KISEP Clinical Research J Korean Neurosurg Soc 28 : 1755-1764, 1999

급성 척수손상시 세포사망의 특성*

연세대학교 의과대학 신경외과학교실, 임상의학연구센터**
진동규 · 김영수 · 윤도흠 · 주진양 · 이경희** · 성제경**

= Abstract =

Cell Death in Acute Spinal Cord Injury

Dong-Kyu Chin, M.D., Young-Soo Kim, M.D., Do-Heum Yoon, M.D., Jin-Yang Joo, M.D., Kyung-Hee Lee, M.S., Je-Kyung Seong, PhD.****

*Department of Neurosurgery,** Medical Research Center, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea*

Objective : In acute spinal cord injury, biomechanical and pathological changes in the cord may worsen after injury. To explain these phenomena, the concept of the secondary injury has evolved and numerous pathophysiological mechanisms have postulated. These, however, have mainly focused only on the cell necrosis. The aim of present study is to verify whether apoptosis plays a role in the animal model of secondary injury of spinal cord.

Materials and Methods : Adult male Sprague-Dawley rats were laminectomized and spinal cord injury was induced using NYU spinal impactor at T9 segment. The animals were sacrificed periodically and tissue specimen was obtained at the injury segment, adjacent segments, and remote segments to observe the secondary injury ultimately for the observation of the spatial and temporal distribution and the related cells for the appearance of apoptosis, if present.

Results : In the spatial distribution of apoptosis, the apoptotic cells were located at gray matter of spinal cord and the number of apoptotic cells were significantly higher in adjacent segments than in the injured segment. In the temporal distribution of apoptosis, the number of apoptotic cells were maximal at 4 hours after injury and decreased subsequently. No apoptotic cells were found at remote segments which implies that there were no influence of apoptosis on transneuronal degeneration.

Conclusion : These results suggest that the lesioned area of spinal cord expanded over time in acute spinal cord injury and apoptosis contributed to the spinal cord neuronal and glial cell loss. In conclusion, apoptosis is thought to have an important role in secondary injury of acute spinal cord injury.

KEY WORDS : Acute spinal cord injury · Secondary injury · Cell death · Necrosis · Apoptosis.

서 론

척수손상은 물리적 요소에 의한 일차손상과, 이에 따르는 조직의 퇴행성 변화에 의한 이차손상으로 나눌 수 있다[1)6)35)]. 또한 손상 부위와는 멀리 떨어져 있지만 신경정보 전달을 위하여 서로 연접되어 있는 세포에도 영향을 줄 수 있다[31)]. 일차손상은 손상의 정도에 따라 정해지는 것이고 인간의 척수손상에서도 사고의 정도와 물리적 힘의 정도에 따라 결정된다[25)36)37)]. 그러나 이차손상은 일차적 물리적 손상 후 시간이 경과한 이후에 나타나며, 현재까지 알려진 이차손상의 기전으로는 과도한 칼슘설(calcium theory)[3)35)], 유리기설(free radical theory)[6)7)], 허혈성 변화[33)], 아편 수용체설(opiate receptor theory)[13)], excitotoxic amino acid[14)]등이 서로 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며, 이들은

*이 논문은 1998년도 연세대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.
*이 논문은 99학년도 대한신경손상학회에서 구연으로 발표하였음.

모두 조직의 괴사에 중점을 두어 연구되었다.

Apoptosis는 1971년 세포사망의 형태학적 연구에서 괴사와 대별하여 학계에 처음으로 보고되었다[19)21)]. Apoptosis는 괴사와는 달리 염증반응을 수반하지 않고 endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 분절화(fragmentation)가 일어나면서 세포가 사망하게 되는 과정[32)]으로써 발생과정에서의 불용 조직의 퇴화, 증식 조직의 정상화 복귀 과정과 각 조직의 형태학적 재구성 및 종양의 성장조절등에 관여하는 것으로 알려져 있다[23)32)]. Apoptosis의 형태학적 특징으로는 endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 분절화, 핵농축, 세포응집, apoptotic body, 염색질의 응집 및 이동등이 알려져 있다[4)32)]. 따라서 세포사망은 크게 괴사와 apoptosis로 분류할 수 있으며, 괴사가 세포의 수동적인 사고 사망(pathological and accidental cell death)에 해당되는데 비하여 apoptosis는 능동적이고 계획된 세포사망(physiological and programmed cell death)에 해당된다[11)20)]. 괴사에 대한 연구는 과거에 많은 연구가 있어 그 이론이 어느 정도 정립되어 있으나, apoptosis는 비록 20년 전부터 도입된 개념이지만, 활발한 연구는 최근 4~5년 전부터 이루어지고 있으며, 아직 연구되어야 할 과제가 많은 실정이다.

신경과학에서는 실험동물 대뇌의 부분적 허혈성 병변을 중심으로 apoptosis에 대한 연구가 주로 진행되고 있다. 실험동물의 대뇌에 허혈성 병변을 만든 이후 세포의 괴사를 관찰하였을 때, 괴사의 범위는 시간의 경과에 따라 점차 커지는 것을 관찰할 수 있으며, 분자생물학적 면역화학 염색을 이용하여 대뇌의 경색 주변부에 경색이전에 apoptosis가 선행하는 것으로 알려져 있다[8)12)22)25)]. 뇌세포의 apoptosis에 대한 연구는 허혈성 병변 이외에도 뇌 손상과 대뇌의 퇴행성 병변에서도 일부 보고되고 있다[28)29)].

급성 척추손상에서의 apoptosis에 대한 논문은 3년 전 학계에 처음으로 보고된 이래 현재까지 5~6편의 논문이 발표되었다[10)18)24)26)]. 현재까지 발표된 연구결과에서는 손상부위에서 apoptotic cell과 DNA fragmentation을 관찰하여 apoptosis가 척수손상에 관여한다고 증명하였으나 apoptotic cell이 발현되는 위치에는 이견이 있어 Crowe등[10)]은 척수백질에서 발생하며 주로 신경교세포에서 발생한다고 보고하였으며, Liu등[26)]은 주로 척수의 회백질에서 경미한 척수손상이후 발생하며, 신경세포 및 신경교세포에서 발생한다고 보고하였다. 또한 기존의 연구들은 주로 손상부위 내에서 발현된 apoptotic cell을 관찰하였으며, 손상부위로부터 먼 거리에 위치한 척수에서의 변화를 관찰한 보고는 없었다.

