

만성 저산소 환경에 의한 신경세포의 사멸에 recombinant erythropoietin이 미치는 영향

김호정, 백진기¹, 양성준¹, 강기영¹, 김강련², 김 현²
관동대학교 의과대학 해부학교실, ¹서남대학교 의과대학 해부학교실,
²고신대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : 만성 저산소증은 중추신경계의 신경세포와 혈관의 형성에 많은 영향을 준다. EPO (erythropoietin)은 조혈 작용을 유도하는 성장인자로서, 최근에는 신경세포의 생존을 유도하는 기능이 있는 것으로 알려지고 있다. 이에 본 실험에서는 만성 저산소증이 신경세포의 사멸을 유도하며, recombinant EPO가 신경세포의 사멸을 지연시키거나, 방어할 것이라는 것을 증명하고자 이번 실험을 시행하였다.

만성 저산소 환경을 10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂의 가스를 혼합하여 구성하여, 흰쥐를 3일간 사육하였으며, 일차 배양된 대뇌피질 신경세포를 6일 간 배양하였다. 대뇌피질에서 EPO와 EPOR의 발현을 확인하기 위하여 면역조직화학법을 이용하여 염색하였으며, western blot 분석을 이용하여 PARP와 pERK, pAKT, 그리고 caspase들의 발현의 변화를 관찰하였다.

먼저 만성 저산소 환경에서 3일간 사육한 발생 18일, 생후 5일 및 7일째 되는 흰쥐의 대뇌 피질에서 erythropoietin과 erythropoietin receptor가 발현되는 양상을 면역조직화학적 염색 방법으로 관찰하였다. 이 때 만성 저산소 환경이 대뇌피질에서 erythropoietin과 그 receptor의 발현을 증가시켰다. 일차 배양된 신경세포를 만성 저산소 환경에 9일 간 노출한 후 recombinant EPO를 투여한 결과 세포사멸의 표지인 PARP의 발현이 현저하게 감소하였다. 세포사멸을 방어하는 세포내 신호 전달 경로를 확인하고자 AKT와 ERK의 인산화를 확인하였는데, AKT의 인산화는 증가하였으나, ERK의 인산화는 변화가 없었다. 또한 caspase 3과 8의 활성화가 현저하게 증가하였으며, 투여한 EPO의 농도가 높을수록 caspase 3와 8의 발현의 억제가 더욱 뚜렷하였다. 그러나 caspase 9의 발현에는 변화가 없었다.

즉 만성 저산소 환경은 신경세포에서 EPO가 EPOR의 발현을 증가시키며, 투여한 recombinant EPO는 AKT 경로를 통해 caspase 3과 8의 활성화를 증가시키고 이에 따라 세포 사멸을 감소시켰다. 또한 이와 같은 작용은 EPO의 농도에 영향을 받는 것으로 확인되었다. 이 결과들은 신경세포의 EPO가 만성저산소증에 의해 유도된 적응의 일종임을 나타내는 것이며, recombinant EPO가 신경세포의 손상을 방어하는 것을 증명하였다. 나아가 EPO가 만성 저산소증에 의한 신경세포 사멸을 방어할 수 있는 치료제로서의 가능성을 증명하였다.

찾아보기 낱말 : 만성저산소증, recombinant EPO, EPOR, 신경세포사멸

서 론

EPO (erythropoietin)은 조혈작용을 조절하는 일종의 cytokine으로 잘 알려져 있다 (Erslev 등 1953).

교신저자: 김 현 (고신대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: drhkim@kosin.ac.kr

EPO를 분비하는 가장 중요한 기관은 신장이며, 빈혈이나 저산소증에서 사육된 쥐의 신장에서 EPO의 분비가 현저하게 증가된다 (Fisher 등 1996). 최근의 연구에 의하면 폐, 고환, 간 그리고 뇌 등 조혈과 관계없는 다양한 기관에서도 발견되며, 저산소 환경은 이들 기관에서 EPO의 생산 및 분비를 증가시킨다

(Digicaylioglu 등 1995, Liu 등 1997).

뇌에서는 주로 대뇌피질과 해마 그리고 꼬리핵에서 발현되는 것으로 알려져 있으나, EPO mRNA는 뇌의 다양한 부위에서도 발현된다 (Bernaudin 등 1999, Siren 등 2001a). 나아가 EPO는 사람의 성인 뇌척수액 (Marti 등 1997), 성상교세포 (Marti 등 1996) 그리고 신경세포 (Bernaudin 등 2000, Siren 등 2001b) 등에서 발견되었다.

EPO는 특별한 수용체에 의하여 그 작용이 이루어진다. 그러므로 중추신경계에서 EPO 수용체 (이하 EPOR)가 발현된다는 사실은 EPO가 생물학적인 기능을 수행하고 있음을 보여주는 것이다. EPOR은 쥐나 원숭이, 혹은 사람의 뇌에서 관찰된다 (Sasaki 등 2001). 또한 EPOR은 발생 중인 사람의 배자에서도 관찰되며, EPO 역시 발생 5주경에 이미 중추신경계에서 관찰되는 것으로 알려져 있다 (Juul 등 1999).

