

허혈상태 정상세포의 HIF-1의
활성조절이 신경세포사멸에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

김 현 수

허혈상태 성상세포의 HIF-1의 활성조절이
신경세포사멸에 미치는 영향

지도 안 영 수 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2004년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학과

김 현 수

김현수의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2004년 6월 일

감사의 글

처음 연구에 길에 들어선 것도 엇그제 같은데 주위의 많은 분들의 지도와 염려로 많은 것을 얻을 수 있었고 그 결과로 이 논문의 결실을 맺을 수 있었습니다.

부족한 저에게 연구자의 자세와 방법을 일깨워 주신 안영수 교수님께 진심으로 감사드립니다. 바쁘신 와중에도 항상 학생들을 옹호한 길로 인도해 주신 김동구 교수님, 부족한 저의 논문위해 자문과 심사를 해주신 이원택 교수님께도 이 지면을 빌어 감사드립니다.

약리학 교실에 큰 주춧돌이 되시는 김경환 교수님, 항상 밝게 웃으시는 김혜영 교수님, 학생들을 따뜻하게 대해주시는 장정원 교수님, 무한한 연구열정을 가지신 이민구 교수님과 맡은바 책임을 다하시는 박경수 교수님 그리고 이 연구에 많은 조언을 주신 임주원 교수님께도 감사하다는 말을 하고 싶습니다.

특히 우리 실험실을 처음 들어 왔을 때부터 지금까지 연구 뿐 만 아니라 모든 면에서 모범을 보이시고 술선수범의 정신을 보여주신 이진우 선생님, 모든 일을 열심히 하는 인숙 누나, 지금은 중국에 계시지만 저를 친구처럼 엄마처럼 대해주신 진정애 선생님, 항상 진취적인 마인드를 가진 정호, 그리고 듬직하고 저보다 형 같은 이용제 선생님 등 같은 실험실에서 동고동락한 랩 사람들에게 고맙다는 말을 전하고 아울러 실험실에서 같이 연구에 매진할 때 항상 곁에서 도와주신 모든 약리학 교실원들과 이 기쁨을 함께 나누고 싶습니다.

이 길이 진정한 나의 길임을 가르쳐주시고 항상 아들에게 베푸는데 있어서 부족함이 없었던 아버지, 저의 앞날을 위해 항상 새벽기도로 뜻을 전해주시는 어머니에게 무한한 감사와 사랑을 드리며 우리 착한 동생 지현, 경희 에게도 고맙다는 말을 전합니다.

항상 부족한 사위이지만 믿고 걱정해주시는 장인어른, 장모님 그리고 귀여운 처제 혜진, 혜민에게도 고마움을 전하고 누구보다도 저를 사랑으로 감싸고 묵묵히 남편의 내조에 최선을 다한 아내에게 진심으로 사랑한다고 말하고 싶습니다. 제 주위에서 저를 지켜봐 주신 모든 분들에게 감사드리며, 특히 좋은 말씀과 두터운 신앙심으로 저를 이끌어 주신 최영순 전도사님, 이석호 목사님

그리고 또 언제 어디서나 하나님의 말씀을 믿고 따르는 우리 주님 말씀에 교회 모든 성도님들에게 진심으로 감사드립니다.

지금까지 주위의 많은 분들에게서 얻었던 고마움과 지혜를 바탕으로 항상 웃음을 잃지 않고 모든 일에 최선을 다하는 사람이 되기를 약속드립니다.

마지막으로 저의 생사화복을 주관하시고 항상 옳은 길로 인도하시는 하나님께 저의 모든 것을 맡기며 이 논문을 영광으로 바칩니다.

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 세포 배양	6
2. 무산소증	6
3. 단백질 추출과 Western blotting	6
4. 겔 지연분석법	7
5. 역전사 중합효소 연쇄반응법	8
6. MTT 측정법	9
7. 통계학적 분석	9
III. 결 과	10
1. 정상세포 배양액의 탈산소화	10
2. 무산소증에 의한 HIF-1의 활성화와 그에 대한 아연 이온의 영향	11
3. 무산소증 또는 아연이온 처리 시 HIF-1 α 과 HIF-1 β 단백의 양적 변화 및 핵으로의 이동변화	13
4. HIF-1을 경유한 표적 유전자 탐색	15

5. 표적유전자에 대한 아연 이온의 영향	16
6. 정상상태 또는 무산소증을 수행한 정상세포에서 배양된 배양액이 신경세포 사멸에 미치는 영향	18
7. 정상세포에서 HIF-1 조절을 통한 신경보호물질의 증감이 신경세포에 미치는 영향	20
 IV. 고 찰	 22
 V. 결 론	 26
 참고문헌	 28
 영문요약	 34

그림 차례

그림 1. 정상세포 배양액의 탈산소화	10
그림 2. 정상세포에 겔 지연분석법을 통한 HIF-1의 활성화와 아연 이온의 영향	12
그림 3. 정상세포의 세포 추출물과 핵 단백추출물에서 무산소증 과 아연 이온처리에 따른 HIF-1 α 와 HIF-1 β 단백질의 양적변화	14
그림 4. 정상세포에 무산소증 처리 시 HIF-1을 경유한 표적 유전자들의 시간별 mRNA 발현	15
그림 5. 표적 유전자들에 대한 아연이온의 영향	17
그림 6. 정상상태 또는 무산소증을 수행한 정상세포에서 배양된 배양액이 신경세포사멸에 미치는 영향	19
그림 7. 정상세포에서 HIF-1 조절을 통한 신경보호 물질의 증감이 신경세포에 미치는 영향	21

국문요약

허혈상태 성상세포의 HIF-1의 활성화조절이 신경세포에 미치는 영향

성상세포는 뇌를 구성하는 세포 중 가장 많은 수를 차지하는 세포로서 신경세포 생존에 중요한 역할을 수행한다. 뇌에 허혈 상태가 일어나면 다양한 유전자들의 발현이 유도되고, 그 중 많은 부분은 전사 인자인 hypoxia inducible factor-1(HIF-1)을 경유하게 된다.

HIF-1은 저산소증 또는 무산소증에 의해 활성화 유도되는 전사인자로서 그 발현과 활성화는 산소의 농도에 의해 엄격히 조절된다. 정상산소(normoxia) 상태에서는 HIF-1 α 가 26S proteasome에 의해 분해되나 산소 농도가 낮은 상태에서는 안정화되고 핵 내에서 VEGF, EPO 등 다양한 유전자를 발현한다.

본 연구에서는 성상세포에 무산소증을 유도하여 HIF-1 α 의 활성화와 이에 따른 유전자의 발현과, 이들이 신경세포 생존에 미치는 영향을 살펴보았다. 또한 이러한 일련의 과정에 대한 아연 이온의 효과도 관찰하였다.

성상세포에서 HIF-1의 HRE 결합 정도를 겔 지연분석법을 통해 측정된 결과 무산소증(anoxia)에서는 그 결합정도가 증가하였으나, 아연 이온으로 인해 DNA 결합정도가 감소하였다. 따라서 그 기전을 알기 위해 성상세포에서 각각 세포 추출물과 핵 단백을 나누어 Western blot을 수행하였다. 그 결과 Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)와 아연 이온의 처리로 세포질에서 HIF-1 α 가 축적되었으나, 핵 안으로 이동은 HIF-1 α 와 HIF-1 β 단백질 모두 감소되었다. HIF-1의 표적 유전자이고 신경보호 물질로 알려진 VEGF, EPO, TGF- β_3 을 역전사 중합효소 연쇄반응으로 각각의 mRNA의 발현을 측정하였다. 그 결과 무산소상태에서 표적 유전자들의 mRNA양이 증가하였으나, PDTC와 아연 이온의 처리로 인해 그 양이 감소하였다. 더 나아가 무산소증을 처리한 성상세포는 신경보호물질인 VEGF, EPO, TGF- β_3 등을 배양액에 분비함으로 그 배양액을 신경세포에 처리하였을 때

신경세포사멸이 감소하였고, 아울러 아연이온의 신경보호물질 생산 억제로 신경세포사멸이 유도되었다.

이상의 결과로 보아 허혈상태 정상세포에서 보상기전으로 활성화되는 HIF-1은 정상세포 뿐만 아니라 신경세포에서도 생존의 효과를 가지며, 또한 아연 이온은 HIF-1 활성억제제로서의 역할을 가지며, 이는 중추신경계에서 허혈상태로 유도된 신경세포에 사멸을 촉진 시키는 인자로 생각된다.