본 연구에서는 대뇌의 허혈성 병변의 파급에 apoptosis가 관여하듯이 급성 척수손상의 이차손상에 apoptosis가 관여한다는 가정 하에 실험을 수행하였다. 이는 괴사에 중점을 두어 시행되어 왔던 기존의 연구와는 전혀 다른 방향의 연구로써 저자는 이러한 가정을 증명하기 위하여, 실험동물의 척수에 물리적 손상을 가한 후 척수손상부위, 척수손상 주변부위, 그리고 손상부위와는 먼 거리에 위치한 척수 세포에서의 병리학적 검사를 통하여 이차손상에 apoptosis의 관여 여부를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 동물모델 제작

실험동물로는 체중 300 350g의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley) 70마리를 사용하였다. 실험동물에 entobar(pentobarbital 20%, 50mg/kg)를 복강 내 주입하여 마취시킨 후 30×20cm 아크릴판 위에 올려놓고, 흉요추부위 피부의 털을 수동면도기를 이용하여 완전히 제거한 뒤 척추의 정중선을 따라 피부를 절개한 다음 주위의 근육을 젖혀 제9, 10흉추의 척추후궁절제술을 실시하였다. 제2요추부터 제6흉추까지의 척추돌기를 확인하고 impactor를 떨어뜨릴 위치인 제9흉수 부위 경막을 완전히 노출시킨다. 동물을 충격을 주는 impactor device(NYU, spinal cord dropping device, USA)에 올려놓고 clamp로 척추돌기를 고정하였다. 직경 2.5mm, 무게 10g인 충격을 주는 막대(impactor rod)를 천천히 내려서 막대가 척수의 표면에 닿은 지점(0점)을 확인한 후, 다시 25mm지점 높이에 막대를 위치시킨 뒤, 막대가 떨어지도록 핀을 잡아당겨서 척수손상을 가했다. 척수손상을 가한 뒤 컴퓨터 모니터(monitor, IBM 386 PC)에 나타나는 척수손상 매개변수들(spinal cord compression parameter)을 확인하여 높이, 속도, 압축 비율(compression rate, dD/dT)이 모두 일정 범위에 해당한 동물모델만 선택하였다. 그 후 동물의 손상부위를 봉합하고 항생제(gentamicin, 0.6cc/1kg)를 근육 주사(i.m.)한 뒤 온도조절 장치가 부착된 자동제어 열방석위에 올려놓고 마취에서 깰 때까지 직장 내 온도를 36~37℃로 유지시켰다.

이렇게 제작된 급성 척수손상 모델 쥐는 영상 20±2℃의 조건에서 사육되었으며 손상 후 스스로 소변을 볼 수 없는 신경인성 방광이 발생함으로 인위적으로 복강을 눌러 규칙적으로 소변을 빼주었다.

2. 실험설계

실험은 척수손상 후 시간별로(손상직후, 4시간, 1일, 3일, 7일, 14일) 각각 10마리 모델 쥐 척수의 손상부위(T9), 손상 주변부위(T8, T10), 원위부(T1, L1)에서 척수조직을

채취하여 급성 척수손상 후 척수의 변화과정을 병리학적 검사를 통하여 관찰하였으며, 급성 척수손상의 이차손상에 apoptosis의 관여 여부를 조사하였다. 대조군으로는 척추후궁절제술만 시행하고 척수손상을 주지 않은 실험동물 10마리를 이용하였다.

3. 병리학적 검사

척수손상 후 시간별로 모델 쥐를 희생시킨 다음 생리식염수 및 4% paraformaldehyde를 심장을 통하여 관류시킨 후 척수조직을 손상부위(T9), 주변부위(T8, T10), 원부위(T1, L1)에서 적출 하였으며, 조직을 10% formalin에 넣어 고정한 뒤 파라핀에 포맷한 후 조직절편을 만들어 염색을 진행하였다.

1) Hematoxylin과 eosin 염색

파라핀에 포맷되어 있는 척수조직을 10㎛ 두께의 조직절편으로 만든 후에 H-E염색을 진행하여 조직손상의 정도, 출혈 및 괴사의 정도를 확인하였으며, 척수손상의 파급 정도를 조사하였다.

2) Apoptosis 확인을 위한 염색(TUNEL염색)

Apoptosis의 확인은 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL) 염색을 이용하였다. TUNEL염색은 apoptotic cell에서만 특이적으로 발생하는 DNA의 3′-OH end와 TdT의 결합성질을 이용하는 염색법으로 본 연구에서는 Apoptag kit(S7100-kit, Oncor, San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 파라핀에 포맷되어 있는 손상 받은 척수를 5㎛의 두께로 자른 다음 조직 슬라이드에 mount하여 실온에서 건조시킨 후, xylene 처리를 하여 탈파라핀 과정을 거친 후 proteinase K(20㎍/ml)를 조직 위에 떨어뜨리고 실온에서 15분간 반응시켜 핵단백질을 소화시켰다. Proteinase K를 불활성화 시킨 후 2~3% hydrogen peroxide in PBS buffer로 조직 슬라이드를 실온에서 5분간 Coplin jar에 담궈 endogenous peroxidase의 작용을 막은 후 PBS buffer로 씻었다. 그 후 Apoptag kit을 사용하여 염색하였다. 즉 TdT효소와 반응시켜 digoxigenin이 표지된 nucleotide를 결합시킨 후 효소반응을 중단시키고 anti-digoxigenin-peroxidase를 반응시키고 diaminobenzidine으로 발색시켰다. TUNEL염색의 정확한 정량화를 위하여 모든 실험동물에서 일정한 해부학적 지표인 central canal을 중심으로 200배의 현미경하에서 apoptotic cell의 숫자를 세었다.

3) 전자현미경 검사

척수 조직을 산도 7.4의 0.1M cacodylate buffer와 함께 2.5%의 glutaraldehyde에서 60분간 고정한다. 1%의 osmium tetroxide와 같은 조건의 0.1M cacodylate buffer에 후고정한 이후 ethanol에서 점차 탈수시킨다. 조직을 ultrathin section으로 자르고 uranyl acetate로 염색한 후 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

4. 통계 처리

모든 계측치는 mean±SD으로 기록하였으며, 각 그룹간의 apoptosis 세포수의 평균치를 검증하기 위하여 two way ANOVA test 및 one way ANOVA test를 사용하였으며 유의 수준은 $p<0.05$로 하였다.

결 과

1. 척수손상 매개변수

본 연구에서는 무게 10g, 직경 2.5mm의 rod를 높이 25mm에서 떨어뜨려서 척수손상을 유발하였다. 이 경우 척수에 가해지는 힘은 일반적으로 중등도의 척수손상에 해당한다.

척수손상의 평균 높이 : 컴퓨터에서 실제로 측정된 높이의 평균값은 23.387±2.861mm이었으며 각 집단간에 유의한 통계적 차이는 보이지 않았다.

Rod의 평균 낙하 속도 : 자동전산화 처리된 rod의 평균 낙하 속도는 0.551±0.028m/sec이었으며 각 집단간에 통계적인 차이는 없었다.

