

척수 손상 후에 투여한
methylprednisolone에 의한
apoptosis의 변화

연세대학교 대학원

의 학 과

장 호 열

척수 손상 후에 투여한
methylprednisolone에 의한
apoptosis의 변화

지도 김 영 수 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

장 호 열

장호열의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 송 낙수 인

심사위원 안 영수 인

심사위원 우 도훈 인

심사위원 주 진영 인

심사위원 정기영 인

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성함에 있어서 아낌없는 격려와 지도를 하여 주시고 학문적인 발전을 위하여 항상 따뜻한 격려를 하여 주신 김영수 교수님께 충심으로 감사를 드립니다.

아울러 본 연구 결과에 대한 조언과 지도 및 관심을 아끼지 않으신 안영수 교수님, 유도흠 부교수님, 주진양 부교수님, 장진우 부교수님께 심심한 감사를 드립니다.

바쁜 중에도 시간을 내어 본 연구의 실험을 위하여 많은 시간과 도움을 제공하였던 박정은, 이경희 선생님을 비롯하여 전기생리 연구실의 여러분께 감사 드립니다.

끝으로 항상 무한한 사랑과 관심으로 돌보아 주시는 부모님, 힘들어도 내색하지 않고 사랑으로 헌신한 아내와 사랑스런 아들 진우에게 조그마한 보답이 되기를 바라며 이 논문을 바칩니다.

저 자 씀

차 례

| | |
|--|----|
| 국문요약 | 1 |
| I. 서 론 | 3 |
| II. 재료 및 방법 | 4 |
| 1. 동물 모델 제작 | 4 |
| 2. 실험 설계 | 5 |
| 3. 행동 검사 | 5 |
| 4. 병리학적 검사 | 5 |
| 가. Hematoxylin과 eosin 염색 | 5 |
| 나. Bcl-2와 Bax 염색 | 5 |
| 다. TUNEL 염색 | 6 |
| 5. 통계 처리 | 6 |
| III. 결 과 | 6 |
| 1. 척수 손상 매개 변수 | 6 |
| 가. 척수 손상의 평균 높이 | 7 |
| 나. Rod의 평균 낙하 속도 | 7 |
| 다. 압축 비율 | 7 |
| 2. 손상 14일째의 BBB 점수 | 8 |
| 3. 병리학적 결과 | 8 |
| 가. Hematoxyline과 eosin 염색 | 8 |
| (1) 초급성기 변화 | 8 |
| (2) 아급성기 변화 | 9 |
| 나. Bcl-2의 염색 | 9 |
| 다. Bax의 염색 | 10 |
| 라. Apoptosis 확인을 위한 염색(TUNEL 염색) | 11 |

| | |
|--------------|----|
| IV. 고찰 | 12 |
| V. 결론 | 15 |
| 참고문헌 | 15 |
| 영문요약 | 19 |

그림 차례

| | |
|-------------------------------------|----|
| 그림 1. 척수 손상 후 2시간째의 척수 소견 | 8 |
| 그림 2. 척수 손상 14일째의 척수 소견 | 9 |
| 그림 3. 척수 손상 8시간째의 Bcl-2 염색 소견 | 10 |
| 그림 4. 척수 손상 4시간째의 Bax 염색 소견 | 11 |
| 그림 5. 척수 손상 1일째의 TUNEL 염색 소견 | 12 |

표 차례

| | |
|----------------------------|----|
| 표 1. 척수 손상 매개 변수 | 7 |
| 표 2. Bcl-2 양성 반응 세포수 | 10 |
| 표 3. Bax 양성 반응 세포수 | 11 |
| 표 4. TUNEL 양성 반응 세포수 | 12 |

국문요약

척수 손상 후에 투여한 methylprednisolone에 의한 apoptosis의 변화

척수 손상의 기전인 일차 손상과 이차 손상 중에서 이차 손상의 기전을 이해하여 척수 손상에서의 회복을 최대화하고자 하는 노력이 계속되어 왔다. 이차 손상의 기전은 괴사와 apoptosis가 있다. 척수 손상 후의 신경학적 회복에 효과가 있어 임상적으로 사용되는 유일한 약물이 methylprednisolone이다. 본 연구는 척수 손상 후에 투여한 methylprednisolone이 apoptosis에 중요한 역할을 하는 Bcl-2와 Bax에 어떤 영향을 일으키며, apoptosis에 어떤 작용을 하는지를 살피고자 하였다.

흰쥐의 흉추부 척수에 중등도의 외상을 가하여 척수 손상 모델 쥐를 만든 후에 약물 처치군은 methylprednisolone 30 mg/Kg를 손상 15분 후에 꼬리 정맥으로 주사하였고, 대조군은 생리 식염수만을 주사하였다. 손상 후 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간 및 14일째에 쥐를 희생시켜서 이들의 척수 조직을 채취하였다. 손상 후 생존 세포를 알기 위하여 H-E 염색을 하였고, apoptosis의 조절 및 실행 단계에서 중요한 역할을 하는 Bcl-2 family중에서 Bcl-2와 Bax에 대한 염색을 시행하였다. 또한 apoptosis의 구조적 변화를 확인하기 위하여 TUNEL 염색을 실시하였다. 손상 후 14일째에 행동 검사를 실시하여 임상적으로 신경학적 회복이 되었는지를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 손상 후 척수 조직의 괴사 현상은 시간이 경과함에 따라 진행되는 양상이 관찰되었으며, 아급성기에 조직의 공동화 현상이 관찰되었으며 대조군의 경우는 공동화 부위가 처치군에 비하여 광범위하였다.

2. 손상 후 14일에 측정된 운동 기능 검사상 methylprednisolone 처치군이 대조군에 비하여 통계적으로 의미 있는 신경 기능의 회복이 있었다.

3. Apoptosis의 조절 및 실행 단계에서 주로 apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2는 중등도의 척수 손상 직후 1시간 이내에 발현하여 손상 후 14일까지 계속 관찰되었으며, methylprednisolone 처치군은 손상 후 8시간대에 Bcl-2의 발현이 증가되었다.

4. Apoptosis를 유도하는 것으로 알려진 Bax는 중등도의 척수 손상 직후 1시간 이내에 발현하여 손상 후 14일까지 계속 관찰되었으며, methylprednisolone 처치군은 손상 후 4시간대에 Bax의 발현이 증가되었다.

5. TUNEL 염색으로 확인한 apoptosis의 구조적 변화 단계는 백서에 중등도의 척수 손상을 가한 경우 손상 1시간 이내에 구조적 변화가 나타나기 시작하여 손상 후 14일까지 계속 관찰되었으며, methylprednisolone 처치군은 손상 후 24시간대에 구조적 변화

가 억제되었다.

이상의 결과로 보아 중등도의 척수 손상을 가한 모델 쥐에 투여한 methylprednisolone 은 신경 기능의 회복에 도움이 되며, 이는 투여 후 일정 시간대에 Bcl-2와 Bax의 작용에 관여하여, 일정 시간대에 apoptosis의 구조적 변화를 억제하는 작용을 하는 것으로 사료 된다.

핵심되는 말: 급성 척수 손상, apoptosis, methylprednisolone, Bax, Bcl-2, TUNEL, H-E stain

척수 손상 후에 투여한 methylprednisolone에 의한 apoptosis의 변화

<지도 김 영 수 교수>

연세대학교 대학원 의학과

장 호 열

I. 서 론

외상성 척수 손상을 받게 되면 손상 즉시 마비가 되거나 시간이 경과함에 따라 신경학적 기능이 소실되어 점차적인 신경 손상의 악화를 초래하게 된다. 척수 손상 환자를 치료하는데 이러한 이차적인 신경 손상의 기전을 이해하는 것이 중요하며 치료의 지침이 된다.