핵심 되는 말 : 정상세포, 신경세포, HIF-1, VEGF, EPO, TGF- β_3 , Zinc

허혈상태 성상세포의 HIF-1의 활성조절이 신경세포사멸에 미치는 영향

<지도교수 안영수>

연세대학교 대학원 의과학과

김 현 수

I. 서 론

뇌졸중(stroke)은 암 다음으로 많은 사망 원인으로 보고 되고 있으며 단일 질환으로서도 우리나라에서 가장 중요한 사망원인으로 밝혀져 있고 뇌졸중에 걸려 사망하지 않는다 하더라도 반신마비, 언어 장애 등의 신경학적 후유증을 야기한다.

뇌졸중에서 최근 연구는 뇌신경세포의 사멸 뿐 만 아니라 뇌 성상세포도 이 병의 매우 중요한 병태 생리에 관여하고 있음이 알려져 있다.¹⁻³ 성상세포는 신경세포와 신경세포의 사이, 신경세포와 혈관의 사이에 있으며 기존에는 영양이나 산소를 신경세포에 공급하는 역할을 담당한다고 알려져 있었으나, 최근의 연구에 의하면 성상세포가 신경전달 물질을 섭취, 제거한다는 연구 결과와 신경세포의 생존이나 재생을 촉진하는 성장물질이 성상세포에서 생산된다는 두 가지 중요한 사실이 관찰되었다.⁴⁻⁷ 이에 따라 뇌졸중에 의한 성상세포의 활성과 사멸은 그 자체에 있어서도 중요하지만 이로 인한 신경전달 물질의 불균형, neurotrophic factor의 감소, 그리고 신경세포에 영양이나 산소를 공급하지 못함으로써 생기는 이차적인 신경세포의 사멸이 매우 중요한 연구가 될 것으로 생각된다.

Hypoxia inducible factor-1(HIF-1)은 정상상태보다 산소 농도가 부족

하거나 무산소상태에서 발현이 증가하는 전사인자이다.^{8,9} HIF-1은 HIF-1 α 와 HIF-1 β 단백질로 구성 되어있고 HIF-1 α 의 발현과 활성화는 산소의 농도에 의해 엄격히 조절된다.¹⁰ 산소 농도가 20%인 정상산소상태에서는 HIF-1 α 가 prolyl hydroxylase에 의해 proline residue가 hydroxylation 되고 von Hippel-Lindau(pVHL)단백이 결합한다. 이는 E₃ ubiquitin ligase를 활성화하고 이후 26S proteasome의해 파괴(degradation)된다.^{11,12} 반면에 저산소나 무산소증에서는 prolyl hydroxylase의 활성이 억제되며, HIF-1 α 단백질이 hydroxylation 되지 않는다. 이러한 hydroxylation 억제현상으로 인해 pVHL 단백질이 결합하지 못하게 되고, 이는 ubiquitin-proteasome의 일련의 과정을 피하게 됨으로 HIF-1 α 단백질이 세포질 안에서 증가한다.^{13,14} 한편 산소 농도가 떨어지면서 생성된 reactive oxygen species (ROS)는 MAP kinase나 phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K/Akt) 경로를 활성화하고 이는 세포질 안에서 증가된 HIF-1 α 를 인산화 함으로서 HIF-1 α 단백질의 안정성을 높인다.^{15,16} HIF-1 α 의 인산화에 대한 보고는 많이 있으나 아직까지 인산화 되는 위치도 확인되지 않은 상태이며, 이런 인산화과정이 이 단백질의 안정성에 구조적, 화학적으로 어떠한 영향을 미치는지도 밝혀지지 않았다. 이렇게 안정화된 HIF-1 α 단백질은 핵 내로 이동하게 되고 핵 내에서 HIF-1 β 와 이중 결합체를 이루면서 전사인자로서의 역할을 수행한다. 이런 HIF-1 이중결합체는 CBP/p300과 같은 조력자(coactivator)와 함께 DNA의 hypoxia responsive element(HRE)에 결합하게 되고 다양한 유전자의 전사를 일으킨다.¹⁷ HRE를 포함하고, 저산소 시에 발현이 증가하는 대표적 유전자로서는 vascular endothelial growth factor(VEGF), erythropoietin(EPO), glucose transporter-1, glycolytic enzymes, tyrosine hydroxylase 등이 있다.¹⁸

세포내의 HIF-1 단백질 활성화를 통해 일어나는 현상은 세포의 생존, 사멸, 분화, 발달 등 다양한 기전에 관여하지만 그 역할에 대해서는 아직까지 명확하게 결론을 지을 수 없고 논쟁의 여지가 많이 남아있다. 먼저 HIF-1의 활성이 세포 사멸을 유도하는 인자라는 보고가 있다. 즉 무산소증을 유도하면 세포고사 단백질로 알려진 Nip3의 발현이 증가해서 세포사멸이 유도된다는 가설이 있고, 또 무산소증이 p53 단백질의 안정화를 유

도한다는 가설이 있다.^{19,20} p53은 전사인자로서 세포사멸을 일으키는 Bax 나 세포성장을 억제하는 p21 같은 단백질의 발현양을 증가 시켜 세포 사멸을 유도할 수 있다.²¹ 또 최근에는 중추신경계 허혈모델에서 p53과 HIF-1 α 의 결합은 delayed neuronal death를 유도한다고도 보고 되어 졌다.²² 그러나 대부분의 논문에서는 HIF-1 단백질이 세포생존인자로 생각되어 지고 이 측면에서 살펴보면 HIF-1의 활성화는 세포의 적응력향상과 직접적인 세포사멸기전의 억제의 작용으로 생각된다. 극심한 무산소증을 유도한 경우를 제외하고는 HIF-1의 발현이 세포생존에 중요한 역할을 할 것으로 예상하고 있고 앞에서도 언급한 바와 같이 EPO, VEGF 같은 세포의 적응력을 향상시켜주는 유전자의 발현과 또 Mcl-1과 같이 직접적으로 세포사멸을 억제하는 유전자를 발현한다는 보고도 있다.²³ 최근에는 세포생존에 관여하는 HIF-1의 표적 유전자들이 속속 밝혀지고 있고 이에 대한 기전의 연구도 광범위하게 진행되고 있다.

아연은 포유동물의 모든 조직과 장기에 광범위하게 분포되어 있는 금속이다. 아연은 protein kinase C등 몸 안에 존재하는 300가지 이상의 효소들이 필요로 하고 특히 전사인자들이 DNA와 결합하는 구조에 필수적인 금속으로 세포 내 유전자 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 특히 중추 신경계에서 다른 조직에 비해 높은 농도의 아연이온이 존재하는데 이중 많은 양의 아연이 신경말단 시냅스 소포체 안에 존재한다.²⁴ 실제 동물의 뇌에서 허혈을 유도하면 시냅스 소포체에서 glutamate와 함께 과다한 아연이온이 방출 되어지고 이 과다한 아연이 신경세포로 유입됨으로서 신경세포가 사멸하게 된다.²⁵ 또 아연 이온은 허혈상태 뿐만 아니라 다양한 신경퇴행성 질환에도 깊은 연관을 가질 것으로 생각되지만 이런 질병의 병태생리에서 아연 이온의 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 정상세포에서 무산소증에 의해 발현이 증가하는 HIF-1 단백질이 신경세포의 생존과 사멸에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았고, 아울러 정상세포에서 아연 이온을 통한 HIF-1 발현 조절이 신경세포의 생존과 사멸에 미치는 영향을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

사람의 정상세포 중에서 유래한 세포주인 LN215 세포와 신경아세포종에서 유래한 세포주인 SH-SY5Y를 10% fetal bovine serum (FBS)과 50 mg/mL streptomycin, 50 U/mL penicillin이 포함된 Dullbeco's modified Eagle's media (DMEM, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. 이 세포들은 실험 전까지 37℃, 5% CO₂ 환경에서 배양상태를 유지시켰다.

2. 무산소증

무산소증은 anaerobic chamber (Forma scientific Inc, Marietta, OH, USA)를 이용하여 유도하였으며, 이때 배양액은 혈청을 제거한 배양액을 사용하였다. LN215 세포를 혈청을 제거한 배양액으로 두 번 세척하고 새 배양액으로 바꾸어 준 후 anaerobic chamber에 넣어 공기를 빼고 산소가 없는 혼합가스 (N₂ 85%, H₂ 10%, CO₂ 5%)를 주입시킴으로써 무산소증을 유발하였다.

3. 단백질 추출과 Western blotting

세포 추출물을 얻기 위해 LN215 세포에 다양한 처리를 한 후 차가운 phosphate-buffered saline으로 두 번 세척하고 직접 전기영동용 sample buffer (1M Tris-HCl (pH 6.8), 50% Glycerol, 10% SDS, 2-mercaptoethanol, 1% bromophenol blue, H₂O)를 60mm 배양접시 당 400 µL를 넣어 세포를 파괴하였다. 이 추출물을 1.5 mL 튜브에 모아 13,000 rpm, 4℃, 30분간 원심분리하여 그 상등액을 채취하였다.

