

# The Effect of Combination Treatment of Melatonin and Hypothermia on Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats

Jae Hyun Park, M.D., Chun Soo Kim, M.D.\*, Sang Lak Lee, M.D.\*, and Seong Ryong Lee, M.D.†

Department of Pediatrics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Departments of Pediatrics\* and Pharmacology†, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

## ABSTRACT

**Purpose:** Melatonin is a naturally occurring hormone produced by the pineal gland. Melatonin has many pharmacological effects in different tissues or organs. Melatonin is especially known to have antioxidant and neuroprotective effects. Hypothermia is a therapeutic tool against hypoxia-ischemia (HI) of the brain. This study examines the effect of combined therapy using melatonin and hypothermia in neonatal rats with HI.

**Methods:** Seven-day old rats were subjected to HI and randomized into four groups : vehicle, melatonin alone, vehicle and hypothermia, and melatonin and hypothermia. Melatonin (30 mg/kg) was intraperitoneally administered in two doses: immediately following HI, and 24 h later. Hypothermia consisted of whole-body cooling (3 hours, 27°C). Sham-treated animals not subjected to HI were also studied. P10, P14, and P35 rats were sacrificed for experiments.

**Results:** Vehicle-treated P10 rats increased in brain infarction compared to controls in TTC staining study. And also, P35 rats decreased in brain volume of injured hemisphere in H&E stain. Melatonin or hypothermia alone did not show any protective effect against HI. However, a combination of melatonin and hypothermia effectively reduced the brain injury. In addition, the results of in situ zymography, TUNEL assay and immunofluorescence studies showed that neuroprotective effects were achieved only with combined therapy.

**Conclusion:** Melatonin may contribute to synergistic effects to neuroprotection of hypothermia on brain damage after HI.

**Key Words:** Melatonin, Hypothermia, Hypoxia-ischemia

## 서론

저산소 허혈은 여러 장기에 산소가 부족하거나 혈류가 줄어들어 발생하는 현상으로 신생아에 있어서 뇌손상의 흔한 원인이 된다. 신생아 저산소 허혈은 신생아기 뇌손상의 중요한

Received: 9 February 2014

Revised: 24 February 2014

Accepted: 28 February 2014

Correspondence to:

Chun Soo Kim, M.D.

Department of Pediatrics,  
Keimyung University School of  
Medicine, 56 Dalseong-ro, Jung-  
gu, Daegu 700-712, Korea

Tel: +82-53-250-7526

Fax: 82-53-250-7783

E-mail: cskim@dsmc.or.kr

Copyright(c)

By Korean Society of Neonatology.

All right reserved.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

인자이며, 아기가 성장하면서 뇌성 마비, 학습장애, 시각 장애, 그리고 뇌전증을 일으킬 수 있다<sup>1)</sup>. 기전적으로는 뇌의 저산소 허혈에 의한 손상에 있어 여러 단계의 생화학적 과정을 거치며 미토콘드리아 기능 이상, 산화 스트레스, 염증반응, 그리고 세포사의 결과를 초래한다<sup>2)</sup>. 보고에 따르면 만삭으로 출생한 신생아에 있어 저산소 허혈에 의한 뇌손상은 1,000명 당 1-4명의 빈도를 보인다<sup>3)</sup>. 따라서 전 세계적으로 중요한 의학적 문제임에 틀림없고 많은 손상 억제에 위한 노력들이 진행되어 오고 있다. 지난 20여년간의 실험적 연구와 임상시험을 통하여 저체온요법이 신생아의 뇌손상을 줄이는데 도움이 되는 것으로 알려졌다<sup>4-6)</sup>. 실험동물을 이용한 다수의 실험연구에서 저체온요법은 저산소 허혈 뇌손상에 대해 신경세포의 손상을 줄이고, 증상 호전에 도움이 되었다<sup>7-9)</sup>. 저체온요법은 뇌 대사를 감소로 유도하며, 고에너지 인화합물의 결핍을 막고 허혈성 뇌손상의 병태생리와 관련된 다양한 기전에 관여해서 뇌 보호작용을 한다고 알려져 있으나 중증 뇌손상 등에 대해서는 제한적인 치료효과를 보이는 실정이다<sup>10)</sup>. 따라서 저체온요법 단독보다는 약물 투여와 병용하여 치료 가능 시간의 확장이나 유효한 치료효과를 높이려는 시도를 하고 있다<sup>11)</sup>. 지금까지 병용요법에 대한 보고는 제한적인데, 예를 들어 저체온요법과 caspase 억제제 또는 MK-801의 병용요법 등이 그 예이다<sup>12,13)</sup>.

Melatonin은 포유류의 송과샘에서 분비되는 호르몬으로 산화 스트레스를 억제하고, 면역을 강화시키며, 노화를 억제한다고 알려져 있다<sup>14-16)</sup>. 여러 연구에서 melatonin은 신경 보호작용을 가지는 것으로 알려져 있는데, 뇌허혈 동물 모델에서 melatonin 투여가 허혈성 뇌신경세포 손상을 억제하였으며, 신생아 저산소 허혈 뇌손상에 대한 보호작용도 보고되었다<sup>17,18)</sup>. Melatonin이 matrix metalloproteinase (MMP)의 활성을 억제하는데, 허혈 뇌신경손상에 MMP가 중요하게 작용한다는 사실에 근거하여 melatonin이 저산소 허혈 뇌손상에 어떠한 영향을 미칠 것으로 생각된다<sup>19)</sup>. MMP는 중추신경계에서 정상적 생리적 기능은 물론, 병태생리적 진행 과정에 있어 기저막과 세포 외 기질의 파괴에도 관여하는데, 특히 gelatin을 파괴시킬 수 있어 gelatinase로도 알려진 MMP-2와 MMP-9이 저산소 허혈 뇌손상에서 혈액-뇌 장벽의 파괴, 혈관성 뇌부종, 뇌출혈 등의 뇌신경손상 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>20,21)</sup>.