만성 저산소증은 인식능력 (cognitive function) 이상, 간질발작, 신경계 이상 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 사람에게 있어서 만성 저산소증의 가장 흔한 원인은 조산에 의한 뇌실내출혈 및 만성 폐질환이다. 또한 저산소증은 주산기 (perinatal period)에서 신생아의 사망률을 증가시키는 중요한 요인 중의 하나이다 (Vannucci 1990). 그 동안 많은 연구에 의해 만성저산소증이 세포사멸 (cell death)을 유발하는 기전들이 알려져 있으나, 저산소증으로부터 신경세포를 보호할 수 있는 방법은 아직 뚜렷하게 발견되지 않고 있다 (Bernaudin 등 2002a).

최근에 신생아의 만성 저산소증에서 신경손상의 기전을 밝히고 그 치료법을 개발하는 분야에 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 등과 같은 neurotrophic factor 나 vascular endothelial growth factor (VEGF) 등 다양한 단백질의 역할에 주목하고 있다. 최근에 VEGF가 만성저산소증에서 혈관재형성과 신경세포방어 기능을 가지고 있음이 보고되었다 (Ogunshola 등 2002). 그 동안 조혈작용에 관여하는 것으로 알려진 EPO가 신경세포방어 기능을 가지고 있음이 알려졌다 (Strunk 등 2004).

EPO는 쥐의 뇌에서 저산소증에 반응하여 그 발현이 증가하는 것으로 알려져 있으며 (Digicaylioglu

등 1995), 다양한 in vivo, 혹은 in vitro 뇌손상모델에서 EPO가 신경세포를 방어하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다 (Dame 등 2001). 만성 저산소 환경은 hypoxic-inducible factor (HIF)의 발현을 증가시키며, HIF의 발현은 EPO의 발현을 유도한다 (Wenger 2002). 최근에는 EPO를 투여한 경우 중추신경계 전구세포들의 분화와 생존을 유도하며 (Studer 2000), 만성저산소증에 노출된 후 신경세포들의 분화가 증가하는 것으로 보고되었다 (Shingo 등 2001).

최근까지의 연구결과들은 EPO가 신경세포들의 생존에 중요한 역할을 한다는 것을 증명하고 있다. 그러나 지금까지의 연구는 뇌허혈증 등 급성이며 신경세포의 치명적인 손상에 초점이 맞추어져 왔다. 하지만 만성 저산소증 환경과 뇌신경세포의 손상에 대한 EPO의 역할은 보고된 바가 없다. 본 연구자들은 치명적이지는 않지만 만성적인 저산소환경이 EPO가 신경세포의 손상을 방어하는데 중요한 역할을 할 것으로 가정하였다. 이에 만성저산소증에 있어 EPO가 신경세포에 미치는 역할을 밝혀내고자 이 실험을 시행하였다. 나아가 이 실험을 통해 만성 저산소증의 치료에 있어서 EPO가 가지고 있는 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

본 실험에 사용된 동물은 임신한 Sprague-Dawley 계 흰쥐와 생후 2일 및 5일 된 흰쥐를 각 실험군당 6마리를 사용하였고, 신경세포의 일차배양을 위하여 임신 15일 된 ICR계 생쥐의 배자를 추출하여 사용하였다. 비치명적 만성 저산소 환경 (chronic sublethal hypoxia)에 노출시키기 위하여 완전히 밀폐된 저산소통 (hypoxic chamber)에서 3일 간 매일 3시간씩 사용하였다. 저산소가스 (Hypoxic gas, 한국산업가스)는 Kim 등 (2004)이 기술한 바와 같이 10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂로 구성하였다.

저산소 환경에 노출시킨 후 임신한 흰쥐와 경추 탈골에 의해 희생 시킨 후 태아를 추출하고 수술현미경하에서 발생 중인 뇌를 확인하고 채취하였다.

그리고 생후 2일 된 쥐와 생후 4일 된 쥐를 같은 방식으로 희생시킨 후 뇌를 추출하고 western blot 분석을 위한 lysate를 만들었으며, 면역조직학적 연구를 위해 조직고정을 시행하였다.

2. 대뇌 피질 신경 세포의 일차배양 (primary cortical neuronal cultures)

임신 15일 된 생쥐로 자궁에서 배자를 추출하고, 그 배자의 종뇌 (telencephalon)로 부터 Sestan 등 (1999)이 서술한 방법에 의해 신경세포를 분리하였다. 분리된 세포들을 poly-L-ornithine과 laminin (이상 Sigma Co., USA)으로 코팅된 plastic petri dish에서 배양을 시작하였다. 배양액은 neurobasal media에 sodium pyruvate solution, Fetal Bovine Serum, L-glutamine solution, B26 supplement, Pen/strep solution (이상 GIBCO Co., USA)를 조합하여 제조하였다. 세포들은 6일 동안 저산소 환경에 노출시켰다. 이때 완전히 밀폐된 저산소통 (hypoxic chamber)에서 배양하였으며, 저산소 가스의 조성은 상기된 것과 같다. 배양 기간 중 매일 배양액의 반을 교체하였다. 저산소 환경에 노출한 후 3일 째 되는 날 신경세포의 배양액에 recombinant EPO (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 각 실험군 별로 2 unit와 5 unit 씩 투여하였다. 그 후 3일 간 계속해서 저산소 환경에 노출하였다.