핵단백질을 얻기 위해서는 PBS로 세척된 세포를 저장성 완충액 A (10 mM

HEPES (pH 7.9), 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF)에서 부유 시켰다. 부유된 세포들을 얼음 위에서 10분간 둔 후 27-gauge의 바늘에 여러 번 통과시켜 세포막을 파괴시킨 후 원심분리하여 상등액은 버리고 남은 핵을 고장성 완충액 B (20 mM HEPES (pH 7.9), 25% glycerol, 0.42 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 5 mg/mL leupeptin, 5 mg/mL aprotinin)에 부유 시켜 얼음에 15분간 배양하였다. 이후 원심분리하여 상등액을 취하여 핵 단백추출물을 얻었다. Bradford 법을 이용하여 bovine serum albumin을 기준으로 단백질을 정량한 후 동일한 단백량을 전기영동용 sample buffer에 녹여 시료를 준비하였다. 각 시료를 5분간 끓인 후 SDS-PAGE을 하였다. 전기영동이 끝난 후 nitrocellulose membrane으로 단백질을 전이시켰다. 비특이적인 단백질의 결합을 배제시키기 위하여 5% non-fat dry milk 로 4°C 12시간 반응시킨 후 HIF-1 α , HIF-1 β 에 대한 항체(BD, Transduction Laboratories, USA)를 각각 1:500, 1:1000로 희석한 후 상온에서 2-3시간 반응 시켰다. Tris-buffered saline (0.1% Tween 20)으로 7분간 세 번 세척한 후 1차 항체의 유래 종에 따라 발색반응을 일으키는 효소가 부착되어 있는 적절한 이차 항체로 상온에서 2-3시간 반응시키고 Tween20으로 7분간 세 번 세척하였다. Enhanced chemiluminescence kit (Amersham Pharmacia, Brckinghamshire, UK)을 이용하여 발광 시키고 이를 X-ray film (Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgium)에 노출시켜 현상하였다.

4. 겔 지연분석법 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

전사조절 단백질인 HIF-1의 활성화 정도를 측정하기 위한 방법이다. 동위 원소로 표지한 HIF-1 oligonucleotide wild type (5'-GCC CTA CGT GCT GTC TCA-3')또는 HIF-1 oligonucleotide mutant type (5'-GCC CTA AAA GCT GTC TCA-3') 0.0175 pmole ($>10^4$ CPM)과 1 μ g의 poly dIdC를 포함한 10 μ L의 2X 결합 완충액(20 mM Tris-HCl, PH 7.6, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% glycerol)을 동량의 핵 추출물과 섞어 주었다. 상온에서 30분간 반응시킨 후 그 혼합물을 미리 만들어 놓은

nondenaturing 6% polyacrylamide gel에 200V 에서 2 시간 동안 전기영동을 하였다. 전기영동 후 gel을 3M paper 로 진공 건조 시켜 옮긴 후 자가방사기록 하였다. Competition assay와 supershift assay의 경우에는 probe를 넣기 전에 동위원소를 표지하지 않은 oligonucleotide 혹은 HIF-1 항체(BD, Transduction Laboratories, USA)를 2 μ L 넣어 반응시킨 후 probe를 첨가하였다.

5. 역전사 중합효소 연쇄반응법 (Reverse-transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR)

정상세포의 mRNA 발현은 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 측정하였으며, 내부 대조물질로는 β -actin을 사용하였다. 정상세포의 총 RNA는 guanidine thiocyanate 추출법에 의해 추출하였다.²⁶ Random hexamer primer 50pg (Promega, Madison, WI, U.S.A), deoxynucleotide triphosphate 혼합물 500 μ M, RNAase inhibitor 25U, Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase 200 U(Promega, Madison, WI, U.S.A)을 함유한 반응용액에 2 μ g의 total RNA를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. RNA 160 ng에 해당하는 동량의 cDNA에 각 VEGF, EPO, TGF- β_3 , IGF-2에 특이한 primer 및 β -actin에 대한 primer 그리고 Tag polymerase (Promega, Madison, WI, U.S.A)을 함유한 반응 용액을 넣고 PCR을 시행하였다. PCR은 95°C 30초, 50~60°C 30초, 72°C 60초로 30~40 cycle로 VEGF, EPO, TGF- β_3 , IGF-2에 대한 mRNA를 증폭시켰다.

VEGF의 primer 서열은 5'-CAC ATA GGA GAG ATG AGC-3' (forward primer), 5'-CCG CCT CGG CTT GTC ACA-3' (reverse primer) 이었으며, PCR 생성물의 크기는 230 염기쌍이었다. EPO의 primer 서열은 5'-CTG GAG AGG TAC CTC TTG GAG-3' (forward primer) 5'-CCC CTG TGT ACA GCT TCA GCT T-3' (reverse primer) 이었으며, PCR 생성물의 크기는 441 염기쌍이었다. TGF- β_3 의 primer 서열은 5'-CCA ATT ACT GCT TCC GCA ACT-3' (forward primer) 5'-GCA GAT GCT TCA GGG TTC

AG-3' (reverse primer) 이었으며, PCR 생성물의 크기는 211 염기쌍이었다. IGF-2의 primer 서열은 5'-GGA ATC CCA ATG GGG AAG TC-3' (forward primer) 5'-TGG GTG GGT AGA GCA ATC AGG-3' (reverse primer) 이었으며, PCR 생성물의 크기는 488 염기쌍이었다. β -actin의 primer 서열은 5'-ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG-3' (forward primer) 5'-GTG AGG ATC TTC ATG AGG TAG TC-3' (reverse primer) 이었으며, PCR 생성물의 크기는 349 염기쌍이었다. PCR을 한 PCR 생성물을 0.5 mg/mL ethidium bromide을 함유한 1.5% agarose 겔에 부하 시킨 뒤 전기영동하여 UV투과법으로 각각의 mRNA에 대한 발현양을 측정하였다.

6. MTT (Microculture Tetrazolium) 측정법

24 well plate에 세포를 적정량 분주하고 이후 일련의 과정을 통한 자극을 준 후 MTT 측정법을 사용하였다. MTT 염료를 PBS에 1mg/ml의 농도로 처리 한 후 4시간 배양하였다. MTT의 환원으로 인해 살아있는 세포는 보라색의 formazan 결정을 생성하고 이는 extract용액 (25% dimethylformamide, 10% SDS)에 12시간 녹임으로서 흡광도를 측정 할 수 있다. Spectrometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CH, USA)로 570nm 에서 흡광도를 측정 하였고 처리군의 OD570과 아무것도 처리하지 않는 군의 OD570과의 비율로 세포 생존율을 나타내었다.

7. 통계학적 분석

MTT 측정법으로 수행한 세포 생존율의 실험결과를 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었으며, 통계분석을 위하여 Statview (version 5.01, The Institute, CA, USA) 프로그램을 사용하였다. 정량값들을 각 군간 분류하여 두 모집단, 모평균에 대한 t검정 (Two-Sample t-test for means)과 일요인 분산 분석 (one-way ANOVA)으로 분석하고 post-hoc comparisons (Fisher's PLSD법) 으로 각 군 간의 통계적 유의성을 검색하였다.

III. 결과

1. 정상세포 배양액의 탈산소화 (Deoxygenation)

배양액의 탈산소화를 관찰하기 위하여 혈청을 제거한 배양액을 정상세포에 처리한 후 anaerobic chamber (Forma scientific Inc, Marietta, OH, USA)를 이용하여 시간에 따른 산소 포화도를 dissolved oxygen meter (Corning, Corning, NY, USA)로 측정하였다 (그림 1). Anaerobic chamber에 세포를 넣고 공기를 제거하고 산소가 없는 혼합가스를 주입한 순간부터 배양액의 산소 포화도가 감소하였고 30분이 지나면 1%정도로 감소, 1시간 이후의 배양액의 산소 포화도는 0.1% 이하로 감소하였다.

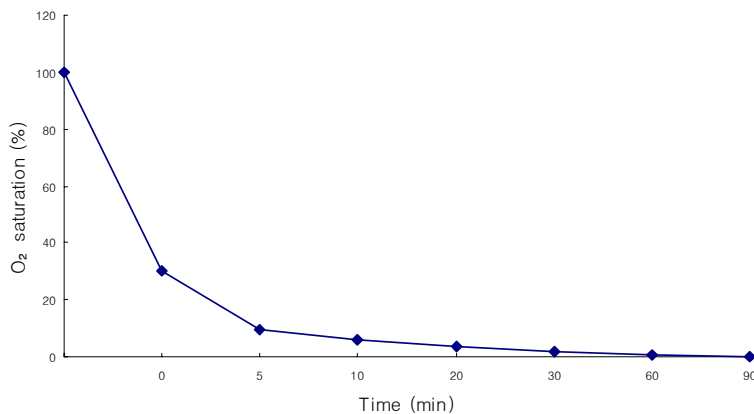


그림 1. 정상세포 배양액의 탈산소화. 세포 배양액에 탈 산소화를 위해 혈청이 없는 배양액으로 배지를 교체한 후 세포를 anaerobic chamber에 넣었다. 세포를 anaerobic chamber에 넣은 후 chamber내 공기를 빼고 산소가 없는 혼합가스로 교체한 직후를 0시간으로 하였으며, 각각의 시간마다 dissolved oxygen meter를 이용하여 산소 포화도를 측정하였다.