이 연구는 신생쥐에서 유발시킨 저산소 허혈 뇌손상에 대해 melatonin과 저체온치료의 병용요법이 부가적인 뇌 보호작용을 나타내는지 알아보고 저체온요법의 치료적 한계가 약물 병용요법으로 극복될 수 있는지 알아보고자 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험동물

1주령의 Sprague-Dawley 중 신생 쥐(체중 16-18 g, Koatech-Harlan, Korea)를 실험에 사용하였다. 출생 전 임신 상태의 암컷을 구입 후 환경에 적응시킨 다음 분만 후 7일째 신생 흰쥐를 실험에 이용하였다. 사육실은 12시간 간격으로 명암이 조절되며, 실내 온도를  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 일정하게 유지하였다. 실험 프로토콜과 모든 실험과정은 계명대학교 의과대학 실험동물 윤리위원회의 승인을 받았다(승인번호: KM-2013-69).

### 2. 저산소 허혈 뇌손상의 유발

$\text{N}_2\text{O}$  (70%) 및  $\text{O}_2$  (30%)와 함께 isoflurane 마취(마취유도 시 3% 및 마취유지 시 1.5%) 하에서 뇌손상을 유발하기 위한 수술을 실시하였으며, 목 부분의 피부를 상하로 절개하여 우측 총경동맥을 노출시켜 주변 신경과 조직으로부터 분리한 후 6-0 silk 봉합사로 결찰하는 방법으로 일측 대뇌 반구의 허혈을 유발하였으며, 수술 직후 모체가 있는 케이지로 옮겨 1시간 동안 회복시켰다. 이후 단계인 저산소 손상은  $37^\circ\text{C}$ 로 유지되는 수조 안에 아크릴 박스를 넣고, 박스 안에 실험 쥐를 두고 8% 산소 및 92% 질소로 구성된 혼합 가스를 양압상태에서 흘려주는 방법으로 실험동물을 저산소 환경에 90분간 두었다.

### 3. 약물 투여 및 저체온치료

실험 프로토콜은 두 가지로 구성되며, 프로토콜 I은 저산소 허혈 뇌손상 후 약물 내지 vehicle (5% ethanol) 투여 및 저체온요법을 실시한 것이며, 프로토콜 II는 뇌손상 후 약물 내지 vehicle을 투여하였으나 저체온요법은 실시하지 않은 것이다(Figure 1). 저산소 허혈 뇌손상 후 실험쥐를 다시 케이지에 옮기고, 15분 경과 후 약물이나 vehicle을 투여하였으며 총 1시간 회복시켰다. Tai 등<sup>22)</sup>은 실험쥐에 사용한 melatonin의 용량이 15-50 mg/kg에서 효과적이었는데, 100% ethanol에 melatonin (Sigma, Korea)을 녹인 후 증류수를 첨가하여 5% ethanol 수준으로 희석 시켜, 30 mg/kg 용량으로 복강 내 투여하였으며, 수술 24시간 후 1회 추가 투여하였다. 저체온치료는  $27^\circ\text{C}$  환경에서 3시간 시행하였다. 정상 대조군에 실험군과 동일한 양의 5% ethanol을 동일한 일정으로 투여하였다.

### 4. 실험군

각 군당 실험쥐는 8마리이며, 실험군의 구성은 다음과 같다. (1) 정상 대조군(sham-operated control group) - P10 (수술 3일 후 희생), P14 (수술 7일 후 희생) 및 P35 (수술 4주 후 희생): 저산

소 허혈 뇌손상을 유발하지 않은 군 (2) Vehicle 투여 저산소 허혈군 (vehicle-treated hypoxic-ischemic group) - P10, P14 및 P35 : 저산소 허혈군으로 vehicle을 투여한 군 (3) melatonin 투여 저산소 허혈군 (melatonin-treated hypoxic-ischemic group) - P10, P14 및 P35 : 저산소 허혈군으로 melatonin를 투여한 군 (4) Vehicle 및 저체온치료 저산소 허혈군 (vehicle and hypothermia-treated hypoxic-ischemic group) - P10, P14 및 P35 : 저산소 허혈군으로 vehicle 투여와 저체온치료를 실시한 군 (5) melatonin 및 저체온치료 저산소 허혈군 (melatonin and hypothermia-treated hypoxic-ischemic group) - P10, P14 및 P35 : 저산소 허혈군으로 melatonin 투여와 저체온치료를 실시한 군

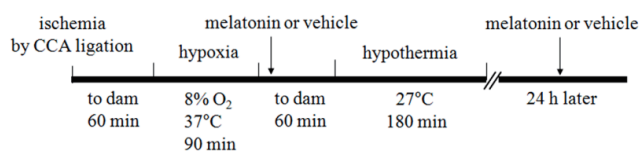
## 5. 뇌손상의 조직학적 검사

저산소 허혈 뇌손상 3일 후 P10 실험쥐의 경부를 절단한 후 희생시키고 두개골에서 뇌를 꺼내어 얼음으로 냉각 시킨 식염수에 5분간 냉각시킨 후 brain matrix를 사용하여 1 mm 두께의 관상절편을 6개 제작하여, 2% 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) 용액으로 37°C에서 30분간 빛을 차단한 상태로 염색하여, 디지털 카메라로 이미지를 얻은 후 Image J 프로그램(version 1.45, <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>에서 다운로드)을 사용하여 경색부위의 크기를 측정하였다.

저산소 허혈 뇌손상 4주 후 P35 실험쥐를 isoflurane으로 깊이 마취시키고, 좌심실을 통해 냉각 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 관류시켰다. 경부를 절단한 후 두개골에서 뇌를 꺼내어 즉시 냉각시켰으며, cryostat (MVE, Germany)를 사용하여 14  $\mu$ m 두께의 관상 뇌절편을 유리 슬라이드에 부착시켜 샘플 슬라이드를 제작하였다. 관상 뇌절편 슬라이드는 formalin에

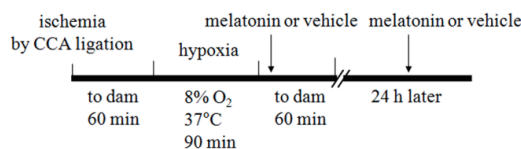
### • Protocol I.