3. Western blotting

일차 배양한 생쥐 배자의 신경세포와 발생 18일 된 배자 및 생후 5일, 7일된 쥐의 뇌를 이용하여 단백질을 추출하고 western blot 분석을 시행하였다. 추출 방법은 Kim 등 (2004)이 기술한 방법을 사용하였다. Lysates는 modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 g/mL Aprotinin, leupeptin, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF)를 이용하여 만들었다. 일차항체로는 anti-EPO 및 anti-EPOR (Santa Cruz Biotechnology, USA, 1 : 1,000), anti-PARP, anti-pERK, anti-AKT, anti-pAKT, anti-caspase 3 (이상 Cell signaling technology,

USA, 1 : 1,000), anti-ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, USA, 1 : 10,000), anti-caspase 8, 9 (Santa Cruz Biotechnology, 1 : 1,000)를 사용하였다. 면역 반응을 감지하기 위하여 Supersignal detection reagent (Pierce Co.)를 사용하였으며, Hyperfilm (Kodak, USA)에 노출시킨 후, 평판스캐너를 이용하여, 현상된 film의 디지털 영상을 얻었다.

4. 면역 조직 화학염색법

뇌에서의 EPO와 EPOR의 발현을 확인하기 위하여 통상적인 avidin-biotin complex (ABC) method에 의한 면역조직화학염색법을 시행하였다. 1차 항체로는 rabbit anti-EPO (Santa Cruz Biotechnology, USA, 1 : 100), rabbit anti-EPOR (Santa Cruz Biotechnology, USA, 1 : 500)을 사용하였다.

2차 항체로는 anti-rabbit biotinylated IgG (Vector Co.)를 1 : 200으로 희석하여 실온에서 60분 동안 반응시켰으며, avidin-biotinylated enzyme complex reagent (Vector Co., USA)를 실온에서 30분 동안 반응시켰다. Peroxidase와 결합하는 기질 용액으로 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 용액 (Vector Co., USA)을 사용하여 3분에서 7분간 반응시켰으며, permanent mount를 이용하여 봉입하였다. 완성된 조직 표본을 광학현미경 (Nikon, Japan)으로 관찰하고 광학현미경용 Digital camera (Jenoptik, Germany)를 이용하여 촬영하였다.

결 과

1. 면역조직화학적 소견

만성 저산소 환경에 노출된 수정 18일째 흰쥐 배자 대뇌의 피질과 생후 5일 그리고 7일째 흰쥐의 대뇌 피질에서 EPO와 EPOR의 발현을 관찰하였다. 임신 18일 된 흰쥐 배자의 경우 대조군과 실험군 모두에 있어 EPO의 발현이 뚜렷하게 나타나지 않았으며, 발현의 차이도 뚜렷하지 않았다. 그러나 생후 5일 및 7일 된 흰쥐의 대뇌 피질에서는 수정 18일째 되는 배자에 비해 EPO의 발현이 증가하였으

며, 저산소 환경에 노출된 흰쥐의 경우 EPO의 발현은 정상군의 뇌에 비해서 증가하였다 (Fig. 1).

EPO에 비해 EPOR의 발현은 전 실험군에 걸쳐 뚜렷하게 나타났다. 또한 저산소증에 노출된 실험군에 있어 정상 흰쥐에 비해 EPOR의 발현이 현저하게 증가하였다. 또한 EPOR의 발현은 대뇌 피질 전체에 걸쳐 관찰되었으며 부위에 따른 발현의 차이는 없었다. 임신 18일의 배자의 경우 대뇌피질의 표

면으로 갈수록 EPOR이 발현되는 신경세포의 수가 현저히 늘어났다. 생후 5일째와 7일째의 경우 출산 전 배자의 경우에 비해 발현의 차이가 뚜렷하게 나타났다. 특히 생후 5일째의 경우 만성 저산소증에 노출된 흰쥐의 대뇌 피질에서 EPOR의 발현이 현저하게 증가되었음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