압축 비율 : 척수손상을 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 일어날 때까지의 시간의 비율인 압축 비율을 산정하였다. 평균 압축 비율은 42.700±5.128이었으며 각 집단 간에 압축 비율은 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

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

2. 병리학적 결과

1) Hematoxylin과 eosin 염색

(1) 초급성기 변화 : 손상직후, 4시간, 1일

손상직후 백질과 회백질에 다발성 점상출혈이 발생하며, 이는 척수손상부위(T9)에서 가장 심하여 불꽃모양의 출혈 및 혈종이 발생하기도 하였고, 회백질의 변성이 심하여 파괴된 세포, 부종, 출혈 등으로 정상 세포 구축의 파괴가 심하였다. 신경세포 또한 대부분 파괴되어 있었다. 척수손상 주변부위(T8과 T10)에서는 점상출혈이 관찰되어 비교적

출혈의 양은 많지 않음을 알 수 있었고 정상 세포 구축은 비교적 보존되면서 신경세포 역시 관찰되었다(Fig. 1). 척수손상 원위부(T1과 L1)의 조직학적 소견은 정상이었다.

(2) 급성기 변화 : 3일, 7일

척수손상부위(T9)에서는 회백질 내에 부종이 심해지고, 백혈구 및 대식세포의 침윤이 관찰되어 염증반응 및 괴사가 진행되며, 일부에서는 공동화 현상이 시작되었다. 이러한 염

Table 1. Spinal cord injury parameter

Time post-injury		Height(mm)	Velocity(m/sec)	Compression rate(dD/dT)*
Immediate	(n=10)	20.766±3.693	0.539±0.043	41.400±4.502
4 hours	(n=10)	23.875±1.264	0.550±0.034	42.619±5.861
1 day	(n=10)	22.655±2.941	0.535±0.016	42.000±6.307
3 days	(n=10)	24.948±0.379	0.564±0.021	43.200±5.574
7 days	(n=10)	23.321±2.645	0.553±0.019	44.200±4.417
14 days	(n=10)	25.247±0.618	0.564±0.028	42.700±5.229
Total	(n=60)	23.387±2.861	0.551±0.028	42.700±5.128

*Rates obtained dropping the maximum cord compression depth by the compression time(m/sec).

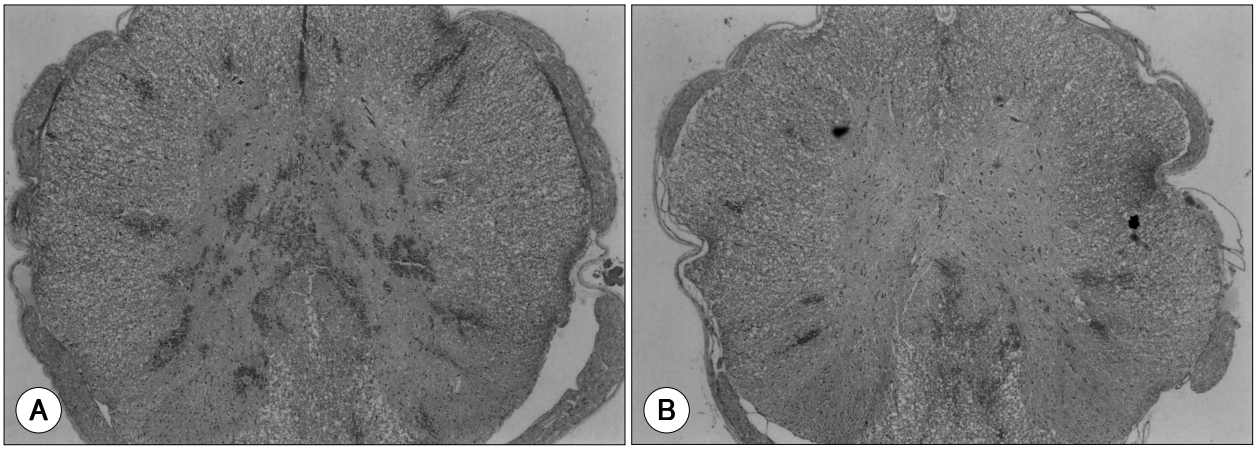

Fig. 1. Hematoxylin and eosin stain of the spinal cord immediately after spinal cord injury(×40). A : Injured segment(T9). The most striking feature of the sections is the hemorrhage in the central gray matter. Petechial hemorrhage of varing size is distributed around the central canal. The gray matter architecture is altered with cell debris and hemorrhage. B : Adjacent segments(T10). The petechial hemorrhage is also seen here but with small size. The gray matter cytoarchitecture is preserved.

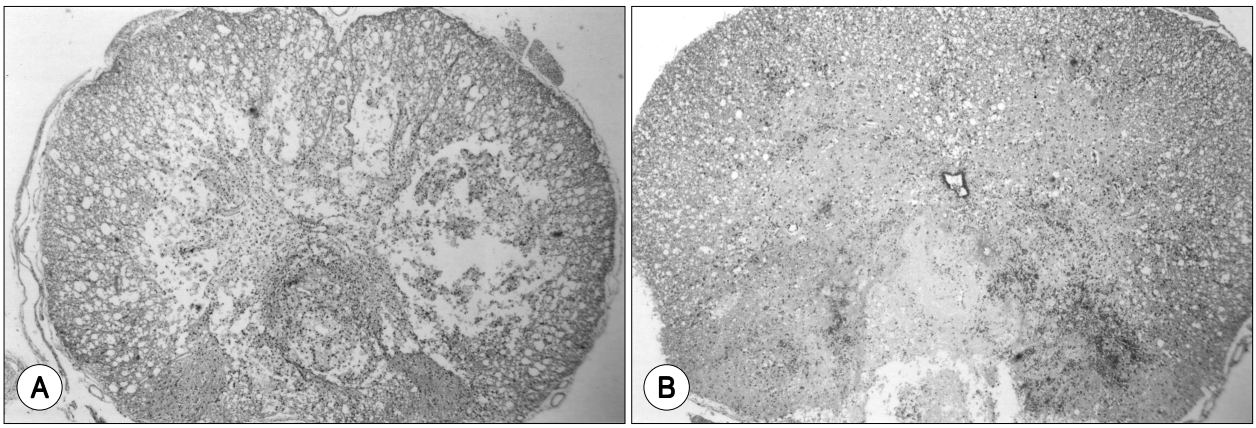

Fig. 2. Hematoxylin and eosin stain of the spinal cord seven days after spinal cord injury(×40). A : Injured segment(T9). The pathology had progressed to severe inflammation, necrosis, edema, and vessel breakdown. The central architecture is barely maintained and only the periphery of the spinal cord is preserved. The myelin sheaths of the white matter are dilated. B : Adjacent segments(T10). There are also same kind of reaction but the degree is slight.

증반응 및 괴사는 주위의 백질에서도 관찰되기 시작하였으며, 백질 내의 신경축삭에서는 부종이 심해졌다. 손상 주변부(T8과 T10)에서도 역시 점상출혈을 중심으로 백혈구 및 대식세포의 침윤, 염증반응 및 괴사가 진행된 소견을 보임으로써 병소가 확대되었음을 확인하였고, 비록 병변이 없이 정상 세포 구축이 유지되는 부위에서도 신경세포에서는 Nissle substance의 퇴행성 변화가 시작되었고, 백질에 위치한 신경축삭에서는 부종이 발생하였다(Fig. 2). 원위부(T1과 L1)에서는 염증반응 및 괴사의 소견은 없었으며, 신경세포도 정상을 유지하였다.