#### Ischemia-hypoxia with hypothermia



### • Protocol II.

#### Ischemia-hypoxia without hypothermia



**Figure 1.** Diagram shows the protocol I and II for experimental processes. Start points of timelines mean the end of surgery and general anesthesia. Abbreviation: CCA, common carotid artery.

30분 가량 고정시킨 후 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실시하였고, 뇌손상 정도는 광학현미경과 디지털 카메라로 영상을 얻은 후 검사하였다. Image analyzer로 손상 측 대뇌반구 면적을 측정한 후 대조 대뇌반구의 면적에 비해 위축된 정도를 조사하였다.

## 6. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) 검사

저산소 허혈 뇌손상과 관련된 세포자멸사 과정을 보기 위하여 DNA 분절을 확인할 목적으로 TUNEL 염색 키트(Roche Diagnostic, USA)를 사용하였으며, 사용자 protocol에 준하여 실험을 실시하였다. 간단히 기술하면, 저산소 허혈 뇌손상 유발 수술 후 실험쥐의 심장을 통해 PBS로 재관류한 후 두개골에서 뇌를 신속히 제거 후 2-methylbutane과 액체 질소를 이용하여 급속 냉각시켰다. Cryostat로 뇌조직을 14  $\mu$ m 두께로 잘라 관상 뇌절편을 제작하고, 10% formalin으로 고정시킨 후 PBS로 3회 세척한 다음 TUNEL 반응용액을 뇌조직에 처리한 후 diaminobenzidine 기질 용액을 처리하여 발색반응 후 현미경으로 관찰하였다.

## 7. In situ zymography

*In situ* zymography 기법은 조직 절편에서 MMP-9와 MMP-2의 효소활성의 구분은 불가하나, 조직상에서 효소의 활성 변화 및 위치를 알 수 있다. 심장을 통해 PBS로 관류한 후 뇌조직을 고정시키지 않고 신속히 제거 후 2-methylbutane과 액체 질소로 급속 냉각시켰다. Cryostat로 조직을 14  $\mu$ m 두께로 절편을 만든 후 키트 (Enz-Check kit, Invitrogene, USA)를 이용해 37°C 조건으로 배양기 내에서 약 18시간 반응시킨 다음, 형광현미경으로 관찰하였다<sup>23</sup>. 뇌절편상의 gelatinase에 의해 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 부착된 gelatin이 파괴될 때 FITC 형광이 검출된다. 이 기법은 각 위치에 분포된 gelatinase의 활성 증감과 정확한 조직학적 위치를 알 수 있다.

## 8. 면역형광법

저산소 허혈 뇌손상 유발 후 4주 경과한 P35 실험쥐를 희생시켰다. Isoflurane으로 깊이 마취시킨 후, 흉곽을 열고 좌심실을 통해 PBS 용액을 관류하여 혈액을 제거한 후, 이어서 4% paraformaldehyde를 흘려주어 뇌를 고정시켰다. 두개골에서 뇌를 신속히 꺼내어 동일한 고정액으로 4°C 조건에서 추가 고정시키고 각각 15% 및 30% sucrose 용액에 24시간씩 처리하여 냉각손상을 방지하였다. Cryostat로 20  $\mu$ m 두께로 절편을 잘라 유리 슬라이드에 부착해 실험 때까지 deep freezer에 보관하였다. 0.3% Triton X-100과 3% 정상 염소 혈청(normal goat serum)을 포함하는 PBS로 blocking한 후 뇌조직 슬라이드에 1차 항체, 즉 anti-neuronal nuclear antigen (NeuN) (1:100, Millipore, USA) 혹은 anti-glial

fibrillary acidic protein (GFAP) (1:200, Millipore, USA)를 반응 용액에 적용시킨 후, 4°C에서 약 18시간 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 세척한 후 2차 항체인 anti-mouse tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate (TRITC) (1:100; Jackson Immuno-Research, USA)를 포함한 용액을 슬라이드에 적용한 후 30분간 반응을 시킨 다음 PBS로 3회 세척 후 물기를 제거 한 후 Vectorshield (Vector laboratories, USA)를 점적하고 커버 슬라이드를 덮은 후 형광현미경으로 관찰하며 촬영하였다.

## 9. 통계 분석

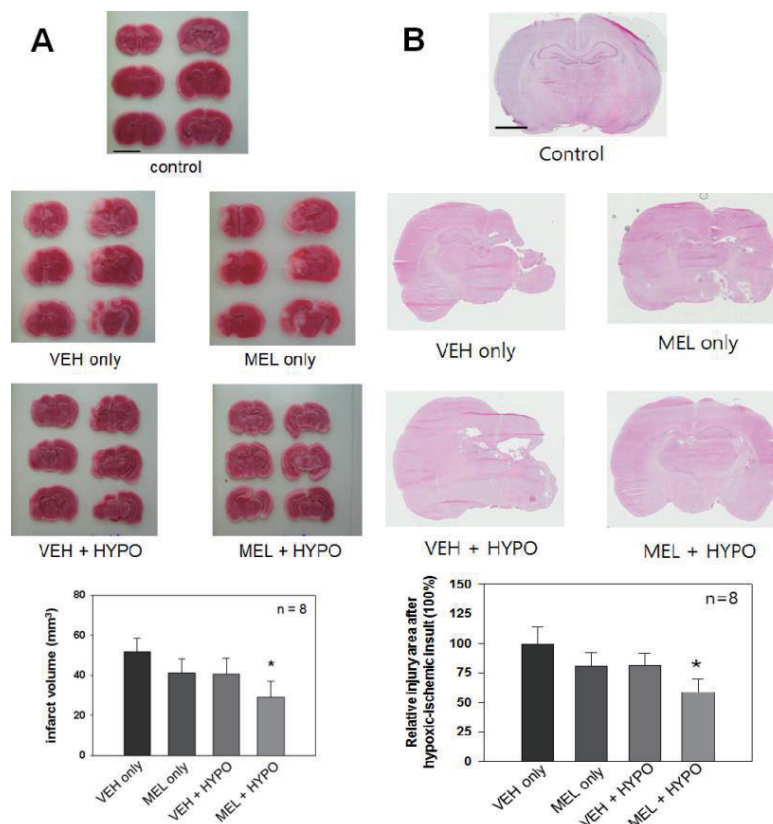
본 실험의 결과 분석에 있어 melatonin 및 저체온요법에 의한 신경 보호작용을 알아보기 위해 조직학적 결과의 유의성을 검증하기 위해 일측 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)

