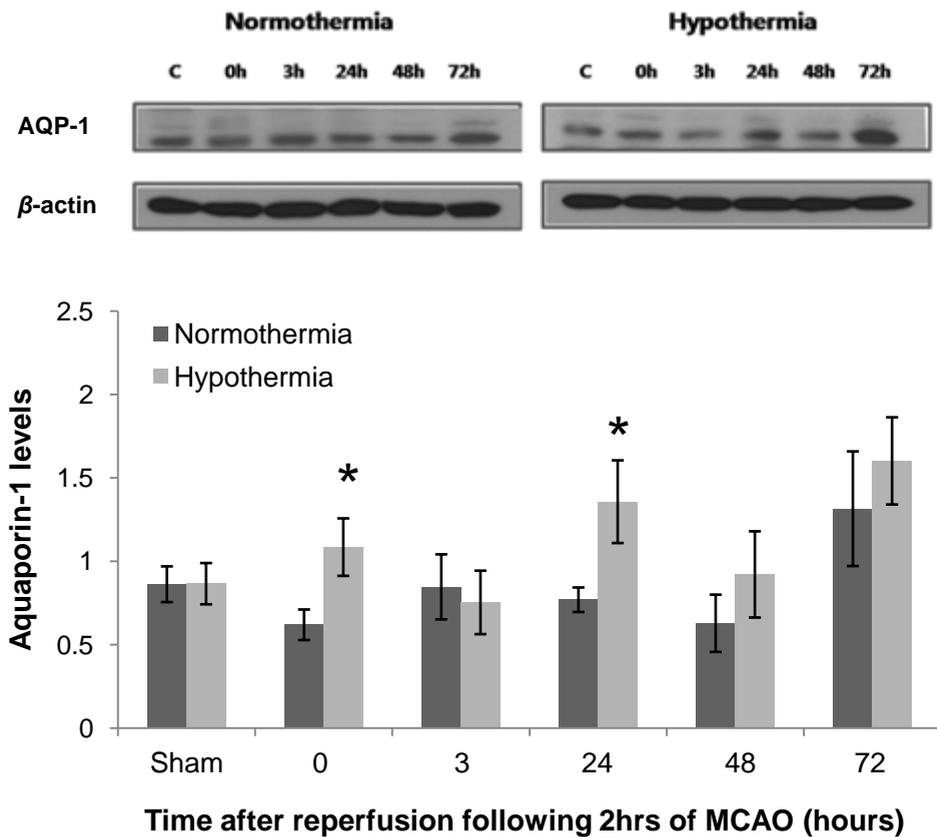
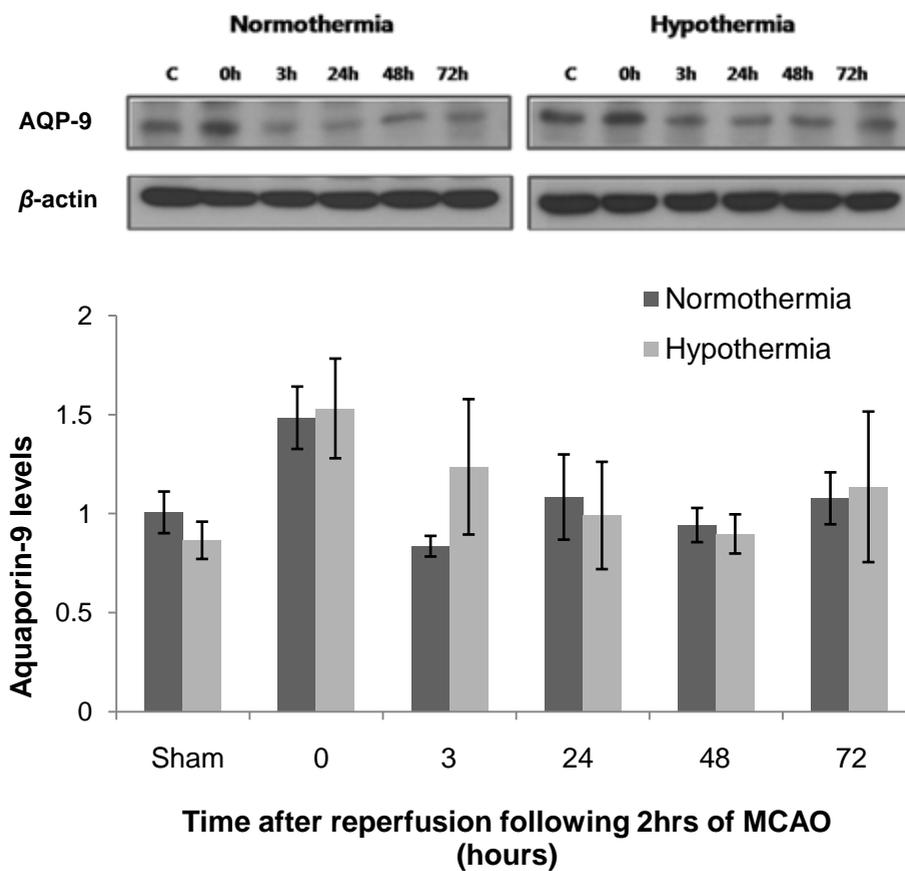