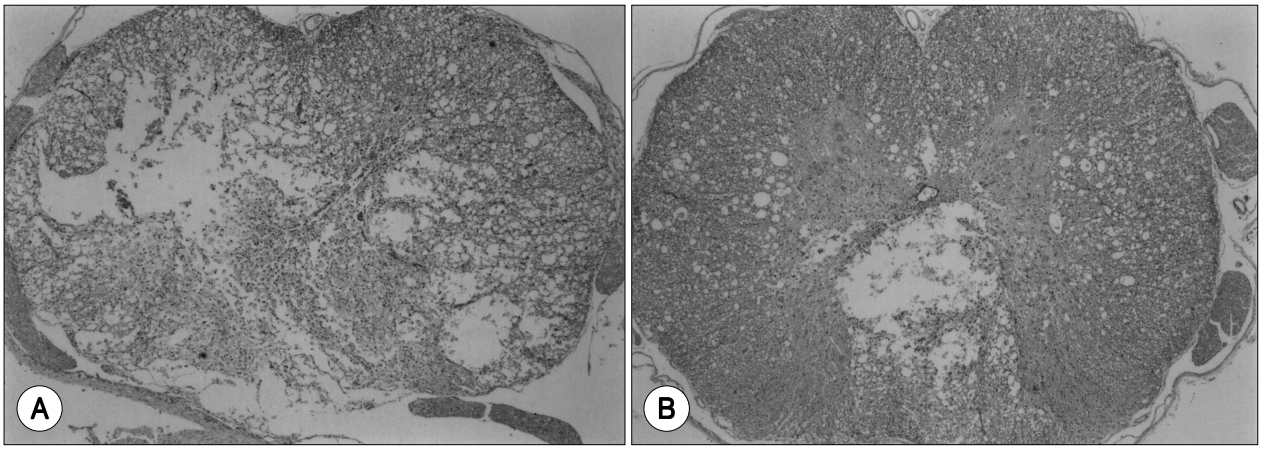

Fig. 3. Hematoxylin and eosin stain of the spinal cord 14 days after spinal cord injury(×40). A : Injured segment(T9). Cystic degeneration is observed in central gray matter. The cavitation, which is lined predominantly by loose glial tissue, is multiloculated and extended to adjacent segment. Macrophages and inflammatory cells are infiltrated and gliosis was developed. B : Adjacent segments(T10). There are also same kind of cavitation.

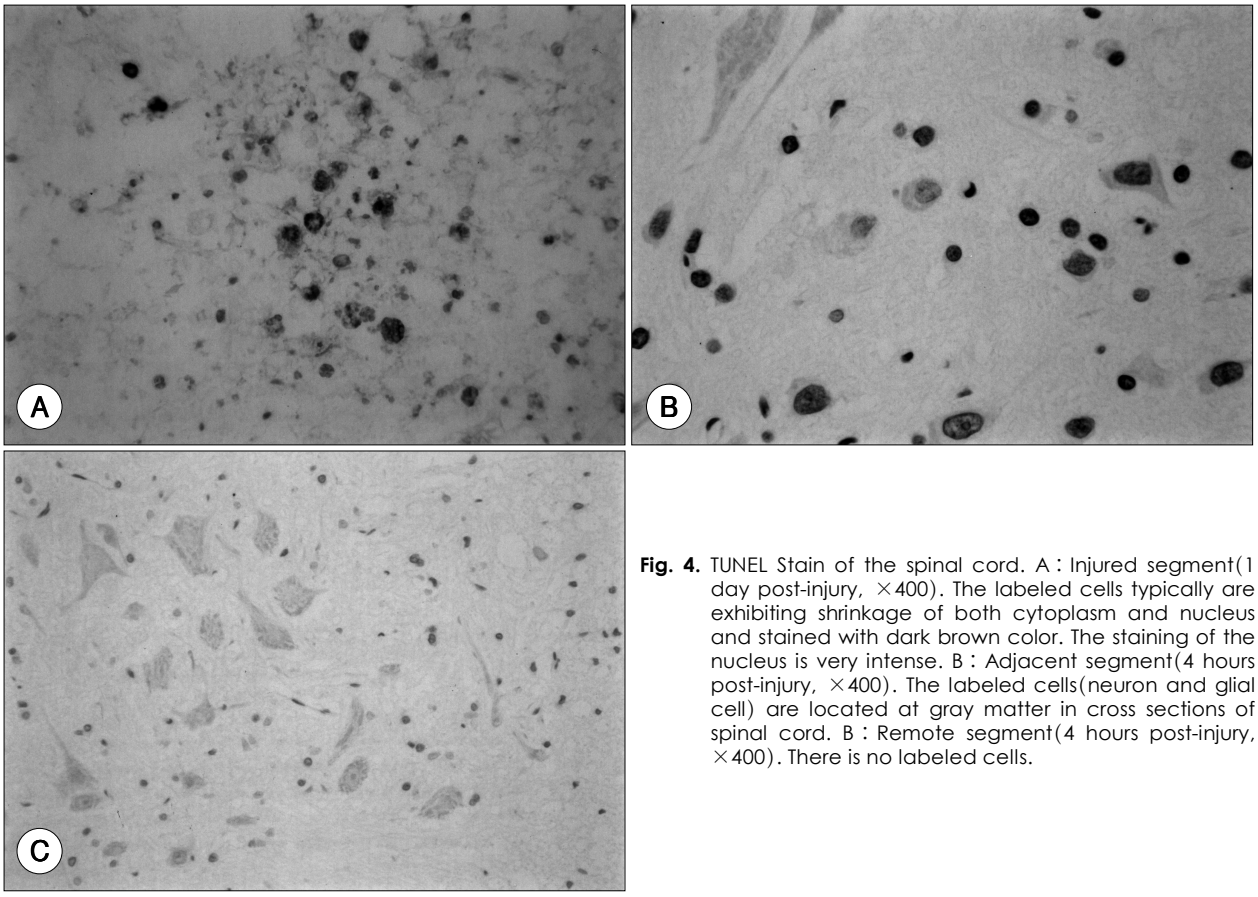

Fig. 4. TUNEL Stain of the spinal cord. A : Injured segment(1 day post-injury, ×400). The labeled cells typically are exhibiting shrinkage of both cytoplasm and nucleus and stained with dark brown color. The staining of the nucleus is very intense. B : Adjacent segment(4 hours post-injury, ×400). The labeled cells(neuron and glial cell) are located at gray matter in cross sections of spinal cord. B : Remote segment(4 hours post-injury, ×400). There is no labeled cells.