2. 무산소증에 의한 HIF-1의 활성화와 그에 대한 아연 이온의 영향

정상세포에 무산소증을 수행하여 HIF-1의 활성화와 그에 대한 아연 이온이 미치는 영향을 알아보기 위하여 겔 지연 분석법을 수행하였다. 무산소상태 5시간 처리로 HIF-1의 활성화가 증가하였다. 동위원소가 표지되지 않는 wild type consensus oligonucleotide를 표지 소식자보다 100배 이상으로 넣어주면, HIF-1 밴드가 사라졌고, mutant type oligonucleotide를 넣으면 밴드가 사라지지 않음을 보아 이 밴드가 HIF-1 특이 밴드임을 증명하였다. Supershift assay에서 HIF-1 항체를 2 μ L 넣어줌으로 HIF-1 밴드가 위로 올라감을 확인하였다(그림 2A). HIF-1의 활성화에 대한 아연 이온의 영향을 알아보기 위해 정상 세포에 PDTC (50 μ M)와 아연 이온을 농도별로 처리하였다. 선행 연구에 의해 PDTC는 아연 이온의 운반체로 사용하였다.^{27,28} 무산소상태를 5시간 처리하여 HIF-1이 활성화 되었고, 아연 이온농도 0.1 μ M에서 활성화가 감소되었고, 아연 이온농도 0.5 μ M에서는 HIF-1 밴드가 사라져서 활성화가 억제됨을 보았다(그림 2B).

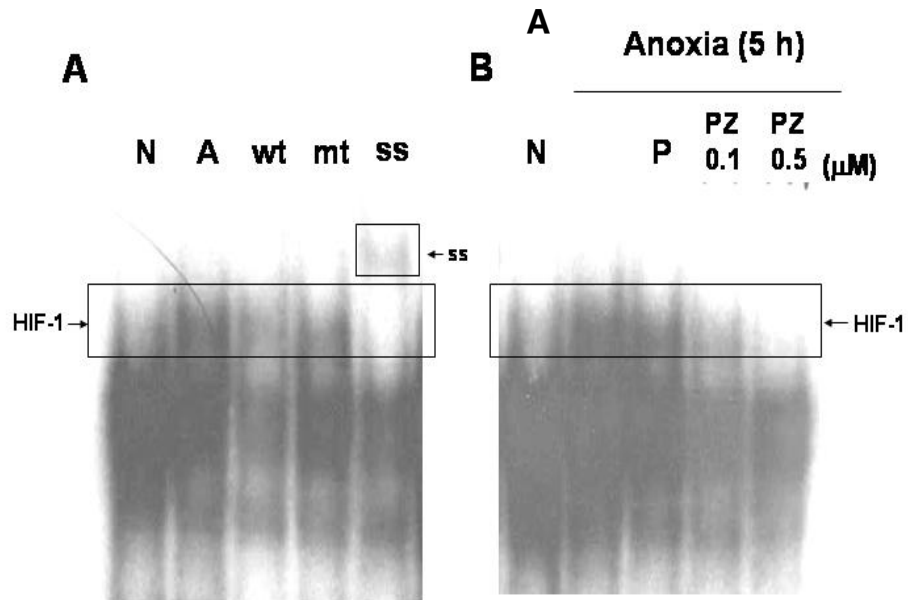
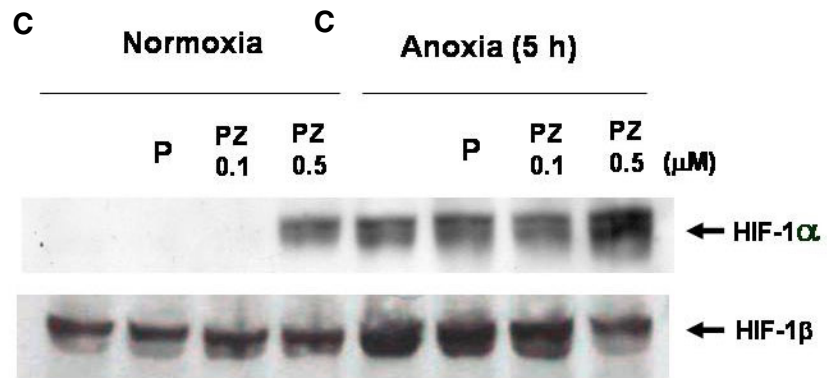


그림 2. 정상세포에 겔 지연분석법을 통한 HIF-1의 활성화와 아연 이온의 영향. 그림 2A: 정상세포에서 HIF-1의 특이밴드를 확인하기 위해 competition assay와 supershift assay를 수행하였다. (N: normoxia A: anoxia wt: wild type oligonucleotide mt: mutant type oligonucleotide ss: supershift P: PDTC) 그림 2B: 무산소증을 통한 HIF-1의 활성화와 그에 대한 아연 이온의 영향을 살펴보기 위해 무산소상태는 5시간을 수행하였다. PDTC (50 μ M)는 아연 이온의 ionophore로 사용하였고, PDTC 단독 (P) 또는 아연 이온을 0.1 μ M (PZ 0.1), 0.5 μ M (PZ 0.5) 농도로 추가하여 처리하였다.

3. 무산소증 또는 아연이온 처리 시 HIF-1 α 과 HIF-1 β 단백질의 양적 변화 및 핵으로의 이동변화

무산소증으로 인한 HIF-1의 활성을 세포내의 단백질 수준에서 확인하기 위하여 Western blot을 수행하였다. 실험 군은 정상산소군과 무산소증군으로 나누었고 아연 이온의 영향을 알아보기 위해 농도별로 (0.1, 0.5 μ M) 처리하였다. 배양액의 선택에 있어서 혈청에 아연 이온이 존재하기 때문에 본 실험에서는 혈청이 없는 배양액을 사용하였다. 세포 추출물의 실험에서는 정상산소군에서 아연이온 0.5 μ M처리로 HIF-1 α 가 축적되었다. 무산소증군(5시간)에서는 HIF-1 α 단백질의 축적이 관찰되었고, 무산소증군에서 아연이온을 처리하면 무산소증군보다 축적되는 HIF-1 α 단백질이 더 많음을 확인하였다. 한편, 무산소증 상태에서 HIF-1 β 도 증가함을 확인 하였다(그림 3A). 반면, 핵 단백질에서 HIF-1 α 와 HIF-1 β 의 Western blot을 실시한 결과 정상산소군의 핵단백질에서는 아연 이온 0.5 μ M처리에 세포 추출물에서 확인했던 HIF-1 α 밴드가 사라졌고, HIF-1 β 단백질도 핵으로의 이동이 감소하였다.²⁹ 또한 무산소증군에서는 아연 이온농도 0.1 μ M에서부터 HIF-1 α 단백질의 핵 안으로 이동이 감소하였고, 아연 이온농도 0.5 μ M에서는 핵으로의 이동이 완전히 봉쇄되었다(그림3B).