이러한 결과는 흰쥐의 대뇌 피질의 신경세포에서 EPO의 발현에 비해 EPOR의 발현이 더욱 뚜렷하게

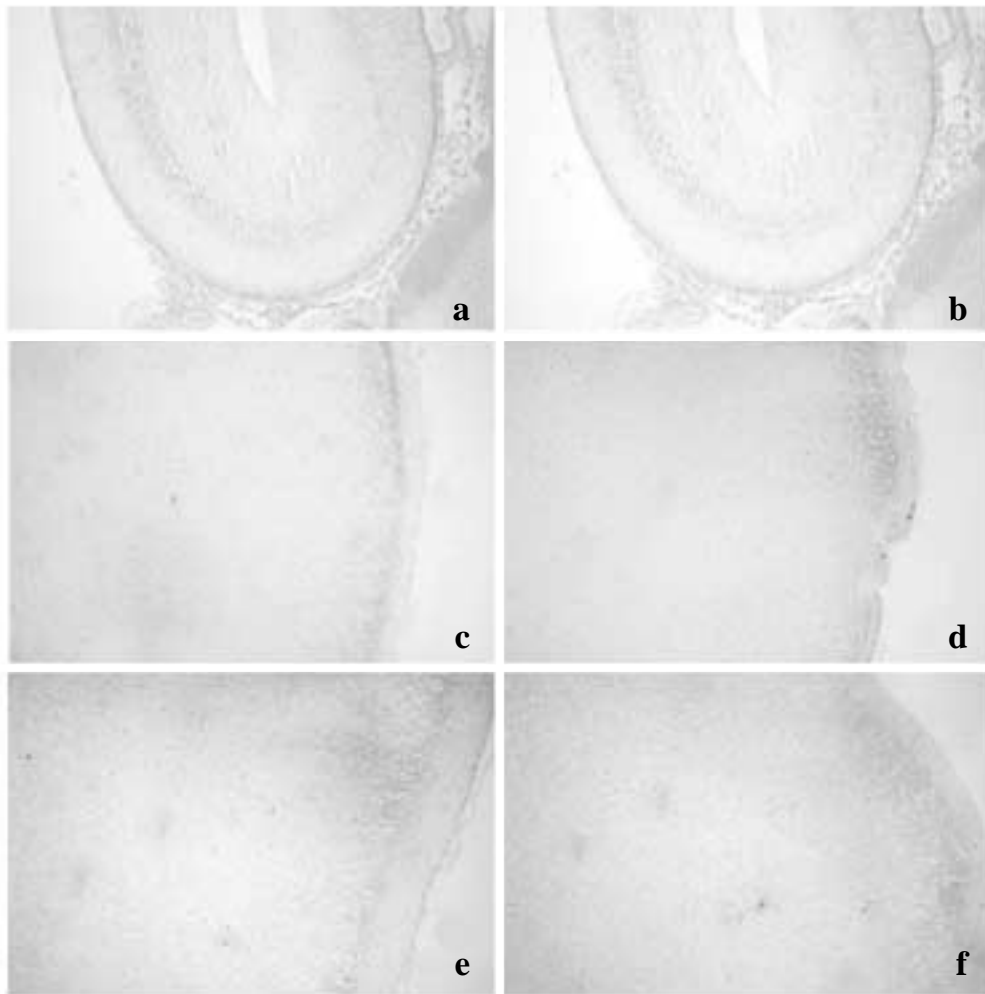


Fig. 1. Immunohistochemical findings of cerebral cortex of mice, Immunoreactivity of EPO (brown color) increased at cerebral cortex of P5 (postnatal day 5) and P7 mice, but not E18 (embryonic day 18) embryo under chronic hypoxia. a: E18 in normoxic conditions, b: E18 in hypoxic conditions, c: P5 in normoxic condition, d: P5 in hypoxic condition, e: P7 in normoxic condition, f: P7 in hypoxic condition ($\times 100$)

나타났음을 보여준다. 또한 만성 저산소 환경이 신경세포에서 EPOR의 발현을 유도하였음을 확인할 수 있다.

2. 만성 저산소증에 노출된 신경세포 손상에 recombinant EPO의 역할

EPO가 저산소 환경에 노출된 신경세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 저산소 환경에서 배양 중

인 생쥐의 신경세포에 recombinant EPO를 투여하였다. Western 분석을 이용하여 저산소 환경에 노출된 임신 15일 된 생쥐의 대뇌피질 신경세포에서 세포사멸을 나타내는 PARP의 발현을 관찰한 결과 정상군에 비해 현저하게 증가하였다 (Fig. 3). 그러나 5 unit의 EPO를 투여한 후에는 PARP의 발현이 현저하게 감소하였다. 이러한 결과는 저산소 환경이 대뇌피질 신경세포의 사멸을 유도한다는 것을 나타내