(3) 아급성기 변화 : 14일

척수손상부위(T9)에서는 회백질 내에 공동화 현상이 심해지고 많은 수의 백혈구 및 대식세포의 침윤이 관찰되었다. 백질에서도 신경축삭의 부종이 심해졌다. 손상 주변부(T8과 T10)에서도 역시 회백질 내에 공동화 현상이 관찰되었으며, 신경세포의 괴사는 더욱 심해졌다. 백질에서는 신경축삭의 부종이 지속되었다(Fig. 3). 원위부(T1 및 L1)에서는 염증반응 및 괴사의 소견은 없었으며, 신경세포도 정상을 유지하였다.

2) Apoptosis 확인을 위한 염색(TUNEL염색)

(1) 형태학적 특성

Apoptosis가 진행중인 양성인 세포는 TUNEL염색에 염색되지 않은 배경에 비하여 진한 갈색으로 염색되며, 주변의 괴사된 세포에 비하여 크기가 작고 핵에서는 apoptotic body가 발견되었다. 응집된 염색질은 핵의 변연부로 이동하였다(Fig. 4). 반면에 괴사된 세포는 연한 갈색으로 염색되며, 세포질 및 핵의 크기가 apoptotic cell에 비하여 크고 apoptotic body가 없었다.

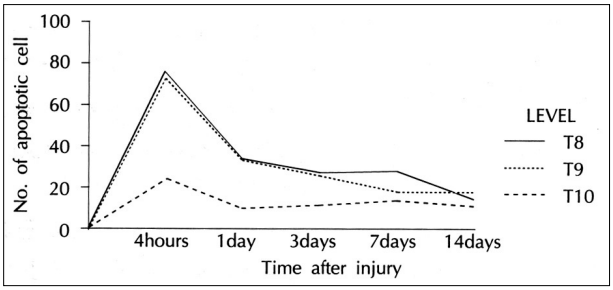

Fig. 5. Temporal and spatial distribution of apoptotic cells after spinal cord injury in rat model. No apoptotic cells are found immediately after injury. Tunel stain(see Materials and Methods) is used to detect the apoptotic cells of spinal cord tissue at the indicated times after spinal cord injury. The number of apoptotic cell is significantly higher in T8 and T10 than in T9 from Turkey's multiple comparison test($p<0.05$: $n=10$ animals per group).

(2) TUNEL염색 양성세포의 종류

TUNEL염색에 양성반응을 보인 세포는 주로 신경교세포였다. 이들은 주로 척수의 회백질에 위치하였으며, 손상 후 4시간에 39.2±19.4개로 가장 많이 발견되었으며, 이후에도 모든 시간대에서 발견되었으나 점차 감소하였다. 반면에 TUNEL염색에 양성인 신경세포는 손상 후 4시간에 15.3±7.9개로 나타났다가 이후에는 발견할 수 없었다(Fig. 4).

(3) TUNEL염색 양성세포의 분포

UNEL염색에 양성세포의 분포는 손상부위인 T9에서는 평균 10.8±10.9개였으며, 손상 주변부인 T8에서는 29.0±28.6개, 그리고 T10에서는 26.8±27.3개로써 손상 주변부에서 의의 있게 많은 수에서 발견되었다. 손상부인 T9에서는 괴사된 조직 및 공동화 되어 있는 조직의 변연부에서 주로 발견되었다(Fig. 4, 5). 반면 손상부와 원거리에 위치한 T1 및 L1에서는 양성인 세포는 없었다. 조직절편의 단면에서는 주로 회백질에 분포하였으며, 백질에서는 거의 관찰되지 않았다.

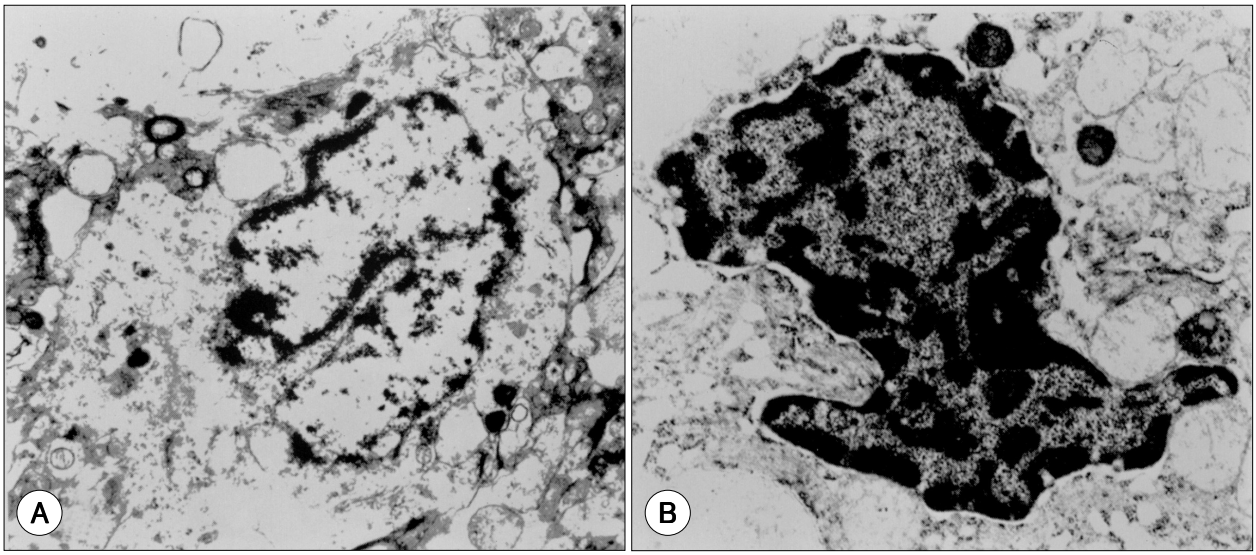

Fig. 6. Electron micrograph of apoptosis. A : Early apoptosis. The nuclear and cytoplsmic membrane are shrunken and infolded. Aggregation of chromatin into dense and coarse mass is seen but cytoplasmic organelles and membranes are structurely intact. B : Progressed apoptosis. The shrinkage of cytoplasm and the convolution of nuclear membrane are further progressed and the chromatin pattern is more condensed.

(4) TUNEL염색 양성세포의 발현시간

TUNEL염색에 양성인 세포는 손상직후에는 발견할 수 없었으며, 손상 후 4시간에 54.5±29.4개로 의의 있게 가장 많은 수에서 발견되었다가 이후 시간대에서는 점차 감소되는 양상을 보였다(Fig. 5). 손상부위별 양성세포의 발현시간도 역시 손상 후 4시간에서 가장 많이 발견되어 손상 주변부인 T8에서는 73.3±20.3개, T10에서는 67.7±20.1개로 통계학적 의의가 있었으며, 손상부위인 T9에서는 10.8±16.2개로 가장 많이 발견되었으나 통계학적 의의는 없었다(Fig. 5).