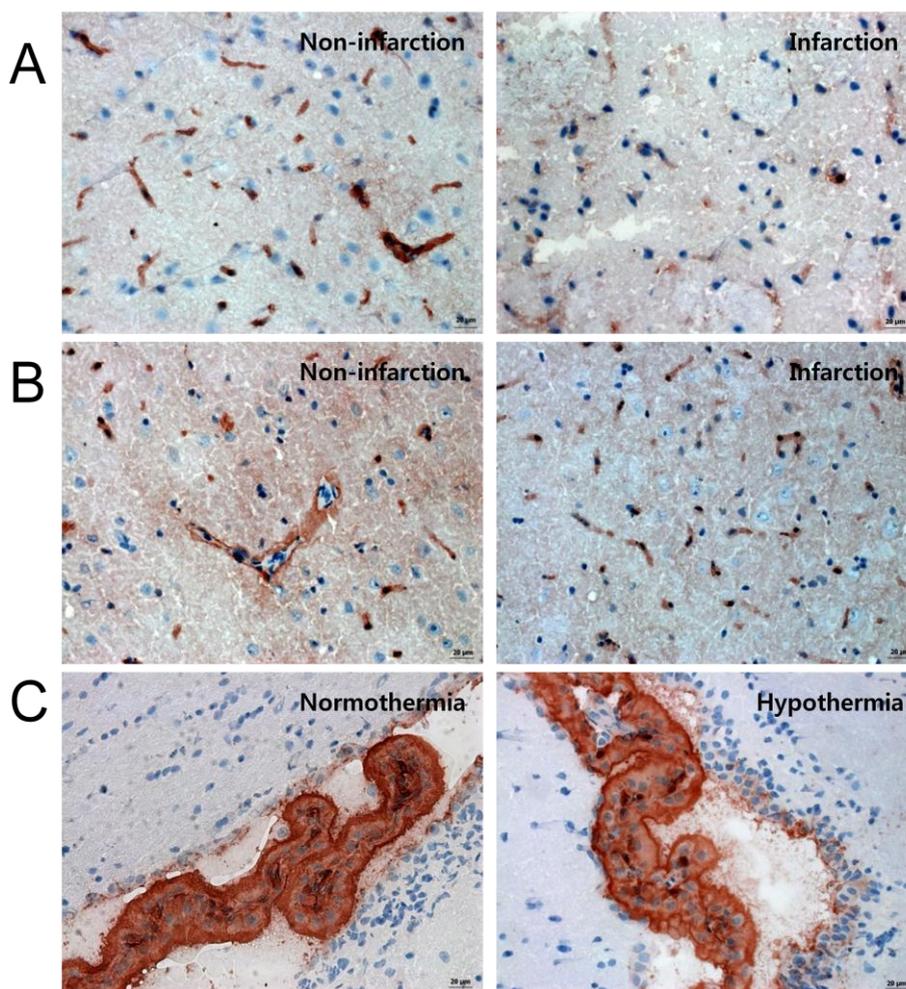
Figure 5. The levels of aquaporin-9 protein measured by western blot. They are neither changed after cerebral ischemia nor different between hypothermia and normothermia groups.



6. 면역조직화학염색

면역조직화학염색상 AQP-4의 발현이 뇌경색 부위에서 정상부위보다 감소한 것이 관찰되었으며, AQP-1은 맥락막 층에 발현된 것이 관찰되었다(Figure 6).

