

흰쥐 대뇌의 국소허혈로 유발되는 신경세포의 세포사멸사 (apoptosis)와 Apoptosis Inducing Factor의 관련성에 관한 연구

이 영 일

단국대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : 세포사멸사(apoptosis)는 유전자에 의해 조절되는 세포의 자살기작으로서 생체의 발생 및 항상성(homeostasis) 유지를 위한 방어에 중요하게 작용한다. 그러나 신경계통에서의 부적절하고 과도한 세포사멸사는 알츠하이머병(Alzheimer's disease)을 비롯한 여러 퇴행성신경계질환(degenerative neuronal disease)들과 뇌졸중(stroke)에 의한 신경세포의 허혈손상(ischemic damage)에 깊이 관여하고 있다. 본 연구에서는 최근 뇌세포의 세포사멸사 과정에 있어서 caspase 계열의 작용과 관계없이 작용하는 것으로 알려진 AIF(apoptosis inducing factor)의 발현양상을 흰쥐(rat)를 사용한 국소허혈모델(focal ischemic model)에서 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 중간대뇌동맥(middle cerebral artery; MCA)의 폐쇄에 의해 국소허혈이 유발된 부위의 신경세포에서 세포사멸사가 일어난 것이 확인되었다.
2. 중간대뇌동맥을 폐쇄시킨 대뇌반구(cerebral hemisphere)의 ventral pallidum에서 AIF에 대한 면역염색성이 증가하였다.
3. 중간대뇌동맥에 의해 공급받는 부위에 대한 Western Blot 결과 중간대뇌동맥이 폐쇄된 대뇌반구의 대뇌겉질(cerebral cortex)과 해마(hippocampus)부위에서 AIF의 발현이 증가하였다.

뇌허혈(brain ischemia)에 의한 신경세포의 세포사멸사 기전에 대한 이해는 최근까지 주로 caspase 계열의 작용에 의한 것으로 간주되어 왔으나, caspase 계열의 작용과 무관한 AIF의 발견은 caspase 계열의 작용만으로는 설명될 수 없었던 부분에 대한 보완과 더불어 신경세포의 세포사멸사 기전에서 중요한 역할을 수행함이 증명되었다. 따라서 본 연구에서 밝혀진 결과들은 뇌허혈에 의한 신경세포의 세포사멸사와 관련된 병태생리를 이해하는데 있어서 형태학적으로 의미있는 자료를 제공할 것으로 사료된다.

찾아보기 낱말 : 세포사멸사, AIF(apoptosis inducing factor), 흰쥐, 중간대뇌동맥, 뇌허혈

서 론

세포사멸사(apoptosis)는 유전자에 의해 조절되는 세포의 자살기작으로서 생체의 발생 및 homeostasis를 위한 방어에 매우 중요하게 작용한다(Ellis 등 1991). 이러한 작용은 신체의 거의 모든 부위에서 관찰되는 현상이며, 특히 신경계통에서 일어나는 세

포사멸사는 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease) 등을 포함하는 퇴행성 뇌신경질환(degenerative neuronal disease)과 허혈(ischemia)에 의한 뇌신경세포의 사멸과 관련하여 그 중요성이 부각되어 있다. 그러므로 신경세포의 세포사멸사에 관여하는 인자들에 대한 분자생물학적 기전을 밝히는 것은 신경세포의 손상과정을 이해하고 향후 치료방법을 모색하는데 있어서 매우 중요한 요소가 될 것이다. 세포사멸사에 직간접적으

교신저자: 이영일(단국대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: anat104@dku.edu

로 관여하는 여러 인자들 중 현재까지 비교적 비중 있고 중요한 것으로 밝혀진 caspase (cystein protease with aspartate-specificity)는 (Cryns과 Yuan, 1998) 그 기질 (substrate)에서 aspartic acid 다음을 절단하는 cysteine protease로 현재까지 11종류가 밝혀져 있고 기질 선호도에 따라 세 그룹으로 나눌 수 있으며, 종류에 따라서는 alternating splicing에 따라 이형체가 존재하기도 한다. 이외에도 p53 단백질, PARP, c-jun 등 (Eliasson 등 1997, Endres 등 1997, Herdegen 등 1998, Morrison and Kinoshita, 2000, Martin-Villalba 등 2001)과 같은 세포사멸조절분자 (death regulatory molecules)들이 이에 관여하는 것으로 밝혀져 있으며, 특히 p53 단백질은 신경세포의 손상에 의한 세포사멸사에 있어서 상위억제제 (upstream initiator)로 작용하여 caspase의 활성을 유도하며 허혈 (ischemia)이나 흥분독소 (excitotoxin) 등에 의해 그 발현이 증가되는 것으로 보고되었다 (Xiang 등, 1996, Banasiak과 Haddad 1998, McGahan 등 1998). 이와 더불어 p53 유전자가 발현되지 않는 (null mutation) 상황에서는 뇌허혈을 유발시킬 경우 신경세포의 손상이 현저히 줄어들게 되며 (Crumrine 등 1994, Morrison 등 1996), 이러한 실험동물로부터 얻어진 신경세포들은 저산소증 (hypoxia)과 (Halterman 등 1999) 흥분독소에 대한 저항성이 증가되어 있음이 밝혀졌다 (Xiang 등 1996, 1998).