3) 전자현미경 검사

손상 후 4시간 및 1일의 척수 조직에서 괴사된 세포에서는 세포 및 핵의 크기가 커지면서, 세포막과 핵막이 파괴되었고 세포 소기관(미토콘드리아, 리보솜, 소포체)의 파괴가 뚜렷하였으나, apoptosis가 진행된 세포에서는 세포 소기관 및 세포막, 핵막이 유지되면서, 염색질이 응집되면서 핵의 변연부로 이동하였다. 세포막 및 핵막이 convoluted되면서 세포가 위축되고 세포가 여러 개의 분절로 나누어져 apoptotic body를 형성하였다(Fig. 6).

고 찰

본 연구에서는 실험동물인 흰쥐에서 척추후궁절제술로 노출된 제9흉추부의 경막위로 중량 낙하(weight drop)이후 급성 척수손상 모델 쥐를 제작하였다. 척수손상을 가할 때 25mm의 높이에서 손상을 주었으며 이는 중등도의 척수손상이 가해졌음을 의미한다. 각 집단간에 손상의 높이, 충격을 주는 막대의 속도, 압축비율은 통계학적으로 차이가 없었으며 이는 각 집단간에 같은 정도의 손상을 주었다는 것을 객관적으로 확인할 수 있는 것이다. 이는 기존의 실험들이 대개의 경우 경미한 척수손상 후 나타나는 apoptosis를 관찰 한 것과는 구분이 되는 것이다.

최근 2~3년 사이에 apoptosis가 급성 척수손상에서 이차손상의 또 다른 기전으로 작용할 수 있다는 보고들이 발표되고 있다[10)18)24)26)]. 그러나 대부분 경미한 손상을 받은 실험동물을 이용하였으며, Liu등[26)]은 본 연구에서 사용한 NYU impactor를 이용하였으나 impactor rod를 6.25mm과 12.5mm에서 떨어뜨려 충격을 가함으로써 경미한 손상을 받은 척수손상 모델을 만들어 실험을 진행하였다. 본 연구에서는 impactor rod를 25mm에서 떨어뜨려 중등도 이상의 척수손상을 받은 모델 쥐를 대상으로 하였다. 경미한 손상을 받은 모델 쥐는 시간이 경과함에 따라 점차 하지마비가 회복되며, 실제 임상에서도 경미한 척수손상 환자들의 마비증세는 시간이 경과함에 따라 점차 회복되어 이들의 치료에는 별다른 문제점이 제기되지 않는다. 반면에 중등도 이상의 척수손상을 받은 모델 쥐에서는 실제 임상에서 문제되는 완전마비 환자들에서와 같이 마비가 회복되지 않고 영구적 장애로 남는다. 본 연구에서는 실제 임상에서 문제가 되는 완전마비의 모델 쥐를 제작하고자 하였다.

Apoptosis의 확인을 위하여 apoptotic cell에서만 특이적으로 발생하는 DNA의 3′-OH end와 TdT의 결합성질을 이용하는 TUNEL염색을 이용하였다[15)]. 그러나 최근의 보고에 의하면 TUNEL염색은 apoptotic cell뿐만 아니라 괴사된 세포에서도 위양성 반응이 일어날 수 있고 이는 괴사된 세포 내에 비특이적으로 증가된 3′-OH에 의한 것으로 알려지고 있으며, TUNEL염색만으로는 apoptosis를 증명하지 못하는 것으로 밝혀지고 있다[17)27)]. 따라서 저자는 apoptosis의 확인을 위하여 전자현미경 검사를 시행하였다. 중등도 이상의 급성 척수손상을 가한 이후 apoptosis의 공간적 분포를 조사하였을 때 직접적으로 손상을 받지 않은 손상 주변부위(T8 및 T10)에서는 손상을 심하게 받아 괴사가 진행된 손상부위(T9)에 비하여 의의 있게 많은 수에서 양성세포가 관찰되었다. 또한 손상부위(T9)에서도 양성세포의 수는 적었지만 괴사의 변연부를 중심으로 분포하였다. 손상부위에서는 강한 손상을 직접 받았기 때문에 괴사가 유도되었으며, 반면에 손상의 주변부에서는 직접적인 손상은 없었기 때문에 손상부위보다 손상의 정도가 약하여 apoptosis가 유도되었을 것으로 생각된다. 급성 척수손상이후 실험동물에서 척수의 혈류공급이 줄어들고, 자동조절이 제기능을 못하고, 또한 심장 및 혈관의 기능저하로 인하여 척수에 허혈성 변화가 일어난다[9)16)33)]. 척수의 허혈성 병변을 가진 모델 쥐에서 apoptosis의 공간적 분포를 조사하였을 때 주로 허혈성 병변의 주변부에서 apoptosis가 발생하며, 이러한 이유로 중심부에 비하여 심하지 않은 허혈성 병변은 괴사를 일으키기보다는 apoptosis를 유도하는 것으로 보고된다[17)]. 본 연구의 결과는 중등도 이상의 급성 척수손상을 받은 모델 쥐에서는 세포의 괴사가 많이 진행되기 때문에 apoptosis가 발생되지 않을 것이라고 주장한 Liu등[26)]의 결과와는 상반되는 것으로 본 연구에서는 급성 척수손상 이후 apoptosis를 확인하기 위한 조사의 범위를 손상부위에 국한하지 않고 손상 주변부 및 원위부로 확대하였기 때문에 주위조직으로 파급되는 apoptosis를 발견할 수 있었다고 생각한다. 또한 손상 주변부의 척수조직에서 시행한 전자현미경 검사에서도 괴사된 세포에서는 세포 및 핵의 크기가 커지면서, 세포막과 핵막이 파괴되었고 세포 소기관

(미토콘드리아, 리보솜, 소포체)의 파괴가 뚜렷하였으나, apoptosis가 진행된 세포에서는 세포의 크기가 위축되며, 세포 소기관 및 세포막, 핵막이 유지되었고, 염색질이 응집되면서 핵의 변연부로 이동하였다. 또한 세포가 여러 개의 분절로 나누어져 apoptotic body를 형성하였다.