A



B

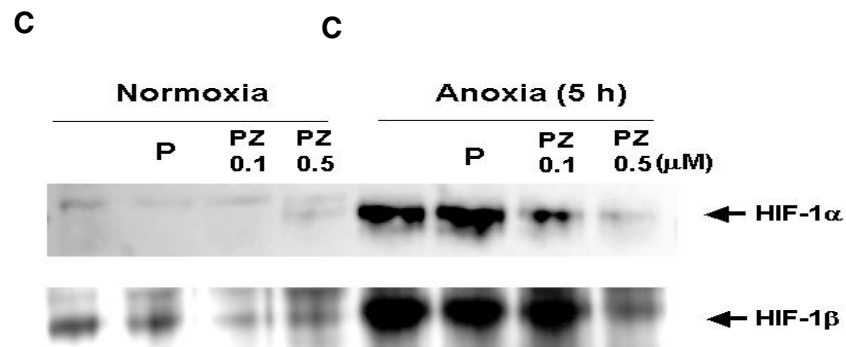


그림 3. 정상세포의 세포 추출물과 핵 단백추출물에서 무산소증과 아연 이온 처리에 따른 HIF-1 α 와 HIF-1 β 단백의 양적 변화. 그림 3A-3B: 무산소증 또는 아연이온 처리 시 HIF-1 α 와 HIF-1 β 단백의 세포내 총량과 핵 내의 양적변화를 알아보기 위해 Western blot을 수행하였다. C: 약물처리를 하지 않은 군 P: PDTC 50 μ M처리. PZ 0.1: PDTC 50 μ M + zinc 0.1 μ M 처리. PZ 0.5: PDTC 50 μ M + zinc 0.5 μ M 처리

4. HIF-1을 경유한 표적 유전자 탐색

정상세포에 정상산소상태와 무산소증을 유발한 후 시간별로 세포에서 총 mRNA를 분리하여 역전사 중합효소 연쇄 반응법을 이용하여 VEGF, EPO, TGF- β_3 , IGF-2의 mRNA 발현양을 측정하였다. VEGF는 4시간 이후부터 증가가 시작되었고 무산소상태가 길어질수록 계속 증가하였다. EPO도 4시간 때부터 증가가 시작되었고 역시 무산소상태가 길어질수록 증가하였다. TGF- β_3 는 증가된 양상이 비교적 적었으나, 무산소상태 4시간 이후부터 증가하였다. 반면에 IGF-2는 시간에 따른 무산소상태에서 mRNA 발현양의 변동이 없었다(그림 4).

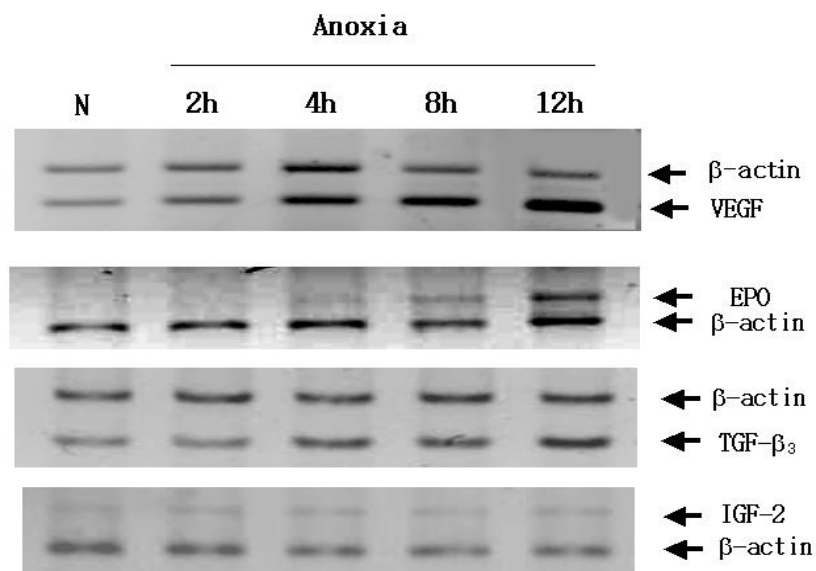


그림 4. 정상세포의 무산소증군에서 HIF-1을 경유한 표적 유전자들의 시간별 mRNA 발현. HIF-1에 의해 발현되는 표적 유전자들을 역전사 중합효소 연쇄반응법으로 mRNA양을 측정하였다. 정상산소상태 (N)와 무산소상태에서 시간별 (2h, 4h, 8h, 12h)로 mRNA 발현량을 관찰하였다. 각각의 염기쌍의 크기는 다음과 같다. VEGF (230bp), EPO (441bp), TGF- β_3 (211bp), IGF-2 (488bp), β -actin (340bp).

5. 표적유전자에 대한 아연 이온의 영향

정상세포에서 무산소증으로 VEGF, EPO, TGF- β_3 mRNA양이 증가하였으므로 이들 유전자 발현에 대한 아연 이온의 영향을 살펴보았다. 이를 위하여 PDTC 50 μ M에 아연 이온을 병행투여한 후 12시간 동안 무산소증을 유도한 후 각각의 mRNA를 역전사 중합효소반응법으로 측정하였다. VEGF와 TGF- β_3 는 무산소상태에 의해 mRNA 발현량이 증가하였고, PDTC 단독으로는 아무 변동이 없었으나 아연이온을 0.5 μ M 추가 하였을때 감소하였다. EPO도 무산소상태에서 mRNA양이 증가하였고, PDTC만 처리한 군과 PDTC와 아연이온 0.1 μ M을 추가한 군에서는 mRNA양이 변동 없거나 증가하는 경향을 보였으나 PDTC와 아연이온 0.5 μ M을 처리한 군에서는 mRNA가 발현되지 않았다(그림 5).

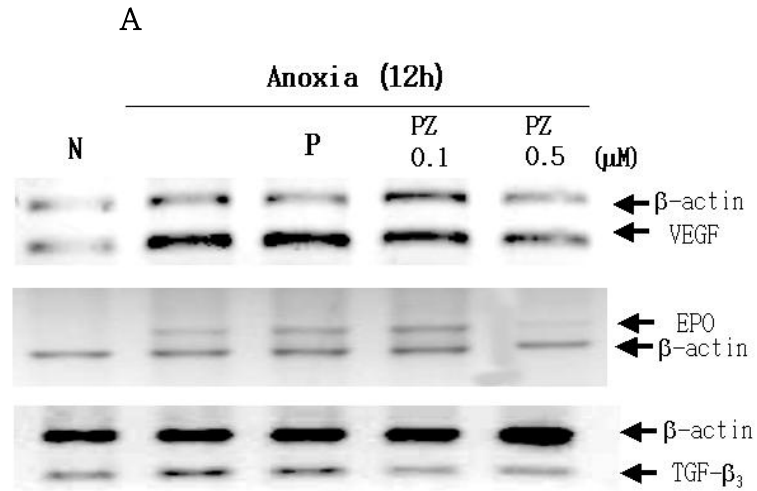


그림 5. 표적 유전자들에 대한 아연이온의 영향. 정상세포에서 HIF-1의 표적유전자 발현에 대한 아연 이온의 영향을 살펴보기 위하여 약물처리하고 12시간 무산소상태를 유지시킨 후 역전사 중합효소 반응법을 수행하였다. N: 정상산소군. A: 무산소증만 유발한 군. P: PDTC 50 μ M 처리. PZ 0.1 또는 0.5: PDTC 50 μ M + zinc 0.1 또는 0.5 μ M 처리.

6. 정상산소상태 또는 무산소증을 수행한 정상세포에서 배양된 배양액이 신경세포사멸에 미치는 영향

앞의 실험에서 정상세포에 무산소증을 처리함에 따라 HIF-1 활성화 기전으로 다양한 신경보호물질이 발현되는 것을 확인하였다. 이에 따라 이러한 물질이 신경세포에 직접적으로 어떤 영향을 미치는가 알아보기 위해 정상세포에서 배양한 배양액을 가지고 신경세포사멸에 미치는 영향을 알아보았다. 우선 정상세포의 배지를 혈청을 제거한 배양액으로 갈아준 후 정상산소군과 무산소증군으로 나누어 각각의 조건에 맞게 12시간 배양하였다. 12시간 배양 후 각각의 배양액을 채취하여 신경세포에 처리한 후 3일 동안 배양함으로써 세포사멸을 유도하였다. 정상세포에서 배양한 배양액 자체가 무혈청 배지이므로 배지 교환 자체가 신경세포 사멸을 일으키는 요인이다. 세포의 생존율을 측정하는 MTT 측정법을 실시한 결과 신경세포에 정상산소상태 배양액을 처리한 군 및 무산소증 배양액을 처리한 군에 대한 생존율은 각각 $54.4 \pm 5.1\%$ 및 $71.1 \pm 4.7\%$ 으로서 정상산소 배양액을 처리한 군에 비하여 무산소증 배양액을 처리한 군 생존율이 유의하게 높았다 ($p < 0.001$, 그림 6).