척수 손상은 물리적 요소에 의한 일차 손상과, 이에 따르는 조직의 퇴행성 변화에 의한 이차 손상으로 나눌 수 있다.¹⁻⁴ 일차 손상은 손상의 정도에 따라 정해지는 것이고 인간의 척수 손상에서도 사고의 정도와 물리적 힘의 정도에 따라 결정된다.^{5,6} 그러나 이차 손상은 일차적 물리적 손상 후 시간이 경과한 이후에 나타나며, 현재까지 알려진 이차 손상의 기전으로는 조직의 괴사(necrosis)에 중점이 되어 왔다.^{3,4,7-15}

1971년 세포 사멸의 또 다른 과정인 apoptosis가 보고된^{16,17} 이래 이에 대한 활발한 연구가 이루어지고 있다.¹⁸⁻²² 뇌손상과 뇌허혈 시에 apoptosis가 관여한다는 보고가²³⁻²⁷ 있는 후 척수의 이차 손상에도 apoptosis가 관여하는 것이 밝혀졌다.²⁸⁻³²

Apoptosis의 과정은 크게 세가지 과정으로 나뉜다. 즉, 신호전달 단계(signalization phase), 조절 및 실행 단계(control and execution phase), 구조적 변화 단계(structural alteration phase)로 구분된다.³³ 조절 및 실행 단계와 구조적 변화 단계는 거의 대부분의 apoptosis 과정에서 유사한 과정을 거치며 신호 전달 단계는 apoptosis를 야기하는 자극의 종류에 따라 다르다. 조절 및 실행 단계는 protease로 역할을 하는 여러 가지 caspase들이 활성화되는 단계인데 그 활성화는 Bcl-2 family에 의하여 조절된다.

Bcl-2 family는 apoptosis를 조절하는 중요한 단백질 군이다. Bcl-2 family 단백질들은 주로 mitochondria의 외막에 존재하며, mitochondria에서 세포질로의 cytochrome c나 apoptosis inducing factor (AIF)의 이동을 억제함으로써 apoptosis를 조절한다.^{33,34} 이 중에는 apoptosis를 촉진하는 것들(Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik, Hrk)도 있고 반면에 apoptosis를 억제하는

것들(Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1)도 있다.³⁵ 또한 이들은 서로 이합체(dimer)를 형성할 수 있으며 antiapoptotic과 proapoptotic의 비율에 의하여 apoptosis가 조절되는 것으로 알려져 있다.^{33,35}

척수 손상 후의 이차 손상에서 나타나는 현상 중 하나인 세포 괴사를 줄여서 척수 손상 후 신경 기능의 회복을 도모하고자 척수 손상 모델에 여러 가지 약제를 투여한 후에 신경 기능의 회복에 미치는 영향에 대한 많은 연구가 진행되어왔다. 이러한 연구와 함께 인간의 척수 손상에 사용되고 있는 약물은 다양하지만,³⁶ 효과가 입증된 약물은 거의 없는 실정이다. 그러나 methylprednisolone은 실험 동물에서 뿐 아니라 인간에서도 그 효과가 입증된 유일한 약물이다.³⁷

이런 이유로 저자는 실험 약물로 methylprednisolone을 주사하여 이 약제에 의하여 이차 손상의 기전 중 하나인 apoptosis에 이 약제가 미치는 영향을 확인하고 Bcl-2 family중 Bcl-2와 Bax가 어느 시기에 깊이 관여하는지를 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 동물 모델 제작

실험 동물로는 Sprague-Dawley계 흰쥐(체중 300~350 g) 101마리를 사용하였다. 실험 동물에 pentobarbital sodium (Entobar) 50 mg/Kg를 복강내로 주입하여 마취시킨 후 30×20 cm 아크릴판에 올려놓은 후, 흉요추부위의 피부의 털을 수동 면도기로 완전 제거하였다. 척추의 정중선을 따라 피부를 절개하고 제9, 10 흉추의 척추 후궁 절제술(laminectomy)을 실시하였다. 제2 요추부터 제6 흉추까지 척추 돌기를 확인하고, impactor (NYU spinal cord contusion system)를 떨어뜨릴 위치인 제9, 10 흉수 부위를 경막이 완전한 상태로 노출시켰다. 그 후 동물을 impactor에 올려놓고 spinal clamp로 척추 돌기를 고정하였다. Impactor rod를 천천히 내려서 rod가 spinal cord의 표면에 닿은 지점(0점)을 확인하고 25 mm 지점에 직경 2.5 mm, 무게 10 g인 rod를 위치한 뒤, release pin을 잡아당겨서 손상을 준 후 monitor상 (IBM 386 PC)에 나타나는 척수손상 매개 변수들(spinal cord contusion parameter)을 확인하여 높이, 속도, 압축 비율(compression rate, dD/dt)이 모두 일정 범위에 해당한 것만 선택하였다. 그 후 동물의 손상 부위를 봉합하고 항생제(kanamycin, 0.6 cc/Kg)를 근육 주사한 뒤 온도 조절 장치가 부착된 heating pad (homeothermic blanket, Harvard, MA, USA)에 올려 놓아 마취에서 깰 때까지 체온을 36~37°C를 유지하였다. 마취에서 깨어난 이후에는 영상 22 ± 2°C의 조건에서 사육하였고, 신경인성 방광에 의하여 스스로 소변을 볼 수 없는 경우에는 인위적으로 복강을 눌러 소변을 빼주었다.

2. 실험 설계

손상 부위(T9)에서 조직을 시간별(1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간, 14일)로 나누어 채취하여 apoptosis를 관찰하여 apoptosis의 부위, 해당 세포, Bcl-2 family가 증가하거나 감소하는 조절 및 실행 단계와 구조적 변화 단계가 나타나는 시간을 관찰하였다. 실험은 각 시간군별로 8마리 이상의 백서를 이용하였다.

손상 15분 후에 methylprednisolone 30 mg/Kg을 꼬리정맥(tail vein)을 통하여 1회 주사하고 실험을 반복하여 apoptosis에 대한 효과를 관찰하였다. 대조군은 saline만을 주사한 백서를 이용하였다.

3. 행동 검사

척수 손상 후 14일째에 행동 검사를 하여 신경 기능의 회복을 평가하였다. 행동 검사는 BBB (Basso, Beattie, and Bresnahan) 운동 평가 척도를³⁸ 사용하여 동물 뒷발의 기능 회복을 조사하였으며 두 사람이 각각 평가한 점수의 평균을 구하였다. 이 척도는 세단계로 나누어져 있는데, 그것은 초기 회복 단계, 중간 회복 단계, 마지막 회복 단계의 총 21점으로 구성되어 있다. 초기 회복 단계는 다리에서 발까지의 관절의 움직임을 점수화하고 있으며, 중간 회복 단계는 걸음걸이(step)의 회복 여부를, 마지막 단계는 사지 걸음걸이의 전체적인 조화와 꼬리의 회복 상태를 점수화하는 것이다.

4. 병리학적 검사

가. Hematoxylin과 eosin 염색

척수 손상 후 시간의 경과에 따른 조직의 변화가² 나타나는 것을 확인하고, methylprednisolone이 척수 조직의 생존에 기여하였나를 확인하기 위하여 실시하였으며 계측은 하지 않았다.