이처럼 caspase가 세포사멸사를 유발시키는 매우 중요한 요소임은 분명한 사실이지만 최근 들어 caspase의 작용과는 독립적으로 신경세포의 세포사멸사를 유발시키는 기전이 존재함이 점차 밝혀지고 있다 (Rideout과 Stefanis 2001, Cregan 등 2002). 실험동물모델을 이용하여 뇌허혈에 의한 신경세포의 세포사멸사 기전을 연구한 실험에서도 caspase를 억제하였을 경우 세포사멸사가 억제되지 않는 신경세포들이 있음을 보고하였다 (Rideout과 Stefanis 2001, Zhan 등 2001). 뿐만 아니라 경우에 따라서는 caspase가 정상적으로 활성화 되어도 caspase에 대한 억제제가 신경세포의 세포사멸사 자체를 억제하지는 못하는 것으로 판명되었다 (Miller 등 1997, Stefanis 등 1999, D'Mello 등 2000). 따라서 이러한 연구결과들은 caspase가 억제 되더라도 세포사멸사를 유발시

킬 수 있는 다른 보조적인 기전이 가동될 수 있음을 암시하는 것이다. 현재까지 caspase에 의해 매개되는 세포사멸사 기전에 대해서는 광범위하게 연구되어 왔으나 caspase계열의 활성화와 관련이 없는 세포사멸사의 기전에 대한 연구는 미약한 상태라 할 수 있다.

최근에 규명된 Apoptosis-inducing factor (AIF)는 분자량이 67 kDA인 caspase 비의존성 세포사멸사 효과기 (effector)로서, caspase계열의 활성화와 관계 없이 세포사멸사를 유발시키는 것으로 알려져 있다 (Susin 등 1999). AIF는 미토콘드리아 (mitochondria)의 내막과 외막 사이에 존재하는 플라보단백 (flavoprotein)으로서 세포가 특정한 세포사멸신호를 받게 되면 미토콘드리아로부터 핵 (nucleus)으로 전위하는 특징을 갖고 있다 (Daugas 등 2000). 또한 AIF는 caspase 계열의 활성화와 무관하게 분리된 핵 또는 세포에서 염색질 (chromatin)의 농축 (condensation)과 DNA의 절단현상을 일으킴이 입증되었다 (Susin 등 1999, 2000, Daugas 등 2000). 뿐만 아니라 p-53에 의해 유발되는 신경세포의 세포사멸사는 caspase 계열을 차단했을 경우에도 효과적으로 일어남이 보고되었다 (Cregan 등 2002). 이처럼 caspase 계열의 작용과 관계없이 세포사멸사를 단독으로 유발시킬 수 있는 새로운 단백질의 발견은 세포사멸사의 기전과 이에 관여하는 인자들에 대한 연구를 다른 관점에서 진행하게끔 하는 계기를 만들어 주었다. 그러나 AIF가 세포사멸사를 단독으로 유발시킬 수 있는 단백질임에도 불구하고 세포사멸사 과정에 있어서 과연 중추적 역할을 수행하는지에 대해서는 현재까지 연구된 결과만으로는 결론지을 수 없으며 AIF와 세포사멸사에 관여하는 다른 인자들과의 상호작용에 대한 연구 역시 앞으로 활발히 진행되어야 할 분야이다.

본 연구에서는 흰쥐의 중간대뇌동맥 (middle cerebral artery) 폐쇄에 의한 국소허혈 (focal ischemia) 동물모델을 이용하여 뇌의 각 부위에서의 AIF의 발현양상을 대조군과 비교분석하였다. 본 연구에서 밝혀진 결과들은 뇌허혈에 의한 신경세포의 세포사멸사와 관련된 병태생리를 이해하는데 있어서 형태학적 으로 의미 있는 자료를 제공할 것으로 사료된다.

재료 및 방법

1. 중간대뇌동맥폐쇄 (Middle Cerebral Artery Occlusion; MCAO)를 통한 동물모델의 구축

무게 250~300그램 가량의 수컷 SD (Sprague-Dawley) 흰쥐를 실험에 사용하였다. 실험동물의 마취는 zoletil-50[®]을 복강내 주사하여 유도하였으며 바깥목동맥 (external carotid artery)의 절단된 부위로 4-0 Ethicon nylon filament[®]를 삽입하여 중간대뇌동맥 (MCA)를 폐쇄시켰다. 이때 4-0 Ethicon nylon filament[®]는 속목동맥 (internal carotid artery)를 경유하여 최종적으로 중간대뇌동맥의 바닥부위에 놓이도록 하였다. 마취의 유도에서부터 회복까지 전 과정동안 실험동물의 체온은 37°C가 유지되도록 하였으며 수술의 성공여부를 확인하기 위해 수술 후 시간대별로 (3, 6, 12시간) 중간대뇌동맥이 공급하는 부위를 포함하는 뇌의 각 부위에서 TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 염색을 실시하였다. TTC 염색을 위해 추출된 흰쥐의 뇌를 brain slicer를 이용해 약 2 cm 정도의 두께로 관상 (coronal) 절편을 시행한 다음 37°C에서 30분간 2%의 TTC 용액에 처리하였다. TTC 염색을 마친 흰쥐 뇌 절편은 최종적으로 neutral buffered formalin (NBF)을 이용하여 고정하였다.

