

백서 피질 신경원 혼합배양 모델에서 Propofol 투여 시점이 허혈-재관류 손상에 미치는 영향: N-Methyl-D-Aspartate 수용체 중심으로

아주대학교 의과대학 마취통증의학교실

김은진 · 박성용 · 박관식 · 주은진 · 김진수 · 이숙영

The influence of propofol administration time on oxygen-glucose deprivation-reperfusion injury in rat mixed cortical cultures focused on N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors

Eun-jin Kim, M.D., Sung Yong Park, M.D., Kwan-Sik Park, M.D., Un-jin Ju, M.D., Jin-Soo Kim, M.D., and Sook Young Lee, M.D.
Department of Anesthesiology and Pain Medicine, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Background: Propofol has been shown to have neuroprotective properties. However, the effect of propofol administration time on neuroprotection is not well understood. This study was conducted to determine if propofol administration time would influence its neuroprotective effects on an in vitro ischemia-reperfusion model, with special attention directed toward NMDA-induced calcium influx.

Methods: Primary mixed cortical cultures of thirteen-day-old rats were exposed to 5 min of oxygen-glucose deprivation (OGD), followed by 2 hr of reperfusion. Propofol (1–100 μ M) was administered before OGD or administered from the time of OGD to the end of the reperfusion period. In the blank and full kill groups, no drug or NMDA 500 μ M treatment was given. The surviving cells were counted using trypan-blue staining, and cell death rate (CDR) was determined. To measure the maximum Ca^{2+} influx, 50 μ M propofol was pre-treated or co-treated with 100 μ M NMDA. In the control and NMDA 100 μ M groups, no drug or NMDA 100 μ M was given. A $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: Cells pre-treated with propofol (10–100 μ M) or co-treated (50–100 μ M) at the time of OGD injury had a decreased CDR compared to the blank group. Cells pre-treated (2,713 nA) or co-treated (3,626 nA) with propofol had a decreased maximum Ca^{2+} influx compared to the 100 μ M NMDA group (4,075 nA). Cells pre-treated with propofol had a decreased maximum Ca^{2+} influx compared to co-treated rats.

Conclusions: Propofol demonstrated neuroprotective effects at lower concentrations when administered prior to OGD injury. This may be partially attributable to the reduction of Ca^{2+} influx against NMDA receptor activation. (Korean J Anesthesiol 2008; 55: 210~6)

Key Words: ischemia-reperfusion injury, N-Methyl-D-Aspartate receptor, propofol.

서 론

뇌허혈은 glutamate와 같은 흥분성 아미노산의 분비를 급격히 증가시킨다.^{1,2)} 이는 glutamate 수용체중 주로는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체를 과도하게 흥분시켜, 신경 세포내 Ca^{2+} 의 농도를 증가시키고 세포사(cell death)에

이르게 한다.³⁻⁶⁾ 재관류 시에도 세포가 손상을 받게 되는데,⁷⁻⁹⁾ Li 등에⁷⁾ 의하면 허혈은 세포 팽창과 neurite 손상 등 약한 정도의 손상과 신경학적 손상 시작 단계만 유발하지만, 비가역적 심한 정도의 손상은 재관류에 의해 나타난다 하였다.

2,3-diisopropylphenol (propofol)은 외래 통원수술에 많이 사용되고 있는 정맥마취제이며, 뇌혈류량 감소,¹⁰⁾ 뇌대사율의 감소¹⁰⁾ 항산화효과,¹¹⁾ N-Methyl-D-Aspartic acid (NMDA) 수용체 길항제로서의 효과,^{12,13)} Na^+ channel-dependent glutamate 분비 억제에 의한 세포외 glutamate 농도의 감소,¹⁴⁾ glutamate 흡수의 증가 등의 기전에 의해 뇌보호 효과가 있다고 알려져 있다.¹⁵⁾ 그러나, 논문에 따라서는 뇌보호 효과를 나타내지 않는다는 보고도 있으며,^{16,17)} 투여 시점에 따른 뇌보호

논문접수일 : 2008년 7월 1일

책임저자 : 이숙영, 경기도 수원시 팔달구 원천동 산5

아주대학교 의과대학 마취통증의학교실, 우편번호: 442-721

Tel: 031-219-4658, Fax: 031-219-5579

E-mail: anesylee@ajou.ac.kr

이 논문은 아주대학교 의료원 대학원 연구과제 3-2005-026-0임.

효과에 대한 보고는 많지 않다.