나. Bcl-2와 Bax 염색

파라핀 포매된 쥐의 척수 손상 조직에, Bcl-2 family 중에서 apoptosis를 촉진하는 것으로 알려진 Bax의 항체(Polyclonal rabbit anti-mouse/rat Bax antibody, PharMingen Co., San Diego, CA, USA)와 apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2의 항체(Polyclonal rabbit anti-rat/mouse Bcl-2 antibody, Pharmingen Co., San Diego, CA, USA)를 이용하여 immunostain을 시행하고, biotin이 결합된 제2 항체와 반응시킨 후에 발색시켰다.

즉, 파라핀에 포매되어 있는 손상 받은 척수를 3 μ m의 두께로 자른 다음 조직 슬라이드에 mount하여 실온에서 건조시킨 후, xylene처리를 하여 탈파라핀 과정을 거치고 여러 단계의 알코올로 처리하여 수화과정을 거친 뒤 3% hydrogen peroxide에 조직을 담구어 5분간 incubation한 후 phosphate-buffered saline (PBS, pH7.4)에 담귀 씻어내었다. Primary antibody (anti-Bcl-2 Ab, anti-Bax Ab)를 조직에 도포하고 실온에서 30분, 4°C에서 overnight로 incu-

bation한 후 PBS로 세척하였다.

PBS로 씻은 후 kit (DAKO LSAB[®] kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)의 biotinylated anti-rabbit/anti-mouse immunoglobulins를 도포하여 10분간 incubation하였다. PBS로 세척한 후 streptavidin peroxidase를 도포한 후 10분간 incubation하였다. PBS로 씻어낸 후 DAB (3,3'-diaminobenzidine, DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA) 용액을 도포하여 발색시켰다.

손상 조직 내에서 Bcl-2나 Bax에 대한 염색이 가장 많이 일어난 부위에서 200배 현미경 하에서 염색된 세포의 수를 측정하였다.

다. TUNEL 염색

파라핀에 포맷되어 있는 손상 받은 척수를 3 μ m의 두께로 자른 다음 조직 슬라이드에 mount하여 실온에서 건조시킨 후, xylene처리를 하여 탈파라핀 과정을 거쳤다. Proteinase K (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA)를 조직 위에 떨어뜨리고 실온에서 반응시켜 proteolytic digestion을 통해 고정 중에 mask된 target site를 노출시킨다. 조직 슬라이드를 3% hydrogen peroxide in PBS에 실온에서 5분간 담귀 endogenous peroxidase의 작용을 막은 후 PBS로 세척하였다. 이후 과정은 ApopTag[®] kit (S7100-kit, Oncor, San Diego, CA, USA)를 사용하여 염색하였다. 즉, equilibration buffer를 조직이 덜일 정도로 슬라이드에 떨어뜨려 실온에서 반응시킨 다음 가볍게 털어내고 reaction buffer와 TdT enzyme을 7:3으로 혼합하여 제조한 working strength TdT enzyme을 가한 후 37°C humidified chamber에서 1시간 동안 배양하였다. 1시간 배양한 조직 슬라이드를 stop/wash buffer에 담근 후 약간 흔들어 주며 실온에서 10분간 배양하였다. 그 후 PBS로 세척하고 anti-digoxigenin peroxidase conjugate를 슬라이드에 도포한 뒤 실온의 humidified chamber에서 30분간 incubate하였다. PBS로 씻어낸 후 DAB 용액으로 실온에서 발색시켰다.

손상 조직 내에서 TUNEL에 대한 염색이 가장 많이 일어난 부위를 중심으로 하여 200배의 현미경하에서 염색된 세포의 수를 측정하였다.

5. 통계 처리

척수 손상 매개변수는 impactor 기계의 특성으로 인하여 평균±표준 편차로 기록하였으며, 그 외의 계측치는 평균±표준 오차로 기록하였다. 약물 처치군과 비처리군간의 apoptosis가 진행되는 세포수의 평균치를 검증하기 위하여 independent sample t-test를 사용하였으며, 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

III. 결 과

1. 척수 손상 매개 변수

본 연구에서는 무게 10 g, 직경 2.5 mm의 rod를 높이 25 mm에서 떨어뜨려서 척수 손상을

유발하였다. 이 경우 척수에 가해지는 힘은 일반적으로 중등도의 척수 손상에 해당한다.

가. 척수 손상의 평균 높이

컴퓨터에서 실제로 측정된 높이의 평균값은 대조군은 22.133 ± 2.292 mm이었고, 약물 처치군은 21.928 ± 2.748 mm이었다. 전체의 평균은 22.031 ± 2.520 mm이었다. 시간별 집단간 및 대조군과 약물 처치군의 집단간에는 유의한 통계적 차이는 없었다.

나. Rod의 평균 낙하 속도

자동 전산화 처리된 rod의 평균낙하 속도의 평균값은 대조군이 0.542 ± 0.021 mm/sec이었고, 약물 처치군은 0.544 ± 0.023 mm/sec이었다. 전체의 평균은 0.543 ± 0.022 mm/sec이었다. 시간별 각 집단간 및 대조군과 약물처치군의 집단간에 유의한 통계적 차이는 없었다.

다. 압축 비율

척수 손상을 주는 순간에도 실험 쥐의 호흡에 의하여 척수의 상하 운동이 있기 때문에 실제로 척수에 정확한 손상이 주어진 정도를 구하기 위하여 척수가 최대로 압축을 받은 깊이 및 척수가 최대로 압축이 나타날 때까지의 시간의 비율인 압축 비율을 산정하였다.

표 1. 척수 손상 매개 변수

| 시간 | 높이(mm) | 속도(m/sec) | 압축비율(dD/dT)* |
|------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Control군 | | | |
| 1시간(n=8) | 20.766 ± 3.693 | 0.539 ± 0.043 | 41.400 ± 4.502 |
| 2시간(n=8) | 21.384 ± 2.409 | 0.541 ± 0.015 | 44.199 ± 4.502 |
| 4시간(n=8) | 21.512 ± 2.046 | 0.536 ± 0.009 | 42.635 ± 2.727 |
| 8시간(n=8) | 21.233 ± 2.043 | 0.536 ± 0.016 | 42.096 ± 3.269 |
| 1일(n=8) | 22.655 ± 2.942 | 0.535 ± 0.016 | 42.000 ± 6.307 |
| 14일(n=8) | 25.247 ± 0.618 | 0.564 ± 0.028 | 42.700 ± 5.229 |
| 전체(n=48) | 22.133 ± 2.292 | 0.542 ± 0.021 | 42.505 ± 4.427 |
| MP군 ¹ | | | |
| 1시간(n=10) | 22.088 ± 3.002 | 0.545 ± 0.027 | 45.325 ± 5.902 |
| 2시간(n=8) | 22.312 ± 2.953 | 0.564 ± 0.016 | 41.627 ± 3.542 |
| 4시간(n=9) | 23.525 ± 3.061 | 0.532 ± 0.021 | 43.004 ± 6.503 |
| 8시간(n=8) | 21.960 ± 2.824 | 0.539 ± 0.026 | 41.735 ± 7.068 |
| 1일(n=8) | 21.514 ± 2.215 | 0.547 ± 0.006 | 44.694 ± 3.141 |
| 14일(n=10) | 20.171 ± 2.435 | 0.535 ± 0.041 | 45.556 ± 2.464 |
| 전체(n=53) | 21.928 ± 2.748 | 0.544 ± 0.023 | 43.657 ± 4.770 |
| 대전체(n=101) | 22.031 ± 2.520 | 0.543 ± 0.022 | 43.081 ± 4.596 |

평균±표준 편차, ()안의 숫자는 실험 동물의 수를 나타낸 것임.