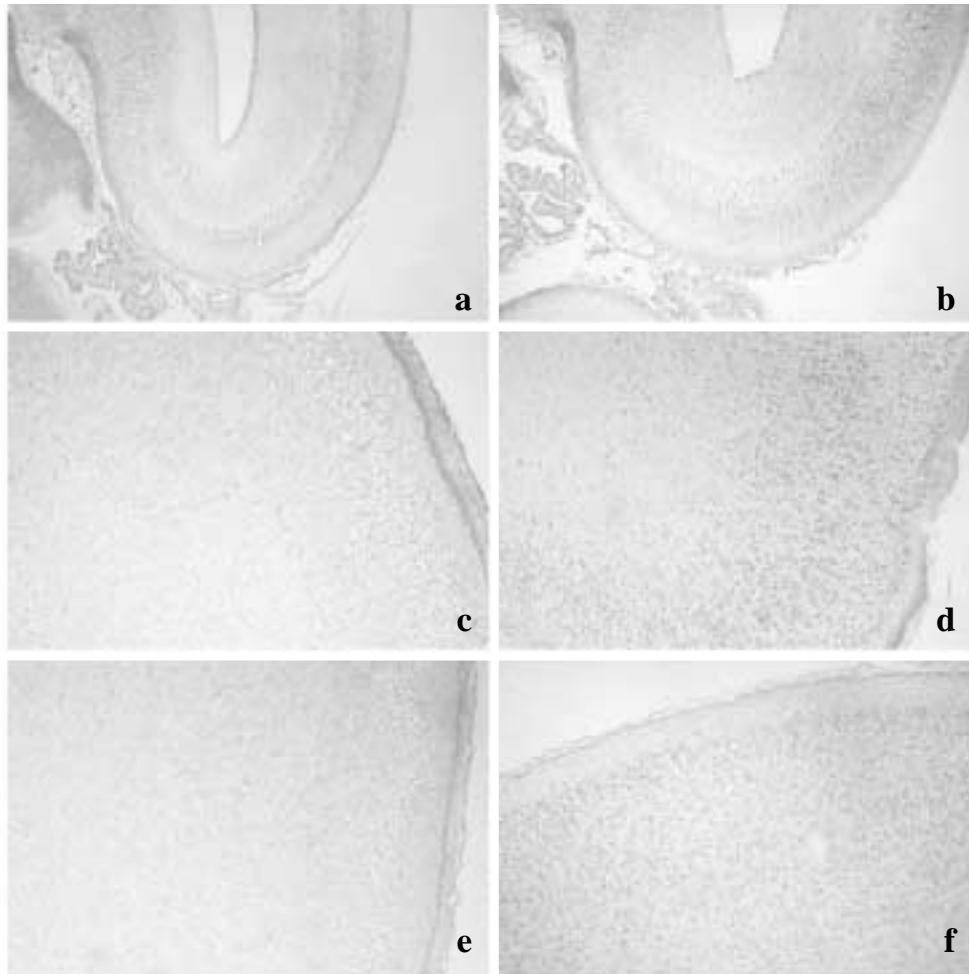


Fig. 2. Immunohistochemical findings of cerebral cortex of mice, Immunoreactivity of EPOR (brown color) increased at cerebral cortex of E18 embryo, P5 (postnatal day 5) and P7 mice under chronic hypoxia. a: E18 in normoxic conditions, b: E18 in hypoxic conditions, c: P5 in normoxic condition d: P5 in hypoxic condition, e: P7 in normoxic condition, f: P7 in hypoxic condition ($\times 100$)

며, recombinant EPO가 만성 저산소 환경에 의한 신경세포의 손상을 방어하는 것을 증명하는 것이다.

3. 저산소증 환경에 의한 신경세포사멸의 억제 는 AKT 경로에 의해 이루어진다.

EPO가 저산소증 환경에 노출된 대뇌피질 신경세포를 사멸로부터 막아주는 세포내 전달 경로를 확인하기 위하여 ERK와 AKT의 인산화(phosphorylation)의 변화를 western 분석법에 의해 관찰하였다. 만성 저산소 환경에서 배양된 신경세포의 경우 pAKT의 발현이 감소하였다. 그러나 recombinant EPO를 투여한 경우 pAKT의 발현이 증가하였다 (Fig. 4).

신경세포 사멸의 또 다른 경로 중의 하나인 ERK의 인산화의 변화를 확인하기 위하여 pERK의 발현을 관찰하였다. 그러나 모든 실험군에서 pERK의 발

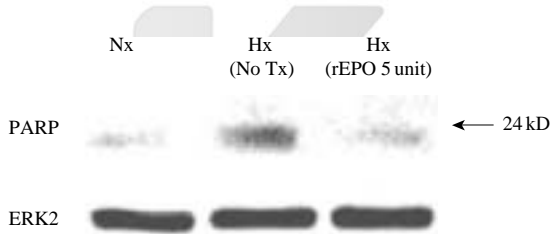


Fig. 3. Western blotting of PARP in primary cultured cortical neuron, Expression of PARP increased under chronic hypoxia (Hx). But after treatment of 5 units of recombinant EPO (rEPO), the activation of PARP was inhibited. Nx : Normoxia, Hx : chronic hypoxia, Tx : treatment

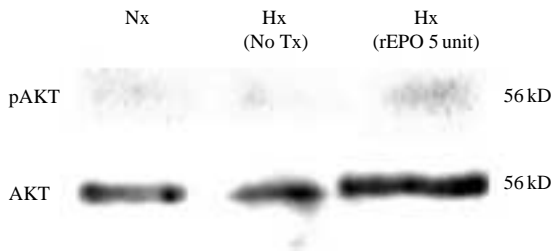


Fig. 4. Western blotting of AKT and pAKT in primary cultured cortical neuron, Expression of pAKT increased after recombinant EPO treatment under chronic hypoxia. Nx : Normoxia, Hx : chronic hypoxia, Tx : treatment

현을 관찰할 수 없었으며, 각 실험군 사이에서도 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다 (Fig. 5).

이러한 결과는 만성 저산소 환경에서 EPO에 의한 신경세포 방어는 AKT의 인산화를 통한 AKT 경로의 활성화에 의해 이루어지는 것을 확인시켜 주는 것이다. 그러나 ERK 경로는 대뇌피질 신경세포의 사멸을 방어하는 EPO의 작용으로 인한 직접적인 영향을 받지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

4. Recombinant EPO는 배양된 신경세포에서 caspase의 활성화를 감소시킨다.

EPO가 신경세포의 사멸을 방어하는 기전을 확인하기 위하여 각 실험군 사이의 활성화된 caspase 3, 8, 그리고 9의 발현과 그 차이를 관찰하였다. 만성 저산소 환경에서 배양된 신경세포에서 caspase 3과 8의 발현은 정상적인 환경에서 배양된 신경세포에 비해 발현이 현저하게 증가하였다. 그리고 recombinant EPO를 투여한 경우 이들 caspase의 발현은 다시 감소되었다. 또한 투여한 EPO의 양에 따른 차이를 관찰할 수 있었는데 2 unit의 recombinant EPO를 투여한 경우 대조군과 유사한 발현 정도를 보였으나, 5 unit를 투여한 경우에는 오히려 정상군 보다 caspase의 발현이 감소하였다. 그러나 caspase 9의 경우 만성 저산소 환경이나 recombinant EPO의 투여에 의한 발현의 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 6).