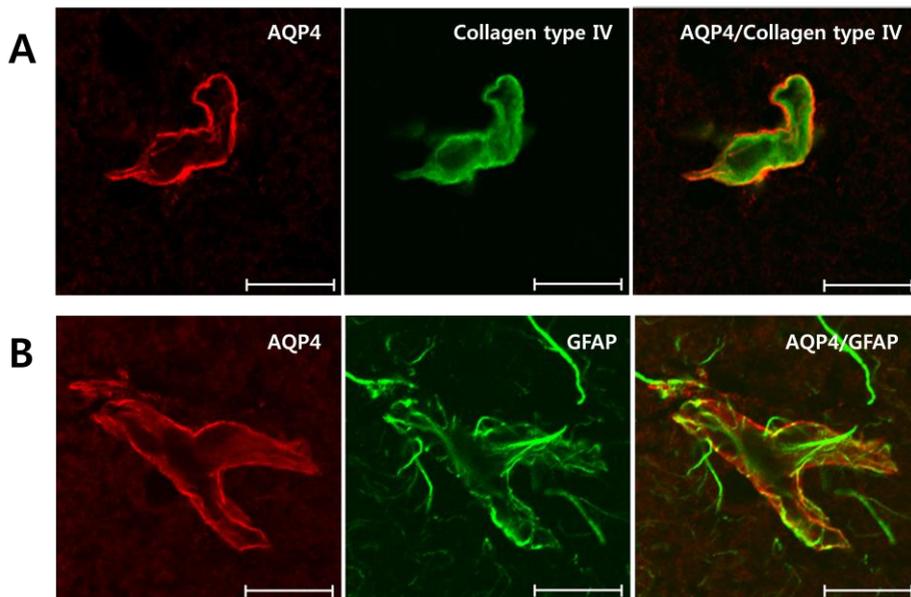
Figure 6. Immunohistochemistry staining for AQP-4 (A and B) and AQP-1 (C) of the rat brain. A. AQP-4 after 2 hours of MCA occlusion (MCAO) and 3 hours of reperfusion of the normothermia group. B. AQP-4 in hypothermia 2hours of MCAO and 3hours of reperfusion group. Its expression is decreased in the ischemic area. C. AQP-1 in 2hours of MCAO and 24hours reperfusion group. Its expression is localized in the choroid plexus. Scale bars=20 μ m.



7. 면역형광염색

정상체온 대조군에서 면역형광염색을 하였으며, AQP-4는 혈관 부위에서 발현되었다. Confocal 현미경으로 관찰 시 4형 콜라겐의 바깥부위에서 염색되어 혈관 바깥부위에서 발현됨을 알 수 있었다. GFAP염색과는 AQP-4 가 함께 발현되어 AQP-4가 별아교 세포의 발 부위에서 발현되는 것이 관찰되었다(Figure 7).

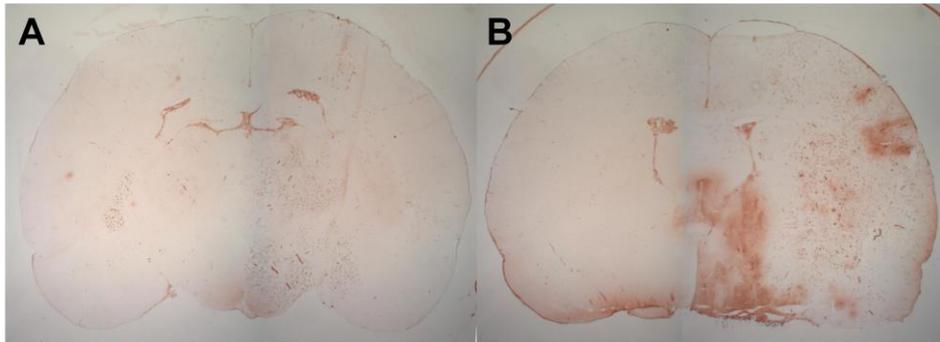
Figure 7. Immunofluorescence staining for AQP-4 (red, A and B), collagen type IV (green, A) and GFAP (green, B) of the rat brain in the normothermia sham group. A. AQP-4 is expressed outside of collagen type IV staining. B. AQP-4 is colocalized with GFAP showing that AQP-4 is expressed on the astrocyte endfeet around the blood vessels. Scale bars=50 μ m.