를 실시하였고 Tukey 사후 검증을 실시하였다.  $P$  값이 0.05 미만 일 때 통계학적으로 의의가 있다고 평가하였다.

## 결과

### 1. 뇌손상의 조직학적 검사 결과

저산소 허혈 손상에 의한 뇌경색을 관찰하기 위해서 TTC 염색을 실시하였다. 뇌손상 후 3일 경과한 P10 실험쥐에서 뇌를 취하여 절편을 만든 후 관찰한 결과, vehicle 투여군에서 뇌경색부위가 현저하게 관찰되었고 이에 대해 melatonin 투여나 저체온요법 단독으로는 경색 크기를 줄이는 경향이 있었으나 통계학적 유의성은 없었다. 그러나 melatonin과 저체온치료의 병용요법을 실시한



**Figure 2.** Histological analysis of brain damage in neonatal rats with hypoxia-ischemia. (A) Representative sections of the brain stained with triphenyltetrazolium chloride (TTC) showing infarction areas in P10 rats; combination therapy of melatonin and hypothermia significantly reduced infarct volume of brain. (B) Findings of brain damage using H&E staining in P35 rats; combined therapy of melatonin and hypothermia significantly reduced the damaged area of ipsilateral hemisphere. Scale bar=5 mm. Abbreviations: Control, sham-operated control group; VEH only, vehicle-treated group; MEL only, melatonin-treated group; VEH+HYPO, vehicle and hypothermia-treated group; MEL+HYPO, melatonin and hypothermia-treated group. \* $P < 0.05$  vs. VEH only.



군( $29.22 \pm 7.99 \text{ mm}^3$ )에서 뇌경색 부위가 vehicle 투여군( $51.71 \pm 6.93 \text{ mm}^3$ )에 비해 유의하게 줄었다( $P < 0.05$ , Figure 2A).

수술 후 4주 경과한 P35 실험쥐를 대상으로 H&E 염색을 실시하여 손상측 대뇌반구의 위축을 관찰하여 손상여부 및 보호방편의 효과를 보고자 하였다. 정상 대조군에 비해 vehicle 투여군( $100 \pm 14.71\%$ )에서 대뇌반구의 현저한 위축이 관찰되었고, 이는 melatonin이나 저체온요법 단독으로는 별 변화가 나타나지 않았다. 그러나, melatonin 및 저체온치료 병합요법군의 대뇌반구의 위축 정도는  $58.75 \pm 10.92\%$ 로 유의하게 감소하였다( $P < 0.05$ , Figure 2B).

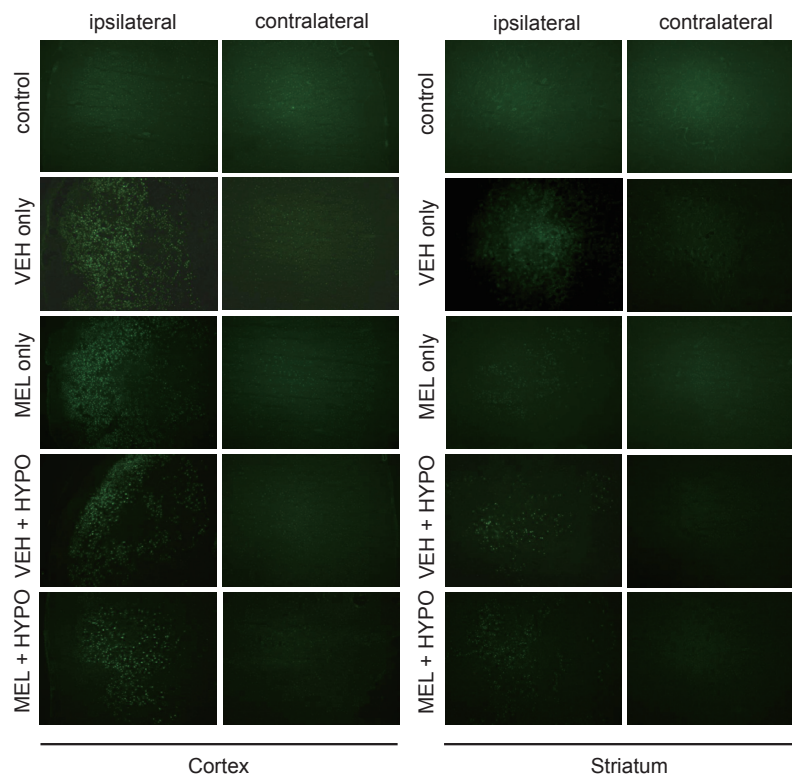
## 2. In situ zymography 결과

뇌손상 유발 1주일 후 희생시킨 P14 실험쥐에서 대뇌겉질에서 관찰한 gelatinase 활성은 현저히 증가되었으며 이는 주로 분포하는 신경세포의 위치에서 활성이 나타나는 것으로 보여진다. 손상 시 증가된 효소 활성에 대해 melatonin 혹은 저체온치료 단독으로

