

# 임신 후기 어미 쥐에 투여한 덱사메타손이 신생 쥐의 중추신경계 성숙에 미치는 영향

윤수정<sup>1</sup> · 구혜수 · 김종일<sup>1</sup>

이화여자대학교 의과대학 병리학교실  
산부인과학교실

접 수 : 2004년 8월 14일  
게재승인 : 2005년 1월 18일

책임저자 : 구 혜 수  
우 158-710 서울 양천구 목6동 911-1  
이화여자대학교 의과대학 병리학교실  
전화: 02-2650-5732  
Fax: 02-2653-8891  
E-mail: heasoo@ewha.ac.kr

조기분만의 위험이 있는 산모에게 산전 글루코코르티코이드 (glucocorticoids, GCs)를 투여하면 조산아에게서 자주 발생하는 호흡곤란증, 뇌실내 출혈, 뇌백질 손상, 괴사성 장염 등의 발생빈도가 감소하여 생존율이 높아진다. 현재 임신 24주부터 34주 사이의 조기분만 위험이 있는 산모에게 GCs를 투여하는 치료를 시행하고 있다.<sup>1</sup> 치료 방법은 덱사메타손(dexamethasone, DEXA) 5 mg을 6시간 간격으로 4회, 또는 베타메타손 12 mg을 12시간 간격으로 2회 근육주사로 투여하는 요법이다. 그러나 이 치료의 최대 효과는 투여 후 24시간부터 7일간 지속되므로, DEXA 치료 후 7일 안에 분만을 하지 않은 산모에게는 1주일만 지나면 다시 투여하는 반복요법을 사용하고 있다. 그 밖에 조산아에게 만성 폐질환이 발생하는 것을 방지하기 위해서 GCs를 직접 투여하기도 한다.

## Effect of Antenatal Dexamethasone Treatment on Neuronal Morphogenesis

Soo Jeong Yoon<sup>1</sup>, Heasoo Koo and Chong Il Kim<sup>1</sup>

Departments of Pathology and <sup>1</sup>Obstetrics and Gynecology, Ewha Womans University, College of Medicine, Seoul, Korea

**Background :** Glucocorticoids (GCs) are essential for normal development and the maturation of the central nervous system. The aim of this study was to determine the effects of antenatal dexamethasone (DEXA) treatment on neuronal morphogenesis and on the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) protein expression in neonatal rat. **Methods :** Pregnant Sprague-Dawley rats were injected with saline (the control), or 0.2 mg/kg/day DEXA or 0.8 mg/kg/day DEXA at 17th, 18th and 19th day of gestation. The newborn rat brains were examined at postnatal days 1 (n=75) and 10 (n=78). **Results :** The DEXA-treated groups showed distorted architectures of neurons in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellar cortex at postnatal days 1 and 10 with an increased number of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive cells. The cerebellar cortex in the DEXA-treated groups showed delayed development with more PCNA-positive cells in the internal granular cell layer. The Purkinje cells showed a markedly decreased number and the decreased length of the dendritic processes. The GDNF positive reaction was decreased in the DEXA-treated groups in a dose-dependent manner. **Conclusions :** The developmental changes and neuronal degeneration at postnatal days 1 and 10 in the newborn rats that were exposed to DEXA at the late gestational age were associated with increased proliferative activity and a decreased level of GDNF protein expression.

**Key Words :** Dexamethasone; Brain; Proliferating cell nuclear antigen; Glial cell line-derived neurotrophic factor

GCs는 중추신경계의 발달과 성숙에 꼭 필요한 물질이다. GCs는 뇌의 성숙단계에서 세포의 성장과 분화, 세포와 세포 사이의 교류와 신호전달에 광범위하게 관여하며, GCs 양이 증가하거나 감소하면 뇌의 구조를 변형시켜 기능장애를 초래한다.<sup>2</sup> GCs가 이와 같이 중추신경계와 신경내분비계통 등에서 여러 가지 구조와 기능의 변화를 일으키지만, 정확한 기전은 아직 확실하게 알려지지 않았다. 임상에서 출생 전후에 GCs 치료를 사용하게 된 이후, GCs가 태아의 성장과 발달에 미칠 수 있는 영향과 출생 후 나타날 수 있는 부작용에 대한 관심이 많아졌다. 중추신경계와 관련된 부작용으로는 두뇌의 성장장애와 신경기능장애 등이 있다.<sup>3-8</sup> 산전 GCs 요법이 조산아에게 도움이 되는 것으로 증명된 반면에, 일주일 간격으로 반복 투여하는 요법은 사망률은 떨어뜨리지 못하면서 체중감소와 두뇌 발달장애를 일으킬 수 있으므로

사용하지 않도록 권장하고 있다.<sup>9-11</sup> 또한 출생 후 GCs 치료는 호흡곤란증은 감소시키지만 환아의 생존율을 높이는데 별로 효과가 없으며 두뇌 발달을 지연시키고 신경장애 위험을 증가시킬 뿐만 아니라 다른 장기의 병변도 많이 초래한다는 보고도 있다.<sup>8</sup>

동물실험에서는 동물의 종류와 성별, GCs의 종류와 투여량과 투여시기에 따라서 중추신경계에 다양한 소견을 보인다.<sup>5,12,13</sup> 중추신경계에서 코르티코스테로이드(corticosteroid, CS) 수용체가 가장 많은 해마를 포함한 변연계는 부신피질이나 신경내분비계와 밀접한 관계가 있고, GCs를 투여한 후에 나타나는 증상(행동, 기억력, 감정, 인지능력 장애)의 대부분이 이 부위와 관련이 있다. 따라서 동물실험에서도 대부분의 연구가 해마를 중심으로 시행되었다. 그 이외에 GCs를 양에게 반복 투여한 결과 시신경의 수초 형성이 지연되는 소견을 보였고,<sup>14</sup> 쥐에게 투여하자 전뇌의 신경세포가 아교세포로 대체되었으며, 신경세포의 증식과 분화에 관여하는 polyamines의 형성에도 영향을 미치는 것으로 관찰되었다.<sup>15</sup> 또한 신경세포의 성숙과 신경연접에 관여하는 neuronal cell adhesion molecule의 발현을 비롯해, nuclear transcription factor, c-fos gene, AP-1 binding protein 등에도 영향을 미치기 때문에, 임신 후기 태아의 뇌가 GCs에 의한 손상을 많이 받는 것으로 보인다.<sup>25</sup>

향신경인자는 신경세포와 신경세포 사이, 그리고 신경세포와 교세포 사이의 상호작용 발달에 꼭 필요한 물질인데, 스트레스와 GCs에 의해 미성숙 혹은 성숙 뇌의 변연계와 시상하부에서 향신경인자의 발현이 변화되는 것이 관찰되었다.<sup>16</sup> 태생기에 발생 중인 뇌에는 여러 종류의 향신경인자가 광범위하게 분포되어 있어서 뇌의 성숙에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되지만, 아직도 정확한 작용기전은 알려지지 않았다.<sup>17</sup> Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)는 도파민분비 신경세포를 보호하는 역할을 하는 단백질로, 발달중이거나 성숙한 쥐와 영장류의 세포에서 광범위하게 발현된다.<sup>18</sup> 여러 종류의 실험에서 GDNF는 도파민분비 신경세포뿐만 아니라 운동신경세포, 소뇌의 풀킨예세포, 감각신경세포 등 다양한 세포의 손상을 억제하는 것으로 알려졌다. 또한 신생 쥐의 대뇌에서 급성 허혈-저산소성 병변에 대해 보호하는 작용도 관찰되었다.<sup>19</sup>

본 연구는 DEXA에 의한 중추신경계의 성숙 변화가 세포의 증식 정도나 GDNF 단백질 발현의 변화와 관계가 있는지 알아보기 위하여 시행되었다. 이를 위해 임신 17, 18, 19일에 DEXA 0.2 mg/kg과 0.8 mg/kg를 투여한 두 군의 어미 쥐에서 태어난 신생 쥐의 중추신경계를 생후 1일과 10일에 관찰하였다.