본 연구는 백서의 신경원 혼합배양 모델에서 산소-혈당 결핍(oxygen-glucose deprivation, OGD)/재관류에 의한 신경세포 손상을 in vitro로 재현하고 여러 가지 농도의 propofol을 허혈자극 전 혹은 허혈자극부터 2시간의 재관류 시까지 계속적으로 첨가하여 이들 약제의 투여 시점에 따른 뇌보호 효과를 살펴보고, fluo-3 AM (Molecular probes, Carlsbad, CA, USA)을 이용한 calcium imaging을 실시하여 허혈-재관류 모델에서 가장 많이 알려진 세포손상 기전인 NMDA 수용체 활성화와 이에 따른 세포내 Ca^{2+} 유입 증가에 propofol 투여 시점이 영향을 미치는지를 살펴보고자 하였다.

대상 및 방법

이 실험은 본 병원 실험실 동물 관리 및 윤리 규정에 따라 행하였다. 몸무게 250-300 g의 임신한지 16일 되는 백서(Sprague-Dawley)를 물과 먹이가 충분히 공급되는 사육실에서 주위 환경에 적응시키며 하루 동안 사육한 후 임신 17일째 제왕절개를 통해 태아를 꺼내어 세포배양 실험을 진행하였다. 실험에 필요한 시료들 중 Eagle's minimum essential medium (MEM), 포도당(glucose), 5% horse serum (HS), 5% fetal bovine serum (FBS), trypan-blue stain은 Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA)로 부터 glutamine, poly-D-lysine, cytosine β -D-arabino-furanoside hydrochloride (Ara C)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로 부터 laminin은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로 부터 구입하였다.

세포배양

실험전 20 mM 포도당, 5% HS, 5% FBS, 2 mM glutamine을 섞은 MEM과 혼합하여 만든 100 μ g/ml의 poly-D-lysine과 4 μ g/ml의 laminin으로 24-well 배양 플레이트와 35 mm 배양 접시를 코팅 처리하였다. 백서를 ether 마취상자에 넣어 마취제를 흡입시켰으며, 호흡이 없어진 것을 확인한 후 꺼내어 경추탈골을 시켰다. 태아를 제왕절개를 통해 꺼낸 후, 20 mM 포도당을 섞은 MEM 용액에 담그고 태아의 뇌피질 부분을 분리하였다. 분리된 뇌피질을 pasteur pipette으로 가볍게 분쇄한 뒤 미리 코팅된 24-well 배양 플레이트에 400 μ l, 35 mm 배양 접시에 2 ml 씩 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 유산소배양기(aerobic chamber)에서 배양하였다. 배양한 세포는 1주 후 glia가 자라나면 20 mM 포도당, 5% HS, 2 mM glutamine을 섞은 MEM 용액과 혼합하여 만든 10 μ M Ara C로 처리하였고, Ara C 처리 후부터 실험 전까지 이를 간격으로 Ara C를 뺀 같은 배양액으로 1/3씩 바꾸어 주었다.

OGD (허혈)-재산소화(재관류) 손상과 약물처리

13일째 혼합 배양된 세포를 사용하였다. 약제를 처치하지 않고 유산소배양기에서 계속 배양시킨 유산소 대조군(대조군)은 35 mm 배양접시의 세포를, 약제를 처치하지 않고 OGD-재관류 자극을 준 무산소 대조군(blank 군), NMDA 500 μ M을 넣고 OGD-재관류 자극을 주어 세포사를 유도시킨 full kill군, propofol 1, 10, 25, 50, 100 μ M을 OGD 자극 1시간 전(전처치군)부터 혹은 OGD 자극 시작부터(동시처치군) 투여하기 시작하여 2시간의 재관류 기간 동안 투여한 약물처리군들은 24-well 배양 플레이트 세포를 사용하였다.

OGD (허혈) 손상은 포도당이 없고, 95% 질소 가스로 30분 동안 기포를 발생시켜 배지(media) 내의 잔여 산소를 제거해준 DMEM (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) 용액으로 배지를 바꾼 후 5분간 무산소배양기에 넣어주는 방법으로 주었다. 재관류는 20 mM 포도당, 5% HS, 2 mM glutamine을 섞은 MEM으로 배지를 바꾸어준 후 산소배양기에서 2시간 동안 배양하는 방법으로 시행하였다. OGD 손상과 재관류 시의 약물 처리는 위의 각각의 배지에 혼합하였다.