급성 척수손상 이후 apoptosis의 발생의 시간적 분포를 보았을 때 apoptosis는 손상 후 4시간에 의의 있게 가장 많은 수에서 발생하며, 이때에는 신경세포 및 신경교세포가 모두 관여하였다. 그러나 손상 후 4시간 이후에는 apoptosis가 주로 신경교세포에서 발생하였으며, 신경세포에서는 발생하지 않았다. 이와 같은 결과로 손상 후 신경세포의 사망은 그것이 괴사이든 혹은 apoptosis이든 상관없이 손상직후 아주 빠른 시간 내에 결정됨을 알 수 있었고, 따라서 신경세포의 손실을 줄이기 위해서는 치료가 손상직후 바로 시작되어야 함을 알 수 있었다. 미국의 제2차 국가 급성기 척수손상 연구(The 2nd national acute spinal cord injury study)에서 손상 후 8시간 내에 많은 양(30mg/kg)의 methylprednisolone을 급성 척수손상 환자에 정맥주사하였을때 신경학적 회복이 의미 있게 향상되었다고 보고하였다[5]. 이는 급성 척수손상에서 손상 후 초급성기에 약물투여를 시작하지 않을 경우에는 효과가 없으며, 신경세포의 사망이 손상 후 아주 빠른 시간 내에 결정됨을 의미한다. 중등도 이상의 급성 척수손상직후 신경세포에서 K^+이 세포 밖으로 이동하여 세포외액의 K^+이 증가하고, 척수 혈류가 하강하며, Ca^{2+}이 증가한다. 이러한 이유로 신경세포의 사망은 척수손상이후 아주 빠른 시기에 결정된다. 따라서 약물 투여의 시간은 손상의 정도에 따라 다를 수 있지만 손상의 정도가 중등도 이상의 심한 손상이라면 손상직후 시작하여야만 효과가 있다고 보고된다[34)36)]. 본 연구의 결과를 토대로 저자는 급성 척수손상 후 신경세포의 apoptosis를 줄이기 위해서는 약물투여를 신경손상 후 4시간이내에 시행하여야 효과적일 것으로 생각한다.

급성 척수손상에서의 apoptosis는 신경세포 뿐만 아니라 회백질내의 신경교세포에서도 발생하였으며, 손상 후 4시간에 의의 있게 가장 많은 수에서 발생하지만 손상 후 아급성기인 2주가 지난 후까지 apoptosis가 신경교세포에서 발생하였다. 신경교세포가 신경정보 전달에 직접 작용하지는 않지만 중추신경계에서 신경세포의 생존에 영향을 주는 관계로 신경교세포의 생존이 신경기능을 유지하는데 중요하게 작용할 것이라는 점은 배제할 수 없는 사실이다. 급성 척수손상 후 척수 백질에 위치한 핍지세포(oligodendrocyte)에서 apoptosis가 일어나며, 핍지세포가 중추신경계에서는 신경축삭의 수초를 형성함으로 핍지세포의 apoptosis는 신경축삭의 퇴행성 변화를 촉진한다[10)30)]. 본 연구에서는 주로 회백질내의 신경교세포에서 apoptosis가 발생하였으며, 백질에 위치한 신경교세포에서는 apoptosis를 거의 발견할 수 없었다. 신경교세포의 apoptosis는 중추신경계 내에서 손상된 신경세포 및 인접부위의 손상 받지 않은 신경세포의 탈수초화를 일으켜 신경기능을 저하시키는 역할을 할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 척수손상의 원위부(T1 및 L1)에서의 apoptosis가 발생하는지 여부를 관찰하였으나 원위부의 척수에서는 어떠한 apoptosis도 발견할 수 없었다. 따라서 급성 척수손상이후 신경교세포에서는 apoptosis가 발생하며, 이는 척수기능을 저하시킬 것으로 판단되지만, 원위부에서는 apoptosis가 발생하지 않음으로써 신경손상의 transneuronal degeneration 및 remote effect에는 apoptosis가 관여하지 않을 것으로 생각한다.

본 연구를 통하여 중등도 이상의 급성 척수손상 모델 쥐에서 일차손상이후 시간이 경과함에 따라 조직의 손상 정도가 점차 커지는 이차손상이 존재함을 알 수 있었고 이차손상에 세포의 계획된 사망인 apoptosis가 관여한다는 것을 확인할 수 있었다. 이전까지는 경미한 척수손상에서만 apoptosis가 발생하는 것으로 보고되었으나 본 연구에서 확인되었듯이 중등도의 척수손상에서도 apoptosis가 발생함을 알 수 있다. 이차손상시 나타나는 여러 현상들 및 발생기전을 apoptosis 만으로 모두 설명할 수 없지만, apoptosis는 이차손상의 여러 가지 발생기전 중에 하나로 고려될 수 있을 것이다. 따라서 저자는 세포 내의 과도한 칼슘, 척수조직의 허혈성 변화, 그리고 활성화된 산화반응에 의한 유리기 등은 endonuclease를 활성화시켜서 apoptosis를 유도할 수 있을 것이며, 이들이 서로 상호 보완적으로 작용하여 이차손상을 일으킬 것으로 생각하며, 추후 이들의 상관관계에 대한 계속적인 연구가 필요한 것으로 생각한다. 또한 본 연구의 결과를 기초로 하여 신경세포 및 신경교세포의 계획된 사망을 조기에 차단할 수 있는 anti-apoptotic drug의 개발에 대한 더 많은 연구가 필요하고 생각한다.

세포의 증식 과정인 세포분열에 반대되는 개념으로 학계에 처음으로 도입된 apoptosis[19)21)]는 발생 과정에서의 불용 조직의 퇴화, 증식조직의 정상화 복귀 과정과 각 조직의 형태학적 재구성 및 종양의 성장조절등에 관여하는 것으로 알려져 있다[4)23)]. 본 연구를 포함하여 신경과학에서의 apoptosis에 관한 연구는 중추신경계의 세포사망과 퇴행성 변화의 관점에서만 분석하였다. 그러나 급성 척수손상에서 손상의 주변부에 계획된 세포의 사망인 apoptosis가 발생하고, 대뇌의 허혈성 병변의 주변부에 apoptosis가 발생함으로써 더 이상의 척수손상 및 대뇌손상의 파급을 억제하는

보호 기능의 apoptosis 연구도 필요하다고 제안한다.

결 론

급성 척수손상은 물리적 요소에 의한 일차손상과, 이에 따르는 조직의 퇴행성 변화에 의한 이차손상으로 나눌 수 있다. 일차손상은 손상의 정도에 따라 정해지는 것으로 인간의 척수손상에서는 사고의 정도와 물리적 힘의 정도에 따라 결정된다. 이차손상은 이러한 일차적 물리적 손상 후 시간이 경과한 이후에 나타난다. 이차손상과 apoptosis의 관계를 규명하기 위하여 전 세계적으로 인정받고 있는 뉴욕대학에서 개발한 충격장치(NYU impactor)를 이용하여 중등도 이상의 척수손상이 가해진 모델 쥐를 제작하였으며, 이들을 대상으로 병리학적 검사 및 TUNEL염색을 시행하여 다음의 결론을 얻었다.

1) 뉴욕대학에서 개발한 급성 척수손상 모델 쥐를 사용하여 외상의 크기, 조직의 손상 정도 및 신경 기능 장애에 있어 일정한 범위의 척수손상을 재현할 수 있었다.

2) 급성 척수손상 후 척수 조직의 괴사현상은 시간이 경과함에 따라 점차 진행되는 양상이 관찰되었으며, 아급성기 이후에는 조직학적으로 공동화 현상이 일어났다. 이는 손상 주변부인 T8 및 T10에도 관찰되었으며 척수손상에서 이차손상이 존재함을 나타내는 것이다.