## 재료와 방법

### 연구재료

본 연구에서는 임신 10일경(체중: 291-354 g)의 흰쥐(Spra-

Table 1. Groups of experimental animals

Group	Treatment	Newborn rats		
		Pregnant rats N (n)	P1d N (n)	P10d N (n)
1	Saline (1 mL/kg/day)	3 (1)	18 (7)	23 (8)
2	DEXA (0.2 mg/kg/day)	6 (2)	35 (10)	32 (12)
3	DEXA (0.8 mg/kg/day)	6 (2)	22 (8)	23 (8)
Total		15 (5)	75 (25)	78 (28)

N, number of experimental animals; (n), number of rats used for frozen tissue; P1d, postnatal 1 day; P10d, postnatal 10 day; DEXA, dexamethasone.

que-Dawley, 대한 바이오링크와 폴라스 인터내셔널)를 사용하였고, 사육기간 중 음식과 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 대조군(제1군)은 15마리 중 3마리로, 임신 17, 18, 19일에 154 mM 식염수 1 mL/kg/day (제일제약, 대구, 한국)를 피하 주사하였다. 실험군은 두 군으로 나누어 같은 기간에 제2군 6마리에게는 텍사메타손(dexamethasone phosphate, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 0.2 mg/kg/day를, 제3군 6마리에게는 0.8 mg/kg/day를 투여하였다. 자련분만 된 신생 쥐가 태어난 지 1일 및 10일 후에 뇌조직을 검사하였다(Table 1). 대조군 한 마리와 실험군 각각 두 마리에서 태어난 신생 쥐는 -70 °C로 동결시켰고, 나머지는 고정액(0.1 M phosphate buffered, 4% paraformaldehyde solution)에 고정하였다.

### 연구방법

#### 뇌관류 및 조직소견 관찰을 위한 처리

신생 쥐가 태어난 지 1일 및 10일 후에 ketamine을 복강 내로 주사하여 마취한 후, 가슴을 열고 24게이지 주사기를 이용하여 좌심방에 고정액을 관류시켜 뇌조직을 고정하였다. 고정된 신생 쥐의 머리를 절개해 두개골을 제거하고 뇌를 꺼내어 4% 중성 포르말린에 3일 이상 고정시킨 후 2 mm 두께로 관상 절단하였다. 이들 조직 절편에 제3 뇌실과 해마 부위가 포함되었는지 육안으로 확인하였다. 소뇌조직과 뇌간도 2 mm 두께로 절단하였다. 이후 통상적인 조직처리 과정을 거쳐 5-6 μm 두께로 연속절단 표본을 제작하고, 헤마톡실린-에오신 염색과 크레실-마이올렛 염색으로 신경세포의 변화를 관찰하였다.

#### 면역조직화학 검사

면역조직화학 검사는 peroxidase-antiperoxidase 방법을 사용하였다. 연속절편을 poly-L-lysine으로 처리한 슬라이드에 붙인 후 항온기에서 60°C로 1시간 가열했다. 그런 다음 실온에서 크실렌으로 탈랍시키고 알코올로 함유과정을 수행한 후, 10분간 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 처리하여 내인성 peroxidase 활성을 억제하였다. TBS 용액(Tris buffered saline, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl)으로 씻은 후 정상 말 혈청에 20분간 반응시켜 비 특이 반응을 차단하였다.

일차 항체는 GDNF (1:150, polyclonal, sc-328; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), tubulin (1:400, monoclonal, anti-beta-tubulin; Zymed, San Francisco, CA, USA), proliferating cell nuclear antigen (PCNA, 1:400, monoclonal, NCL-pcna; Novocastra, Newcastle, UK), glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:100; Dakopatts, Glostrup, Denmark)을 사용하였다. 실온에서 90분간 일차 항체와 반응시킨 후 Novostain universal detection kit (Novocastra, Newcastle, UK)를 사용하여 실온에서 biotin이 결합한 이차 항체로 25분간 반응시키고 TBS 용액으로 세척한 후, streptavidin/peroxidase complex 용액으로 25분간 반응시키고 TBS 용액으로 세척하였다. Peroxidase 반응은 연결항체와 streptavidin으로 각각 20분 보온한 후 liquid DAB substrate kit (Novocastra, Newcastle, UK)를 사용하였다. 세포의 핵을 보기 위하여 Meyer's hematoxylin으로 염색하였다. 일차 항체를 면역화되지 않은 혈청으로 대체하여 음성대조군으로 사용하였다. 면역염색의 일부는 자동면역염색기(Bond system, Vision BioSystems inc., Mount Waverley VIC, Australia)를 사용하였다. 면역염색조건은 대뇌와 소뇌의 여러 부위에서 염색 강도의 정도에 따라 강 양성(3+), 중 양성(2+), 약 양성(1+), 음성(-)으로 분류하여 비교하였다.

#### 전자현미경 검사

제1, 2, 3 각 군에서 신생 쥐가 태어난 지 1일과 10일 후에 각각 2예를 전자현미경으로 검사하였다(총 12마리). 3% 파라포름알데히드-3% 글루타알데히드를 좌심방을 통해 관류시켜 고정한 다음, 뇌를 적출하여 대뇌피질과 소뇌피질에서 표본을 취하여 0.1% OsO<sub>4</sub>에 고정하였다. 그런 다음 일반적인 전자현미경 표본제작 과정에 따라 에폰에 포매하였다. 얇은 절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 Hitachi-500 (Hitachi, Japan) 전자현미경으로 관찰하였다.

#### GDNF의 Western blot 분석

GDNF의 Western blot 분석은 동결한 뇌 전체 조직으로 압수를 분리하여 시행하였다. -70°C에 동결 보관한 조직을 PBS (phosphate buffered saline, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4)로 세척한 후 protease inhibitor cocktail (Complete<sup>TM</sup> Mini Protease inhibitor cocktail, Roche, Mannheim, Germany)이 포함된 lysis buffer [0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), 1% NP-40]를 넣은 뒤 균질화하였다. 이후 5분 간격으로 vortexing하면서 얼음에 1시간 둔 다음 4°C, 14,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 모아 -20°C에 보관하였다. 단백질 농도는 Bio-rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량하였다. 일정량의 단백질(30 µg/lane)에 6× sample buffer [0.35 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.6 M dithiothre-

itol (DTT), 10.28% sodium dodecyl sulfate (SDS), 36% glycerol, 0.048% bromophenol blue]를 첨가한 다음 95°C에서 5분간 처리한 후 4°C에서 냉각하였다. 12% polyacrylamide gel에서 전기영동시킨 후, blotting kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 100 V에서 1시간 동안 polyvinylidene difluoride (PVDF, Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) 막으로 옮겼다.

PVDF 막을 차단 용액(5% skim milk, 0.05% Tween-20 in PBS)에 실온에서 1시간 반응(또는 4°C에서 overnight)시킨 다음, blocking 용액에 1:500으로 희석한 GDNF (D-20) rabbit polyclonal IgG (sc-328, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 실온에서 2시간 처리하였다. 이것을 PBST 용액(0.05% Tween-20 in PBS)으로 10분간 3회 세척한 후, 차단 용액에 1:1,000으로 희석한 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 처리하여 실온에서 1시간 반응시킨 다음 PBST 용액으로 10분간 3회 세척하였다. 단백질 밴드는 SuperSignal<sup>®</sup> West Pico chemiluminescent substrate kit (PIERCE, Rockford, IL, USA)를 이용하였고, Fuji medical X-ray film을 감광시킨 후 Fuji medical film processor, FPM 1200 (Fuji, Tokyo, Japan)으로 현상하여 확인하였다.