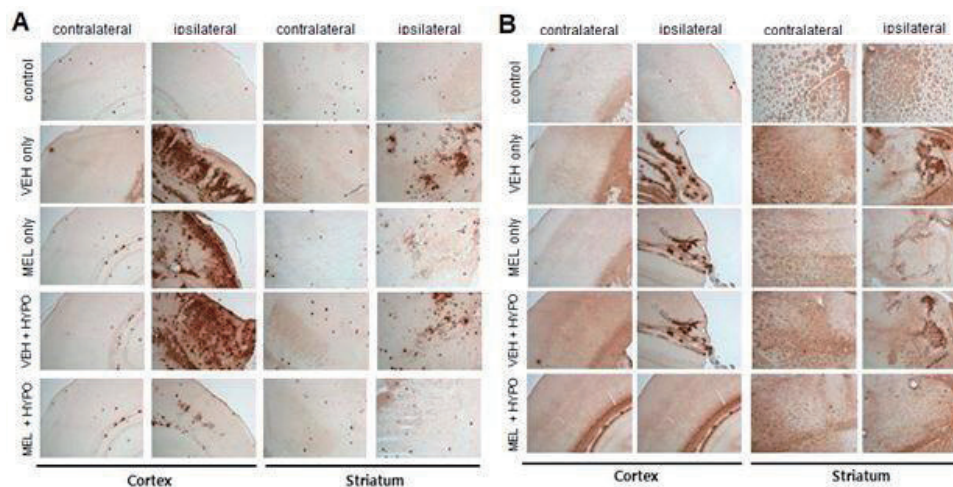
는 변화가 없었으며, 병용 처치에 의해 효소 활성이 줄어드는 양상이었다. P14 실험쥐의 줄무늬체에서 gelatinase 활성을 관찰한 결과 비손상측에 비해 현저히 증가되었으며 이 역시 줄무늬체 영역에 주로 분포하는 신경세포 위치에서 활성이 나타나는 것으로 보여진다. 대뇌겉질과 마찬가지로 손상 시 증가된 효소 활성에 대해 melatonin 혹은 저체온치료 단독으로는 변화가 없었으며, 병용요법에 의해 효소 활성이 줄어드는 양상이었다(Figure 3).

## 3. TUNEL 염색 결과

저산소 허혈 뇌손상을 받은 신생쥐의 대뇌겉질과 줄무늬체에서 각각 TUNEL 염색 양성세포를 관찰하였다(Figure 4). P14 실험쥐에서 Melatonin 혹은 저체온치료 단독으로는 TUNEL 염색 양성 신경세포 수에 영향을 주지 않았으나 병용요법에 의해 TUNEL 염색 양성 신경세포 수가 줄어들었고(Figure 4A), P35 검체 역시 병용치료군에서 TUNEL 염색 양성 세포가 감소하는 경향을 보였다



**Figure 3.** *In situ* zymography in the brain after hypoxia-ischemia (HI) in P14 rats. Sham-operated control group showed very weak gelatinase activity. After HI, gelatinase activity was increased in ipsilateral sides of cortex and striatum compared to contralateral sides. Melatonin or hypothermia did not reduce gelatinase activity. Combined therapy of melatonin and hypothermia reduced gelatinase activity. Scale bar=500  $\mu\text{m}$ . Abbreviations: Control, sham-operated control group; VEH only, vehicle-treated group; MEL only, melatonin-treated group; VEH+HYPO, vehicle and hypothermia-treated group; MEL+HYPO, melatonin and hypothermia-treated group.



**Figure 4.** Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay in neonatal rats with hypoxia-ischemia (HI). (A) Sham-operated control group showed no TUNEL positive cell. After HI, TUNEL-staining positive cells were increased in ipsilateral sides of cortex and striatum compared to contralateral sides. Melatonin or hypothermia did not reduce TUNEL-positive cells. Combined therapy of melatonin and hypothermia reduced TUNEL-positive cells in P14 rats. (B) Also TUNEL-positive cells were reduced only with combined therapy in P35 rats. Scale bar=500  $\mu$ m. Abbreviations: Control, sham-operated control group; VEH only, vehicle-treated group; MEL only, melatonin-treated group; VEH+HYPO, vehicle and hypothermia-treated group; MEL+HYPO, melatonin and hypothermia-treated group.

(Figure 4B).

#### 4. 면역형광법 염색 결과

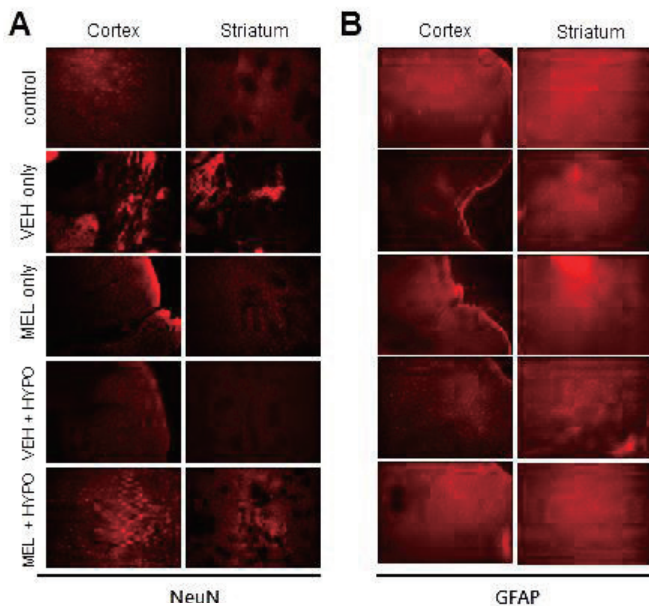
저산소 허혈 손상에 민감한 부위인 대뇌겉질과 줄무늬체에서 신경세포의 특이 단백질 NeuN 발현을 관찰하였다. 해당 부위의 NeuN 발현은 정상 대조군에 비해 저산소 허혈 뇌손상 후 현저히 감소하였다. 이는 손상에 의한 신경세포의 소실을 의미한다. Vehicle 투여군에 비해서 melatonin 혹은 저체온치료 단독에 의해 변화가 없었으나, melatonin 및 저체온치료의 병합요법에 의해 NeuN 발현이 증가되어 신경세포 손상이 줄어들었다(Figure 5A). GFAP는 뇌에 존재하는 별아교세포의 특이 단백질로 뇌손상 시 반응성으로 발현이 증가하는 양상을 보인다. 대뇌겉질과 줄무늬체에서 GFAP 발현이 대조군에 비해 저산소 허혈 뇌손상 후 현저히 증가하였다. 이는 신경세포의 소실을 나타내며 vehicle 군에 비하여 melatonin 혹은 저체온치료 단독에 의해 변화가 없었으나, melatonin 및 저체온치료의 병합요법에 의해 GFAP 발현이 감소된 것으로 보아 뇌손상이 줄어들었음을 알 수 있었다(Figure 5B).