2. TUNEL 염색

세포사멸사 때 일어나는 nuclear DNA fragmentation을 알아보기 위해 in-situ apoptosis detection kit인 Apoptag kit (OncorTM)을 사용하였다. 먼저 동물모델을 ether로 마취시킨 후 Bouin's fluid로 관류고정한 다음 뇌를 추출하여 brain-slicer로 부위별로 뇌를 자른 후에 동일 고정액에 4시간동안 후고정하였다. 그런 다음 탈수 및 투명화의 통상적인 조직처리과정을 거쳐 Paraplast에 포매하여 10 µm 두께의 관상 연속절편후 염색단계에 들어갈때 까지 보관하였다. 절편을 xylene에서 탈파라핀화 (deparaffinization)하고 에탄올을 거쳐 합수 (hydration)시킨 다음 PBS (0.05 M, pH 7.4)로 5분간 2회 세척하고 다시

10 mM PBS (phosphate buffered saline)로 5분간 3회 세척해주고 나서 endogenous peroxidase quench를 위해 2% H₂O₂에 5분간 실온에서 반응시켰다. 다시 10 mM PBS로 5분간 3회 세척하고 equilibrium buffer를 각각의 슬라이드에 2방울 (약 100 µl) 정도를 떨어뜨려 10분간 실온에서 반응시켰다. 그런 다음 reaction buffer 2 방울에 Tdt (terminal deoxy-transferase) enzyme 1 방울을 가하여 만든 Tdt 용액을 100 µl씩 가하여 37°C에서 약 80분간 반응시켰다. 그 뒤 stop wash buffer를 가하여 역시 37°C에서 약 1시간 반응시켰다. 다시 10 mM PBS로 5분간 3회 세척 후 anti digoxigenin-peroxidase를 2방울씩 각각의 슬라이드에 점적하여 실온에서 약 30분간 반응시키고 10 mM PBS로 5분씩 3회 세척하였다. 그런 다음 0.02%의 H₂O₂가 첨가된 0.05% DAB 용액으로 실온에서 약 5분간 발색시키고 멸균증류수로 세척하였으며 마지막으로 0.5% methyl green으로 1분간 대조염색을 시행한 다음 탈수 및 투명화 과정을 거쳐 현미경으로 관찰하였다.

3. AIF 면역조직화학염색 (AIF Immunohistochemistry)

Ether로 쥐를 마취시킨 후 흉강을 열어 우심방귀를 절개함과 동시에 좌심실로 peristaltic pump와 연결된 22 G 바늘을 넣고, 0.12 M PBS, pH 7.4, 4°C 용액을 1분간, 그리고 4% paraformaldehyde가 들어있는 phosphate buffer (0.12 M)를 10분간 주입하였다. 이때 모든 주입속도는 50~60 ml/min를 유지하고 고정액은 쥐의 체중의 약 2배 정도가 주입되도록 하였다. 머리와 목 부위의 피부를 면도칼로 절개한 다음 안구 앞쪽의 이마뼈 (frontal bone)을 절단하여 두개골을 열고 뇌를 적출 하였다. Brain slicer에 적출한 뇌를 놓은 다음 면도날로 4~6 mm 간격으로 관상절개하여 관류고정액과 동일한 고정액에 16~18시간 동안 후고정하였다. 12%의 sucrose가 첨가된 0.12 M PBS 용액에 조직을 한시간 동안 담가두고 같은 용액을 1시간마다 두 번 더 교환해 주었으며, 16%의 sucrose와 18%의 sucrose가 첨가된 0.12 M PBS 용액들도 같은 방법으로 3번씩 교환해 준 다음 18%의 sucrose가 첨가된 0.12 M PBS 용액에서

1~3일간 보관하였다. 보다 높은 농도로 교환시킬 때에는 조직이 용액 속으로 가라앉은 것을 확인한 후 교환하였다. Sucrose 처리를 한 조직은 냉각포매제 (OCT compound)에 포매하여 액체질소에 의해 온도가 낮아진 알코올 속에 넣어 30초 동안 얼렸다.

냉동절편을 40 μm 두께로 시행하였으며, 연속 절편 5장씩을 함께 보존용액이 들어있는 다공판 (multiwell plate)에 넣어 면역조직화학 염색을 시행하기 전까지 4°C에서 보관하였다.

면역조직화학 염색은 자유부유 (free-floating) 방법으로 시행하였으며, 각 단계는 다음과 같다. 자른 조직을 매 5장 마다 한 장씩 취하여서 8개의 well이 있는 아크릴 판에 순서대로 넣은 후 0.012 M PBS에서 15분씩 3회 세척한 후 rabbit anti-AIF (1 : 2,000) 다클론항체와 0.5 mg/ml bovine serum albumin, 1.5% goat serum 그리고 0.3% Triton X-100이 들어있는 1차 항체 용액에서 48시간 동안 4°C에서 진탕시키면서 반응시켰다. 0.012 M PBS에서 10분씩 3회 세척한 다음 biotinylated anti-rabbit IgG (Vectastain kitTM)를 1 : 200으로 희석하여 1시간 30분 동안 진탕시키며 실온에서 반응시켰다. 다시 0.012 M PBS에서 10분씩 3회 세척하고 avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain kit의 A 용액 1 : 100, B 용액 1 : 100, 0.3% Triton X-100)에서 1시간 30분 동안 진탕시키며 실온에서 반응시켰다. 이 후 다시 0.012 M PBS에서 10분씩 3회 세척한 다음 0.003% hydrogen peroxide를 포함한 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine (SigmaTM) 용액에서 7~12분간 실온에서 발색반응을 시켰다. 다시 0.012 M PBS에 세척한 다음 조직을 gelatin coated slide에 올려 2시간 이상 실온에서 말렸다.

신경세포에 대한 염색성을 좋게 하기 위하여 다음의 과정을 추가하였다. Ethanol과 chloroform을 1 : 1로 섞은 용액에 조직을 1시간 동안 담근 후 10분 동안 증류수를 세번 교환해 주면서 세척하였다. 0.005% OsO₄ (osmium tetroxide) 용액에서 7분간 반응시키고, 증류수로 10분간 세번 세척한 후 0.5% thiocarbonylhydrazide (SigmaTM) 용액에서 10분간 반응시키고 다시 증류수로 10분간 세번 세척하였다. 0.005% OsO₄ 용액에서 2분간 다시 반응시킨 다음 증류수로 10분간 세번 세척하고 저농도 ethanol에서

고농도 ethanol로 옮겨서 탈수한 후 xylene으로 투명화시켜서 coverglass를 입혔다.