#### 세포증식 정도 평가

세포증식 정도는 생후 10일된 신생 쥐 소뇌피질 조직에서 측정하였는데, PCNA 항체로 면역염색을 시행한 조직 절편에서 다음과 같은 방법으로 평가하였다. 대조군과 실험군에서 각각 3예를 무작위로 선택하여, 각 예에서 풀킨에세포와 내과립층 부위를 400 배율로 세 장씩 사진을 찍어서 20×15 cm 크기로 인쇄하였다. 각 사진에서 조직이 잘 유지된 부분을 골라 10×10 cm의 정사각형을 그리고, 그 안에 있는 모든 세포를 PCNA에 양성 반응을 보이는 세포와 음성 반응을 보이는 세포로 분류해서 수를 세어, 전체 세포 중 PCNA에 양성 반응을 보이는 세포가 차지하는 비율을 계산하여 증식지수로 하였다. 각 실험군에서 얻은 결과를 Kruskal-Wallis test를 이용하여 분석하였다

## 결 과

#### 신생 쥐의 체중과 뇌의 무게

신생 쥐의 체중은 실험군이 대조군에 비해 생후 1일과 10일에 모두 현저하게 감소하였고, 감소한 정도는 DEXA 투여량과 관련이 있었다(Table 2). 신생 쥐의 뇌의 무게는 출생 10일 후에 DEXA 양에 따라 의미 있는 감소를 보였다. 그러나, 출생 1일 후에는 대조군과 실험군 사이에 의미 있는 차이가 없었고, 실험군에서는 DEXA 투여량에 따라 차이를 보였다.

**대조군과 실험군의 생후 1일 신생 쥐의 뇌조직조건**

태어난 지 1일된 쥐의 대뇌피질은 피질판의 형태로 분화가 덜

**Table 2.** Body and brain weight of newborn rats at postnatal day 1 and 10

Organ Group	Treatment	P1d		P10d	
		N	weight (g) mean (±SD)	N	weight (g) mean (±SD)
Body	1 Saline (1 mL/kg/day)	13	6.15 (0.56) <sup>a</sup>	14	20.78 (1.48) <sup>a</sup>
	2 DEXA (0.2 mg/kg/day)	31	5.24 (0.77)	30	15.45 (2.87)
	3 DEXA (0.8 mg/kg/day)	19	4.45 (0.60)	18	11.36 (3.77)
Brain	1 Saline (1 mL/kg/day)	13	0.25 (0.02)	14	0.84 (0.03) <sup>a</sup>
	2 DEXA (0.2 mg/kg/day)	5	0.29 (0.03)	29	0.71 (0.09)
	3 DEXA (0.8 mg/kg/day)	5	0.24 (0.02)	18	0.63 (0.10)

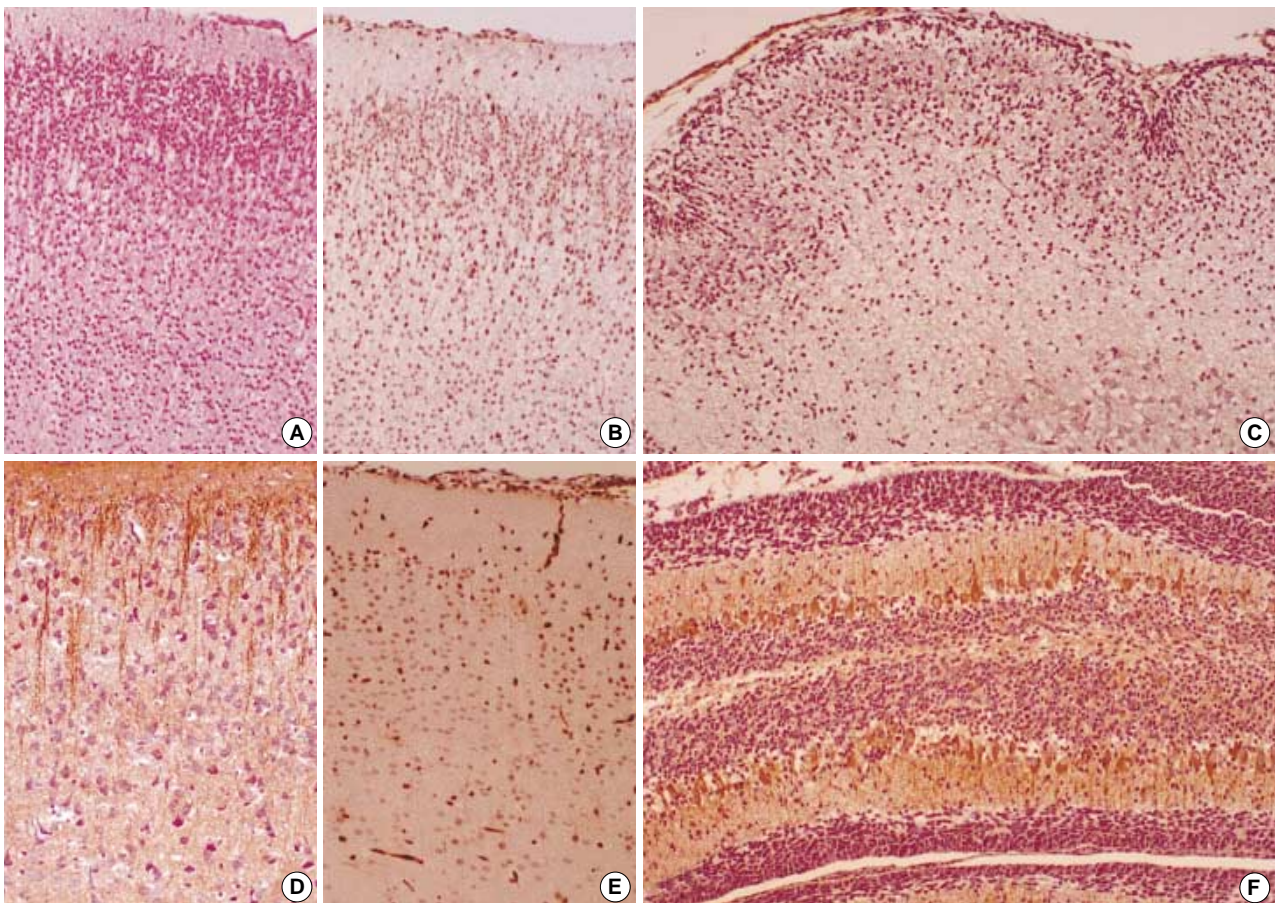
P1d, postnatal 1 day; P10d, postnatal 10 day; DEXA, dexamethasone; N, number; SD, standard deviation.

<sup>a</sup>p<0.05 by Kruskal-Wallis test.

된 상태였고, 이주 중인 원시세포가 많이 관찰되었다(Fig. 1A, B). 소뇌피질은 경계가 불분명한 외과립층과 풀킨예세포가 섞여 있는 소견을 보였다(Fig. 1C). 뇌실막 밑에 있는 원시세포와 이주 중인 원시세포는 GDNF와 PCNA에 강한 양성 반응을 보였으며, 해마의 추체세포와 소뇌의 풀킨예세포는 약한 양성 반응을 보였다. 풀킨예세포는 튜블린 면역염색에서 가장 확실하게 구분할 수 있었다. 실험군은 생후 1일에 대뇌피질, 해마, 소뇌피질에서 신경세포가 손상되고 배열이 불규칙한 소견을 보였으며 PCNA에 양성 반응을 보이는 세포가 많이 관찰되었다(Fig. 2).