이러한 결과는 recombinant EPO가 저산소 환경에서 신경세포의 사멸을 방어하는 것은 caspase 3과 8의 발현을 억제함으로써 이루어진다는 것을 증명하는 것이다. 나아가 recombinant EPO에 의한 caspase

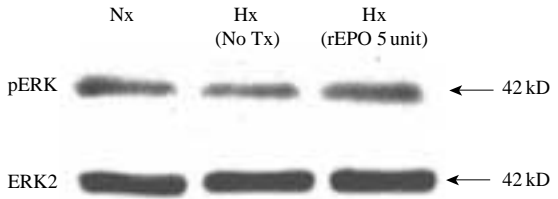


Fig. 5. Western blotting of ERK and pERK in primary cultured cortical neuron, Expression of pERK was not changed after recombinant EPO treatment under chronic hypoxia. Nx : Normoxia, Hx : chronic hypoxia, Tx : treatment

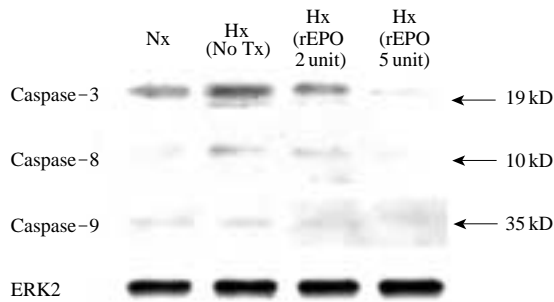


Fig. 6. Western blotting of activated caspase 3, 8, and 9 in primary cultured cortical neuron. Expression of caspase 3 and 8 increased under chronic hypoxia (Hx), but not caspase 9. After treatment of recombinant EPO (rEPO), expression of activated caspase 3 and 8 decreased. Effects on expression of caspase 3 and 8 of rEPO was depend on concentration of recombinant EPO. Nx : Normoxia, Hx : chronic hypoxia, Tx : treatment

의 발현의 감소는 투여한 농도에 의해 영향을 받는다는 것을 확인시켜 주었다.

고 찰

만성 저산소증은 조산아에 있어 비교적 흔히 볼 수 있는 문제이다 (Poets 등 1995). 조산 (preterm birth)은 신생아에 있어 심각한 이상을 초래하는 것으로 알려져 있으며, 주산기 (perinatal period)에서 신생아의 사망률을 증가시키는 중요한 요인 중의 하나이다 (Vannucci 1990). 저산소증은 인식능력 (cognitive function) 이상, 간질발작, 신경계 이상 등을 유발한다. 그 동안 많은 연구를 통해서 저산소증이 세포사멸 (cell death)을 유발하는 기전에 대해 많은 지식이 축적되어 있으나, 저산소 환경으로부터 세포를 보호할 수 있는 방법은 아직 뚜렷하게 발견되지 않고 있다 (Bernaudin 등 2002b).

Wenn 등 (2004)이나 Chong 등 (2003)에 의하면 무산소환경이나 급성허혈성손상은 신경세포에서 EPO의 발현을 증가시킨다고 하였다. 이는 autocrine 혹은 paracrine 방법에 의해 신경세포 손상을 방어한다는 것은 의미한다. 본 실험에서도 출생 후 흰쥐의 대뇌 피질에서 만성 저산소 환경에 의해 EPO 및

EPOR의 발현이 현저하게 증가하였다. 특히 EPOR의 발현의 변화가 뚜렷하였는데, 이는 신경세포의 손상을 막아 주는 기전이 EPO의 분비의 증가에 의해서 일어나는 것 보다는 EPOR의 증가에 의한다는 것을 보여준다. EPOR의 발현이 증가함으로써 다른 부위에서 증가된 EPO와 결합하여 신경세포 방어 기능을 일으킬 것으로 생각된다. Spandou 등 (2004)에 의하면 한 쪽 carotid artery를 결찰하고 1시간이 경과한 후 대뇌를 적출하고 EPO의 발현을 관찰한 결과 EPO의 발현이 증가하였다고 보고하였다. 그러나 EPOR 경우는 24시간이 지나야 발현이 현저하게 증가한다고 보고하여, EPO와 EPOR의 발현이 시간에 따라 차이가 있음을 보고한 바 있다. 급성허혈성 손상이나 치명적인 저산소증인 경우 주로 EPO의 발현을 유도하여 신경세포 자신을 방어하려고 하지만, 시간이 경과하거나 비치명적인 만성 저산소 환경은 신경세포가 적응할 수 있는 시간을 부여하게 된다. 즉 EPOR의 발현이 적응의 결과이며, 증가된 EPOR은 다른 기관으로부터 유래된 EPO와 반응함으로써 신경세포 손상을 방어할 것으로 생각된다.

EPO가 저산소증 환경에서 신경세포를 방어하는 기전에 관해서는 잘 알려져 있지 않았다. 그러나 적혈구 전구세포에 있어 세포사멸을 방어하는 기전은 증명되어 있어 아마도 신경세포나 혈관내피세포에 있어서도 비슷한 기전에 의해 세포를 방어할 것으로 가정하였다. 적혈구 세포의 분화에 있어 EPO는 anti-apoptotic gene의 발현시킴으로 사멸을 방어하거나, caspase 발현의 억제를 통해 세포의 사멸을 방어하는 것으로 알려져 있다. 또한 bcl-2나 bcl-xl 등의 anti-apoptotic gene의 발현을 유지시키는 것으로 보고되었다 (Silva 등 1996). 중추신경계에서도 EPO가 bcl-xl과 같은 anti-apoptotic gene의 발현을 유도하는 것으로 보고되었다 (Chong 등 2003).