4. AIF Western Blotting

대조군과 실험군의 단백질의 양이 각각 50 μg 으로 동일하게 만든 무세포 추출물을 증류수와 bromophenol blue dye를 첨가한 후 5분간 끓였다. 다시 식힌 후 5분 동안 원심분리하여 SDS가 포함된 gel에 loading하여 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 4°C에서 12시간 동안 단백질을 nitrocellulose filter로 이동 (transfer)시켰다. Nitrocellulose filter를 분리한 다음 non-fat milk가 첨가된 Blotto 용액에 1시간 동안 담구어 비특이적인 항원-항체 반응을 차단하였다. Blotto 용액을 제거한 후 1 : 4,000으로 희석한 anti-AIF 1차항체로 3시간 동안 처리하고 Blotto 용액으로 10분 간격으로 4회 세척하였다. 1 : 2,000으로 희석한 anti-rabbit IgG (alkaline phosphatase conjugate)를 2차항체로 사용하여 3시간 처리한 후 Blotto 용액으로 세척하였다. 발색과정은 enhanced chemiluminescence (ECL Western blotting detection reagents, Amersham Pharmacia BiotechTM) 방법으로 시행하였다. 최종적으로 결과에 대한 정량적인 분석을 위해 이미지분석시스템 (image-analysis system, Vilber LourmatTM)을 사용해 면적백분율 (area percentage)을 구하였다.

결 과

1. 뇌허혈의 정도와 범위 조사 (TTC 염색)

중간대뇌동맥의 폐쇄에 의한 경색 (infarct) 범위를 측정하기 위하여 수술후 시간대별로 (3, 6, 12시간) TTC (2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride) 염색을 시행한 결과 주로 꼬리조가비핵 (caudate putamen; Cpu)과 가쪽핵 (nucleus accumbens) 그리고 배쪽창백핵 (ventral pallidum)을 포함하는 바닥핵 (basal ganglia) 부위를 중심으로 TTC에 의해 전혀 염색되지 않은 것을 관찰할 수 있었으며 그 주변의 대뇌겉질 (cerebral cortex) 부위도 TTC에 대한 염색이 거의

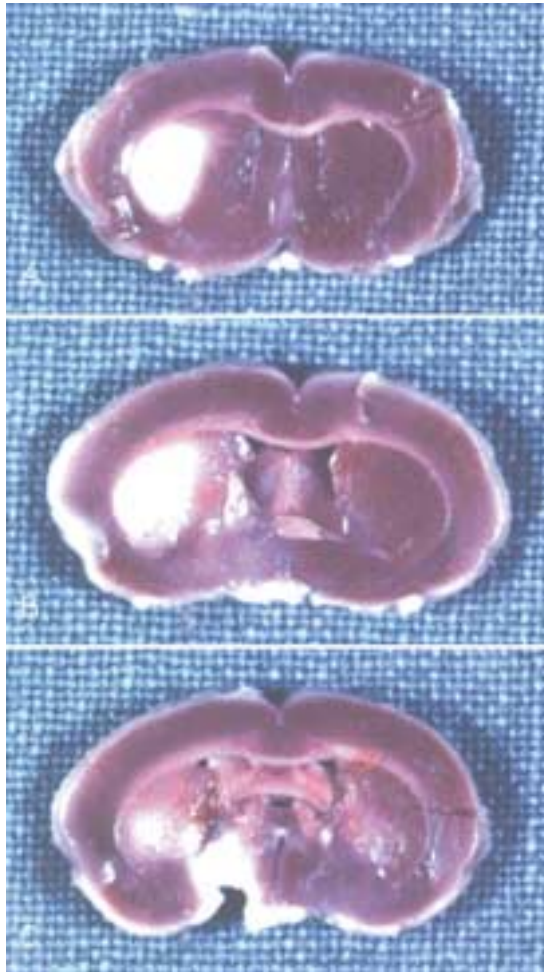


Fig. 1. TTC Staining for measurement of infarct volume.

A : Bregma 1.20 mm	Interaural 10.20 mm
B : Bregma 0.20 mm	Interaural 9.20 mm
C : Bregma -0.80 mm	Interaural 7.20 mm

되지 않았음이 확인되었다(Fig. 1). 이러한 현상은 수술후 3시간 경과 군에서도 뚜렷이 관찰할 수 있었으며 시간이 지날수록 더욱 두드러지는 양상을 보였다. 한편 TTC에 의해 정상적으로 염색된 부위와 경색으로 인해 염색이 되지 않은 부위의 경계는 중간대뇌동맥이 공급하는 부위를 경계로 비교적 잘 구분되었으며 이는 동물모델 구축을 위해 바깥목동맥(external carotid artery)의 절단된 부위로 삽입된

4-0 Ethicon nylon filament[®]가 중간대뇌동맥이 시작되는 부위에 정확히 위치하였음을 보여주는 결과이다.