**대조군과 실험군의 생후 10일 신생 쥐의 뇌조직조건**

대조군은 생후 10일에 대뇌피질, 해마, 소뇌피질의 분화가 잘 되었고, 풀킨예세포는 GDNF에 강한 양성 반응을 보였다. 그리고 PCNA에 양성 반응을 보인 세포는 생후 1일에 비해 감소하였다(Fig. 1D-F). GDNF 단백질에 대한 면역염색은 부위에 따라



**Fig. 1.** The histological findings of cerebral cortex and cerebellar cortex of control newborn rats at postnatal days 1 and 10. The cerebral cortex at postnatal day 1 shows cortical plate consisting of primitive cells, which are strong positive with PCNA antibody (A, B). The cerebral cortex at postnatal day 10 shows well differentiated cortical neurons and less numbers of PCNA positive cells (D, E). The cerebellar cortex at postnatal day 1 shows poorly defined granular cells and Purkinje cells (C), compared with the cerebellar cortex at postnatal day 10, which shows well differentiated Purkinje cells with well defined dendritic processes in molecular cell layer (F). A: H&E, B and E: PCNA, C and F: GDNF, D: tubulin.

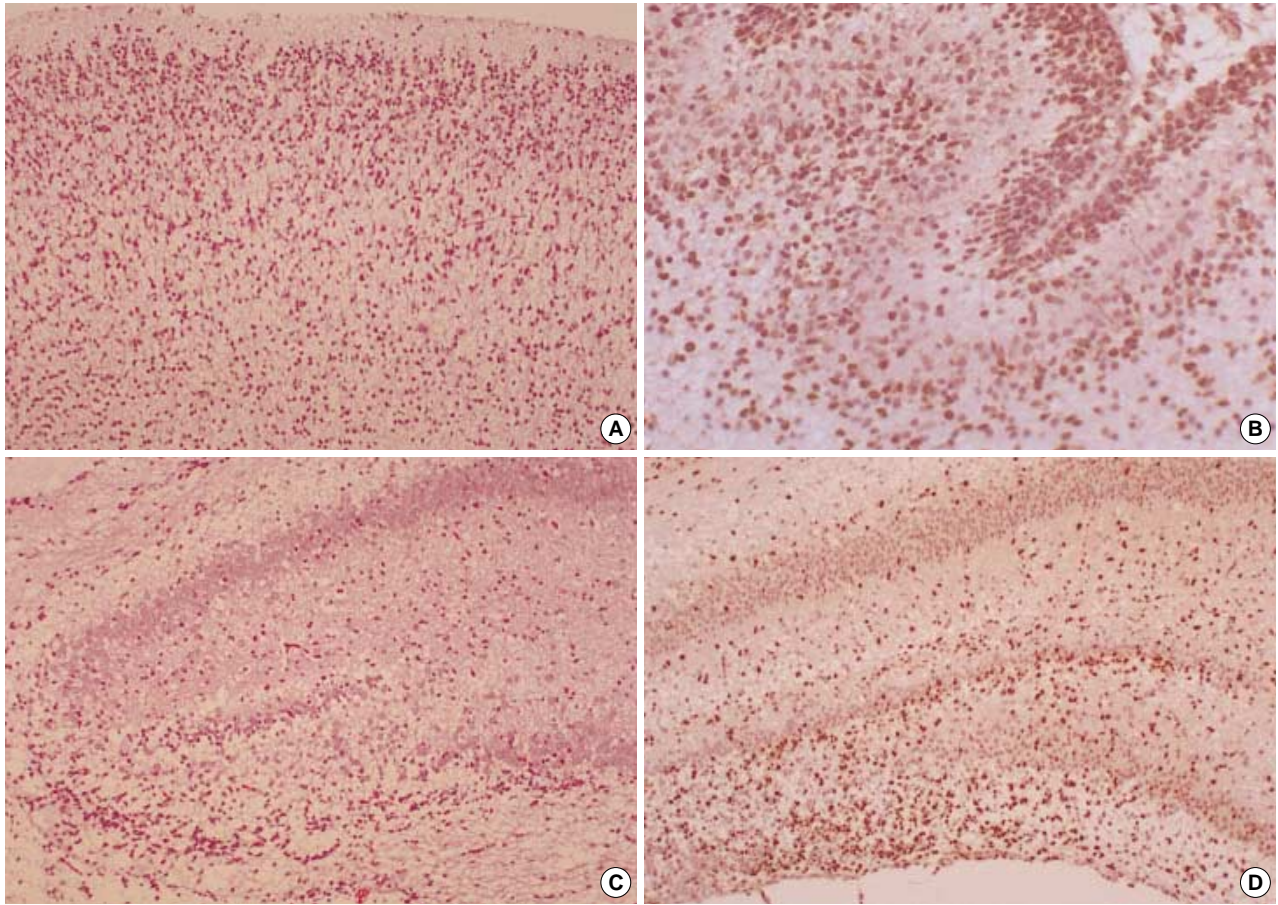


Fig. 2. The histological findings of 0.2 mg/kg dexamethasone injected newborn rats at postnatal day 1. The cerebral cortex (A) shows edematous distorted cortical plate and the cerebellar cortex (B) shows irregular arrangement of primitive PCNA positive cells and poorly defined Purkinje cells. The hippocampus (C, D) shows edema and irregular zonal arrangement of neurons in CA4 and dentate gyrus with many PCNA positive cells. A and C: H&E, B and D: PCNA.

Table 3. Mean numbers of neurons and ratio of PCNA positive cells in internal granular cell layer of cerebellar cortex of newborn rats at postnatal day 10

Group	Treatment	N	Cell number <sup>a</sup> mean (±SD)	Positivity <sup>b</sup> mean (±SD)
1	Saline (1 mL/kg/day)	3	179.0 (43.0)	0.17 (0.05)
2	DEXA (0.2 mg/kg/day)	3	141.7 (79.0)	0.25 (0.03)
3	DEXA (0.8 mg/kg/day)	3	169.3 (73.0)	0.36 (0.05)

N, number; SD, standard deviation; PCNA, proliferating cell nuclear antigen.

<sup>a</sup>p=0.09 by Kruskal-Wallis test, <sup>b</sup>p=0.03 by Kruskal-Wallis test.

증가하거나 감소하였다. Luxol fast blue 염색과 GFAP 면역염색으로 국소 수초 형성과 GFAP 양성인 별세포를 혈관 주변에서 볼 수 있었다.

실험군은 대조군에 비해 대뇌피질에서 신경세포가 손상된 것이 뚜렷하게 나타났다. 실험군의 소뇌피질은 뚜렷한 성숙장애를 보였으며(Fig. 3), 풀킨예세포의 수상돌기 수가 현저하게 감소하였다(Fig. 4, 5). 소뇌피질에서 측정된 세포증식 정도는 DEXA

의 투여량에 비례하여 증가하는 변화를 보였는데(p<0.05), 단위면적당 세포 수는 차이가 없었다(Table 3). 수초의 형성은 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었고, 신경세포가 손상을 받은 부위나 발달지연을 보인 소뇌피질에서 반응 별세포의 증식은 관찰되지 않았다. 실험군의 GDNF 단백질은 해마의 추체세포와 소뇌피질의 풀킨예세포에서 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 4). 전자현미경 검사로 대뇌피질과 소뇌의 신경세포가 공포를 포함하고 수상돌기가 심한 부종을 보이는 신경세포의 변성을 실험군에서 확인할 수 있었다(Fig. 6B, D).