*압축비율은 척수의 최대 압축 깊이와 압축 시간의 비율을 나타낸 것임.

¹손상 15분 후에 methylprednisolone 30 mg/kg를 투여한 군

압축비율의 평균값은 대조군은 42.505 ± 4.427 mm이었고, 약물 처치군은 43.657 ± 4.770 mm이었다. 전체의 평균은 43.081 ± 4.596 mm이었다. 시간별 집단간 및 대조군과 약물 처치군의 집단간에는 유의한 통계적 차이는 없었다.

이상의 매개 변수들의 통계적인 수치는 각 집단간에 균등한 척수 손상이 가해졌음을 의미한다(표 1).

2. 손상 14일째의 BBB 점수

대조군에서는 좌측 하지의 점수가 8.6 ± 1.9 , 우측 하지가 9.4 ± 1.6 이었고, 약물 처치군에서는 좌측 하지가 13.4 ± 2.1 , 우측 하지가 13.4 ± 1.8 이었다. 대조군과 약물 투여군에서 행동 검사상 통계적으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$).

3. 병리학적 결과

가. Hematoxylin과 eosin 염색

(1) 초급성기 변화: 1, 2, 4, 8, 24시간

손상 후 1시간에는 methylprednisolone 처치군과 대조군 모두 정중 시상선을 중심으로 주로 배부의 백질에 점상 출혈이 관찰되었다.

손상 후 2시간에는 methylprednisolone 처치군은 1시간과 비슷한 정도의 점상 출혈이 배부의 백질 정중 시상선을 중심으로 분포하여 있었고, 염증 세포가 나타나기 시작하며, 배부의 백질부에 작은 여러 개의 빈 공간(vacuolization)이 나타나기 시작하였다. 대조군의 경우도 비슷하였으며, 다발성의 빈 공간의 분포가 약물 처치군보다 넓었다(그림 1).

손상 후 4시간에는 methylprednisolone 처치군은 중심관(central canal)과 배부 피질의 중간을 중심으로 동심원의 괴사 부분이 관찰되며, 괴사부분의 배부 경계와 배부 피질 사이에

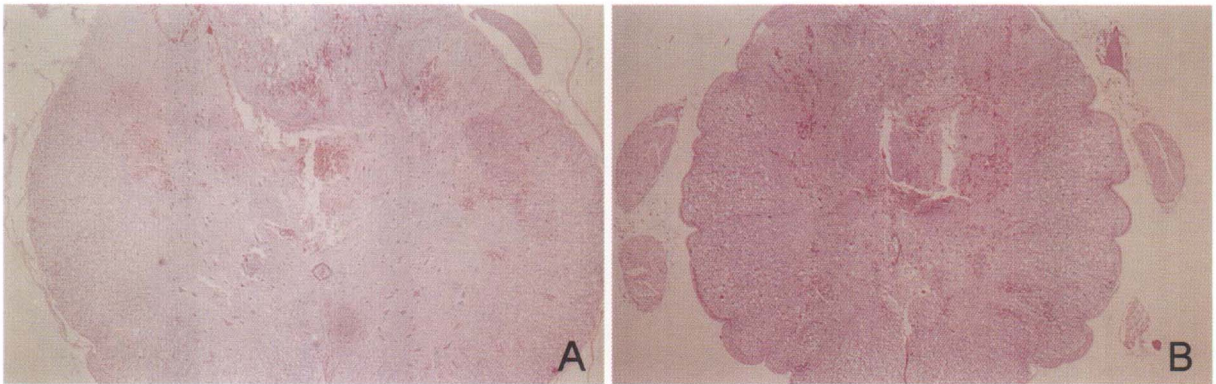


그림 1. 척수 손상 후 2시간째의 척수 소견(H&E, $\times 40$). A. MP처치군의 척수 단면. 점상 출혈이 배부의 백질 정중 시상선을 중심으로 분포하였고, 배부의 백질부에 여러 개의 vacuolization이 나타나기 시작하였다. B. 대조군의 척수 단면. 다발성의 빈 공간의 분포가 약물 처치군보다 넓었다.

다량의 빈 공간이 더 많이 형성되었다. 대조군은 동심원의 피사 부분이 더 커서 배부 피질 근처까지 확대되어 있었으며, 동심원 부위 모든 방향에서 작은 빈 공간이 다발성으로 형성되었다.

손상 후 8시간에는 methylprednisolone 처치군은 피사된 큰 동심원 주위의 배부 회백질은 구조를 대부분 유지하고 있었으며, 복부와 측부의 백질을 중심으로 다발성의 작은 빈 공간이 형성되었다. 대조군은 큰 동심원 주변의 배부 회백질의 일부가 유지되어 있었고 그 외의 회백질과 백질 전체에 다발성의 작은 빈 공간이 발견되었다.

손상 후 24시간에는 methylprednisolone 처치군은 경계가 뚜렷한 큰 하나의 동심원이 관찰되었고 측부와 복부 백질에서 작은 빈 공간이 더 커졌다. 대조군은 큰 동심원의 경계가 불분명하여 전체 척수 조직에 작은 빈 공간들과 연결되는 양상을 보였다.

(2) 아급성기 변화: 14일

Methylprednisolone 처치군은 큰 동심원의 피사 부분 주위의 회백질의 구조는 대부분 유지되었고 측부와 복부의 백질 부분에 다발성의 빈 공간이 선명하게 드러났다.

대조군은 백질과 회백질을 구분할 수 없을 정도의 다발성의 빈 공간이 서로 연결되어 형성되어 있었으며, 이 안에는 gliosis가 관찰되었고, 척수의 전체 면적이 methylprednisolone 처치군에 비하여 작아져 있었다(그림 2).

나. Bcl-2의 염색

피사된 조직의 주변부에서 가장 많이 나타났다. 200배 배율에서 가장 많이 분포된 곳을 측정하였다.

Methylprednisolone 처치군은 손상 1시간 후부터 나타나기(평균 3.9개) 시작하여, 손상 2시간 후에 평균 5.9개로 가장 많이 나타났으며, 두번째로 손상 8시간 후에 평균 4.2개가 나타났으며 손상 1일 후에는 염색 반응이 있는 세포의 수가 평균 1.1개로 줄었다가 손상 14일

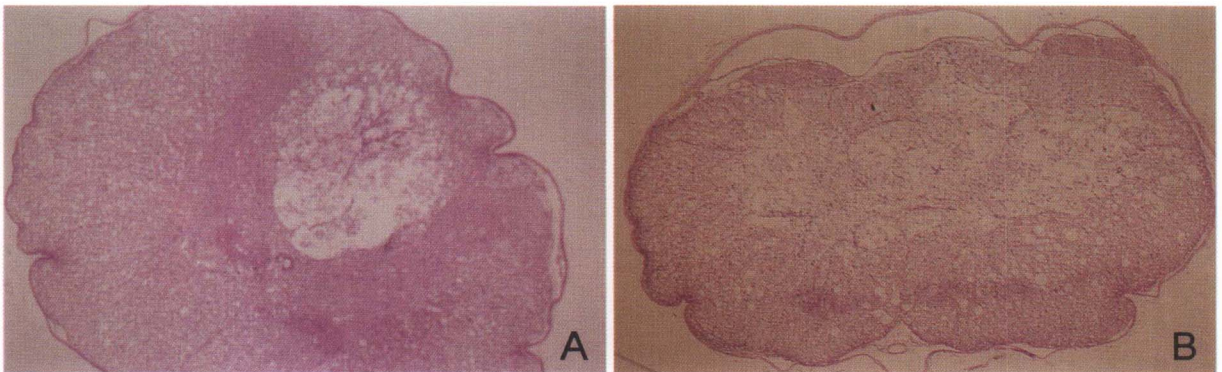


그림 2. 척수 손상 14일째의 척수 소견(H&E, ×40). A. MP 처치군의 척수 단면. 큰 동심원의 피사 주위의 회백질의 구조는 대부분 유지되었고 측부와 복부의 백질 부분에 다발성의 빈 공간이 나타났다. B. 대조군의 척수 단면. 백질과 회백질의 구분이 안되는 다발성의 빈 공간이 서로 연결되어 형성되었고, 척수의 전체 면적이 MP 처치군에 비하여 작아져 있었다.