살아있는 세포수 측정

재관류 후 10% trypan-blue stain을 15 μ l/well 씩 첨가하여 유산소배양기에서 15분간 배양하여 염색하였다. 이후 eyepiece micrometer square 10 \times 10 grid (Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 염색되지 않은 살아있는 세포수를 세었다. 모든 군은 최소한 3마리의 쥐에서 결과를 얻었으며, 각 well 당 세 구역씩 선정하였고 군당 27구역을 선택하여 well의 중심 부위로부터 겹치지 않게 세포수를 세었다. 각 실험군의 죽은 세포 백분율은 수식 [100 \times (대조군 세포수 - 실험군 세포수/대조군 세포수 - full-kill군 세포수 값)]을 사용하여 구하였다(대조군의 죽은세포 백분율 값을 0으로, full kill군의 죽은세포 백분율 값을 100으로 놓은 것임). SPSS 12.0 (SPSS INC. Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 군 내의 propofol 농도에 따른 세포사망율의 비교, 각 군 간의 최대 Ca^{2+} influx의 비교를 one-way ANOVA test로 실시하였고 사후 검증은 Bonferroni test로 실시하였다. P < 0.05를 유의 있는 것으로 간주하였으며, 값은 평균과 표준편차로 기술하였다.

Calcium imaging

35 mm 배양접시에서 배양한 13일째 세포를 이용하였다. 50 μ M propofol을 100 μ M NMDA 자극 1시간 전부터 혹은 동시에 투여하여 propofol이 세포내로의 Ca^{2+} 유입에 미치는 영향을 살펴보았다.

HCSS buffer [(NaCl 70.1 g, KCl 4 g, MgCl₂ 1.6 g, CaCl₂ 2.6 g, glucose 27 g, HEPES 47.7 g, NaOH 4 g, 증류수 1 L),

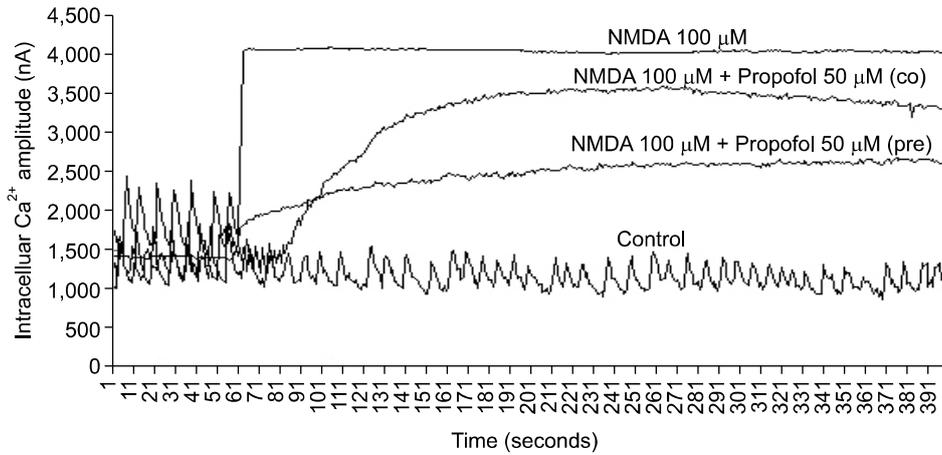


Fig. 1. Figure shows the representative tracings of changes of Ca^{2+} fluorescence in each group. Cells pre-treated (2,713 nA) or co-treated (3,626 nA) with propofol had a decreased maximum Ca^{2+} influx compared to the 100 μ M NMDA (no propofol) group (4,075 nA) ($P < 0.05$). Cells pre-treated with propofol had a decreased maximum Ca^{2+} influx compared to co-treated cells ($P < 0.05$). NMDA 100 μ M: group in which only NMDA 100 μ M (no propofol) was administered during the calcium imaging. NMDA 100 μ M + propofol 50 μ M (co): group in which NMDA 100 μ M + propofol 50 μ M were co-administered during the calcium imaging. NMDA 100 μ M + propofol 50 μ M (pre): group in which propofol 50 μ M were pre-administered for 1 hr and NMDA 100 μ M were administered during the calcium imaging. Control: group in which no drug administered during the calcium imaging.