8. IgG 면역염색

재관류 3시간군에서 시행한 IgG 면역염색상, 정상체온군에서 뇌경색 부위에 IgG 염색이 관찰되었으며, 저체온군에서는 잘 관찰되지 않았다(Figure 8).

Figure 8. IgG staining of the rat brain in the 2 hours of MCA occlusion and 3 hours of reperfusion groups. A. Hypothermia group. B. Normothermia group. Extensive and strong staining is observed in the normothermia group.



IV. 고찰

AQP-1, 4와 9는 여러 아형 중 뇌허혈 후 뇌부종의 형성 및 제거와 연관된 것으로 생각되는 대표적인 water-channel 단백질이다.

지금까지 뇌허혈 모델에서 이들의 발현에 대해 다양하게 보고되고 있다. AQP-1의 경우 일과성 뇌허혈 모델에서 시간에 따른 발현의

변화는 관찰되지 않았다.²⁰ AQP-4는 젊은 쥐의 저산소-뇌허혈 모델에서는 뇌허혈 후 2.5시간 뒤 감소하였고,²² 90분 중대뇌동맥폐쇄 생쥐 모델에서는 23시간 뒤 감소하였다.⁶ 또 다른 90분 중대뇌동맥폐쇄 생쥐 모델에서는 초기에 감소하였다가 회복 후 다시 감소하는

양상을 보였다.²³ 30분 중대뇌동맥 폐쇄 생쥐 모델에서는 1시간 및 48시간 뒤 뇌부종의 증가와 함께 AQP-4의 증가가 관찰되어 전자는 세포독성, 후자는 혈관성 부종과 관련이 있다는 보고도 있었다.²⁰ AQP-9는 30분 중뇌동맥 폐쇄 생쥐 모델에서 뇌부종과는 상관없이 뇌허혈 후 24시간 뒤부터 점차 발현이 증가하는 것으로 보고되었다.²⁰ 본 실험에서는 정상체온군에서 AQP-1, 4와 9 모두 시간에 따른 발현의 변화는 관찰되지 않았다. 특히 AQP-4와 9는 기존 보고와 발현양상이 달랐는데, 이는 모델의 종, 뇌허혈의 방법 및 시간 등에 의한 차이가 영향을 미쳤을 것으로 생각한다.

본 실험에서 정상체온군에서의 뇌부종은 재관류 3시간 뒤가 가장 컸다. IgG 면역염색은 혈액-뇌장벽 손상 시 관찰할 수 있으며, 혈관성 뇌부종을 아는 방법이다. IgG 면역염색이 정상체온군 재관류 3시간군의 뇌경색 부위에서 관찰되어 기존의 보고처럼 혈관성 뇌부종이 빨리 나타나는 것을 알 수 있었다.²⁴

저체온군에서 뇌허혈 후 뇌경색과 뇌부종의 크기는 기존의 보고에서처럼 정상체온군에 비해 감소하였다.^{11, 13, 25} 이러한 뇌저온 효과의 기전으로 두개강 내 압력의 저하, 뇌대사의 억제, 단백질해저하, 글루타메이트 유리 억제, 세포 고사의 억제, 산소 유리기의 생성 억제, matrix metalloproteinase 활성 감소, 혈액-뇌장벽의 보호 작용, 젖산 및 조직 산화의 감소 등이 제시되고 있다.^{11, 14, 19, 26, 27}

뇌저온시 AQP의 변화에 대한 연구를 살펴보면, 흰쥐 실험에서는 5일 뒤 AQP-4의 발현이 감소하였지만,¹⁶ 저산소상태의 별아교 세포 배양 실험에서는 AQP-4는 일시적 감소 후 큰 증가가, AQP-9는 감소가 관찰된 바 있다.¹⁷ 본 실험에서는 AQP-1의 경우 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류 0시간 및 24시간 뒤에 정상체온군에 비해 증가하였으며, AQP-4의 경우 시간에 따라 점차 감소하였다. 이에 대한 기전은 아직 명확히 알려져 있지 않다. 그러나 AQP-4의 경우 혈액-뇌장벽의 손상이 AQP-4의 mRNA의 발현을 증가시킨다는