### GDNF의 immunoblot 소견

뇌조직 전 부위에서 시행한 immunoblot 검사에서 분자량 34 kD의 위치에 GDNF 항체와 반응하는 단백질 밴드가 보였다. 그런데 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었으며, 검사 시기(생후 1일과 10일)와 성별에 따른 변화 역시 보이지 않았다(Fig. 7).

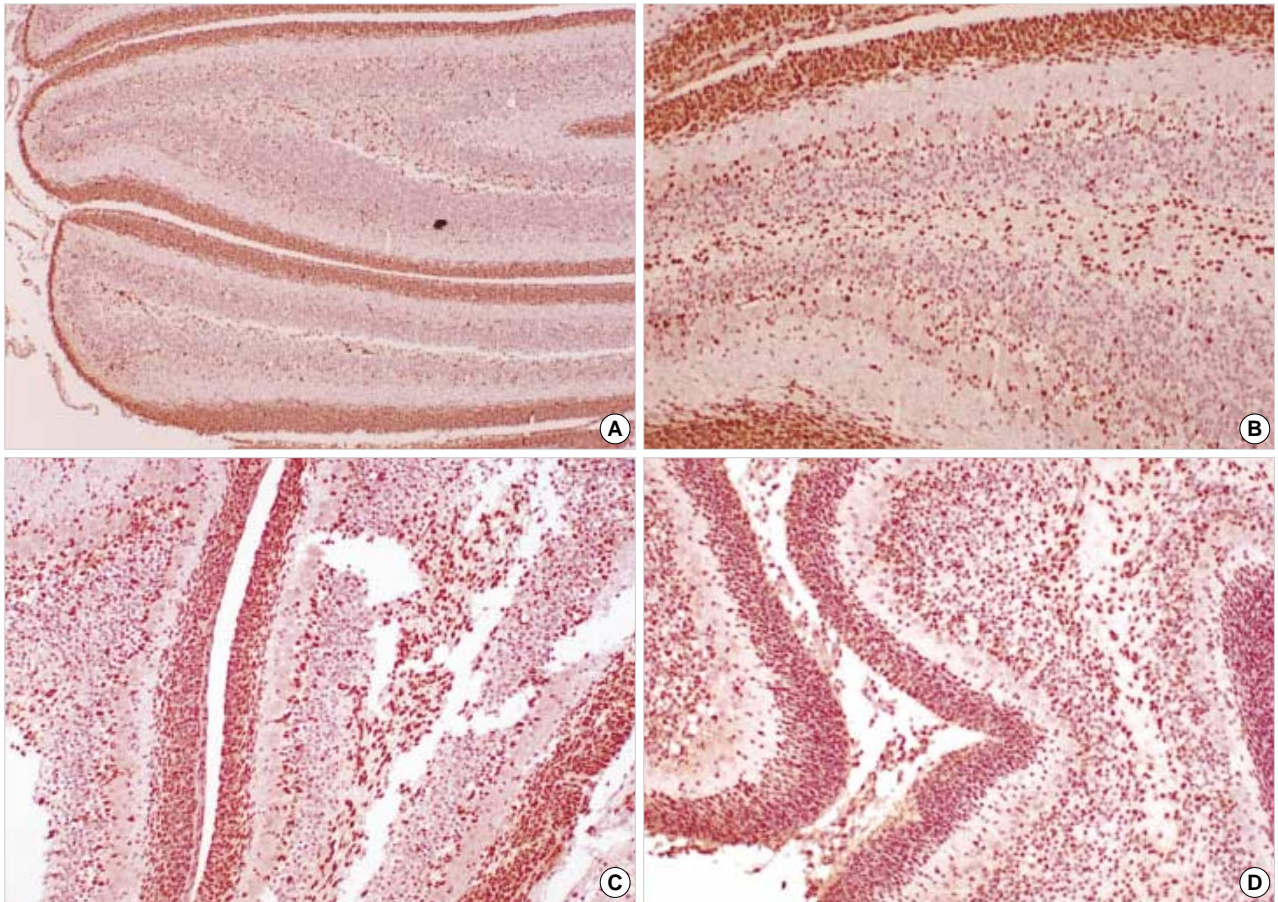


Fig. 3. The PCNA positive cells in the cerebellar cortex of control and dexamethasone injected newborn rats at postnatal day 10. The control rats (A, B) show well differentiated cerebellar folia with scattered PCNA positive cells. Compared with the control rat (B), 0.2 mg/kg (C) and 0.8 mg/kg (D) dexamethasone injected rats show smaller folia with increased numbers of PCNA positive cells. The changes are dose-dependent.

## 고 찰

조기 분만 시 태아의 호흡곤란증을 예방하기 위해 모체에 GCs를 투여할 경우에 조산아의 몸무게와 장기의 무게가 감소하는 것은 잘 알려져 있으며, 투여 횟수가 많을수록 더 심하다.<sup>3,9,20,21</sup> 본 연구에서 신생 쥐의 체중은 출생 후 1일과 10일에 투여한 DEXA의 양에 따라 감소하여, 임상과 동물실험을 통해 알려진 것과 같았다. 뇌의 무게는 생후 10일에 DEXA 투여군이 대조군에 비해 의미 있게 감소하고 투여량에 따라 감소되는 정도가 비례하였다. 반면에 생후 1일에는 대조군에 비해 저용량 DEXA 투여군에서 오히려 뇌의 무게가 증가하고 고용량에서는 대조군과 비슷하였다. 단지 DEXA 투여군에서는 투여량에 따라 의미 있는 차이가 있었다. 이와 같은 결과는 통계에 사용한 쥐의 수가 적었기 때문으로 생각한다.

중추신경계의 발달은 동물의 종류에 따라 매우 다양한 양상을 보인다. 사람을 비롯한 양, 원숭이, 기니피그 등은 뇌 성장과 신경내분비계의 성숙이 자궁 내에서 이루어지는 반면,<sup>22</sup> 쥐, 토

끼, 생쥐는 미숙한 상태로 태어나 출생 후에 성숙이 지속된다. 임신 말기에 쥐의 해마는 임신 80일(전체임신의 25% 이하)된 사람의 태아와 비슷한 정도의 발달을 보이고,<sup>23</sup> 쥐의 뇌는 생후 7일 동안 매우 빠른 속도로 성장한다. 임신 후기에 GCs로 치료하는 경우, 실험동물의 종류에 따라서 손상을 받는 뇌의 부위나 신경내분비의 발생 단계가 다르고, 손상에 의해 나타나는 소견도 달라진다. 본 연구에서 생후 1일에는 뇌가 덜 발달한 상태로 사람 뇌의 발생 초기와 비슷했고, 생후 10일에는 임신 말기 사람의 태아와 비슷한 정도의 발달을 보여서, 쥐는 뇌가 미성숙인 상태로 태어나는 것을 확인할 수 있었다. 생후 1일과 10일에 대뇌와 소뇌의 각 부위에서 관찰된 GDNF 단백질의 분포는 각각 사람의 태아 12-19주와 30-39주에 관찰되는 소견<sup>18</sup>과 비슷했다. 생후 1일과 10일 사이에 GDNF 단백질이 가장 확실하게 증가한 부위는 풀킨예세포였다. 단지 해마의 CA1-CA4 부위의 추체세포는 사람의 경우 임신 말기에 양성 반응이 증가해서 풀킨예세포와 비슷한 정도인데 비해, 쥐의 경우는 임신 초기와 비슷한 양성 소견을 보였고 풀킨예세포보다 약한 반응을 보였다.