(증류수로 10배 희석하여 사용)로 3번 씻어낸 후, fluo-3 AM (Molecular probes, Carlsbad, CA, USA) dye를 5 μ M이 되도록 HCSS buffer와 섞어 1.5 ml/dish씩 넣어주고, CO₂ 배양기에서 30분간 배양하였다. 이후 세포를 HCSS buffer로 3번 씻어내었다. HCSS buffer 1 ml 씩 넣어준 후 400배의 Argon laser 렌즈가 부착된 confocal 현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)에서 live cell image로 0초에서 400초까지의 시간 경과에 따른 세포 내의 칼슘이온의 변화를 관찰하였다. 대조군과 NMDA 100 μ M 대조군, propofol 동시처치군은 세포에 각각 HCSS buffer 1 ml, HCSS buffer 1 ml에 NMDA 100 μ M 섞은 용액 혹은 HCSS buffer 1 ml에 NMDA 100 μ M + propofol 50 μ M 섞은 용액을 50초에 주입하여 400초까지 세포의 변화를 촬영하였으며, propofol 전처치군은 propofol 50 μ M을 1시간 전처치한 후 HCSS buffer 1 ml에 NMDA 100 μ M 섞은 용액을 50초에 주입하여 400초까지 세포의 변화를 촬영하였다. 10초 단위로 촬영된 image 내의 세포 중 각 시점에서 유의한 밝기를 보이는 12개 세포를 선택하여 각 시점에서의 Ca^{2+} influx 평균값을 구하였으며, Carl Zeiss laser scanning system LSM 510 (Carl Ziess, Jena, Germany) 프로그램을 이용하여 평균값을 모아 그래프를 얻었다(Fig. 1).

또한, 각 군에서 Ca^{2+} influx 값 최대치에 차이가 있는지 알아보기 위해 각 군에서 가장 큰 Ca^{2+} influx 값을 선택하여 앞서서와 같은 방법으로 통계처리 하였다.

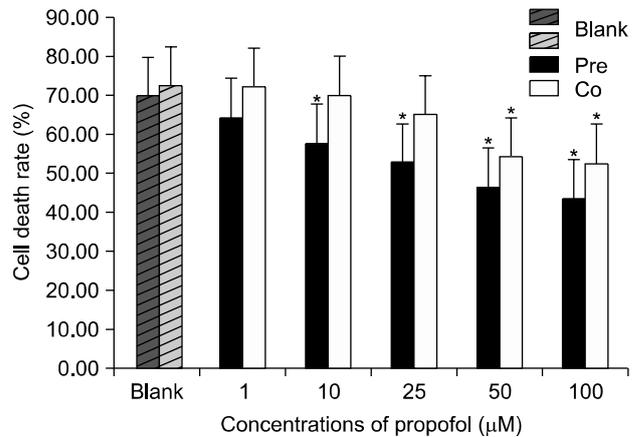


Fig. 2. Figure shows the effect of propofol administration time on cell death rate (CDR, control group cell death value set as 0 and full-kill group cell death value set as 100) during oxygen-glucose deprivation (OGD)-reperfusion injury. Values are mean \pm SD. Number of each group are 27. Cells pre-treated (10–100 μ M) or co-treated (50–100 μ M) with propofol, had a decreased CDR compared to the blank group. Pre-treated propofol decreased the CDR at more lower concentration compared with co-treated propofol. Blank: group in which no drug were treated during the OGD-reperfusion injury. pre: group in which propofol were 1hr pre-treated before OGD to the end of the reperfusion periods. co: group in which propofol were co-treated from the OGD to the end of the reperfusion periods. *: $P < 0.05$ indicates significant differences compared to the blank group.

결 과

5분간의 OGD (허혈), 2시간의 재관류 자극은 71.22% 정도의 세포 사망률을 나타내었다(Fig. 2).

전처치 propofol 1, 10, 25, 50, 100 μM은 각각 64.41%, 57.74%, 52.88%, 46.64%, 43.51%의 세포사망율을 나타내었으며, blank군(69.93%)에 비해 propofol 10-100 μM에서 세포사망율을 의의 있게 감소시켰다(Fig. 2, P < 0.05). 동시 처치 propofol 1, 10, 25, 50, 100 μM은 각각 72.37%, 70.02%, 65.19%, 54.43%, 52.70%의 세포사망율을 나타내어 blank군(72.52%)에 비해 50-100 μM에서 세포사망율을 의의 있게 감소시켰다(Fig. 1, 3, P < 0.05).