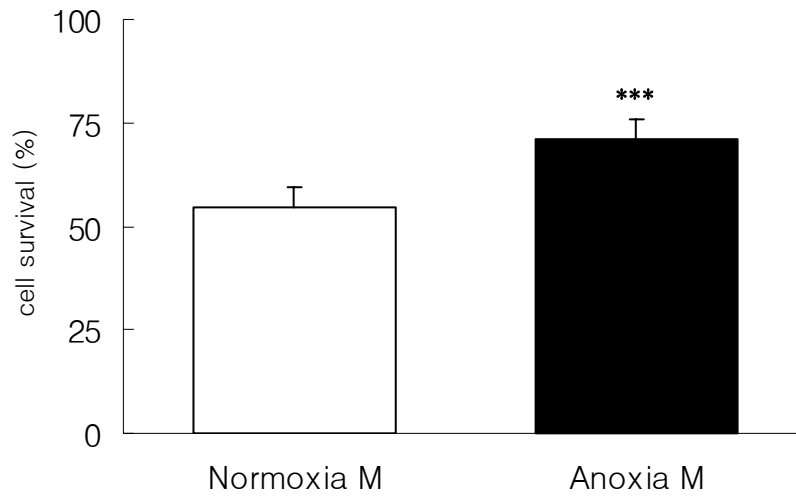


그림 6. 정상산소상태 또는 무산소증을 수행한 정상세포에서 배양된 배양액이 신경 세포사멸에 미치는 영향. 정상세포에 무혈청 배양액으로 갈아준 후 각각 정상산소상태와 무산소상태로 12시간 배양한 후 그 배양액을 채취하였다. 채취한 배양액을 신경 세포에 처리하여 3일 동안 배양한 후 MTT 측정법으로 신경세포의 생존율을 측정하였다. M: media (***) $p < 0.001$ vs. Normoxia M. $n=4$)

7. 정상세포에서 HIF-1의 조절을 통한 신경보호물질의 증감이 신경세포에 미치는 영향

정상세포에 배양액을 갈아준 정상산소군, 무산소증을 처리한 군, PDTC (50 μ M) 처리 후 무산소증을 처리한 군, PDTC (50 μ M)와 zinc (0.5 μ M) 처리 후 무산소증을 처리한 군으로 나누어 배양한 후 각각의 배양액을 채취하였다. 각각의 배양액을 신경세포에 처리할 때 네 가지군 모두 같은 조건으로 설정하기 위해 같은 농도의 PDTC (50 μ M)과 zinc (0.5 μ M)를 넣어주었고, 또 신경세포에서 아연이온의 독성효과를 배제하기 위해 각각의 배양액에 같은 농도의 EDTA (20 μ M)를 처리하였다. 각각의 군의 배양액을 신경 세포에 처리하여 3 일 동안 배양한 후 MTT 측정법으로 세포의 생존율을 측정하였다. 각각의 측정 결과를 살펴보면 정상산소군은 $42.8 \pm 3.0\%$, 무산소증을 처리한 군은 $65.3 \pm 5.1\%$, PDTC 처리 후 무산소증을 처리한 군은 $64.2 \pm 3.3 \%$, PDTC와 zinc 처리한 후 무산소증을 처리한 군은 $54.6 \pm 4.4\%$ 를 나타내었다. 정상 산소군에 비해 무산소증을 처리한 군이 유의하게 생존율이 높았고 ($p < 0.001$) PDTC 처리 후 무산소증을 처리한 군은 무산소증만 처리한 군과 생존율에 있어서 유의한 차이가 없었으나 PDTC와 아연이온처리 후 무산소증을 처리한 군은 무산소증만 처리한 군에 비해 생존율이 감소하였다 ($p < 0.01$, 그림 7).

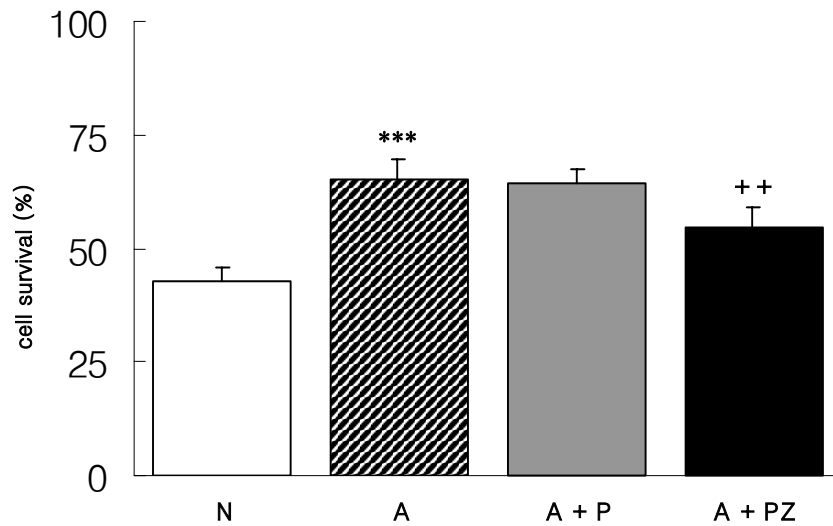


그림 7. 정상세포에서 HIF-1의 조절을 통한 신경보호물질의 증감이 신경세포에 미치는 영향. 정상세포에 무혈청 배양액으로 갈아준 후 적정 자극 처리 후 그 배양액을 채취하였다. 각각의 채취한 배양액을 신경세포에 처리하여 3일간 배양한 후 MTT 측정법을 이용하여 신경세포의 생존율을 측정하였다. N: normoxia A: anoxia P: PDTC (50 μ M) PZ: PDTC + zinc (0.5 μ M) (***p<0.001 vs. N, ++p<0.01 vs. A. n=4)

IV. 고찰

최근에 뇌졸중을 비롯한 다양한 퇴행성 질환에 의한 신경세포사멸에서 뇌 성상세포가 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 특히 뇌 성상세포는 신경세포의 생성, 유지, 발달, 분화의 중요한 역할을 수행하고 있는바 무산소증이 야기하는 생체적 변화를 성상세포 수준에서 살펴보고, 더 나아가 신경세포에 어떠한 영향을 미치는지 밝히고자 하였다. 중추 신경계에서 허혈 상태가 유도되면 이러한 열악한 상황을 극복하고자 생체 내에서 보상기전이 활성화되고, 허혈 상태의 적응도를 높여주는 유전자들이 발현된다. 이러한 유전자의 대부분은 낮은 산소 농도에서 활성화되는 HIF-1이라는 전사인자에 의해서 발현된다.¹⁶

무산소증은 허혈 상태의 *in vitro* 모델로서 본 연구에서는 anaerobic chamber로 시스템을 구축하였다. 무산소상태에서 HIF-1의 활성화와 활성화된 HIF-1과 아연 이온의 관계를 알아 보기위해 HIF-1과 DNA사이의 결합능력의 측정으로 전사 활성도를 알 수 있는 겔 지연분석법을 실시하였다. 먼저 competition assay와 supershift assay를 통해 발현되는 밴드가 HIF-1임을 확인하였고, 무산소상태에 의해 HIF-1이 활성화되고, 무산소상태에서 HIF-1 활성화는 아연 이온을 처리함에 따라 HIF-1과 DNA 사이의 결합능력이 현저하게 감소함을 확인하였다. 이후 이 현상의 기전을 살펴보기 위해 Western blot을 실시하였다. 먼저 성상세포에 무산소증을 수행하면 전사 인자인 HIF-1이 활성화되고 그 구성 요소인 HIF-1 α 와 HIF-1 β 단백질이 세포질 내에서 증가되었다. HIF-1 α 는 무산소상태의 시간에 따라 점점 증가 되는 양상을 보였고,^{10,11} HIF-1 β 는 생체 내에서 일정하게 발현되는 단백질로 무산소증을 수행함에 따라 그 발현되는 양이 증가 하였다. 이는 정상상태에서 일어나는 von Hippel-Lindau 단백질과의 결합,^{30,31} 이후 ubiquitination을 야기하는 E₃ ubiquitin ligase의 활성화와 이를 인식한 26s proteasome의 분해기전을 피하는 것으로 이는 단백질의 안정성에 기인한다.^{13,14} 다음 실험에서는 HIF-1 α 와 아연이온의 관계를 살펴보고자 하였고, PDTC를 아연 이온의 운반체로 사용하였다.^{27,28} 성상세포에서 아연 이온의 효과는 정상산소상태와 무산소상태 모두

에서 HIF-1 α 단백을 세포질 내에서 축적 시켰고, 무산소상태에서 아연 이온을 처리하였을 때는 무산소증만 처리한 군보다 더 많은 HIF-1 α 단백질이 축적되었고 이 같은 현상은 아연 이온이 proteasome을 억제한다는 선행 연구결과와 일치한다. 반면 HIF-1 β 는 무산소상태에서 단백질이 약간 증가하였고, 아연 이온의 영향은 없었다. 이후 핵단백질만 추출해서 Western blot을 수행한 실험에서는 아연 이온에 의해 HIF-1 α , HIF-1 β 단백질 모두 핵 안으로 이동하지 못함을 발견하였다. HIF-1 α 는 아연이온 농도가 증가함에 따라 핵 안으로 이동이 억제되었고, HIF-1 β 도 마찬가지로 아연이온 농도 0.5 μ M에서 많은 양의 단백질이 핵 안으로 이동하지 못했다. 이러한 현상은 특이할만한 결과로 Hep3B 세포에서 아연 이온에 의해 HIF-1 β 가 핵 안으로 이동하지 못한다는 보고는 있었으나,²⁹ 본 실험에서는 아연 이온이 HIF-1 α 와 HIF-1 β 단백질 모두 핵 안으로 이동을 억제함을 확인하였다. 이로 인해 아연 이온이 HIF-1의 활성 억제제로 사용될 수 있음을 확인하였다.