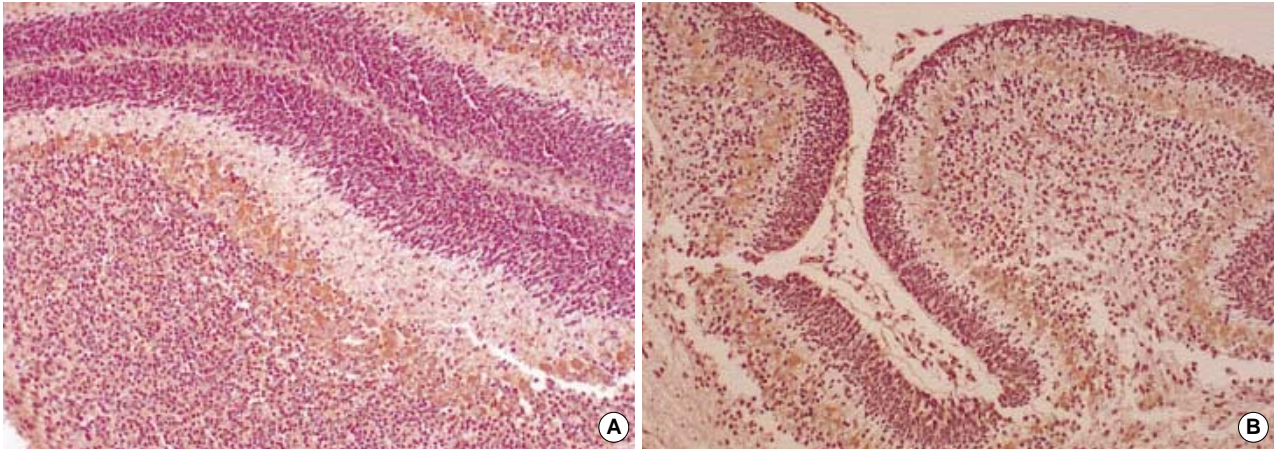


Fig. 4. The GDNF reaction in Purkinje cells of dexamethasone injected newborn rats at postnatal day 10. The 0.2 mg/kg dexamethasone injected rat (A) shows stronger positive reaction in Purkinje cells compared with the 0.8 mg/kg dexamethasone injected rat (B).

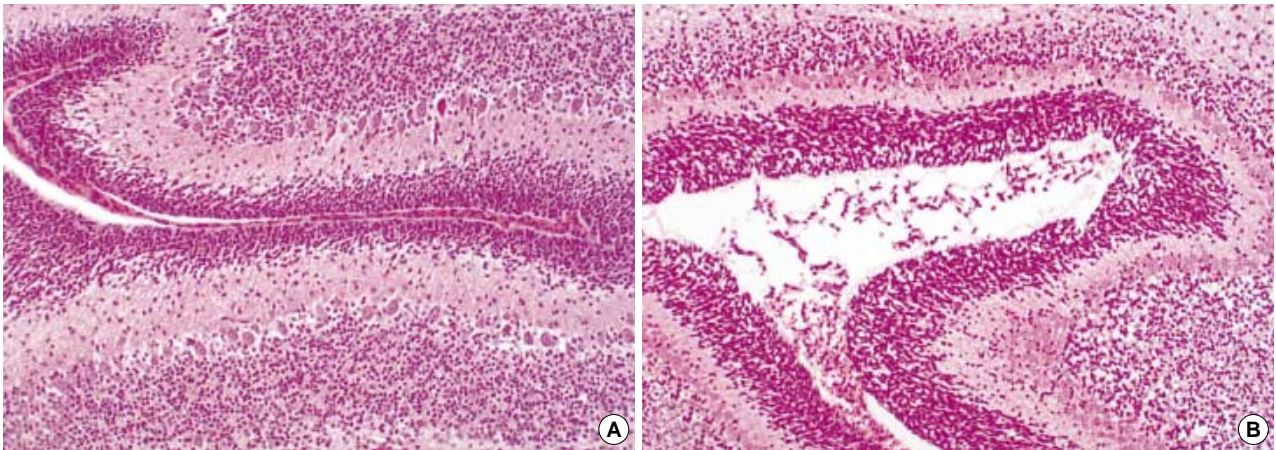


Fig. 5. The development of cerebellar Purkinje cells of control and dexamethasone injected newborn rats at postnatal day 10. The Purkinje cells in 0.8 mg/kg dexamethasone injected rat (B) shows poorly developed dendritic processes compared with control rats (A).

내인성 GCs는 임신 기간 동안 뇌 전체의 발달과 신경생성에 관여하는데, 이와 결합하는 CS 수용체에는 미네랄코르티코이드 수용체(mineralocorticoid receptor, MR)와 글루코코르티코이드 수용체(glucocorticoid receptor, GR)의 두 종류가 있다. 실험동물의 종류와 성별에 따라 수용체의 분포와 발달하는 시기가 다르다.<sup>24</sup> 쥐 뇌의 CS 수용체는 임신 기간 중에 소량으로 유지되다가 임신 말기에 증가하고, 신생 쥐의 소뇌는 GR이 가장 많은 부위다.<sup>25</sup> GCs 수용체의 친화력도 실험동물의 종에 따라 다르는데, 쥐와 생쥐는 친화력이 높은 반면, 기니피그와 사람을 포함한 영장류는 친화력이 낮다. DEXA와 베타메타손과 같은 GCs는 주로 GR과 결합하여 작용하므로, GCs에 영향을 받는 기간에 존재하는 GR의 수와 분포에 따라 증상이나 병변이 달라진다. 임신 말기에 투여한 DEXA는 CS 수용체를 변화시키고, GR의 유전자 발현도 낮추는 작용도 있다. 이와 같이 GCs에 의한 병변이 실험동물의 종류와 성별뿐만 아니라 GCs의 투여시기와 뇌의 부위에 따라서 다르게 나타나기 때문에, 내인성 GCs의 증가

나 외부에서 투여한 GCs에 의해서 나타나는 소견을 비교할 때는 위와 같은 요소를 고려해야 한다.

오랫동안 스트레스나 체내 GCs가 증가하면 CS 수용체가 가장 많은 부위인 해마의 구조에 변화가 생기는 것으로 알려져 있는데, 그 중에서 가장 뚜렷한 변화는 해마의 크기가 감소하고 CA3에 있는 추체세포의 수상돌기가 위축되는 것이다.<sup>26-28</sup> Uno 등<sup>13</sup>은 임신 후기의 Rhesus monkey에게 DEXA 저용량과 고용량을 각각 1회 투여하거나 같은 양을 4회로 나누어서 투여한 결과, 해마 CA1-CA3의 추체세포와 치아이랑의 과립세포 수가 감소하며 세포질과 수상돌기가 파괴되는 것을 관찰하였다. 또한 CA3에 있는 이끼섬유말단(mossy fiber ending)에서 축삭-수상돌기 연결의 심한 변성이 관찰되었다. 이러한 변화는 가장 적은 용량을 투여했을 때도 나타났으며 병변은 DEXA 투여량에 비례하여 심해졌다. 같은 양이라도 소량으로 나누어서 4회 투여한 경우에는 한 번에 투여한 경우보다 더 심한 손상을 보여서, DEXA를 여러 번 투여하는 것이 중추신경계에 더 영향을 미친