세포내 최대 Ca²⁺ influx 수치는 대조군에서 1,921 nA,

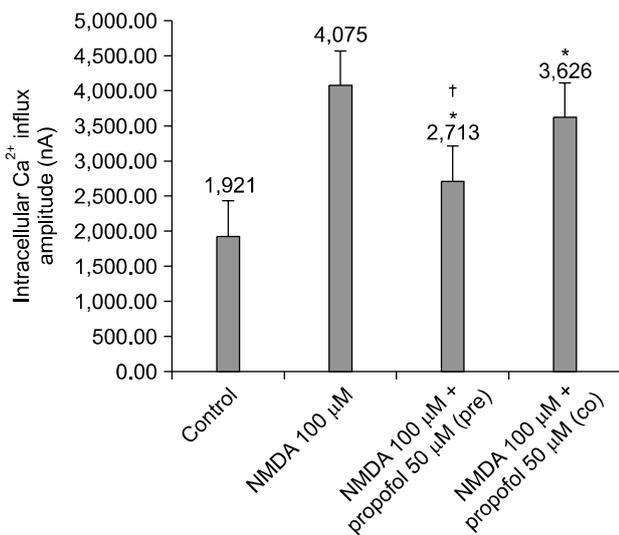


Fig. 3. Figure shows the maximum Ca²⁺ influx amplitude in each group. Values are mean ± SD. Cells pre-treated (2,713 nA) or co-treated (3,626 nA) with propofol had a decreased maximum Ca²⁺ influx compared to the 100 μM NMDA (no propofol) group (4,075 nA)(P < 0.05). Cells pre-treated with propofol had a decreased maximum Ca²⁺ influx compared to co-treated cells (P < 0.05). Control: group in which no drug was administered during the calcium imaging. NMDA 100 μM: group in which only NMDA 100 μM (no propofol) was administered during the calcium imaging. NMDA 100 μM + propofol 50 μM (pre): group in which propofol 50 μM were pre-administered for 1 hr and NMDA 100 μM was administered during the calcium imaging. NMDA 100 μM + propofol 50 μM (co): group in which NMDA 100 μM + propofol 50 μM were co-administered during the calcium imaging, *: P < 0.05 indicates significant differences compared with NMDA 100 μM (no propofol) group. †: P < 0.05 indicates significant differences compared with NMDA 100 μM + propofol 50 μM co-treatment group.

NMDA 100 μM 투여군에서 4,075 nA, NMDA 100 μM + propofol 50 μM 전처치 군에서 2,713 nA, NMDA 100 μM + propofol 50 μM 동시 투여군에서 3,626 nA이었으며, 두 군 모두 NMDA 100 μM 단독 투여군 보다 의의있게 감소하였다(P < 0.05). 또한, 세포내 최대 Ca²⁺ influx 수치는 NMDA 100 μM + propofol 50 μM 전처치군에서 NMDA 100 μM + propofol 50 μM 동시 투여군에 비해서 의의있게 감소하였다(Fig. 1, 3, P < 0.05).

고 찰

본 연구에서 사용한 산소-혈당 결핍(oxygen-glucose deprivation, OGD)과 재산산화 모델은 뇌허혈과 재관류에 의한 신경세포 손상을 in vitro로 재현하는 모델이다.^{18,19)} propofol을 허혈 자극 전 혹은 허혈자극과 동시부터 투여하며 약제의 투여 시점에 따른 뇌보호 효과 차이를 살펴본 결과, 허혈자극 전부터 투여 시 더 낮은 농도부터 뇌보호 효과를 보였다. 또한, propofol을 NMDA 자극 전 투여한 경우 NMDA 자극과 동시에 투여 한 경우보다 최대 Ca²⁺ influx를 더욱 억제하여 세포내 Ca²⁺의 증가로부터 야기되는 손상기전에 효과적으로 작용하였을 것으로 사료되나 세포내 특히 mitochondria 수준에서의 뇌손상에 대한 효과는 본 연구로는 규명할 수가 없었다.

뇌허혈과 재관류에 의한 뇌손상의 주요 기전 중 하나는 신경흥분 독성(excitotoxicity)이며, 과다 분비된 glutamate 등 흥분성 아미노산에 의해 glutamate 수용체들 중 주로는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 과도한 자극으로 인해 신경세포 세포사(neuronal cell death)가 일어나는 것을 의미한다.³⁻⁶⁾

세포외 glutamate의 농도는 접합 분절로의 유리과 glutamate transporter에 의한 흡수의 균형에 의해 유지되고 있다. 뇌허혈 초기에는 접막전 신경이 탈분극화되며 vesicle 내에 저장되어 있던 glutamate가 유리되는 기전에 의해,²⁰⁻²²⁾ 이 후에는 volume sensitive organic anion channels를 통한 Cl⁻의 이동과 동반된 glutamate의 유리,²³⁾ neuron이나 astrocyte에서 Na⁺의 존적으로 작용하는 glutamate transporter의 역작용 등에 의해 세포외로의 glutamate가 급격히 증가한다.^{24,25)} Benveniste 등은¹⁾ in vivo에서 10분간의 허혈 후 glutamate가 8배 증가한다고 보고하였다.