째에는 평균 2.5개가 양성 반응을 보여 지속적인 Bcl-2 단백질의 활성화가 일어나고 있었다.

대조군은 손상 1시간 후에 평균 3.8개의 양성 반응을 보이기 시작하여, 손상 2시간 후에 가장 많은 양성(평균 7.0개) 반응을 보였으며, 이후 계속 줄어들어 손상 1일에는 평균 0.1개였으며, 손상 14일에 역시 1.1개의 양성 반응을 보여 지속적인 Bcl-2 단백질의 활성화가 일어나고 있었다.

각 시간대별로 약물 처치군과 대조군간의 independent sample t-test를 한 결과, 손상 후 8시간대에서 $p=0.028$ 로, 약물 처치군에서 Bcl-2 (+) 세포가 의미 있게 많았다(표 2, 그림 3).

다. Bax의 염색

괴사된 조직의 주변부에서 가장 많이 나타났다. 200배 배율에서 가장 많이 분포된 곳을 측정하였다.

Methylprednisolone 처치군은 손상 1시간 후에 평균 2.1개로 나타나기 시작하여, 손상 4시

표 2. Bcl-2 양성 반응 세포수

| | 1시간 | 2시간 | 4시간 | 8시간 | 1일 | 14일 |
|------------------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|
| 대조군 | 3.8±1.1 | 7.0±3.5 | 4.3±1.1 | 1.3±0.4 | 0.1±0.1 | 1.1±0.6 |
| (N) | (10) | (6) | (8) | (8) | (8) | (10) |
| MP군 ¹ | 3.9±1.4 | 5.9±1.1 | 2.8±0.8 | 4.2±1.2* | 1.1±0.7 | 2.5±1.9 |
| (N) | (7) | (8) | (8) | (6) | (7) | (8) |

평균±표준 오차, ()안의 숫자는 실험 동물 수를 나타낸 것임.

*대조군에 비하여 $p<0.05$

¹손상 15분 후에 methylprednisolone 30 mg/kg를 투여한 군

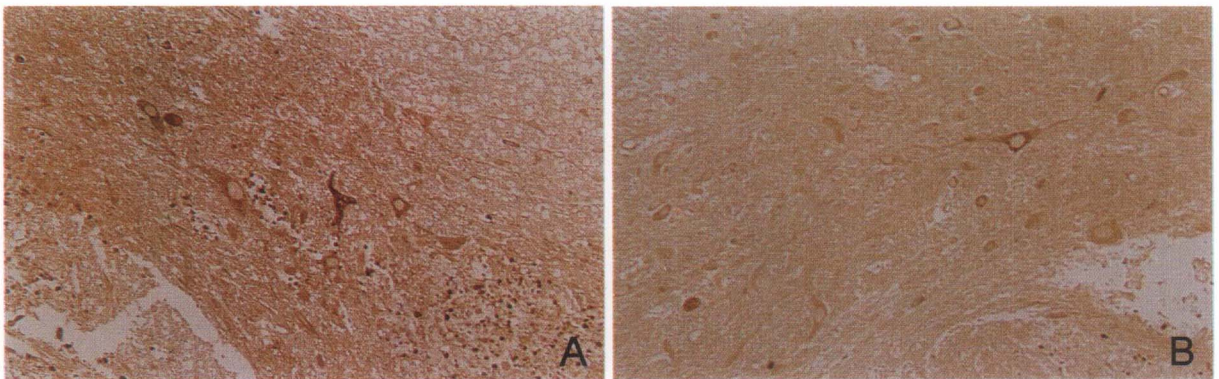


그림 3. 척수 손상 8시간째의 Bcl-2 염색 소견(×200). A. MP 처치군의 염색. 평균 4.2개의 Bcl-2 (+) cell이 나타났다. B. 대조군의 염색. 평균 1.3개의 Bcl-2 (+) cell이 나타났다. 손상 후 8시간에 methylprednisolone 처치군이 대조군에 비하여 의미 있는 차이가 있었다($p=0.028$).

간 후에 평균 5.6개로 가장 많이 나타났으며, 손상 1일 후에는 염색 반응이 있는 세포의 수가 평균 1.3개로 줄었으며, 손상 14일째에도 평균 0.5개가 양성 반응을 보여 지속적인 Bax 단백질의 활성화가 나타나고 있었다.

대조군은 손상 1시간 후에 평균 2.6개의 양성 반응을 나타내어 가장 많은 양성 반응을 보였으며, 손상 14일에도 1.1개의 양성 반응을 나타내어 지속적인 Bax 단백질의 활성화가 나타나고 있었다.

각 시간대별로 약물 처치군과 대조군간의 independent sample t-test를 한 결과, 손상 후 4시간대에서 $p=0.004$ 로, 약물 처치군에서 Bax (+) 세포가 의미 있게 많았다(표 3, 그림 4).

라. Apoptosis 확인을 위한 염색(TUNEL 염색)

괴사된 조직의 주변부에서 가장 많이 나타났다. 200배 배율에서 가장 많이 분포된 곳을 측정하였다.

Methylprednisolone 처치군은 손상 1시간 후부터 나타나기(평균 11.0개) 시작하여, 손상 8

표 3. Bax 양성 반응 세포수

| | 1시간 | 2시간 | 4시간 | 8시간 | 1일 | 14일 |
|------------------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|
| 대조군 | 2.6±0.9 | 1.7±1.1 | 0.8±0.3 | 1.1±0.7 | 1.4±0.8 | 1.1±0.7 |
| (N) | (10) | (6) | (8) | (7) | (8) | (10) |
| MP군 ¹ | 2.1±1.2 | 3.3±1.3 | 5.6±1.4* | 2.0±0.9 | 1.3±1.0 | 0.5±0.3 |
| (N) | (7) | (9) | (8) | (7) | (8) | (10) |

평균±표준 오차, ()안의 숫자는 실험 동물 수를 나타낸 것임.