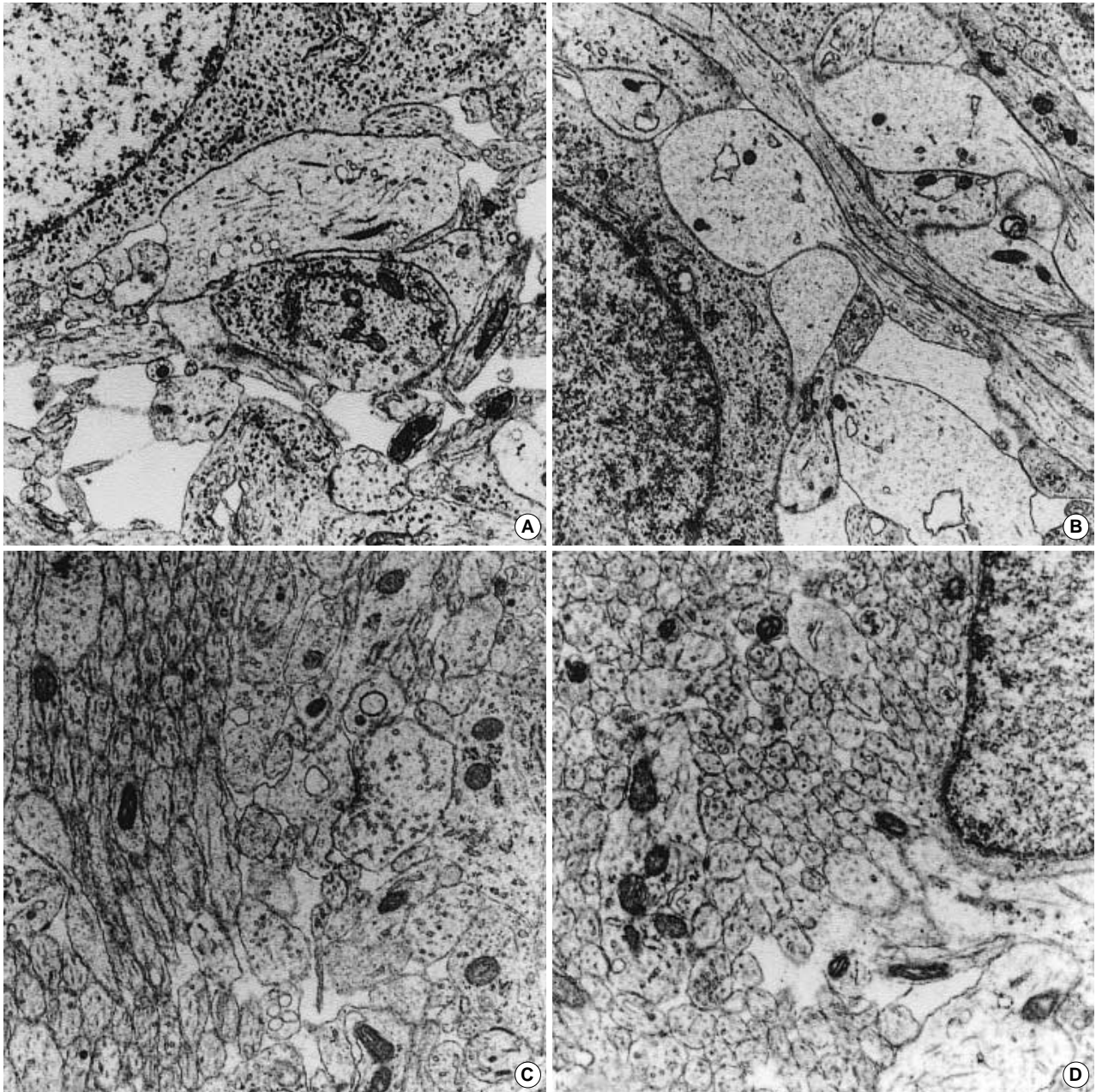


Fig. 6. The electron microscopic findings of cerebral and cerebellar cortex of control and dexamethasone injected rats at postnatal days 1 and 10. The electron microscopic examination shows edematous and degenerated dendrites with decreased organelles in the cerebral cortex of 0.8 mg/kg dexamethasone injected rat at 1 day (B) and the cerebellar cortex of 0.8 mg/kg dexamethasone injected rat shows similar changes at 10 days (D) compared with the control rats at 1 day (A) and 10 days (C). A and B:  $\times 13,600$ , C:  $\times 20,400$ , D:  $\times 25,500$ .

다는 사실을 시사하였다. 그리고 DEXA 투여 후 생후 20개월에 시행한 MRI 검사에서도 해마의 크기가 30% 정도 감소하여, GCs에 의해 태생기 해마에 발생한 병변이 생후에 오랜 기간 행동과 신경내분비 작용에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 DEXA 투여 후 생후 1일에 대뇌피질, 해마, 소뇌에서 신경세포의 변화는 Rhesus monkey의 해마에서 나타난<sup>13</sup> DEXA에 의한 급성 신경세포변성과 비슷했지만, 세포증식과 관계된

PCNA에 양성인 세포가 많이 관찰되었다. 생후 10일에 나타난 대뇌피질과 해마의 변화는 생후 1일에 나타난 변화와 비슷하여 신경세포의 손상과 불규칙한 배열, 부종, PCNA 양성 세포 증가가 지속되었고, 해마의 크기가 감소하거나 추체세포 수상돌기가 위축되는 현상은 관찰되지 않았다. 그러나 소뇌피질은 DEXA 투여량에 비례해서 부피가 작아지고 이랑의 크기가 작아졌으며, 풀킨세포의 세포질이 작고 수상돌기가 잘 발달하지 않아서



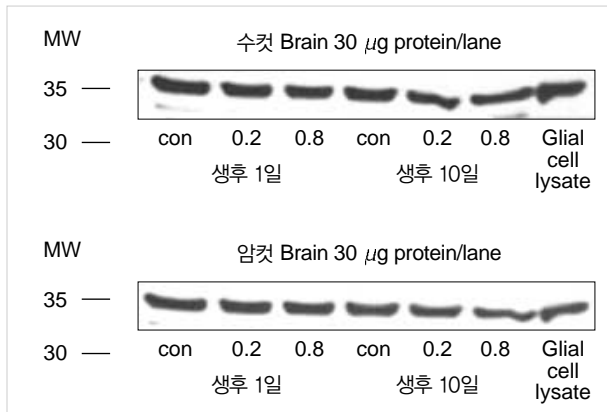


Fig. 7. Western blot of whole brain homogenates of control and dexamethasone injected newborn rats at postnatal days 1 and 10. Western blot of 1-day-old and 10-day-old newborn rat brain shows a single band of approximately 34 kDa. Male and female rats show similar findings in control and dexamethasone injected groups.

Uno 등<sup>13</sup>이 DEXA 투여 30일 후에 해마의 추체세포에서 관찰한 소견이나 Watanabe 등<sup>27</sup>과 Wooley 등<sup>28</sup>이 보고한 해마 추체세포에서 관찰한 수상돌기의 변화와 비슷하였다. 이런 소뇌피질의 변화나 그와 관련된 기능의 변화는 아직 자세히 보고된 바 없다. 본 연구에서는 소뇌피질에서 측정된 세포의 증식 정도가 DEXA 투여량에 비례했지만, 대조군과 실험군의 단위면적당 소뇌 과립세포 수가 차이가 없었던 것은 세포밀도가 가장 잘 유지된 부위의 세포 수를 세었기 때문으로 생각한다. 임신 17일 이전에 분화되는 것으로 알려진 중뇌와 뇌간에 있는 신경세포의 변형은 보이지 않았다. 이와 같이 대뇌와 소뇌의 변화가 차이가 있는 것은, 대뇌피질은 제태 기간 17-19일에 신경세포 분열이 가장 왕성한 반면 소뇌는 신경세포 분열이 대부분 출생 후에 생기고,<sup>12</sup> DEXA에 의한 신경세포의 손상은 세포분열이 왕성한 시기에 가장 많이 생기는 것과 관련이 있을 것으로 추측할 수 있다. 본 연구에서는 생후 1일과 10일에만 검사를 시행했기 때문에 병변의 정확한 발생시기와 진행과정은 알 수 없었다. 또한 소뇌피질의 변화가 일시적인 것인지 혹은 영구적인 손상이 생긴 것인지는 생후 10일 이후에 장기간 관찰해야 할 것이다.