주장이 있으며,²⁸ 그 밖에 기존 연구들을 통해 다음과 같은 몇 가지를 가정할 수 있다. 첫째, 뇌저온의 ‘pan-inhibiting’ 효과이다. 일반적으로 뇌저온은 단백질의 유전정보 해독작용을 저해한다. 따라서, 유해과정뿐 아니라 heat-shock protein 70과 같이 보호 효과를 가진 유전자에도 영향을 미친다. 이 단백질은 뇌허혈 시 뇌보호 효과를 가지지만,²⁹ 저체온 시에도 감소한다.³⁰ 이러한 효과가 AQP에도 영향을 미쳤을 것으로 생각하나, AQP-4에만 영향을 미치는 것에 대해서는 아직 설명할 수 없다. 둘째로 젖산의 감소 효과이다. 뇌허혈 시 무산소성 당분해 과정 때문에 젖산 산증이 일어나며,³¹ 이는 세포독성 뇌부종 형성과 연관이 있다.³² 배양된 쥐의 별아교세포의 세포막에서 젖산 산증이 AQP-4의 발현을 증가시키는 것이 보고되었는데,³³ 저체온 시 감소하는 젖산이 AQP-4의 감소와 연관이 있을 수 있다. 셋째로, 산화질소(Nitric oxide) 합성 저하 효과이다. AQP-4의 인산화는 산화질소와 연관이 있다.³⁴ 저체온 시 산화질소의 합성 저하가 일어나는데,³⁵ 이러한 효과가 AQP-4의 발현에 영향을 주었을 것으로 생각한다.

AQP-1은 주로 맥락막 층에 분포하며, 뇌척수액 형성에 관여한다.³⁶ 뇌허혈에서 신정보호 효과를 보이는 agmatine이 뇌허혈 후 AQP-1 감소와 뇌부종을 감소시켜, AQP-1도 뇌허혈 후 뇌부종과 관계가 있을 것이다.³⁷ 본 실험에서는 저체온군에서 AQP-1이 오히려 증가를 해, 이에 대해서는 후속 연구가 필요할 것으로 생각한다.

본 실험에서 AQP-4는 뇌허혈 후 3시간, 48시간 뒤에 정상체온군에 비해 저체온군에서 의미 있게 감소하였다. 그에 반해 뇌부종은 3시간 뒤에는 정상체온군이 72시간 뒤에는 저체온군이 더 큰 양상으로 나타나, AQP-4와 뇌부종의 관계가 정확하게 일치하지는 않았다. 본 실험의 뇌부종 측정방법이 주로 혈관성 뇌부종의 측정에 더 적합한 방법으로, 세포독성 뇌부종의 영향이 적었기 때문일 수도 있다. Wet/dry 중량 측정법이 이러한 영향을 최소화할 수도 있지만, 기존

보고에서도 그렇듯이 본 실험실에서의 예비실험에서도 뇌의 전체 용적의 크기를 측정하여 뇌부종을 평가하였을 때와 큰 차이는 보이지않았다.³⁸ TTC염색 시 사용하는 포르말린 고정액이 조직의 수축을 유발하여 뇌부종이 저평가되었을 가능성도 있지만, 뇌경색 부위뿐만 아니라 정상부위에도 똑같이 영향을 미쳐서 큰 차이는 없을 것으로 생각한다.³⁹ 72시간 뒤에는 오히려 정상체온군이 더 감소하였는데, 이는 세포 괴사 후 세포의 수축 때문인 것으로 생각하며, 이러한 영향이 뇌부종 측정에 영향을 미쳤을 수도 있다.

V. 결론

본 연구를 통해 저체온군에서 뇌경색과 뇌부종의 크기가 정상체온군에 비해 감소하고, AQP-4도 감소한 것을 확인하였다. 또한, AQP-1이 저체온군에서 뇌경색 후 0시간, 24시간 뒤에 정상체온군에 비해 의미 있게 증가하여, 저체온군의 뇌부종의 감소는 AQP-1과 4의 발현의 변화와 연관성이 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

1. Rabinstein AA. Treatment of cerebral edema. *Neurologist*. 2006;12:59-73
2. Klatzo I. Brain oedema following brain ischaemia and the influence of therapy. *Br J Anaesth*. 1985;57:18-22
3. Hacke W, Schwab S, Horn M, Spranger M, De Georgia M, von Kummer R. 'malignant' middle cerebral artery territory infarction: Clinical course and prognostic signs. *Arch Neurol*. 1996;53:309-15
4. Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4:991-1001
5. Badaut J, Regli L. Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain. *Neuroscience*. 2004;129:971-81
6. Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug FM, Froehner SC, Adams ME, Neely JD, Agre P, Ottersen OP, Bhardwaj A. An alpha-syntrophin-dependent pool of aqp4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:2106-11
7. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*. 2000;6:159-63
8. Badaut J, Brunet JF, Regli L. Aquaporins in the brain: From aqueduct to "Multi-duct". *Metab Brain Dis*. 2007;22:251-63
9. Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos MC. Water movements in the brain: Role of aquaporins. *Trends Neurosci*. 2008;31:37-43
10. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2007;22:778-84
11. Maier CM, Ahern K, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK.

- Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: Effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke*. 1998;29:2171-80
12. Schwab S, Schwarz S, Spranger M, Keller E, Bertram M, Hacke W. Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction. *Stroke*. 1998;29:2461-6
 13. Kollmar R, Schabitz WR, Heiland S, Georgiadis D, Schellinger PD, Bardutzky J, Schwab S. Neuroprotective effect of delayed moderate hypothermia after focal cerebral ischemia: An mri study. *Stroke*. 2002;33:1899-904
 14. Kataoka K, Yanase H. Mild hypothermia--a revived countermeasure against ischemic neuronal damages. *Neurosci Res*. 1998;32:103-17
 15. Huang ZG, Xue D, Preston E, Karbalai H, Buchan AM. Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: Effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci*. 1999;26:298-304
 16. Berger C, Xia F, Körmann M, Schwab S. Hypothermia in acute stroke--slow versus fast rewarming: An experimental study in rats. *Experimental neurology*. 2007;204:131-7
 17. Fujita Y, Yamamoto N, Sobue K, Inagaki M, Ito H, Arima H, Morishima T, Takeuchi A, Tsuda T, Katsuya H, Asai K. Effect of mild hypothermia on the expression of aquaporin family in cultured rat astrocytes under hypoxic condition. *Neurosci Res*. 2003;47:437-44
 18. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84-91

19. Lee KY, Kim EH, Kim GH, Heo JH, Lee BI, Sunwoo IN. Effect of brain hypothermia on ischemic injury and matrix metalloproteinase activity in focal cerebral ischemia. *J Korean Neurol Assoc.* 2003;21:378-86
20. Marlise de Castro Ribeiro LH, Julien Bogousslavsky, Luca Regli, J??e Badaut,. Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res.* 2006;83:1231-40
21. Tsubokawa T, Yamaguchi-Okada M, Calvert JW, Solaroglu I, Shimamura N, Yata K, Zhang JH. Neurovascular and neuronal protection by e64d after focal cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Res.* 2006;84:832-40
22. Meng S, Qiao M, Lin L, Del Bigio MR, Tomanek B, Tuor UI. Correspondence of aqp4 expression and hypoxic-ischaemic brain oedema monitored by magnetic resonance imaging in the immature and juvenile rat. *Eur J Neurosci.* 2004;19:2261-9
23. Frydenlund DS, Bhardwaj A, Otsuka T, Mylonakou MN, Yasumura T, Davidson KG, Zeinalov E, Skare O, Laake P, Haug FM, Rash JE, Agre P, Ottersen OP, Amiry-Moghaddam M. Temporary loss of perivascular aquaporin-4 in neocortex after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:13532-6
24. Young W, Rappaport ZH, Chalif DJ, Flamm ES. Regional brain sodium, potassium, and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia. *Stroke.* 1987;18:751-9
25. Huh PW, Belayev L, Zhao W, Koch S, Busto R, Ginsberg MD. Comparative neuroprotective efficacy of prolonged moderate intraischemic and postischemic hypothermia in focal cerebral ischemia. *J Neurosurg.* 2000;92:91-9