증가된 glutamate는 glutamate 수용체 중 주로 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체를 자극하여 세포 손상을 가져온다. 세포의 Na⁺의 세포내로의 이동과 뒤이은 Cl⁻, 수분의 세포 내로의 이동이 세포 팽창을 일으키는 기전과,²⁶⁾ 세포내로 다량으로 유입된 Ca²⁺이 reactive oxygen species (활성 산소) 생성과 neuronal nitric oxide synthase 등을 활성화시키

는 기전 등에 의해 세포 손상을 일으킨다.²⁷⁻²⁹⁾

재관류에 의해서도 세포손상을 받게 되는데, Li 등은⁷⁾ 재관류에 의해 더 심한 손상이 일어난다 하였다. 재관류 시 세포손상의 기전으로는 활성산소의 생성 등이 보고되고 있으나,^{28,29)} 재관류 초기에는 증가된 glutamate에 의한다는 보고들도 많다. Phillis 등은⁹⁾ 허혈 시작과 함께 glutamate가 급격히 증가하여, 재관류 후 20-30분에 걸쳐 서서히 감소한다 하였으며, Matsumoto 등은⁸⁾ 세포의 glutamate 등의 아미노산들이 허혈 시 5-50배로 급격히 증가하며, 허혈의 강도가 세면 재관류 2-4시간 후 아미노산들은 다시 증가한다고 보고하였다.

본 연구에서는 OGD에 의한 5분간의 in vitro 허혈과 2시간의 재관류 자극을 주었으며, 배양액 내 glutamate 등의 농도를 측정하지 않아 세포사의 기전이 glutamate 등의 아미노산 증가와 관련이 있는지 정확히 알 수는 없으나, 위의 다른 연구 결과들로 미루어보아 세포의 glutamate 증가가 세포사의 원인 중 일부로 추정된다.

Propofol은 in vivo와 in vitro에서 뇌보호 효과를 보고하고 있다.^{12,13,30,31)} Adembri 등은³⁰⁾ in vivo에서 10, 30, 100 μM propofol을 OGD와 재관류 시 투여하여 35-40%의 뇌손상을 줄였으며, Yamakura 등은³¹⁾ 20 μM의(임상사용 가능 농도: ~35 μM) propofol이 NMDA 수용체를 24% 억제한다고 보고하였다. 본 연구에서는 허혈 전부터 propofol 투여 시 10, 25, 50, 100 μM 농도에서 세포사멸율을 대조군의 69.93%에 비해 57.74%, 52.88%, 46.64%, 43.51%로 유의있게 감소시켰으며, 허혈과 동시에 50, 100 μM의 propofol을 투여하여 사망세포율을 대조군의 72.52% 보다 54.43%, 52.70%로 감소시켜 위의 보고와 비슷한 정도의 뇌보호 효과를 보였지만, in vitro 연구에서 in vivo 연구와의 정확한 비교는 어려웠다.

Propofol의 투여시기가 뇌보호에 미치는 효과에 대한 보고는 거의 없다. Adembri 등은³⁰⁾ in vivo에서 24시간 허혈 시작부터 재관류 후 30분간 propofol을 투여하여 뇌경색 면적을 30% 줄였지만, 허혈시작 30분이 경과하여 propofol 투여를 시작한 경우 뇌경색 용적을 줄이지 못하였다 보고하여, 10, 25 μM propofol을 허혈시작 전부터 투여하면 뇌보호 효과가 있었지만 허혈시작 이후로 투여 시점이 늦어진 경우 뇌보호 효과를 나타내려던 더 높은 농도의 propofol이 필요한 본 연구의 결과와 비슷하였다.

Amakawa 등은³²⁾ thiopental을 허혈 전과 후에 주어, 아미노산 분비와 조직학적 예후에 미치는 영향을 살펴본 결과, 허혈 후 투여 시 뇌보호 효과를 위해 더 많은 용량의 thiopental이 필요하며, 허혈 전 투여된 thiopental의 효과는 흥분성 아미노산 분비의 감소에 의한다고 보고하였다. 본 연구에서는 propofol을 허혈자극 동시부터 투여한 경우 허혈

자극 전부터 투여한 경우 더 높은 용량이 요구되었으며(10 μM vs 50 μM), glutamate 등의 농도는 측정하지 않았다.

세포의 증가된 glutamate에 의한 NMDA 수용체 활성화와 세포내로의 Ca²⁺의 유입, 이에 따른 일련의 반응에 의해 세포 손상이 오는데, Choi 등은⁵⁾ 세포손상에서 Ca²⁺ 유입의 양과 속도가 세포손상의 종류를 결정한다 하였다.