#### 고찰

이 연구에서는 신생쥐를 이용하여 저산소 허혈에 의해 유발된 뇌손상에 대해서 melatonin 투여와 저체온치료의 병용요법이 뇌

조직 손상을 억제하였음을 보여주고 있다. 뇌손상의 치료에 사용된 melatonin이나 저체온요법 모두 뇌신경 보호작용의 가능성을 가지고 있으나, 이 연구 모델에서는 단독 적용으로는 유의한 보호작용을 보이지 않았다.

Melatonin은 신경 보호작용을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 특히 성체 흰쥐나 마우스의 뇌허혈 모델에서 보호작용을 나타내는 것으로 알려져 있는데 국소 허혈 및 전뇌 허혈에 모두 효과적이다<sup>22,24,25</sup>. Melatonin이 가지는 신경 보호효과에는 몇 가지 기전이 제시되었는데<sup>17,18,26,27</sup>, 그 중 유리 라디칼의 제거 혹은 여러 라디칼에 의한 지질과산화 억제와 관련 있는 강력한 항산화 효과가 주된 작용이며, 항산화 작용 효소의 증가나 신경성 nitric oxide 합성효소 억제, 항염증반응, 항세포자멸사 효과 등을 들 수 있다. Carloni 등<sup>28</sup>은 저산소 허혈에 노출된 생후 7일 신생쥐에서 손상 30분 전, 24시간 및 48시간 후에 시행한 반복적 melatonin의 투여는 손상 후 7일경 평가한 조직학적 소견상 뇌손상을 줄이고, 성체쥐에서 행동의 부조화나 학습능력 부족을 줄이는 뇌 보호효과가 있다고 하였다. 이 연구의 주된 목적은 저체온치료와 병용한 melatonin의 투여가 뇌 보호에 도움이 되는지 여부를 관찰하기 위함이었어서 melatonin을 조기에 투여하지 않고, 저산소 허혈 손상 후 약 3시간 무렵과 24시간 후에 투여하였다. 따라서 melatonin을 손상 전 또는 손상 후 즉시 투여하거나 여러 날에 걸친 반복적 내지 고용량을 사용하였다면 melatonin 단독 사용이 기존의 다른 연구처럼 뇌 보호작용이 관찰될 수도 있을 것이다<sup>28,29</sup>.



**Figure 5.** Immunofluorescence studies in brain cortex and striatum after hypoxia-ischemia in P35 rats. (A) Microphotographs of the expression of NeuN ( $\times 100$ ). Sham-operated control group showed normal expression of NeuN. NeuN-positive cells were decreased in vehicle-treated group. Melatonin or hypothermia did not inhibit the loss of NeuN-positive cells. Combined therapy of melatonin and hypothermia reduced the loss of NeuN-positive cells. (B) Microphotographs of the expression of anti-gial fibrillary acid protein (GFAP) ( $\times 100$ ). The increase of GFAP-positive cells was reduced only with combined therapy of melatonin and hypothermia. Scale bar=500  $\mu$ m. Abbreviations: Control, sham-operated control group; VEH only, vehicle-treated group; MEL only, melatonin treated group; VEH+HYPO, vehicle and hypothermia-treated group; MEL+HYPO, melatonin and hypothermia-treated group.

저산소 허혈 뇌손상 후 저체온치료의 작용 기전은 다양하다. 현재까지 보고된 가설적 기전으로는 흥분성 아미노산인 glutamate에 의한 신경 독작용 억제, N-methyl-D-aspartate 수용체 감소, NO 생성 효소의 활성 억제, 항산화 물질의 증가, leukotriene 생성의 감소, 그리고 세포자멸사 억제 등이다<sup>7-10)</sup>. 저산소 허혈 손상에 대한 동물실험에서 저체온요법의 뇌 보호효과는 저체온의 정도 및 기간, 시작시기 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. Huh 등<sup>30)</sup>의 보고에 따르면, 2시간 동안의 허혈 환경에 노출된 성체쥐에서 직장 체온 기준 32°C 및 27°C의 3시간 두부 저체온요법을 시행한 결과, 두 가지 방법 모두 체온을 37°C로 유지한 대조군보다 손상 24시간 후 시행한 실험쥐의 행동과 신경학적 평가에서 더 우수한 성적을 보였다. 또한 손상에 따른 뇌부종이나 뇌경색이 대조군에 비해 감소하였는데 32°C로 시행한 군이 27°C 실험군보다 뇌 보호효과가 더 좋은 경향을 보였다. 생후 7일된 신생쥐를 27°C 보육기 환경에 3시간 노출시키는 것은 직장 체온을 약 28-32°C로 유지하는 저체온치료 효과가 있다고 알려졌다<sup>31)</sup>. 이러한 자료를

근거로 연구자들은 저체온치료의 목적으로 실험쥐를 27°C 환경에 3시간 노출시켰으나 실체를 직장체온을 조사하지 못한 제한점이 있다.