2. 신경세포의 세포사멸사(TUNEL 염색)

실험적으로 뇌허혈이 유발된 부위에 존재하는 신경세포에 세포사멸사가 일어났는지 여부와 그 정도를 부위별로 파악하기 위한 간접적인 방법으로 수술후 시간대별로(3, 6, 12시간) TUNEL 염색을 시행하였다. TUNEL 양성반응은 수술 후 12시간이 지난 군에서만 관찰할 수 있었으며 수술 후 각각 3시간과 6시간이 지난 군에서는 TUNEL 양성반응이 관찰되지 않았다. TUNEL 양성반응을 보인 신경세포의 핵은 주로 뇌허혈에 의해 경색(infarction)이 유발된 대뇌반구(cerebral hemisphere)의 꼬리조가비핵(caudate putamen; Cpu)에서 관찰되었다. 반면 정상부위인 반대쪽 대뇌반구에서는 꼬리조가비핵을 포함한 모든 부위에서 TUNEL 양성반응을 보인 신경세포의 핵을 거의 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

3. AIF에 대한 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)

뇌허혈에 의해 경색이 유발된 부위에서의 세포내 AIF의 양적인 변화를 중간대뇌동맥이 공급하는 대뇌반구의 부위별로 살펴보기 위해 수술 후 12시간과 24시간이 지난 군에 대해 각각 AIF에 대한 면역조직화학염색을 시행하였다. AIF에 대한 면역염색성은 정상 대뇌반구의 모든 부위에서 비교적 고르게 관찰되었으나 그 발현정도는 매우 작은 것이 확인되었다. 이에 반해 경색이 유발된 반대편 대뇌반구에서는 배쪽창백핵(ventral pallidum)을 중심으로 AIF에 대한 면역염색성이 뚜렷이 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 AIF에 대한 면역염색성의 증가는 수술후 12시간이 경과한 군에서는 거의 나타나지 않았지만 24시간이 경과한 군에서는 뚜렷이 확인할 수 있었다(Fig. 3).

4. AIF의 시간대별 발현양상의 변화(Western Blotting)

뇌경색의 유발에 의한 세포내 AIF의 발현정도의

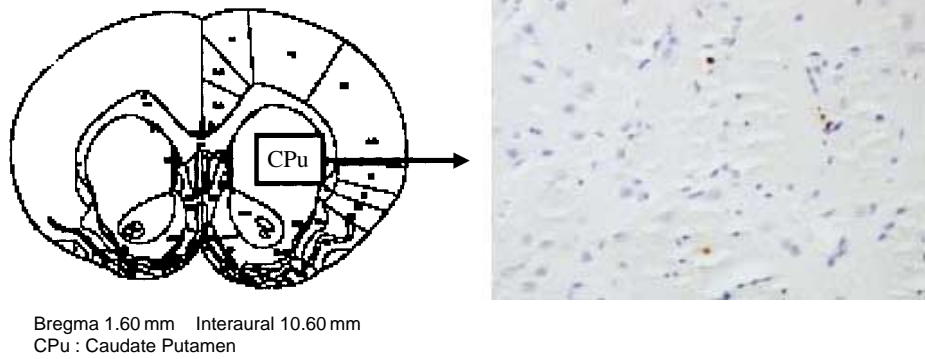


Fig. 2. TUNEL positive nuclei (arrows) in the ipsilateral (ischemic) caudate putamen. 12 hrs. after middle cerebral artery occlusion ×200.

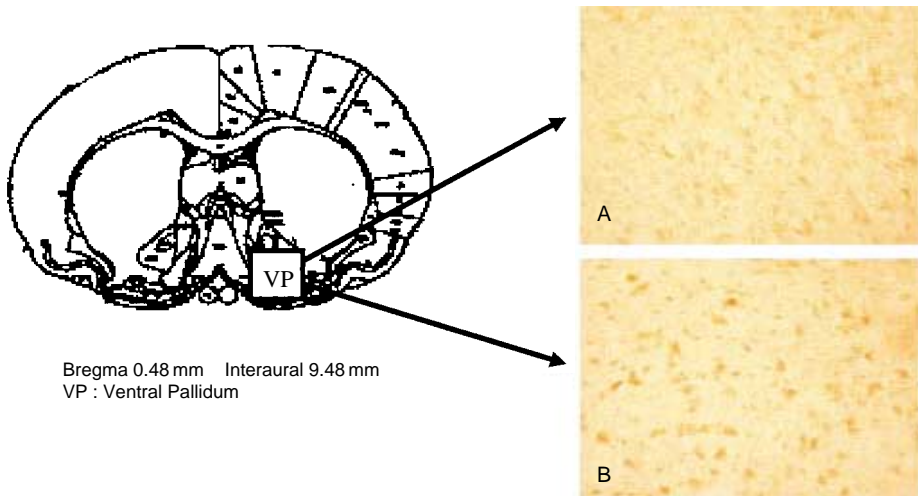


Fig. 3. Increased AIF immunoreactivity in CPU (caudateputamen) after 24 hrs. of ischemic insult. ×200. A : contralateral hemisphere (non-ischemic), B : ipsilateral hemisphere (ischemic)

변화를 보다 정량적으로 살펴보기 위해 AIF에 대한 Western Blotting을 수술후 12시간, 18시간, 그리고 24시간이 지난 군에서 각각 시행하였다. 이 때 Western Blotting을 위한 샘플은 중간대뇌동맥이 공급하는 부위와 뇌허혈에 비교적 민감한 부위로 알려진 해마(hippocampus)부위로 나누어 추출하였다. 먼저 해마부위에서의 AIF의 발현양을 면적백분율(% area)로 계산하였을 경우 수술후 24시간이 경과하였을 때 가장 많은 발현양(100%)을 보였고 12시간

경과군과 18시간 경과군에서는 각각 80%와 87%를 나타냈다. 한편 해마를 제외한 중간대뇌동맥이 공급하는 부위에서의 AIF 발현양은 수술후 12시간이 경과하였을 때 가장 많은 발현양(100%)을 보였으며 18시간 경과군과 24시간 경과군에서는 각각 65%와 80%를 나타냈다. 따라서 해마부위에서의 AIF의 발현양의 최고치는 해마를 제외한 중간대뇌동맥이 공급하는 부위에서보다 늦게 나타나는 시간적 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