적혈구 세포에서의 세포사멸에 관한 보고들과 유사하게 신경세포의 사멸이 관찰되었으며, 이는 세포사멸의 지표로서 사용되는 PARP의 발현의 증가로 증명할 수 있었다. PARP의 발현은 만성 저산소증 실험군에서는 증가하였으나 EPO를 투여한 쥐에서는 현저하게 감소하였음을 관찰하였다. 또한 그 기전과 세포내 신호전달과정을 확인하기 위해 caspase

의 발현을 관찰하였다. 정상 신경세포에 비해 만성 저산소 환경에서 배양된 신경세포는 caspase 3와 8의 발현이 증가하였다. 그러나 EPO를 투여한 신경세포에서는 caspase 3와 8의 발현이 감소되었다. 이러한 결과는 신경세포의 손상과 EPO의 방어 기전에 caspase 3과 8이 중요한 역할을 하고 있다는 것을 보여주는 것이다. 또한 EPO의 농도가 증가할수록 caspase 3와 8의 발현이 감소하는 것이 관찰되었는데 이는 EPO의 농도의 변화가 신경세포의 사멸에 대한 방어에 중요한 요인이 됨을 가리키는 것이다. 본 실험에서는 다른 연구자들의 보고에서 언급된 anti-apoptotic gene에 관한 실험을 시행하지 않았지만 caspase의 발현의 변화를 확인한 결과들은 적혈구와 마찬가지로 신경세포에서도 EPO가 anti-apoptotic gene들의 발현을 유도할 것이라는 것을 보여준다.

저산소증에 의해 손상 받은 신경세포에서 EPO의 역할을 확인하기 위해서는 세포내 신호전달경로를 증명하는 것이 중요하다. 신경세포방어에 있어 EPO의 작용은 AKT나 MAPK, ERK의 인산화에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다 (Digicaylioglu와 Lipton 2001, Siren 등 2001a, Chong 등 2003). 본 실험에서도 만성 저산소 환경에서 배양된 신경세포에 EPO를 투여한 후 AKT와 ERK의 인산화의 변화를 확인하였다. 이 때 EPO가 ERK의 인산화에 영향을 주지 않으나 AKT의 인산화는 현저하게 증가시켰다. 이러한 결과는 EPO에 의한 신경세포 생존을 유도하는 경로가 AKT 경로임을 증명하고 있다. 무산소 환경에서 신경세포에 대한 EPO의 영향을 연구한 다른 보고에서 EPO가 AKT 경로를 통해 caspase 3와 8의 발현을 감소시킨다고 하였다 (Chong 등 2003). 이러한 보고는 본 실험 결과와 일치하며, 무산소 환경이나 저산소 환경 모두 유사한 경로를 통해 신경세포 사멸을 유도한다는 것을 보여 주고 있다. 또한 EPO에 의한 신경세포 방어 경로 역시 일치한다.

EPO가 신경세포방어기전을 가지고 있으며, 치료제로서의 가능성을 제시하는 보고들이 있다. Wen 등 (2004)에 의하면 대뇌 허혈증 (cerebral ischemia)은 EPO와 EPOR의 발현을 유도하며, 측뇌실에 직

접 EPO를 주입하면 신경세포의 사멸을 방지할 수 있다고 하였다. 또한 EPO는 손상된 신경세포에서 연접 (synapse)을 증가시킴으로 신경세포의 기능을 회복시킨다 (Sakanaka 등 1998). 이러한 동물 실험의 결과들은 허혈성 신경세포손상에 있어 EPO의 투여가 신경세포의 사멸을 방어할 뿐만 아니라 신경세포의 기능을 회복시켜 줄 수 있음을 제시하고 있다. Chong 등 (2003)에 의하면 무산소환경이나 free radical에 의해 유도된 신경세포의 사멸을 EPO가 감소시킬 수 있음을 보고하였다. 이들은 신경세포에 의해 형성된 EPO는 세포의 손상을 막는데 부족하며, EPO를 외부적으로 투여해야 만이 가능하다고 보고하였다. 나아가 Siren 등 (2001b)의 실험에 의하면 사람의 경우에도 EPO가 치료제로서 가능성이 있음을 보고하였다.

신생아기에 저산소증에 의한 신경세포 손상을 받은 경우 정신지체 (mental retardation)이나 기억장애, 인식장애 등의 후유증이 남을 수 있다. Kumral 등 (2004)은 새로 태어난 쥐가 저산소 환경에 노출된 후 유사한 학습장애가 나타나는 데, 이때 EPO를 투여하게 되면 이러한 장애를 줄여 줄 수 있다고 보고하였다. 그러므로 이러한 실험들은 주산기 때 저산소증에 의한 뇌의 발달 장애를, EPO의 투여에 의해 감소시킴으로, EPO가 조산아의 저산소증 치료에 사용될 수 있다는 가능성을 제시하는 것이다.

본 실험에서 흥미로운 것은 임신 중인 쥐를 만성 저산소증에 노출시켰을 때 EPOR의 발현이 생후의 쥐와 마찬가지로 증가하였다는 사실이다. 이러한 결과는 임신 중일 때 모체가 만성저산소증에 빠진 경우에도 태아의 뇌신경세포에 영향을 줄 수 있다는 것을 보여 주는 것이다. 이러한 이유로 태아의 신경계의 발달에 영향을 미치며, 생후 쥐의 뇌에서와 마찬가지로 신경세포 방어가 이루어진다는 것을 증명한다. 생후의 쥐와 마찬가지로 EPOR의 발현이 증가하여 신경세포의 생존을 유도하는 것을 알 수 있었다.