신생아 저산소 허혈 뇌손상에 대해서 저체온요법은 현재 적용할 수 있는 가장 효과적인 치료법이나 치료 가능 시기가 손상 후 약 6시간 이내로 짧고, 특히 중증 뇌증에 대해서 사망이나 신경학적 장애로 평가한 치료효과가 제한적이라는 문제점이 있다<sup>32,33)</sup>. 따라서, 임상분야에서는 저산소 허혈 뇌손상 후 지연된 시점에서 저체온치료를 시행할 상황이거나 중증 뇌증인 경우에는 약물요법 등을 추가하여 저체온요법의 제한점을 극복하는 방안 개발이 중요할 것이다. 실제로 Liu 등<sup>31)</sup>의 보고에 따르면, 실험쥐에서 저산소 허혈 뇌손상 후 topiramate와 저체온치료를 병합하였을 때 대뇌 겉질의 감각운동기능이나 뇌조직의 손상의 정도 등의 방법으로 평가한 뇌 보호작용이 증강되었다고 한다. 이 연구는 실험쥐에서 뇌손상 유발 후 먼저 melatonin을 투여하고 이후 지연적으로 저체온요법을 시행하였으며 조직학적 조건을 근거로 뇌 보호효과를 평가하였다. 뇌 손상의 억제는 melatonin 또는 저체온 치료 단독 적용으로는 나타나지 않았고, 오직 병합요법에서 관찰되었다. 저산소 허혈 뇌손상에 따른 세포자멸사의 정도를 평가하기 위한 TUNEL 검사는 손상 수일 내 잘 관찰되나<sup>34)</sup>, 이 연구에서 melatonin 또는 저체온치료의 병합요법을 적용한 경우 TUNEL 양성세포의 감소가 손상 후 1주경뿐 아니라 3주경에도 관찰되는 경향을 보였다. 또한 손상부위가 위축되는 경향이 있고 대뇌반구의 면적 변화가 중재적 치료에 영향을 받으며, 이러한 요소는 결국 관찰 부위에서 TUNEL 양성세포의 수의 변화에 영향을 줄 수 있으므로 정량분석은 곤란하였다.

뇌손상 유발 후 melatonin을 먼저 사용한 이 연구에서 이 물질이 어떠한 기전으로 저체온치료와 상승효과를 가졌는지 세포 또는 분자생물학적 기전은 아직 알 수 없다. Melatonin의 주된 약리작용인 강력한 항산화효과가 뇌 보호작용의 배경 기전으로 작용하였을 가능성을 추측해 볼 수 있을 것이다. 이외에 melatonin이 가지는 손상세포의 미토콘드리아 보존 기능, 항염증작용, 항세포자멸사효과, MMP 억제 작용 등이 부분적으로 기여할 것으로 생각된다<sup>18,34)</sup>. 특히 허혈 손상에 있어 MMP가 신경손상의 병태생리학에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 20여 가지 MMP 효소 중 특히 MMP-2와 MMP-9이 밀접한 관련이 있다<sup>35)</sup>. 이들 MMP-2와 MMP-9의 생성 및 활성 증가로 인해 신경혈관의 기질이 파괴되어 뇌의 부종과 출혈, 세포손상이 야기되는 것으로 알려졌다<sup>36)</sup>. 또한 저산소 허혈에 의한 신생 실험동물에서 MMP가 뇌손상에 관여한다는 보고도 있다<sup>37)</sup>. 이 연구에서 뇌손상 후 7일 경 실험쥐의 대뇌 겉질 및 줄무늬에서 MMP-2 및 MMP-9 즉, gelatinase의 활성에 대한 관찰을 실시하였는데 효소 활성의 억제는 melatonin 또는 저체온치료 단독 적용으로는 나타나지 않



있고 병합요법에서 뚜렷하게 관찰되었다. 향후 뇌손상에 대해서 melatonin과 저체온치료의 병합요법에 따른 다양한 시기의 gelatinase 활성 변화를 연구할 필요가 있다고 사료된다. 결론적으로 저산소 허혈 뇌손상에 있어서 저체온치료 단독으로는 보호작용을 나타내지 못하였으며 melatonin과 저체온치료의 병합요법이 뇌 보호작용을 가능하도록 하였음을 알 수 있었고, 뇌손상 억제제의 자세한 기전을 밝혀내기 위해서 추가 연구가 필요하다.