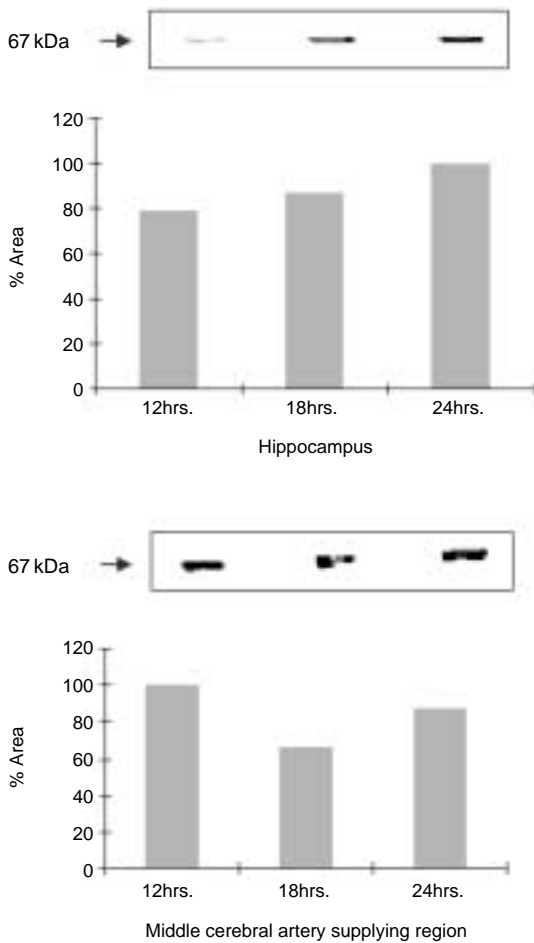


Fig. 4. Western Blot analysis of AIF according to the time course after middle cerebral artery occlusion in the hippocampus and middle cerebral artery supplying region.

고찰

본 연구의 결과에서 나타난 바와 같이 중간대뇌동맥의 폐쇄에 의한 국소허혈(focal ischemia)은 매우 정확하고 효과적으로 진행되었다. 이처럼 허혈을 국소적으로 유발시킬 경우에는 뇌의 특정부위만을 선택하여 그 부위의 기능적 의미를 파악할 수 있음은 물론, 일반적으로 한쪽 대뇌반구에서만 허혈을 유도하게 되므로 대조군(control)을 따로 선정할 필

요가 없다. 따라서 뇌허혈의 정도 및 범위에 대한 본 연구결과는 목동맥(carotid artery)과 척추동맥(vertebral artery)을 결찰하여 뇌의 완전허혈(global ischemia)을 유발시키는 기존의 연구방법과 비교할 때 정확도와 신뢰도, 그리고 효율적인 측면에서 훨씬 앞선 것으로 판단된다. 그러나 본 연구에서는 중간대뇌동맥에 대한 선택적 폐쇄를 일시적(transient)이 아닌 영구적(permanent)으로 유발하였는데, 일시적 폐쇄모형을 시도하기 위해 4-0 Ethicon nylon filament®를 일정 기간이 경과한 후 중간대뇌동맥으로부터 삽입했던 부위를 통해 제거했을 경우 대부분의 흰쥐들이 심한 경련(convulsion)과 함께 바로 죽는 결과를 초래하였다. 그러나 임상적으로 유용하게 사용되기 위해서는 국소허혈 뿐만 아니라 일시적 허혈이 가능한 모델이 반드시 필요하므로 이를 위한 기술적 보완이 향후 연구수행에 있어서 무엇보다 중요한 것으로 판단된다.

Caspase 계열이 급성뇌손상(acute neuronal injury)에 따르는 신경세포의 세포사멸사에 있어서 중요한 매개자(mediator)로 작용함은 틀림없는 사실이다. 이를 뒷받침 하기 위하여 세포사멸사가 펩타이드 억제제(peptide inhibitor)를 포함한 caspase 억제제에 의해 억제된다는 사실이 보고되었으며 각각의 caspase 특이적인 기능을 연구하기 위해 caspase 유전자를 제거하는 연구(knock-out mice)들이 수행되었다(Sadowski 등 2002). Caspase-1 또는 caspase-11이 결핍된 mice는 전체적으로는 정상적인 발생을 하지만 조직에 따라서 Fas와 granzyme-B가 매개하는 세포사멸사에 대해 저항성이 있는 것으로 나타났다(Kudia 등 1995, Wang 등 1998). 한편 caspase-3이 제거된(null) 생쥐(mice)는 중추신경계(central nervous system)에서 과다세포증식(hypercellularity)이 나타나고 출산을 전후로 결국 사망하게 되는데, 이러한 결과는 발생과정에서 중추신경계의 불충분한 세포사멸에 의한 것임을 알 수 있다(Kudia 등 1996). 그러나 세포사멸사와 caspase 계열 사이의 직접적인 관련성에 대한 여러 연구결과에도 불구하고 실제 caspase 계열을 억제하였을 경우에는 신경세포에 대한 일시적이거나 제한적인 보호효과가 있다고 보고되었다(Rideout과 Stefanis 2001). 이러한 결과는 뇌

손상으로부터 신경세포를 보호하기 위한 치료법 개발의 초점을 단순히 caspase 계열을 억제하는 데에만 맞추는 것에 한계가 있음을 보여주고 있으며, 따라서 caspase 계열의 작용을 보완해주거나 이와는 독립적인 apoptosis 유발기전에 대한 연구와 이를 기초로 하는 다양한 치료법 개발이 필요하게 되었다. 실제로 미토콘드리아로부터 분리된 단백질인 endonucleaseG와 HtrA2는 최근들어 강력한 caspase 계열 비의존성 세포사멸사 매개자인 것으로 밝혀졌다 (Li 등 2001, Suzuki 등 2001, van Loo 등 2001). AIF에 대해서는 AIF-null mouse 모델을 만들 수 없었기에 보다 자세한 연구는 진행될 수 없었다. 흥미롭게도 AIF는 발생과정에서 나타나는 programmed cell death에 필수적인 것으로 보고되었으며 (Joza 등 2001) 이는 AIF-null mouse 모델을 만들기 어려운 이유 중 하나일 것으로 사료된다.