HIF-1을 경유로 증가하는 유전자의 발현은 정상세포 자신의 생존에도 중요하지만 신경세포 사멸에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는바 다양한 유전자의 전사 활성도를 살펴보았다. 일찍이 저산소증 또는 무산소증에 의해 활성화되는 유전자들이 많이 밝혀져 있고, 그 중 무산소상태에서 발현되고, HIF-1을 경유로 하고, 세포 밖 배양액으로 분비될 수 있는 이 세 가지 조건을 모두 충족시킬 수 있는 유전자를 검색하였다. 먼저 VEGF는 혈관생성인자로서 허혈상태에서 세포 밖으로 분비되고, 혈관생성을 위해 혈관내피세포에 주로 작용한다고 알려져 있다.^{32,33} 그러나 최근에는 VEGF가 혈관생성인자로서의 역할이외에도 VEGFR-2를 경유로 세포 생존에 중요한 기전으로 알려진 PI3K/Akt 경로를 활성화하는 것으로 알려져 신경세포나 정상세포의 생존에 중요한 역할을 할 것으로 보고 되고 있다.^{34,35} 본 연구에서 VEGF mRNA의 발현은 정상산소군과 비교하여 볼 때, 무산소시간에 따라 점점 발현량이 증가하였고, 아연 이온을 처리하였을 때 농도에 따라 mRNA 양이 감소하였다. EPO는 HIF-1을 경유로 발현하는 대표적인 신경보호물질로 알려져 있다.³⁶⁻³⁸ 초기에는 EPO가 뇌 전체에 걸쳐 발현하는 것으로 생각했으나,^{39,40} 최근에는 EPO의 많은 부분이 정상세포에서 발현하는 것으로 보고 되고 있다.³⁸ 또 EPO 수용체가 정상세포 뿐만 아니라 신경세포에도 발견되었다.^{41,42} EPO의 작용기전에는 JAK-2와 PI3K가 관련되어 있으며,⁴¹⁻⁴³ 생존 기전으로는 EPO가 Bad

을 억제한다는 보고와,³⁸ NF- κ B을 활성화 한다는 보고 등이⁴¹ 발표되고 있으나 아직 명확한 기전은 논쟁의 여지로 남아있다. 본 실험에서 EPO mRNA의 발현을 정상산소군과 비교하여 볼 때 무산소상태에서 4시간부터 발현되었으며 시간에 따라 그 양이 증가하였다. 아연 이온을 처리하였을 때는 PDTC만 처리한 군과 PDTC와 아연이온 0.1 μ M을 처리한 군에서 EPO mRNA 발현량이 약간 증가 하는 듯 했으나 아연 이온농도 0.5 μ M에서는 발현되지 않았다. EPO 유전자에는 HIF-1이 결합할 수 있는 hypoxia response element (HRE)가 존재하고, 이외에도 NF- κ B, GATA등의 다른 전사인자가 결합할 수 있는 사이트도 존재한다. EPO mRNA 발현과 EPO의 분비를 NF- κ B와 GATA의 활성이 억제한다는 보고가 있어,⁴⁴ PDTC와 아연이온 0.1 μ M의 낮은 농도에서는 이 약물들로 인한 NF- κ B 억제로 EPO의 발현이 조금 증가 하였을 것으로 생각되지만 더 높은 농도 아연이온 0.5 μ M에서는 NF- κ B 억제와 관계없이 EPO mRNA양이 감소할 것으로 추측된다. 최근 TGF- β_3 도 HIF-1을 경유하는 유전자로 밝혀졌고, 그 기능도 세포의 증식과 분화를 유도한다고 알려져 있으며, 또한 다양한 질환에서 세포를 보호하는 물질로 알려져 있다.⁴⁵⁻⁴⁷ 본 실험에서 정상산소군과 비교해 볼 때 무산소상태로 인해 TGF- β_3 mRNA양이 조금 증가하였고, 아연 이온에 의해 그 발현량이 감소하였다. 이상의 결과로서 성상세포에서 무산소증을 처리함으로 HIF-1이 활성화되고 활성화된 HIF-1로 인해 표적 유전자인 VEGF, EPO, TGF- β_3 의 mRNA가 발현하였으나 아연 이온을 처리함에 따라 그 발현량이 감소함을 관찰할 수 있었다. 성상세포에서 무산소증을 통해 발현이 증가하는 신경보호 물질들은 신경세포의 생존에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는바 직접 성상세포에서 무산소증을 유도한 후 그 배양액을 얻어 신경세포에 처리함으로서 신경세포사멸과의 연관성을 살펴보았다. 성상세포에서 무산소증을 처리한 배양액을 신경세포에 처리하였을 때 정상산소군의 배양액을 처리한 경우보다 신경세포 사멸이 20%정도 감소함을 확인하였다. 이는 성상세포에서 무산소증을 처리함에 따라 신경보호 물질인 VEGF, EPO, TGF- β_3 등의 발현이 증가함으로 일어나는 현상으로 생각된다. 아울러 본 실험에서 HIF-1의 발현 억제제로 확인된 아연 이온을 성상세포에 처리하고 무산소증을 처리하면 신경보호 물질들의 발현이 감소함을 위의 실험에서 확인하였고, 그 배양액을 신경세포에 처리하였을 때 무산소증만 처리한 배양액보다 신경세포 생존율이 감소하였다. 이

상의 결과로서 정상세포의 HIF-1의 발현 조절이 신경세포의 사멸에 영향을 미칠 수 있다는 결과를 얻을 수 있었고, 최근에 많이 논의되고 있는 정상세포의 역할을 새롭게 재조명 하였다. 다양한 신경세포사멸 기전에서 HIF-1 단백질의 발현은 세포의 적응력과 항상성 향상의 측면에서 중요한 역할을 수행할 것으로 생각되어진바 이에 대한 연구도 계속 진행되어야 할 것이다.

아연 이온은 생체 내에 미량 존재하는 이온으로 특히 뇌에 있어서 중요한 기능을 갖는다. 최근에는 병리학적 측면에서 많이 연구 되어지고 있고 뇌졸중과 간질 등에 많은 연관이 있다고 알려져 있다. 아연 이온이 NMDA 수용체, AMPA/Kainate 수용체, 전압 의존성, Ca^{2+} 통로 등을 통해 급속하게 신경세포에 들어가게 되면 미토콘드리아의 기능을 파괴하고,⁴⁸ ROS의 생산⁴⁹ 등을 통해 세포를 사멸 시킨다. 또 다른 기전으로는 protein kinase C (PKC)의 활성화,⁵⁰ 전사인자인 EGR1의 활성화에 의한 세포사멸 등이 알려져 있다.⁵¹ 하지만 신경세포 사멸에서의 아연이온의 역할은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않고 본 연구에서는 아연 이온이 생체 내에서 HIF-1 발현을 억제할 수 있음을 제시하였다.

최근 뇌졸중 연구에서 아연 이온에 대한 역할이 신경세포 사멸 기전에 매우 중요하게 생각되고 있다. 뇌가 허혈 상태에 직면하면 시냅스에 존재하는 고농도의 아연이 밖으로 방출되고 이 아연 이온은 다른 단백질과의 결합이 없이 신경 세포 내로 들어가 독성을 나타낸다.⁴⁹ 아연 자체가 위험한 것은 아니지만 허혈 상태에서 이 같은 세포 내의 아연 분포의 변화는 칼슘과 더불어 독성을 일으키는 것으로 생각되고 있다. 이렇게 대부분의 뇌졸중과 아연 이온에 대한 연구는 신경세포에 초점이 맞춰져 있으나 본 연구에서는 정상세포 수준에서 보았고 허혈 상태 야기 시 시냅스에서 방출된 아연이온은 신경 세포 뿐만 아니라 주위의 정상세포에도 영향을 미칠 것이고, 이는 본 연구의 결과와 같이 정상세포에서 신경보호 물질 생산의 감소로 인한 세포의 적응력 감소, 생존기전의 억제 등 여러 가지 환경 변화에 의해 신경세포의 사멸이 더욱 증가하게 될 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구에서는 정상세포에서 무산소증에 의한 HIF-1의 활성화에 의해 발현이 증가되는 유전자의 신경세포 사멸에 대한 영향을 관찰하였으며, 또한 이에 대한 아연 이온의 역할에 대해 알아보려고 하였다.

실험결과는 다음과 같다.