Grasshoff 등은³³⁾ 백서의 피질 신경원에서 calcium imaging 시작과 동시에 propofol 0.1-100 μM을 투여하고, 180초 후에 300 μM NMDA 자극을 주며, propofol이 세포내 Ca²⁺ influx에 미치는 영향을 살펴보았는데, 10 μM 이상의 propofol이 Ca²⁺ influx를 유의있게 감소시켜 propofol의 뇌보호 효과의 기전 중 하나라고 하였으며, 100 μM의 고농도 propofol도 Ca²⁺ influx의 50% 정도만 감소시킨다고 하였다. 본 연구에서는 이들과 달리 propofol의 투여 시점을 달리 하며, 전 처치 혹은 동시 처치에서 모두 세포사멸 감소에 효과가 있었던 농도인 propofol 50 μM 을 투여하며 실험하였는데, 100 μM NMDA 대조군, 50 μM propofol 1시간 전 처치 + NMDA 100 μM 을 투여한 전 처치군, 50 μM propofol + NMDA 100 μM 동시 처치군에서 각각 최대치 4,075 nA, 2,713 nA, 3,626 nA의 calcium influx를 일으켜, propofol 전 혹은 동시 투여 시 Ca²⁺ influx 최대치가 유의있게 감소하였으며, 전투여는 동시투여에 비해서도 Ca²⁺ influx를 유의있게 감소시켜, propofol 투여시점이 의미가 있었다.

NMDA 수용체 중 NR1 subunit이 NMDA 수용체의 기능에 중요한 역할을 하며, phosphorylation은 glutamatergic transmission을 강화시킨다. Kingston 등은³⁴⁾ 신경세포에서 propofol 농도가 증가할수록, propofol의 전 처치 시간이 길어질수록 NR1 subunit의 phosphorylation이 더 많이 감소한다고 하였으며, 100 μM propofol을 15분간 전처치하여 NR1의 phosphorylation이 억제된 상태에서 100 μM NMDA 투여 시 세포내 calcium 증가가 감소함을 보고하였다. 본 연구에서는 허혈 자극 전에 propofol을 1시간동안 전 처치하였을 때 더 낮은 농도에서 뇌보호 효과가 있었으며, propofol 전 처치는 동시 처치 보다 NR1 subunit phosphorylation과 calcium 유입을 더 많이 억제시켜 propofol 투여시기에 따른 뇌보호 효과가 차이 나는 이유로 제시될 수 있겠으나, NR1 subunit의 phosphorylation 억제 정도 등에 대한 연구는 실시하지 않았다.

백서의 신경원 혼합배양 모델에서 허혈/재관류에 의한 신경세포 손상을 in vitro로 재현하고 여러 가지 농도의 propofol을 허혈 자극 전 혹은 허혈자극과 동시부터 투여하며 약제의 투여 시점에 따른 뇌보호 효과 차이를 살펴보았는데, 허혈자극 전부터 투여 시 더 낮은 농도부터 뇌보호 효과를 보였다(10 μM vs 50 μM). Propofol을 NMDA 자극 전에 투여함으로써 Ca²⁺의 최대 influx를 더욱 효과적으로 낮추는 것이 하나의 기전으로 제시될 수 있겠으나, 향후

propofol이 NR1 subunit의 phosphorylation에 미치는 영향에 대한 연구들이 추가로 이루어져야겠다.