한편 세포사멸사를 촉진시키거나 억제시키는 구성원들로 이루어진 Bcl-2 계열의 단백질들은 서로 상반되는 작용을 적절히 조합함으로써 미토콘드리아에 의해 매개되는 모든 세포사멸사 과정을 제어할 수 있게 된다 (Adams와 Cory 1998, Gross 등 1999). 세포사멸사를 촉진시키는 (proapoptotic) 것으로 알려진 Bax는 아직 정확한 기전이 밝혀진 것은 아니지만 특정한 세포사멸신호 (cell death signal)에 의해 세포질로부 미토콘드리아로 전위되어 (Goping 등 1998) 그곳에서 미토콘드리아막의 투과성을 높이고 cytochrome-c와 같은 세포사멸사 유발인자를 방출하며 (Finucane 등 1999), caspase 계열에 의존적이거나 비의존적인 모든 신경세포의 세포사멸사 기전에 관여하는 것으로 보고되었다 (Cregan 등 2002). 반면 Bcl-2는 p-53에 의해 유발되는 caspase 계열에 의존적이거나 비의존적인 모든 신경세포의 세포사멸사를 차단하며 이 과정에서 AIF는 시간적으로 적어도 cytochrome-c 보다 먼저 미토콘드리아로부터 방출되는 것으로 보고되었다 (Cregan 등 2002). 이전의 연구결과들에 의하면 미토콘드리아로부터의 AIF의 방출은 cytochrome-c와 동시에 또는 이보다 먼저 일어나는 것으로 보고되었는데 (Daugas 등 2000, Loeffler 등 2001) 아마도 이러한 AIF와 cytochrome-c의 방출에 관한 시간적 전후관계는 미토

콘드리아막의 투과성을 증가시키는 자극의 특성과 세포의 종류에 따라 결정되는 것으로 판단된다. 뇌 허혈에 의해 세포내에서 발현되는 AIF의 양적인 증가는 본 연구의 결과에서 알 수 있듯이 중간대뇌동맥이 공급하는 다른 부위보다 해마 (hippocampus)에서 시간적으로 더 늦게 증가하는 양상을 보였다. 해마는 일반적으로 허혈에 대해 뇌의 다른 부위보다 비교적 민감한 것으로 알려져 있지만 AIF 발현량의 증가가 시간적으로 더 느리게 나타난 결과에 대한 해답은 AIF가 미토콘드리아로부터 핵으로 전위되는 시간적 전후상황과 연계된 보다 자세한 연구가 이루어져야 얻을 수 있을 것으로 보인다.

결론적으로 AIF는 뇌허혈로 인한 신경세포의 세포사멸사 기전과 깊은 관련이 있음이 분명해졌으며 이는 뇌허혈에 의한 신경세포의 손상기전을 연구하는데 있어서 중요한 단서를 마련해 줄 것으로 판단된다. 뇌허혈을 비롯한 급성뇌손상으로부터 신경세포를 보호하기 위한 치료법 개발에 있어서 AIF의 중요성은 더욱 부각될 것으로 전망되므로 향후 AIF에 대한 보다 심도있는 연구를 통하여 AIF와 세포사멸사에 관여하는 다른 인자들 사이의 인과관계는 물론, 다른 인자들은 제외된 상태에서 AIF의 단독기능만으로도 효과적인 세포사멸사가 유발될 수 있는지 여부도 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Adams JM, Cory S : The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281 : 1322-1326, 1998.
- Banasiak KJ, Haddad GG : Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res* 797 : 295-304, 1998.
- Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS : Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 158 : 507-517, 2002.
- Crumrine RC, Thomas AL, Morgan PF : Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 14 : 887-891, 1994.

- Cryns V, Yuan J : Proteases to die for. *Genes Dev* 12 : 1551–1570, 1998.
- D’Mello SR, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P : Caspase-3 is required for apoptosis-associated DNA fragmentation but not for cell death in neurons deprived of potassium. *J Neurosci Res* 59 : 24–31, 2000.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irionpoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G : Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14 : 729–739, 2000.
- Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hum PD, Traystman RJ Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL : Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 3 : 1089–1095, 1997.
- Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR : Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7 : 663–698, 1991.
- Endres M, Wang ZQ, Namura S, Waeber C, Moskowitz MA : Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly (ADP-ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab* 17 : 1143–1151, 1997.
- Finucane DM, Bossy-Wetzed E, Waterhouse NJ, Cotter TG., Green DR : Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem* 274 : 2225–2233, 1999.
- Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, Shore GC : Regulated targeting of Bax to mitochondria. *J Cell Biol* 143 : 207–215, 1998.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ : Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13 : 1899–1911, 1999.
- Halterman MW, Miller CC, Federoff HJ : Hypoxia-inducible factor-1 alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J Neurosci* 19 : 6818–6824, 1999.
- Herdegen T, Claret FX, Kallunki T, Martin-Villalba A, Winter C, Hunter T, Karin M : Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* 18 : 5124–5135, 1998.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L : Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410 : 549–554, 2001.
- Keramaris E, Stefanis L, MacLaurin J, Harada N, Takaku K, Ishikawa T, Takero MM, Robertson GS, Nicholson DW, Slack RS, Park DS : Involvement of caspase-3 in apoptotic death of cortical neurons evoked by DNA damage. *Mol Cell Neurosci* 15 : 368–379, 2000.
- Kudia K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston MS, Su S, Flavell RA : Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267 : 2000–2002, 1995.
- Kudia K, Zheng TS, Na S, Kuan CY, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA : Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384 : 368–372, 1996.
- Li LY, Luo X, Wang X : Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. *Nature* 412 : 95–99, 2001.
- Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Metivier D, Nieminen AL, Brothers G, Penninger JM, Kroemer G : Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J* 15 : 758–767, 2001.
- Martin-Villalba A, Hahne M, Kleber S, Vogel J, Falk W, Schenkel J, Krammer PH : Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ* 8 : 679–686, 2001.
- McGahan L, Hakim AM, Robertson GS : Hippocampal Myc and p53 expression following transient global ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 56 : 133–145, 1998.
- Miller TM, Moulder KL, Knudson CM, Creedon DJ, Deshmukh M, Korsmeyer SJ, Johnson EM : Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J Cell Biol* 139 : 205–217, 1997.
- Morrison RS, Kinoshita Y : The role of p53 in neuronal cell death. *Cell Death Differ* 7 : 868–879, 2000.
- Morrison RS, Wenzel HJ, Kinoshita Y, Robbins CA, Donehower LA, Schwartzkroin PA : Loss of the p53 tumor suppressor gene protects neurons from kainate-induced cell death. *J Neurosci* 16 : 1337–1345, 1996.
- Rideout HJ, Stefanis L : Caspase inhibition: a potential therapeutic strategy in neurological diseases. *Histol Histopathol* 16 : 895–908, 2001.
- Sadowski DK, Coy JF, Mier W, Hug H, Los M : Caspases—their role in apoptosis and other physiological processes as