*대조군에 비하여 $p<0.05$

¹손상 15분 후에 methylprednisolone 30 mg/kg를 투여한 군

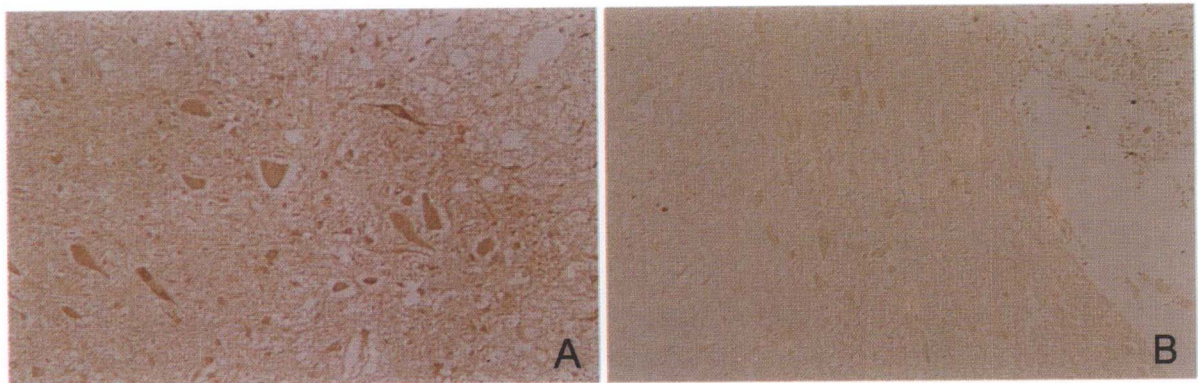


그림 4. 척수 손상 4시간째의 Bax 염색 소견(×200). A. MP 처치군의 염색. 평균 5.6개의 Bax (+) cell이 나타났다. B. 대조군의 염색. 평균 0.8개의 Bax (+) cell이 나타났다. 손상 후 4시간에 methylprednisolone 처치군과 대조군의 의미 있는 차이가 있었다($p=0.004$).

표 4. TUNEL 양성 반응 세포수

| | 1시간 | 2시간 | 4시간 | 8시간 | 1일 | 14일 |
|-----|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|
| 대조군 | 10.8±0.6 | 31.5±7.0 | 34.8±8.3 | 33.8±9.5 | 59.2±8.3* | 4.9±2.0 |
| (N) | (4) | (4) | (4) | (5) | (8) | (9) |
| MP군 | 11.0±2.0 | 28.0±7.0 | 25.7±7.4 | 37.4±5.8 | 14.0±3.4 | 12.3±5.1 |
| (N) | (7) | (6) | (6) | (6) | (6) | (6) |

평균±표준 오차, ()안의 숫자는 실험 동물 수를 나타낸 것임.

*대조군에 비하여 $p < 0.05$

¹손상 15분 후에 methylprednisolone 30 mg/kg를 투여한 군

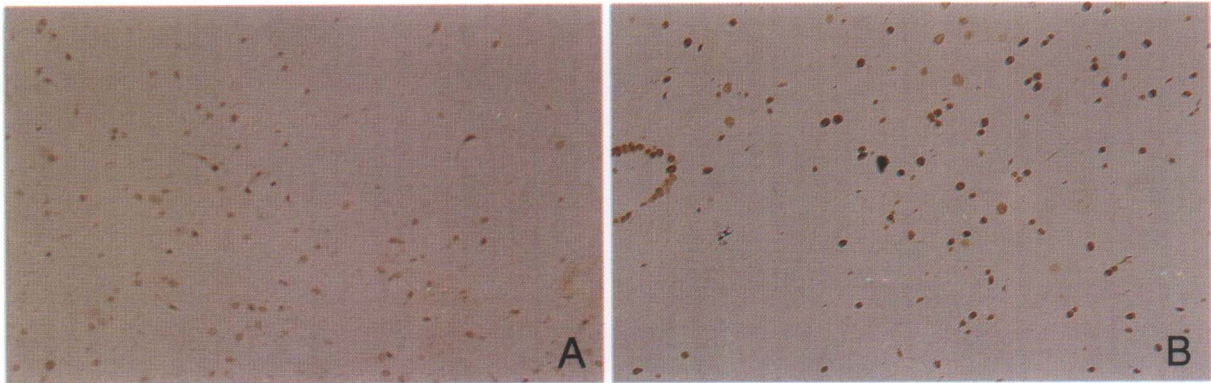


그림 5. 척수 손상 1일째의 TUNEL 염색 소견(×200). A. MP 처치군의 염색. 평균 14.0개의 TUNEL (+) cell이 나타났다. B. 대조군의 염색. 평균 59.2개의 TUNEL (+) cell이 나타났다. 손상 후 1일에 MP 처치군과 대조군의 의미 있는 차이가 있었다($p=0.003$).

시간 후에 평균 37.4개로 가장 많이 나타났으며, 손상 1일 후에는 염색 반응이 있는 세포의 수가 평균 14개로 줄었으며, 손상 14일째에는 평균 12.3개가 양성 반응을 보여 지속적인 apoptosis를 나타냈다.

대조군은 손상 1시간 후에 평균 10.8개의 양성 반응을 보이기 시작하여, 손상 1일 후에 가장 많은 양성(평균 59.2개) 반응을 보였으며, 손상 14일에도 평균 4.9개의 양성 반응을 보여 지속적인 apoptosis를 나타냈다.

각 시간대별로 약물 처치군과 대조군간의 independent sample t-test를 한 결과, 손상 후 24시간에 $p=0.003$ 으로, 약물 처치군에서 TUNEL (+) 세포가 의미 있게 많았다(표 4, 그림 5).

IV. 고 찰

척수 손상 쥐에 methylprednisolone을 처치한 군과 대조군을 비교한 결과 척수 손상 후 24시간째에 약물 처치군의 apoptosis가 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 감소를 나타냈으

며, 손상 14일째 약물 처치군의 운동 기능이 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 회복되었고, 손상 부위 척수 조직에서도 보존된 신경 세포가 많았다.

Methylprednisolone은 glucocorticoid로 척수 손상 후의 신경학적 회복에 효과가 입증된 유일한 약물이다.³⁷ 현재까지 알려진 대표적인 약리 작용은³⁹ lipid peroxidation의 억제, arachidonic acid의 유리와 eicosanoid formation을 유발하는 lipid hydrolysis의 억제, 조직내 혈류의 유지, 혐기성 대사의 유지, 세포 내의 Ca^{++} 축적의 억제, neurofilament degradation의 감소, neuronal excitability와 synaptic transmission의 증가 등이다. Glucocorticoid는 nuclear receptor에 binding하거나 gene expression을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁴⁰ Methylprednisolone으로 전 처치한 모델 쥐에서 ischemia를 유발하였을 경우 대조군에 비하여 apoptosis가 적게 나타나는 것이 확인되었다.⁴¹ Methylprednisolone은 척수 허혈 후의 gene expression에 영향을 주어 apoptosis를 감소시킨 것으로 사료된다. 척수의 손상 후에도 이 약제가 gene expression에 영향을 주었을 것이다. 이 약제가 척수 손상 후의 세포 괴사와 계획된 apoptosis에 함께 작용하여 상기의 결과가 나온 것으로 사료된다. 또한 high dose로 methylprednisolone을 투여한 경우는 steroid hormone receptor와는 관계하지 않는 것으로 추측되고 있으며,³⁹ 이들의 대표적인 작용은 lipid peroxidation의 억제로 알려져 있다.⁴² Oxygen-derived free radical이 척수 손상의 병인으로 인식되고 있다.⁴² Oxidative stress는 apoptosis를 일으키는 원인 중의 하나이다.⁴³ 본 실험에서도 high dose methylprednisolone의 antioxidant effect가 척수 손상 후의 apoptosis를 줄여서 신경의 회복에 도움이 된 것으로 사료된다.