참 고 문 헌

1. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984; 43: 1369-74.
2. Calò G, Sbrenna S, Bianchi C, Beani L: Immediate and delayed effects of in vitro ischemia on glutamate efflux from guinea-pig cerebral cortex slices. *Brain Res* 1997; 751: 300-6.
3. Rothman SM, Olney JW: Glutamate and the pathophysiology of hypoxic ischemic brain damage. *Ann Neurol* 1986; 19: 105-11.
4. Choi DW, Rothman SM: The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci* 1990; 13: 171-82.
5. Choi DW: Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992; 23: 1261-76.
6. Rothman S: Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitters mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci* 1984; 4: 1884-91.
7. Li D, Shao Z, Vanden Hoek TL, Brorson JR: Reperfusion accelerates acute neuronal death induced by simulated ischemia. *Exp Neurol* 2007; 206: 280-7.
8. Matsumoto K, Lo EH, Pierce AR, Halpern EF, Newcomb R: Secondary elevation of extracellular neurotransmitter amino acids in the reperfusion phase following focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 114-24.
9. Phillis JW, O'Regan MH: Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurochem Int* 2003; 43: 461-7.
10. Kochs E, Hoffmann WE, Werner C, Thomas C, Albrecht RF, am Esch JS: The effects of propofol on brain electrical activity, neurologic outcome and neuronal damage following incomplete ischemia in rats. *Anesthesiology* 1992; 76: 245-52.
11. Murphy PG, Myers DS, Davies MJ, Webster NR, Jones JG: The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). *Br J Anaesth* 1992; 68: 613-8.
12. Hans P, Bonhomme V, Collette J, Albert A, Moonen G: Propofol protects cultured rat hippocampal neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate toxicity. *J Neurosurg Anesthesiol* 1994; 6: 249-53.
13. Orser BA, Bertlik M, Wang LY, MacDonald JF: Inhibition by propofol (2,6 di-isopropylphenol) of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptor in cultured hippocampal neurones. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 1761-8.
14. Ligamaneni R, Birch ML, Hemmings HC Jr: Widespread inhibition of sodium channel-dependent glutamate release from isolated nerve terminals by isoflurane and propofol. *Anesthesiology* 2001; 95: 1460-6.
15. Velly LJ, Guillet BA, Masmajeun FM, Nieoullon AL, Bauder NJ, Gouin FM, et al: Neuroprotective effects of propofol in a model of ischemic cortical cell cultures: role of glutamate and its transporters. *Anesthesiology* 2003; 99: 368-75.
16. Shibuta S, Varathan S, Inoue T, Shimizu T, Varathan V, Tomi K, et al: The effects of propofol on NMDA or nitric oxide mediated neurotoxicity in vitro. *Neuroreport* 2001; 12: 295-8.
17. Zhu H, Cottrell JE, Kass IS: The effect of thiopental and propofol on NMDA- and AMPA-mediated glutamate excitotoxicity. *Anesthesiology* 1997; 87: 944-51.
18. Goldberg MP, Weiss JH, Pham PC, Choi DW: N-methyl-D-aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 243: 784-91.
19. Tabor MP, Van der Worp HB, Sooda P, Veldman H, Joosten EA, Strous G, et al: An advanced in vitro model to study hypoxia/low glucose-induced neuronal cell damage and death. *Ann NY Acad Sci* 1997; 825: 267-78.
20. Drejer J, Benveniste H, Diemer NH, Schousboe A: Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J Neurochem* 1985; 45: 145-51.
21. Katayama Y, Kawamata T, Tamura T, Hovda DA, Becker DP, Tsubokawa T: Calcium-dependent glutamate release concomitant with massive potassium flux during cerebral ischemia in vivo. *Brain Res* 1991; 558: 136-40.
22. Fujimoto S, Katsuki H, Kume T, Kaneko S, Akaike A: Mechanisms of oxygen glucose deprivation-induced glutamate release from cerebrocortical slice cultures. *Neurosci Res* 2004; 50: 179-87.
23. Phillis JW, Song D, O'Regan MH: Inhibition by anion channel blockers of ischemia-evoked release of excitotoxic and other amino acids from rat cerebral cortex. *Brain Res* 1997; 758: 9-16.
24. Roettger V, Lipton P: Mechanism of glutamate release from rat hippocampal slices during in vitro ischemia. *Neurosci* 1996; 75: 677-85.
25. Rossi DJ, Oshima T, Attwell D: Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 2000; 403: 316-21.
26. Rothman SM: The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci* 1985; 5: 1483-9.
27. Gunasekar PG, Kanthasamy AG, Borowitz JL, Isom GE: NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implications for cell death. *J Neurochem* 1995; 65: 2016-21.
28. Li C, Jackson RM: Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C 227-41.
29. Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR: Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci* 2007; 27: 1129-38.
30. Adembri C, Venturi L, Tani A, Chiarugi A, Gramigni E, Cozzi A, et al: Neuroprotective effects of propofol in models of cerebral ischemia: inhibition of mitochondrial swelling as a possible mechanism. *Anesthesiology* 2006; 104: 80-9.
31. Yamakura T, Sakimura K, Shimoji K, Mishina M: Effects of propofol on various AMPA-, kainate- and NMDA-selective glutamate receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes.

- Neurosci Lett 1995; 188: 187-90.
32. Amakawa K, Adachi N, Liu K, Ikemune K, Fujitani T, Arai T: Effects of pre- and postischemic administration of thiopental on transmitter amino acid release and histologic outcome in gerbils. *Anesthesiology* 1996; 85: 1422-30.
33. Grasshoff C, Gillessen T: Effects of propofol on N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium increase in cultured rat cerebrocortical neurons. *Eur J Anaesthesiol* 2005; 22: 467-70
34. Kingston S, Mao L, Yang L, Arora A, Fibuch EE, Wang JQ: Propofol inhibits phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunits in neurons. *Anesthesiology* 2006; 104: 763-9.
-