- revealed by knock-out studies. *Arch Immunol Ther Exp* 50 : 19-34.
- Sean PC, Andre F, Jason GM, Steven MC, Francesco C, Seong WY, Ted MD, Valina LD, David SP, Guido K, Ruth SS : Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 158 : 507-517, 2002.
- Selznick LA, Zheng TS, Flavell RA, Rakic P, Roth KA : Amyloid beta-induced neuronal death is bax-dependent but caspase-independent. *J Neuropathol Exp Neurol* 59 : 271-279, 2000.
- Stefanis L, Park DS, Friedman WJ, Greene LA : Caspase-dependent and independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons. *J Neurosci* 19 : 6235-6247, 1999.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M : Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397 : 441-446, 1999.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R : A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8 : 613-621, 2001.
- van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declereq W : Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* 8 : 1136-1142, 2001.
- Wang S, Miuyma SM, Jung YK, Zhu H, Li E, Yuan J : Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 92 : 501-509, 1998.
- Xiang H, Hochman DW, Saya H, Fujiwara T, Schwarzkroin PA, Morrison RS : Evidence for p53-mediated modulation of neuronal viability. *J Neurosci* 16 : 6753-6765, 1996.
- Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Schwarzkroin PA, Morrison RS : Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J Neurosci* 18 : 1363-1373, 1998.
- Zhan RZ, Wu C, Fujihara H, Taga K, Qi S, Naito M, Shimoji K : Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome-c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 : 529-540, 2001.

Korean J Phys Anthrop
16(4): 279 ~ 289, 2003

Abstract

Changes of Apoptosis Inducing Factor in the Rat Brain with Ischemic Injury Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion

Young-Il Lee

Department of Anatomy, College of Medicine, DanKook University, Chonan, Korea

It is well known that cerebral ischemia induces apoptotic neuronal cell death along with necrosis. Apoptosis is characterized by several morphological nuclear changes including chromatin condensation and nuclear fragmentation. These changes are triggered by the activation of members of caspase family, caspase activated DNase, and several novel proteins. A novel gene, the product of which caused chromatin condensation and DNA fragmentation, was recently identified, cloned, and designated apoptosis inducing factor (AIF). AIF is a mitochondrial flavoprotein (prosthetic group: flavin adenine dinucleotide) with significant homology to plant ascorbate reductase and bacterial NADH oxidase, and is normally confined to the mitochondrial space. In a variety of different apoptosis-inducing conditions, AIF translocates through the outer mitochondrial membrane to the cytosol and the nucleus. Thus, similar to cytochrome c, AIF is a phylogenetically old, bifunctional protein with an oxidoreductase function and a second apoptogenic function.

In this study, to investigate changes of AIF expression levels in the rat brain during various time periods (6, 12, 18, 24 hrs) of ischemic insults, we performed permanent middle cerebral artery (MCA) occlusion model using male SD rats and the extent of ischemic injury was measured by 2% TTC (2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride) staining. There were numerous TUNEL-positive neuronal cell nuclei, which implies apoptotic cell death in the areas with ischemic insult. Western blot analysis was performed with separate samples (cytosolic fraction & mitochondrial fraction). This method was designed to investigate if the expression of AIF is really increased during ischemic injury, or the increased AIF activity is caused by its release from the mitochondrial inter-membrane space to cytosol. In the immunohistochemical study using polyclonal anti-AIF antibody revealed overall distribution of AIF in the rat brain including cerebral cortex, basal ganglia and also in hippocampus that is especially sensitive to ischemia. There was apparently increased AIF immunoreactivity in the nucleus accumbens of ischemia-induced hemisphere compared to contralateral control hemisphere.

Our results seem to be the first evidence on the involvement of AIF in the apoptotic neuronal cell loss with ischemic insult and will provide some clues to the pathophysiology of neuronal apoptosis induced by ischemic insult. Further researches will reveal functional relationship between AIF and other factors involved in chromatin condensation and degradation and whether AIF itself will be useful as a caspase-independent, Bcl-2-independent death inducer.

Key words : Apoptosis, AIF (apoptosis inducing factor), Rat, Middle cerebral artery, Cerebral ischemia