Bcl-2와 Bax는 같은 Bcl-2 family이지만 그 역할이 서로 반대인 것으로 알려져 있으며,³⁵ 이들이 작용하는 방법에 대하여 여러 견해가 있다. 이들의 비율에 의하여 apoptosis가 결정된다는 것이 기존의 설명이었다.^{33,35} Familial amyotrophic lateral sclerosis를 발생시킨 transgenic mouse로 연구한 결과, 모델쥐의 척수에서 Bax : Bcl-2 이합체가 나타나며, 말기 쥐의 경우는 Bcl-2의 수치가 적었고, Bax의 수치가 높아졌으며, 반대로 asymptomatic 쥐의 경우는 Bcl-2가 많았으며, 따라서 이합체의 구성에서 Bax의 수치가 높을수록 apoptosis를 일으킨다 하였다.⁴⁴ In vitro에서는 이러한 결과가 잘 나타나나, in vivo 실험에서는 이러한 결과가 나타나지 않은 경우가 있다. Laryngeal squamous cell cancer 환자 134명에서 절제한 종양 표본을 관찰한 결과 Bcl-2 : Bax의 비율이나, Bcl-2나 Bax protein의 양과 종양 내에서의 spontaneous apoptosis와는 상관 관계가 없었다고 보고하고 있다.⁴⁵ 본 실험에서도 Bax : Bcl-2의 비율과 약물 처치군 : 대조군의 apoptosis의 비율에는 상관 관계가 없었다.

Bcl-2와 Bax는 서로 연관되어 apoptosis를 조절하는 것으로 알려져 있으나, Knudson과 Korsmeyer는 Bcl-2 deficient mouse와 Bax deficient mouse를 이용하여 실험한 결과, Bax나 Bcl-2가 각각 독립적으로 apoptosis에 관여할 수 있다는 것을 밝혔다.⁴⁶ 본 실험에서 약물 처치군이 대조군에 비하여 손상 후 4시간에 Bax가 증가하였으나, 다음 검사 시간인 손상 후 8시간에 Bcl-2가 증가한 것은 apoptosis를 억제하기 위한 mechanism이 작용된 것으로 사료

된다. 또한 이는 Bax와 Bcl-2가 각각 독립적으로 작용한 것임을 나타내는 것으로 사료된다. Finucane 등의 최근의 연구를 보면, 세포 배양한 인간의 배아 신장 세포(293T)에 Bax를 transfection하여 배양하면, Bax가 유도한 caspase의 활성화와 mitochondria로부터 cytochrome c를 유리하여 apoptosis가 일어나지만 이는 Bcl-2나 Bcl-xL에 의하여 apoptosis가 다시 억제 되는 것으로 나타났다.⁴⁷ 본 실험에서도 약물 처치군에서, 일시적인 Bax의 증가가 있었으나 이어서 나타난 Bcl-2의 의미 있는 증가가 apoptosis를 궁극적으로 억제하여 약물 처치군에서 손상 후 24시간에 TUNEL (+) 세포의 수가 의미 있게 적어지면서 손상 14일째의 생존 세포가 많았고, 행동 검사상 유의한 회복을 보인 것으로 사료된다.

척수 손상을 가한 쥐와 원숭이에서 손상 후 3주일까지 관찰하여 지연성의 apoptosis가 나타난다고 하였으나,³² 이는 손상 주변의 부위까지 관찰한 것이며, 손상 부위에서는 손상 후 1일 이내에 대다수의 apoptosis가 유도되었다. 본 연구는 척수 손상 후에 나타나는 apoptosis의 형태학적 변화가 나타나기 이전인 조절 및 실행 단계에서 Bcl-2와 Bax가 약물 처치군과 대조군에서 어떻게 작용하나를 보고자 함이었으며, 손상 부위로 국한한 실험을 계획하였다. 따라서 모델쥐의 척수 손상 후에 구조적 변화가 가장 많이 나타나는 시간인,⁴⁸ 손상 후 4시간에서 1일 사이와 그 이전 시간만을 면밀히 관찰하였고, 약물 투여의 효과를 판정하기 위하여 척수 손상 후 14일째의 행동 검사와 척수 조직 검사를 시행하였다. 본 실험의 결과에서도 이 시간대가 유효하여 손상 후 8시간 이내에 Bax와 Bcl-2 (+) 세포가 가장 많았으며, 손상 후 8시간과 24시간에 구조적 변화가 가장 많이 나타났다.

조절 및 실행 단계에 대한 연구 중에서 Fas로 전처치하여 apoptosis를 유도한 경우 4시간째에 전체 Bax의 35~40%가 세포질에서 mitochondria로 translocation되어 차후에 구조적 변화가 나타나는 것이 확인되었다.⁴⁹ 또 다른 연구에서는 Fas로 전처치한 human breast epithelial cell line에서 6시간에 Bax의 90%가 mitochondria로 전이하는 구조적 변화를 나타내고, 이어서 apoptosis가 발생하는 것으로 보고하였다.⁵⁰ 본 연구에서도 methylprednisolone 처치군에서는 손상 후 4시간대에 의미 있게 Bax (+) cell이 증가한 것으로 보아 methylprednisolone이 척수 손상 후 apoptosis에 대한 약리 작용은 Fas의 자극도 하나의 역할을 하는 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과로 보아, high dose methylprednisolone은 중등도의 척수 손상 쥐에서, 손상 부위에서 Bax의 expression이 일시적으로 증가하고, 뒤이어 Bcl-2의 증가가 나타나면서, apoptosis의 구조적 변화가 일어나는 것을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다. 본 실험에서 나타난 methylprednisolone 투여군에서 일시적인 Bax의 활성화와 이어서 나타난 Bcl-2의 증가가 이 약제의 어떤 작용에 의한 것인지는 밝히지 못하였다. 이 원인의 규명을 위하여, 본 약제의 투여로 인하여 척수 손상 쥐에서 Fas와 각종 caspase의 변화에 대한 연구가 향후 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

백서의 척수에 중등도의 손상을 가한 후에 손상 15분 후에 methylprednisolone 30 mg/Kg 를 정맥 주사한 약물 처치군과 saline만을 정맥 주사한 대조군의 척수 손상 부위를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 손상 후 척수 조직의 괴사 현상은 시간이 경과함에 따라 진행되는 양상이 관찰되었으며, 아급성기인 손상 후 14일에 나타난 조직의 공동화 부위는 대조군이 methylprednisolone 처치군에 비하여 광범위하였다.

2. 손상 후 14일에 측정된 운동 기능 검사상 methylprednisolone 처치군이 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 신경 기능의 회복이 있었다.

3. Apoptosis의 조절 및 실행 단계에서 주로 apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2는 중등도의 척수 손상 직후 1시간 이내에 발현하여 손상 후 14일까지 계속 관찰되었으며, methylprednisolone 처치군은 손상 후 8시간대에 Bcl-2의 발현이 증가되었다.

4. Apoptosis를 유도하는 것으로 알려진 Bax는 중등도의 척수 손상 직후 1시간 이내에 발현하여 손상 후 14일까지 계속 관찰되었으며, methylprednisolone 처치군은 손상 후 4시간대에 Bax의 발현이 증가되었다.

5. TUNEL 염색으로 확인한 apoptosis의 구조적 변화 단계는, 백서에서 중등도의 척수 손상을 가한 경우 손상 1시간 이내에 구조적 변화가 나타나기 시작하여 손상 후 14일까지 계속 관찰되었으며, methylprednisolone은 손상 후 24시간대에서 구조적 변화를 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 중등도의 척수 손상을 가한 모델 쥐에 투여한 methylprednisolone이 신경 기능의 회복에 도움이 되며, 이는 특정 시간에 Bcl-2와 Bax의 작용에 관여하여 apoptosis를 특정 시간에 억제하는 작용을 하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation. JAMA 1911;50:941-52.
2. Allen AR. Remarks on histopathological changes in spinal cord due to impact: an experimental study. J Ner Ment Dis 1914;41:141-7.
3. Braugher JM, Duncan LA, Case RL. Interaction of lipid peroxidation and calcium in the pathogenesis of neuronal injury. CNS Trauma 1985;2:269-83.
4. Young W. Role of calcium in central nervous system injury. J Neurotrauma 1992;9 suppl 1:9-25.