26. Linares G, Mayer SA. Hypothermia for the treatment of ischemic and hemorrhagic stroke. *Crit Care Med.* 2009;37:S243-9
27. Zhao H, Steinberg GK, Sapolsky RM. General versus specific actions of mild-moderate hypothermia in attenuating cerebral ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:1879-94
28. Vizuete ML, Venero JL, Vargas C, Ilundain AA, Echevarria M, Machado A, Cano J. Differential upregulation of aquaporin-4 mrna expression in reactive astrocytes after brain injury: Potential role in brain edema. *Neurobiol Dis.* 1999;6:245-58
29. Kelly S, Zhang ZJ, Zhao H, Xu L, Giffard RG, Sapolsky RM, Yenari MA, Steinberg GK. Gene transfer of hsp72 protects cornu ammonis 1 region of the hippocampus neurons from global ischemia: Influence of bcl-2. *Ann Neurol.* 2002;52:160-7
30. Chopp M, Li Y, Dereski MO, Levine SR, Yoshida Y, Garcia JH. Hypothermia reduces 72-kda heat-shock protein induction in rat brain after transient forebrain ischemia. *Stroke.* 1992;23:104-7
31. Siesjo BK. Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981;1:155-85
32. Staub F, Baethmann A, Peters J, Weigt H, Kempster O. Effects of lactic acidosis on glial cell volume and viability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10:866-76
33. Morishima T, Aoyama M, Iida Y, Yamamoto N, Hirate H, Arima H, Fujita Y, Sasano H, Tsuda T, Katsuya H, Asai K, Sobue K. Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neurosci Res.* 2008;61:18-26
34. Gunnarson E, Zelenina M, Axehult G, Song Y, Bondar A, Krieger P, Brismar H, Zelenin S, Aperia A. Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. *Glia.*

2008;56:587–96

35. Kader A, Frazzini VI, Baker CJ, Solomon RA, Trifiletti RR. Effect of mild hypothermia on nitric oxide synthesis during focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*. 1994;35:272–7; discussion 7
36. Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel aquaporin-1. *FASEB J*. 2005;19:76–8
37. Kim JH, Lee YW, Park KA, Lee WT, Lee JE. Agmatine attenuates brain edema through reducing the expression of aquaporin-1 after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009
38. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Kluge A, Bachmann A, Fisher M, Kaps M, Bachmann G. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke*. 2004;35:566–71
39. Hu W, Kharlamov A, Wang Y, Perez-Trepichio AD, Jones SC. Directed sampling for electrolyte analysis and water content of micro-punch samples shows large differences between normal and ischemic rat brain cortex. *Brain Res*. 2000;868:370–5

Abstract

The Expression and Temporal Course of Aquaporin after Brain Hypothermia in Focal Cerebral Ischemia

Jong Yun Lee

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Ji Hoe Heo)

Brain edema after the cerebral ischemia can worsen the symptoms and increase the mortality. Aquaporins (AQPs) are water-channel proteins, which play a role in water regulation in the brain. AQPs have been implicated in brain edema. Ischemic brain edema is effectively reduced by hypothermia. Although the mechanisms of hypothermic effects has been proposed as decrease of the blood-brain barrier permeability, inhibition of free radical generation, and anti-inflammatory actions, yet the role of AQP is unknown. To reveal their relationship with the brain edema and hypothermia, we compared their expression patterns with brain swelling in normothermia and hypothermia after focal cerebral ischemia.

Wistar rats were subjected to 2 hours (hr) of middle cerebral artery occlusion (MCAO) and 0, 3, 24, 48, 72 hr of reperfusion. Body temperature was maintained at 37°C in the normothermia group. Hypothermia was induced by maintaining the body temperature at

33±0.5°C during MCAO. Sizes of cerebral infarction and those of brain edema were determined using 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride staining. The levels of AQP-1, 4, and 9 proteins were assessed using western blot. Cellular localization was determined by immunohistochemistry and immunofluorescence studies.

Blood-brain barrier damage was determined by IgG staining.

As a result, Hypothermia decreased sizes of infarction ($P<0.05$) and those of brain edema at 2 hr MCAO/0 hr and 3 hr reperfusion ($P=0.032$, 0.032 , respectively). AQP-4 levels were decreased in the hypothermic rats ($P=0.017$), which was statistically significant at 2 hr MCAO/3 hr and 48 hr reperfusion ($P=0.008$, 0.008 , respectively). AQP-1 levels were significantly increased in the hypothermic rats at 2 hr MCAO/0 hr and 24 hr reperfusion ($P=0.032$, 0.008 , respectively). The levels of AQP-9 were neither changed after cerebral ischemia nor different between hypothermia and normothermia groups. AQP-4 was localized at the astrocyte endfeet and its expression was decreased in the ischemic core. AQP-1 expression was localized in the choroid plexus. Extensive and strong IgG staining was observed in the normothermia rats at 2 hr MCAO/3 hr reperfusion.

Hypothermia-induced reduction of ischemic brain edema may be associated with changing expression of AQP-1 and 4.

Key Words : cerebral ischemia, hypothermia, aquaporin, brain edema