본 실험의 결과들은 만성 저산소 환경이 신경세포의 사멸을 방어하는 데 EPO가 중요한 역할을 하고 있음을 증명하며, EPO가 만성 저산소환경에 의해 손상받은 신경세포들을 치료할 수 있다는 가능

성을 보여 주는 것이다. 나아가 EPO가 만성저산소
 증에 의한 장기적이고 심각한 후유증을 감소시킬
 수 있음을 제시하고 있다.

참 고 문 헌

- Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, MacKenzie ET, Petit E : Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 30: 271-278, 2000.
- Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E : A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 643-651, 1999.
- Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET, Petit E, Schumann-Bard P : Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 393-403, 2002.
- Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, Petit E, Sharp FR : Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J Biol Chem* 277: 39728-39738, 2002.
- Chong ZZ, Lin SH, Kang JQ, Maiese K : Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. *J Neurosci Res* 71: 659-669, 2003.
- Dame C, Juul SE, Christensen RD : The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* 79: 228-235, 2001.
- Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M : Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci* 92: 3717-3720, 1995.
- Digicaylioglu M, Lipton SA : Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 412: 641-647, 2001.
- Erslev AJ : Humoral regulation of red cell production. *Blood* 5: 347-380, 1953.
- Fisher JW, Koury S, Ducey T, Mendel S : Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *Br J Haematol* 95: 27-32, 1996.
- Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD : Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 2: 148-158, 1999.
- Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA : Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J Biol Chem* 279: 33538-33546, 2004.
- Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, Kiray M, Genc S, Duman N, Koroglu TF, Ozkan H, Genc K : Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res* 153: 77-86, 2004.
- Liu C, Shen K, Liu Z, Noguchi CT : Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem* 272: 32395-32400, 1997.
- Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Trentz O, Bauer C : Detection of erythropoietin in human liquor : intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int* 51: 416-418, 1997.
- Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M : Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 8: 666-676, 1996.
- Ogunshola OO, Antic A, Donoghue MJ, Fan SY, Kim H, Stewart WB, Madri JA, Ment LR : Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J Biol Chem* 277: 11410-11415, 2002.
- Poets CF, Stebbens VA, Richard D, Southall DP : Prolonged episodes of hypoxemia in preterm infants undetectable by cardiorespiratory monitors. *Pediatrics* 95: 860-863, 1995.
- Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R : In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci* 95: 4635-4640, 1998.

- Sasaki R, Masuda S, Nagao M : Pleiotropic functions and tissue-specific expression of erythropoietin. *News Physiol Sci* 16: 110-113, 2001.
- Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P : Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 286: 741-746, 1999.
- Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S : Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 21: 9733-9743, 2001.
- Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G, Fernandez-Luna JL : Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 88: 1576-1582, 1996.
- Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P : Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci* 98: 4044-4049, 2001.
- Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H : Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic-hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 101: 271-276, 2001.
- Spandou E, Papoutsopoulou S, Soubasi V, Karkavelas G, Simeonidou C, Kremenopoulos G, Guiba-Tziampiri O : Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. *Brain Res* 1021: 167-172, 2004.
- Strunk T, Hartel C, Schultz C : Does erythropoietin protect the preterm brain? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89: 364-366, 2004.
- Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R : Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 20: 7377-7383, 2000.
- Vannucci RC : Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 27: 317-326, 1990.
- Wen TC, Rogido M, Genetta T, Sola A : Permanent focal cerebral ischemia activates erythropoietin receptor in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 355: 165-168, 2004.
- Wenger RH : Cellular adaptation to hypoxia : O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 16: 1151-1162, 2002.

Korean J Phys Anthropol
18(4): 291 ~ 301, 2005

Abstract

Effects of Recombinant EPO on Death of Cortical Neuron in Chronic Hypoxia

Ho-Jeong Kim, Jin-Gee Baek¹, Jun-Seong Yang¹, Ki-Young Kang¹,
Kang-Ryune Kim², Hyun Kim²

Department of Anatomy, College of Medicine, Kwandong University

¹*Department of Anatomy, College of Medicine, Seonam University*

²*Department of Anatomy, College of Medicine, Kosin University*

Chronic hypoxia has been associated with change in neurovascular behavior, mediated, in part, by erythropoietin (EPO). EPO, a hematopoietic growth factor, could act as a neurotrophic factor. In the present study, we investigated the characteristics of EPO and erythropoietin receptor (EPOR) expressions by cortical neuron *in vivo* and *in vitro* and tested the hypothesis that EPO serves protective functions under chronic hypoxia.

E18, P5 and P7 mice for 3 days and primary cultured neurons for 6 days were incubated in hypoxic conditions consisted of a mixture of 10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂. To study expressions of EPO, EPOR, caspases, pAKT, pERK, and PARP, immunohistochemical staining and western blotting were carried out.

In addition to expressing EPO and EPOR under normoxic conditions, neurons increased their expression of EPO and EPOR under hypoxia. The effects of recombinant EPO appeared to be mediated via the phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-AKT pathway, correlated directly with activation of caspase 3. Also recombinant EPO decreased expression of caspase 8, but not caspase 9.

Finally, recombinant EPO decreased apoptosis of cultured neurons as evaluated by expression of PARP. These data support a role for EPO in maintenance of cortical neuron under chronic hypoxia.

Key words : Chronic hypoxia, Neuronal cell death, Recombinant EPO, EPOR

Correspondence to : Hyun Kim (Department of Anatomy, College of Medicine, Kosin University)
E-mail : drhkim@kosin.ac.kr