## REFERENCES

- 1) Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med* 2004;351:1985-95.
- 2) Mclean C, Ferriero D. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin Perinatol* 2004;28:425-32.
- 3) Levene MI, Sands C, Grindulis H, Moore JR. Comparison of two methods of predicting outcome in perinatal asphyxia. *Lancet* 1986;1:67-9.
- 4) Thoresen M, Penrice J, Lorek A, Cady EB, Wylezinska M, Kirkbride V, et al. Mild hypothermia after severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res* 1995;37:667-70.
- 5) Bona E, Hagberg H, Løberg EM, Bågenholm R, Thoresen M. Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome. *Pediatr Res* 1998;43:738-45.
- 6) Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, Halliday H, Juszczak E, Levene M, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ* 2010;340:c363.
- 7) Yager JY, Asselin J. Effect of mild hypothermia on cerebral energy metabolism during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Stroke* 1996;27:919-25.
- 8) Gunn AJ, Gunn TR, de Haan HH, Williams CE, Gluckman PD. Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs. *J Clin Invest* 1997;99:248-56.
- 9) Miller JA Jr, Miller FS, Westin B. Hypothermia in the treatment of asphyxia neonatorum. *Biol Neonat* 1964;6:148-63.
- 10) Wyatt JS, Gluckman PD, Liu PY, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, et al. Determinants of outcomes after head cooling for neonatal encephalopathy. *Pediatrics* 2007;119:912-21.
- 11) Kim HM. Pharmacological approaches in newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy. *Neonatal Med* 2013;20:335-42.
- 12) Adachi M, Sohma O, Tsuneishi S, Takada S, Nakamura H. Combination effect of systemic hypothermia and caspase inhibitor administration against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Pediatr Res* 2001;50:590-5.
- 13) Alkan T, Kahveci N, Buyukuyul L, Korfali E, Ozluk K. Neuroprotective effects of MK 801 and hypothermia used alone and in combination in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Arch Physiol Biochem* 2001;109:135-44.
- 14) Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007;42:28-42.
- 15) Altun A, Ugur-Altun B. Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *Int J Clin Pract* 2007;61:835-45.
- 16) Bubenik GA, Konturek SJ. Melatonin and aging: prospects for human treatment. *J Physiol Pharmacol* 2011;62:13-9.
- 17) Shinozuka K, Staples M, Borlongan CV. Melatonin-based therapeutics for neuroprotection in stroke. *Int J Mol Sci* 2013;14:8924-47.
- 18) Fan X, Kavelaars A, Heijnen CJ, Groenendaal F, van Bel F. Pharmacological neuroprotection after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Curr Neuropharmacol* 2010;8:324-34.
- 19) Hung YC, Chen TY, Lee EJ, Chen WL, Huang SY, Lee WT, et al. Melatonin decreases matrix metalloproteinase-9 activation and expression and attenuates reperfusion-induced hemorrhage following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res* 2008;45:459-67.
- 20) Rosell A, Lo EH. Multiphasic roles for matrix metalloproteinases after stroke. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:82-9.
- 21) Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001;21:7724-32.
- 22) Tai SH, Hung YC, Lee EJ, Lee AC, Chen TY, Shen CC, et al. Melatonin protects against transient focal cerebral ischemia in both reproductively active and estrogen-deficient female rats: the impact of circulating estrogen on its hormetic dose-response. *J Pineal Res* 2011;50:292-303.
- 23) Lee SR, Tsuji K, Lee SR, Lo EH. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci* 2004;24:671-8.
- 24) Pei Z, Pang SF, Cheung RT. Pretreatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J Pineal Res* 2002;32:168-72.
- 25) González-Burgos I, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Morali G, Cervantes M. Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett* 2007;423:162-6.
- 26) Chung SY, Han SH. Melatonin attenuates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through



- microglial inhibition. *J Pineal Res* 2003;34:95-102.
- 27) Espinar A, García-Oliva A, Isorna EM, Quesada A, Prada FA, Guerrero JM. Neuroprotection by melatonin from glutamate-induced excitotoxicity during development of the cerebellum in the chick embryo. *J Pineal Res* 2000;28:81-8.
  - 28) Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Pineal Res* 2008;44:157-64.
  - 29) Gupta YK, Chaudhary G, Sinha K. Enhanced protection by melatonin and meloxicam combination in a middle cerebral artery occlusion model of acute ischemic stroke in rat. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80:210-7.
  - 30) 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.
  - 31) Liu Yi, Barks JD, Xu G, Silverstein FS. Topiramate extends the therapeutic window for hypothermia-mediated neuroprotection after stroke in neonatal rats. *Stroke* 2004;35:1460-5.
  - 32) Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* 2005;353:1574-84.
  - 33) Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 2005;365:663-70.
  - 34) Robertson NJ, Faulkner S, Fleiss B, Bainbridge A, Andorka C, Price D, et al. Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain* 2013;136:90-105.
  - 35) Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in brain injury. *J Neurotrauma* 1995;12:833-42.
  - 36) Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* 2009;158:983-94.
  - 37) Chen W, Hartman R, Ayer R, Marcantonio S, Kamper J, Tang J, et al. Matrix metalloproteinases inhibition provides neuroprotection against hypoxia-ischemia in the developing brain. *J Neurochem* 2009;111:726-36.

## 신생쥐에서 유발시킨 저산소 허혈 뇌손상에 대한 melatonin과 저체온치료 병용요법의 효과

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 소아청소년과, 계명대학교 의과대학 소아과학교실\*, 약리학교실†  
박재현 · 김천수\* · 이상락\* · 이성용†

**목적:** Melatonin은 송과샘에서 분비되는 호르몬으로, 여러 조직에 있어 다양한 약리작용을 나타낸다. 특히, melatonin은 우수한 항산화 효과와 신경 보호작용을 가진다고 알려져 있다. 저체온치료는 저산소 허혈 뇌손상에 적용되는 임상 치료법이다. 이 연구는 저산소 허혈을 유발시킨 신생쥐에서 melatonin 및 저체온치료의 병합요법의 효과에 대하여 알아보려고 하였다.

**방법:** 생후 7일된 쥐에 저산소 허혈을 유발하였고, 실험군은 vehicle군과 melatonin 단독투여군, vehicle 및 저체온치료 병합요법군, melatonin 및 저체온치료의 병합요법군으로 나누었다. Melatonin은 30 mg/kg 용량으로 복강 내 주사하였는데, 저산소 허혈 손상 직후 및 24시간 경과 시점으로 구분해서 2차례 투여하였다. 저체온치료는 전신 냉각으로 27°C 환경에서 3시간동안 시행하였다. 정상 대조군은 저산소 허혈 뇌손상을 유발하지 않은 sham 수술군으로 하였다. 수술 후 3일(P10), 1주 경과(P14) 및 4주 시점(P35)에서 실험쥐를 희생시켜서 뇌손상을 평가하였다.

**결과:** TTC 염색에서 vehicle 투여한 P10 실험쥐는 저산소 허혈로 인한 뇌경색이 대조군에 비해 현저하였다. 또한, H&E 염색에서 P35 실험쥐는 손상측 뇌위축이 현저하였다. Melatonin이나 저체온치료 단독으로는 뇌의 경색이나 위축을 유의하게 억제하지 못하였으나, melatonin 및 저체온요법의 병합치료는 뇌손상을 줄이는 효과가 있었다. *In situ* zymography 및 TUNEL 염색, 면역형광법을 이용해서 뇌손상을 평가한 결과 오직 병합요법만이 신경 보호효과를 나타내었다.

**결론:** Melatonin은 저산소 허혈 뇌손상에 대하여 저체온치료의 신경 보호작용에 상승효과를 가지는 것으로 보인다.