3) 급성 척수손상이후 apoptosis는 손상부위인 T9에서 보다 손상 주변부인 T8 및 T10에서 의의 있게 많이 발생하였다. 손상부위인 T9에서는 괴사된 조직 및 공동화 되어 있는 조직의 변연부에서 주로 발생하였으며, 척수의 단면에서는 주로 회백질에 분포하였다.

4) 급성 척수손상직후에는 TUNEL염색에 양성인 세포가 관찰되지 않았으나, 손상 후 4시간에 의의 있게 많은 수에서 관찰되었으며, 이후 시간대에서는 점차 감소하는 양상을 보였다.

5) 신경세포의 apoptosis는 손상 후 4시간에서만 관찰되었고, 이후에는 발견할 수 없었다. 그러나 신경교세포의 apoptosis는 손상 후 4시간에 가장 많이 발생하였으며, 이후에도 모든 시간대에서 발견되었으나 점차 감소하였다.

6) 척수손상 원위부에 위치한 T1 및 L1에서는 apoptosis가 관찰되지 않았으며, 따라서 신경 손상의 remote effect에는 apoptosis가 관여하지 않음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 급성 척수손상 모델 쥐에서 시간의 경과에 따라 척수 손상부위가 점차 확대되어 이차손상이 존재함을 보여 주고 있으며, 급성 척수손상의 이차손상에는 계획된 세포사망인 apoptosis가 괴사의 변연부 및 인접 척수분절에서 관여하는 것으로 나타났다.

● 논문접수일 : 1999년 8월 11일
● 심사완료일 : 1999년 9월 20일
● 책임저자 : 진 동 규
135 - 270 서울 강남구 도곡동 146 - 92
연세대학교 의과대학 신경외과학교실
전화 : 02) 3497 - 3390, 전송 : 02) 3461 - 9229

References

1) Allen AR : *Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation. JAMA 50 : 941-952, 1911*
2) Allen AR : *Remarks on histopathological changes in spinal cord due to impact : an experimental study. J Nerv Ment Dis 41 : 141-147, 1914*
3) Balentine JD : *Calcium toxicity as a factor in spinal cord injury. Surv Synth Pathol Res 2 : 184-193, 1983*
4) Bowen ID : *Apoptosis or programmed cell death? Cell Biol Int 17 : 365-380, 1993*
5) Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J, Marshall LF, Perot PL, Piepmeier J, Sonntag VKH, Wagner FC, Wilberger JE, Winn HR : *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 322 : 1405-1411, 1990*
6) Braughler JM, Duncan LA, Chase RL : *Interaction of lipid peroxidation and calcium in the pathogenesis of neuronal injury. CNS Trauma 2 : 269-283, 1985*
7) Braughler JM, Hall ED : *Central nervous system trauma and stroke : Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxydation. J Free Radic Biol Med 6 : 289-313, 1989*
8) Charriaut-Marlangue C, Margaill I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y : *Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia : An in situ DNA fragmentation analysis. J Cereb Blood Flow Metab 16 : 186-194, 1996*
9) Cho YE, Kim YS : *The effect of nimodipine on spinal cord blood flow and neuronal function in acute spinal cord injured cat. J Korean Neurosurg Soc 22 : 109-122, 1993*
10) Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS : *Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. Nature Medicine 3 : 73-76, 1997*
11) Dickson DW : *Apoptosis in the brain physiology and pathology. Am J Pathol 146 : 1040-1044, 1995*
12) Du C, Hu R, Csernansky CA, Liu XZ, Hsu CY, Choi DW : *Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia : a role for apoptosis? J Cereb Blood Flow Metab 16 : 195-201, 1996*

13) Faden AI : *Opioid and nonopioid mechanisms may contribute to dynorphin's pathophysiological actions in spinal cord injury. Ann Neurol 27 : 67-74, 1990*
14) Faden AI, Ellison JA, Noble LJ : *Effects of competitive and non-competitive NMDA receptor antagonist in spinal cord injury. Eur J Pharmacol 175 : 165-174, 1990*
15) Gavrieli Y, Shermal Y, Ben-Sasson SA : *Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119 : 493-501, 1992*
16) Joo JY, Kim YS : *The effect of 21-aminosteroid U74389F on spinal cord blood flow and SSEP in acute spinal cord injured cat. J Korean Neurosurg Soc 21 : 1147-1159, 1992*
17) Kato H, Kanellopoulos G, Matsuo S, Wu YJ, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW, Kouchoukos NT : *Protection of rat spinal cord from ischemia with dextrophan and cycloheximide : effects on necrosis and apoptosis. J Thorac Cardiovasc Surg 114 : 609-618, 1997*
18) Katoh K, Ikata T, Katoh S, Hamada Y, Nakauchi K, Sano T, Niwa M : *Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. Neurosci Lett 216 : 9-12, 1996*
19) Kerr JFR : *Shrinkage necrosis : a distinct mode of cellular death. J Pathol 105 : 13-20, 1971*
20) Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV : *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 73 : 2013-2026, 1994*
21) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR : *Apoptosis : a basic biological phenomenon with wider ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 24 : 239-257, 1972*
22) Kirino T : *Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res 239 : 57-69, 1982*
23) Korsmeyer SJ : *bcl-2 initiated a new category of oncogenesis : Regulation of cell death. Blood 80 : 879-886, 1992*
24) Li GL, Brodin G, Farooque M, Funa K, Holtz A, Wang WL, Olsson Y : *Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord. J Neuropathol Exp Neurol 55 : 280-289, 1996*
25) Li Y, Chopp M, Jiang N, Zhang ZG, Zaloga C : *Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. Stroke 26 : 1252-1258, 1995*
26) Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW : *Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. J Neurosci 17 : 5395-5406, 1997*
27) 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 15 : 728-737, 1995*
28) Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE : *Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. J Neurosci 15 : 3775-3787, 1995*
29) 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 147 : 1575-1583, 1995*
30) Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS : *Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. J Neurosci Res 50 : 798-808, 1997*
31) 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 74 : 997-1008, 1996*
32) Stewart BW : *Mechanisms of apoptosis : Integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. J Natl Cancer Inst 86 : 1286-1294, 1994*
33) Tator CH, Fehlings MG : *Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. J Neurosurg 75 : 15-26, 1991*
34) Yoon DH, Kim YS, Young W : *Pre-injury treatment of methylprednisolone in experimental spinal cord injury. J Korean Neurosurg Soc 25 : 1568-1575, 1996*
35) Young W : *Role of calcium in central nervous sysrem injury. J Neurotrauma 9(suppl 1) : 9-25, 1992*
36) Young W : *Secondary injury mechanism in acute spinal cord injury. J Emerg Med 11 : 13-22, 1993*
37) Young W : *Experimental spinal cord injury therapies. Proceedings of fourth international neurotrauma symposium. Seoul, 1997, pp7*