본 연구에서는 산전에 DEXA를 투여함으로써 소뇌의 풀킨에 세포에서 나타나는 변화가 GDNF 단백질의 표현과 관련이 있고 투여량에 비례해 감소한다는 사실을 면역조직화학염색으로 확인할 수 있었다. 그러나 GCs에 의한 GDNF 생성의 변화를 정확하게 평가하기 위해서는 뇌의 각 부위에서 나타나는 mRNA 발현과 GDNF 수용체의 변화를 함께 검사할 필요가 있다. 본 연구에서 뇌조직 전 부위에서 시행한 면역탁본법 검사에서는 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었지만, 뇌의 각 부위 별로 검사하면 차이가 있을 것으로 생각한다.

GCs를 산전에 투여할 경우 뇌의 무게가 정상보다 줄어드는 것은 GCs가 핏피교세포를 손상시키고 그에 따라 수초가 적게

형성되기 때문이라고 설명하는 보고도 있다.<sup>29</sup> 또한 다른 연구에서는 DEXA 투여 후에 시신경의 수초가 늦게 형성되는 것을 관찰했지만,<sup>14,15</sup> 본 연구에서는 DEXA 투여가 수초 형성을 억제하는 것은 관찰할 수 없었다. 생후 1일된 쥐의 뇌는 수초가 거의 형성되지 않을 정도로 미숙한 상태며, 생후 10일에는 뇌의 일부 부분에서만 수초가 형성되는 시기이므로 정확한 평가를 하기 어려웠다. DEXA에 의해 신경세포가 손상된 후에 별세포가 증식했다는 연구보고<sup>12</sup>와는 다르게, 본 연구에서는 GFAP나 GDNF 면역염색에서 증식된 별세포를 볼 수 없었다.

동물실험 결과 뇌의 발생 기간에 투여한 GCs가 세포의 생성과 사멸을 방해하는 것으로 밝혀졌고, 또한 신경세포에서 포도당의 섭취를 억제하거나 세포질에서 신경세포로 글루탐산염이 재섭취되는 것을 억제함으로써 신경세포를 간접적으로 손상시키는 것으로 보고되었다.<sup>2,5</sup> 이와 같은 신경세포 손상을 일으키는 기전은 세포가 정상일 경우에는 큰 영향을 끼치지 않지만, 허혈이나 포도당이 부족한 신경세포에는 심한 손상을 일으킬 수 있다. 임상에서 조산 위험이 있는 태아는 허혈이나 저혈당 등과 관련이 있을 수도 있으므로, GCs를 투여하는 경우 중추신경계에 더 심한 손상이 생길 수 있다.

### 참고문헌

1. Jobe AH. Indications for and questions about antenatal steroids. *Adv Pediatr* 2002; 49: 227-43.
2. Matthews SG. Antenatal glucocorticoids and the developing brain: mechanisms of action. *Semin Neonatol* 2001; 6: 309-17.
3. Bloom SL, Sheffield JS, McIntire DD, Leveno KJ. Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 485-90.
4. Dessens AB, Haas HS, Koppe JG. Twenty-year follow-up of antenatal corticosteroid treatment. *Pediatrics* 2000; 105: E77.
5. Huang WL, Beazley LD, Quinlivan JA, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. Effect of corticosteroids on brain growth in fetal sheep. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 213-8.
6. Peterson BS, Vohr B, Staib LH, et al. Regional brain volume abnormalities and long-term cognitive outcome in preterm infants. *JAMA* 2000; 284: 1939-47.
7. Salokorpi T, Sajaniemi N, Hallback H, Kari A, Rita H, Von Wendt L. Randomized study of the effect of antenatal dexamethasone on growth and development of premature children at the corrected age of 2 years. *Acta Paediatr* 1997; 86: 294-8.
8. Shinwell ES, Karplus M, Reich D, et al. Early postnatal dexamethasone treatment and increased incidence of cerebral palsy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000; 83: F177-81.
9. French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. Repeat-

- ed antenatal corticosteroids: Size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 114-21.
10. Modi N, Lewis H, Al-Naqeeb N, Ajayi-Obe M, Dore CJ, Rutherford M. The effects of repeated antenatal glucocorticoid therapy on the developing brain. *Pediatr Res* 2001; 50: 581-5.
  11. Smith LM, Qureshi N, Chao CR. Effects of single and multiple courses of antenatal glucocorticoids in preterm newborns less than 30 weeks' gestation. *J Matern Fetal Med* 2000; 9: 131-5.
  12. Carlos RQ, Seidler FJ, Slotkin TA. Fetal dexamethasone exposure alters macromolecular characteristics of rat brain development: A critical period for regionally selective alterations? *Teratology* 1992; 46: 45-59.
  13. Uno H, Lohmiller L, Thieme C, *et al.* Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 1990; 53: 157-67.
  14. Dunlop SA, Archer MA, Quinlivan JA, Beazley LD, Newnham JP. Repeated prenatal corticosteroids delay myelination in the ovine central nervous system. *J Matern Fetal Med* 1997; 6: 309-13.
  15. Quinlivan JA, Beazley LD, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. Retinal maturation is delayed by repeated, but not single, maternal injections of betamethasone in sheep. *Eye* 2000; 14: 93-8.
  16. Chao HM, McEwen BS. Glucocorticoids and the expression of mRNAs for neurotrophins, their receptors and GAP-43 in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 26: 271-6.
  17. Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, *et al.* NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 1990; 5: 501-9.
  18. Koo H, Choi BH. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the developing human fetal brain. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19: 549-58.
  19. Ikeda T, Koo H, Xia YX, Ikenoue T, Choi BH. Bimodal upregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the neonatal rat brain following ischemic/hypoxic injury. *Int J Dev Neurosci* 2002; 20: 555-62.
  20. Abbasi S, Hirsch D, Davis J, *et al.* Effect of single versus multiple courses of antenatal corticosteroids on maternal and neonatal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 1243-9.
  21. O'Shea TM, Doyle LW. Perinatal glucocorticoid therapy and neurodevelopmental outcome: an epidemiologic perspective. *Semin Neonatol* 2001; 6: 293-307.
  22. Matthews SG. Dynamic changes in glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA in the developing guinea pig brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1998; 107: 123-32.
  23. Darlington RB, Dunlop SA, Finlay BL. Neural development in metatherian and eutherian mammals: Variation and constraint. *J Comp Neurol* 1999; 411: 359-68.
  24. Owen D, Matthews SG. Glucocorticoids and sex-dependent development of brain glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* 2003; 144: 2775-84.
  25. Pavlik A, Buresova M. The neonatal cerebellum: the highest level of glucocorticoid receptors in the brain. *Brain Res* 1984; 314: 13-20.
  26. Stein MB, Koverola C, Hanna C, Torchia MG, McClarty B. Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse. *Psychol Med* 1997; 27: 951-9.
  27. Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 1992; 588: 341-5.
  28. Woolley CS, Gould E, McEwen BS. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 1990; 531: 225-31.
  29. Barres BA, Lazar MA, Raff MC. A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids, and retinoid acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 1994; 120: 1097-108.