5. Young W. Secondary injury mechanism in acute spinal cord injury. *J Emerg Med* 1993; 11:13-22.
6. Young W. Experimental spinal cord injury therapies. Processings of fourth international neuro-trauma symposium;1997 Sep 12-15; Seoul, Korea.
7. Balentine JD. Calcium toxicity as a factor in spinal cord injury. *Surg Synth Pathol Res* 1983; 2:184-93.
8. Braughler IM, Hall ED. Central nervous system trauma and stroke: Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med* 1989;6:289-313.
9. Faden AI. Opioid and nonopioid mechanisms may contribute to dynorphin's pathophysiological actions in spinal cord injury. *Ann Neurol* 1990;27:67-74.
10. Faden AI, Ellison JA, Noble LJ. Effects of competitive and non-competitive NMDA receptor antagonist in spinal cord injury. *Eur J Pharmacol* 1990;175:165-74.
11. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991;75:15-26.
12. 주진양, 김영수. 급성 척수 손상 고양이에서 21-aminosteroid U74389F 투여가 척수 혈류 및 체성지각 유발전위에 미치는 영향. *대한신경외과학회지* 1992;21:1147-59.
13. 조용은, 김영수. 급성 척수 손상 고양이에서 Nimodipine 투여가 척수 혈류 및 신경 기능 회복에 미치는 영향. *대한신경외과학회지* 1993;22:109-22.
14. Li Y, Chopp M, Jing N, Zhang ZG, Zaloga C. Induction of DNA Fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1995;26:1252-8.
15. 윤도흠, 김영수, Young W. Pre-injury treatment of methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *대한신경외과학회지* 1996;25:1568-77.
16. Kerr JFR. Shrinkage necrosis: a distant mode of cellular death. *J Pathol* 1971;105:13-20.
17. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wider ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;24:239-57.
18. Gavrieli Y, Stermal Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
19. Bowen ID. Apoptosis or programmed cell death? *Cell Biol Int* 1993;17:365-80.
20. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-26.
21. Stewart BW. Mechanism of apoptosis: Integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1286-94.
22. Dickson DW. Apoptosis in the brain physiology and pathology. *Am J Pathol* 1995;146:1040-4.
23. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1992;239:857-66.
24. Macmanus JP, Hill IE, Preston E, Rasquinha I, Walker T, Buchan AM. Differences in DNA fragmentation following transient cerebral or decapitation ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:728-37.

25. Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliastros VE. Evidence of apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 1995;15:3775-87.
26. Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol* 1995; 147:1575-83.
27. Stefanis L, Burke RE. Transneuronal degeneration in substantia nigra pars reticulata following striatal excitotoxic injury in adult rat: time-course, distribution, and morphology of cell death. *Neuroscience* 1996;74:997-1008.
28. Katoh K, Ikata T, Katoh S, Hamada Y, Nakauchi K, Sano T, et al. Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neurosci Lett* 1996;216:9-12.
29. Li GL, Brodin G, Farooque M, Funa K, Holtz A, Wang WL, et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. *J Neuroanthol Exp Neurol* 1996;55:280-9.
30. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 1997;17:5395-406.
31. Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res* 1997;50:798-808.
32. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature Med* 1997;3:73-76.
33. Kroemer G, Zmazani N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 18:44-51.
34. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-32.
35. Reed JC. Mini-Review: Cellular mechanisms of disease series. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
36. Kato H, Kanellopoulos G, Matsuo S, Wu YJ, Jacquin MF, Hsu CY, et al. Protection of rat spinal cord from ischemia with dextrophan and cyclohexamide: effects on necrosis and apoptosis. I. *Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:609-18.
37. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, et al. A randomized controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury: Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990;322: 1405-11.
38. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995;12:1-21.
39. Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg* 1992;76:13-22.
40. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989;56:335-44.
41. Kanellopoulos GK, Kato H, Wu Y, Dougenis D, Mackey M, Hsu CY, et al. Neuronal cell death in the ischemic spinal cord: the effect of methylprednisolone. *Ann Thorac Surg* 1997; 64:1279-86.
42. Hall ED, Braughler JM. Free radicals in CNS injury. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*

1993;71:81-105.

43. Slater AFG, Nobel SI, Orrenius S. The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochem Biophys Acta* 1995;1271:59-62.
44. Vukosavic S, Dubois-Dauphi M, Romero N, Przedborski S. Bax and Bcl-2 in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 1999;73:2460-8.
45. Jackel MC, Dorudian MA, Marx D, Brinck U, Schauer A, Steiner W. Spontaneous apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma is independent of bcl-2 and bax protein expression. *Cancer* 1999;85:591-9.
46. Knudson CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet* 1997;16:358-64.
47. Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibited by Bcl-xL. *J Biol Chem* 1999;274:2225-33.
48. 진동규. 급성 척수손상시 세포사망의 특성. 서울: 연세대학교 대학원; 1999.
49. Murphy KM, Streips UN, Lock RB. Bax membrane insertion during Fas(CD95)-induced apoptosis precedes cytochrome c release and is inhibited by Bcl-2. *Oncogene* 1999;18:5991-9.
50. Murphy KM, Streips UN, Lock RB. Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N-terminus and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* 2000;4[epub ahead of print].

Abstract

Alteration of apoptosis in acute spinal cord injured rat with methylprednisolone treatment

Ho Yeol Zhang

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Young Soo Kim)

There have been many efforts to maximize the recovery from spinal cord injury (SCI). The mechanism of SCI is divided into primary injury and secondary injury. The secondary SCI occurs in the form of necrosis and apoptosis. So far, methylprednisolone is the only approved medicine with the positive effect on the recovery from SCI. This study looked at the effect of methylprednisolone used in acute spinal cord injured rat on the alterations of Bcl-2, Bax and apoptosis.

Moderate SCI was made on the thoracic spinal cord of the Sprague-Dawley rat. Fifteen minutes after SCI, methylprednisolone 30 mg/Kg in treatment group or saline in control group was injected. Rats were sacrificed 1, 2, 4, 8, 24 hours and 14 days after trauma. Collected cord tissues were stained with H-E, Bax, Bcl-2 and TUNEL. Rats, 14 days after trauma, were checked for BBB locomotion test.

Results were as follows.

1. Cell death after trauma progressed with time. Wider range of cell death was noted in control group 14 days after SCI.
2. BBB locomotion test showed statistically significant recovery in methylprednisolone treated group.
3. Bcl-2 (+) cells were detected 1 hour after SCI upto 14 days and significantly higher in treatment group at 8 hours after SCI.
4. Bax (+) cells were detected 1 hour after SCI upto 14 days and significantly higher in treatment group at 4 hours after SCI.
5. TUNEL (+) cells were detected 1 hour after SCI upto 14 days and significantly higher in the control group at 24 hours after SCI.

These results suggest that methylprednisolone is effective in the recovery of moderately injured rat spinal cord and alters the activity of Bcl-2 and Bax as well as in a specific time.

Key Words: acute spinal cord injury, apoptosis, methylprednisolone, Bax, Bcl-2, TUNEL, H-E stain