1. 정상세포에 무산소증 처리로 젤 지연분석법상 전사인자인 HIF-1의 활성이 증가되었다. 그리고 무산소상태에서 PDTC와 아연 이온을 처리함에 따라 그 결합 능력이 현저하게 감소하였다.
2. 정상세포에 무산소증 처리로 HIF-1 α 와 HIF-1 β 단백질이 증가하였다. 그리고 아연 이온처리로 세포질 내의 HIF-1 α 단백질은 축적되었지만, HIF-1 β 단백질은 양적 변화가 없었다. 그러나 세포질 내 증가된 HIF-1 α 단백질이 아연 이온처리로 핵 안으로 이동하지 못했다. HIF-1 β 단백질 역시 아연 이온처리로 핵 안으로 이동이 억제되었다.
3. 무산소증에 의해 신경보호물질로 알려진 VEGF, EPO, TGF- β_3 의 mRNA의 발현량이 증가하였고, 아연 이온에 의해 각각의 mRNA양이 감소하였다.
4. 정상세포에서 무산소증에 의해 발현이 증가한 신경 보호 물질을 포함한 배양액은 신경세포 사멸을 감소시켰고, 아연 이온의 처리로 신경 보호 물질이 감소한 배양액은 신경세포 사멸을 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 허혈상태 정상세포에서 HIF-1이 활성화되고, 활성화된 HIF-1은 신경보호 물질의 발현을 증가시키며 이는 정상세포 뿐만 아니라 신경세포의 생존에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 그러나 허혈 시 분비

되는 아연 이온은 이러한 HIF-1의 신경보호 작용을 억제하여 신경세포 사멸을 증가시킬 수 있는 인자로 생각된다.

참고문헌

1. Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M. Astrocytes and Stroke: Networking for survival? *Neurochem Res* 2003;28:293-305
2. Marrif H, Juurlink BH. Astrocytes respond to hypoxia by increasing glycolytic capacity. *J Neurosci Res* 1999;57:255-260
3. Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 1990;10:1583-1591.
4. Landis DM. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:133-151
5. Aschner M. Astrocytic functions and physiological reactions to injury: the potential to induce and/or exacerbate neuronal dysfunction—a forum position paper. *Neurotoxicology* 1998;19:7-17
6. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological functions. *Trends Neurosci* 1997;20:570-577
7. Little AR, O' Callaghan JP. Astrogliosis in the adult and developing CNS: is there a role for proinflammatory cytokines. *Neurotoxicology* 2001;22:607-618
8. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its subunit. *J Biol Chem* 1996;272:32253-32259
9. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor-1 Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 1997;272:19253-19260

10. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5510-5514
11. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999;274:6519-6525
12. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7987-7992
13. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF-1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292:464-468
14. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-1alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂ regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-472
15. Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M, Mechiels C. Transduction pathways involved in hypoxia-inducible factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med* 2001;31:847-855
16. Sodhi A, Montaner S, Miyazaki H, Gutkind JS. MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia-inducible factor-1 in rasV¹ upregulation of VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:292-300
17. Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, et al. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF-1 in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 1999;18:1905-1914
18. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor-1. *Annu Rev Cell Dev Biol*

- 1999;15:551-578
19. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9082-9087
 20. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* 1998;392:405-408
 21. Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Giaccia AJ. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 1994;14:6264-6277
 22. Halterman MW, Miller CC, Federoff HJ. Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53. *J Neurosci* 1999;19:6818-6824
 23. Leuenroth SJ, Grutkoski PS, Ayala A, Simms HH. Suppression of PMN apoptosis by hypoxia is dependent on Mcl-1 and MAPK activity. *Surgery* 2000;128:171-177
 24. Frederickson CJ. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* 1989;31:145-238
 25. Lee JM, Zipfel GJ, Park KH. Zinc translocation accelerates infarction after mild transient focal ischemia. *Neuroscience* 2002;9:871-878
 26. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidine isothiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
 27. Kim CH, Kim JH, Moon SJ, Chung KC, HsuCY, Seo JT, et al. Pyrithione, a zinc ionophore, inhibits NF- κ B activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:505-9
 28. Kim CH, Kim JH, Hsu CY, Ahn YS. Zinc is required in pyrrolidine dithiocarbamate inhibition of NF- κ B. *FEBS Lett* 1999;449:28-32
 29. Chun YS, Choi E, Kim GT, Lee MJ, Lee SE, Kim MS, et al. Zinc

- induces the accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , but inhibits the nuclear translocation of HIF-1 β , causing HIF-1 inactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:652-656
30. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2000;2:423-427
 31. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 2000;19:4298-4309
 32. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989;246:1309-1312
 33. Rosenstein JM, Mani N, Silverman WF, Krum JM. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7086-7091
 34. Jin K, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10242-10247
 35. Jin K, Mao XO, Batteur SP, McEachron E, Leahy A, Greenberg DA. Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor. *Neuroscience* 2001;108:351-358
 36. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997;76:105-116
 37. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral

- artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:26-32
38. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* 2002;22:10291-10301
 39. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:3717-3720
 40. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, et al. Erythropoietin gene expression in human, Monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 1996;8:666-676
 41. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between jak2 and NF- κ B signaling cascades. *Nature* 2001;412:641-647.
 42. Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998;43:40-49
 43. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74:227-236
 44. La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF- κ B. *FASEB J* 2002;16:1811-1813
 45. Li J, Foitzik K, Calautti E, Baden H, Doetschman T, Dotto P. TGF- β_3 , but not TGF- β_3 , protects keratinocytes against 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced cell death in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1999;274:4213-4219
 46. Booth D, Haley JD, Bruskin AM, Potten CS. Transforming growth factor- β_3 protects murine small intestinal crypt stem cells and

- animal survival after irradiation, possibly by reducing stem-cell cycling. *Int J Cancer* 2000;86:53-59
47. Kim HC, Bing G, Kim SJ, Jhoo WK, Shin EJ, Bok wie M, et al. Kainate treatment alters TGF-beta3 gene expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;108:60-70
 48. Manev H, Kharlamov E, UZ T, Mason RP, Cagnoli CM. Characterization of zinc-induced neuronal death in primary cultures of rat cerebellar grannule cells. *Exp Neurol* 1997;146:171-178
 49. Kim EY, Koh JY, Kim YH, Sohn S, Joe E, Gwag BJ. Zn²⁺ entry produces oxidative neuronal necrosis in cortical cell cultures. *Eur J neurosci* 1999;11:327-334
 50. Noh KM. Mediation by membrane protein kinase C of zinc-induced oxidative neuronal injury mouse cortical cultures. *J Neurochem* 1999;72:1609-1616
 51. Park JA, Koh JY. Induction of an immediate early gene egr-1 by zinc through extracellular signalregulated kinase activation in cortical culture: its role in zinc-induced neuronal death. *J Neurochem* 1999;73:450-456

ABSTRACT

Role of astrocytic HIF-1 in neuronal cell death.

Hyun Soo Kim

*Department of Medical science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor **Young Soo Ahn**)

Astrocytes are found abundantly in brain. They are not only necessary for the normally working brain but also critically involved in many pathological conditions, including stroke.

Hypoxia or anoxia induces expression of various genes via hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in astrocytes. The transcription factor HIF-1 is composed of HIF-1 α and HIF-1 β . Under normoxic condition, HIF-1 α is rapidly degraded by the proteasome, while it is stabilized and accumulated in anoxic condition. Stabilized HIF-1 α and HIF-1 β are translocated, and dimerized in the nucleus. Dimerized HIF-1 then transactivates hypoxic-inducible genes such as VEGF, EPO, glucose transporter-1 etc.

This study was to investigate the effect of astrocytic HIF-1 activated during anoxic condition on the neuronal cell survival. In addition, the effect of zinc on HIF-1 activity and, subsequently, the expression of HIF-1 responsive genes such as VEGF, EPO and TGF- β 3 was examined.

Accumulation of HIF-1 α protein and subsequent increase in the DNA binding activity of HIF-1 were observed in the astrocytes incubated under anoxic condition for 5 hours. Furthermore, it was confirmed that

the increased activity of HIF-1 by anoxia induced the mRNA expression of VEGF, EPO, TGF- β 3 in astrocytes. The anoxia-conditioned medium of astrocyte culture was transferred to the culture of neuronal cells and assessed the effects on the neuronal cell death. The anoxia-conditioned medium protected the neuronal cell from the serum deprivation death. Zinc inhibited HIF-1 activity by blocking the nuclear translocation of HIF-1 α and HIF-1 β . Also, zinc inhibited the expression of HIF-1 responsive genes which were increased by anoxia. As a result, the anoxia-conditioned medium treated with zinc had no protective effect on the neuronal cell death.

These results suggest that HIF-1 activation in the anoxic condition in astrocytes can act as a protective mechanism against neuronal cell death, and zinc would be a deteriorating molecule in anoxic condition that increases the neuronal cell death through the suppression of HIF-1 activity in astrocytes.

