

일과성 국소 대뇌 허혈 생쥐 모델에서 Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1의 증가 및 Ask1 표적 siRNA 처치에 의한 대뇌 허혈 감소

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 뇌졸중 및 신경-혈관집중치료실

김현우 · 조경주 · 김현정 · 조양제 · 이병인 · 김경환

Increase of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 and Inhibitory Effect of Ask1 Targeted Small Interfering RNA on Infarction after Ischemia/Reperfusion in Mice

Hyun-Woo Kim, BS, Kyoung-Joo Cho, MS, Hyun-Jeong Kim, MS,
Yang-Je Cho, MD, Byung-In Lee, MD and Gyung Whan Kim, MD, PhD

Stroke and Neurocritical Care Section, Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Oxidative signal transduction has been crucial for the ischemic neuronal cell death. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (Ask1), mitogen-activated protein MAP kinase kinase kinase 5, activated by oxidative stress which induces apoptotic signal pathway. We investigated the expression of Ask1 after ischemia/reperfusion. And siRNA targeting Ask1 could efficiently attenuate the cerebral infarction volume. **Methods:** Adult male ICR mice were subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 60 minutes followed by reperfusion. The expression and mRNA of Ask1 were evaluated by Western blot, RT-PCR and immunohistochemistry at various time points after reperfusion. Ask1 and cell death were also investigated by Western blot analysis, immunohistochemistry and TUNEL assay to evaluate the effect of Ask1 on cerebral infarction by treatment with siRNA targeting Ask1. **Results:** The expression of Ask1 was increased as early as 1 hour after ischemia/reperfusion and continued to 24 hours in ischemic brain compared to nonischemic brain. Double immunofluorescent staining demonstrated that Ask1 expression was colocalized in DNA damaged cells after ischemia/reperfusion. After treatment of Ask1-siRNA, down-regulation was confirmed by that the level of mRNA and protein of Ask1 was decreased and subsequently led to reduce cerebral infarction volume. **Conclusion:** Our results suggest the increased Ask1 expression induce apoptotic DNA damage after ischemia/reperfusion. And also we demonstrated that Ask1-siRNA attenuates upregulation of Ask1, which was followed by the reduction of infarction volume in ischemic brain after ischemia/reperfusion. Ask1-siRNA could represent a molecular target for prevention of ischemic stroke.

J Neurocrit Care 2008;1:143-149

KEY WORDS: Stroke · Cerebral infarction · Mitogen-activated protein kinase 5.

서 론

활성 산소종(reactive oxygen species: ROS)은 직접 세포손상을 일으키거나, 간접 신호전달체계를 통해 세포손상을 일으킨다. 이와 같은 직·간접적으로 세포손상을 야기

하는 활성산소종(ROS)은 뇌졸중을 포함한 여러 중추신경계 질환에서 병인론적으로 중요한 역할을 하며,^{1,2} 특히 과산화 음이온(O₂⁻)이 세포고사(apoptosis) 신호전달체계를 통해 대뇌 허혈의 병태생리학에 중요한 역할을 하는 것으로 많은 연구들에서 보고되고 있다.²⁻⁶

Address for correspondence: Gyung Whan Kim, MD, PhD
Stroke and Neurocritical Care Section, Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine, 134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

Tel: +82-2-2228-2010, Fax: +82-2-393-0705

E-mail: gyungkim@yumc.yonsei.ac.kr

본 연구는 한국과학재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 연구임(KOSEF-2-0709-0008).

미토겐 활성화 단백질 키나아제(Mitogen-activated protein kinase: MAPK) 연쇄증폭(cascade)은 활성 ROS와 자외선 등의 환경 스트레스나 성장인자와 같은 다양한 외부 자극에 의해 활성화되며, 세포분화와 성장, 사멸 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{7,8} MAPK cascade는 세 가지 단백질 키나아제 family인, MAP kinase kinase (MAPK-

KK), MAP kinase kinase (MAPKK), 그리고 MAP kinase (MAPK)로 구성된다.^{8,9} 최상위 단계인 MAPKKK와 중간 단계인 MAPKK, 그리고 최하위 단계인 MAPK는 순차적으로 맞물려 활성화되며, MAPKK와 MAPK는 활성 연쇄 증폭의 인산화를 통해 활성화되는 것으로 잘 알려져 있으나,⁸ MAPK cascade의 시발점이라 할 수 있는 MAPKKK들의 활성화 기전은 아직 명확하지 않다. 지금까지 Raf, MEKs, TAK1, MTK1, MLK, 그리고 Apoptosis signal-regulating kinase 1 (Ask1)에 이르기까지 십여 개의 MAPKKK들이 발견되었으며,⁸ 각각 서로 다른 자극에 반응하여 서로 다른 기전을 통해 활성화되는 것으로 알려져 있다. 대뇌 허혈 후의 세포사멸에서도 MAPK pathway가 관여한다는 보고들은 여럿 있었으나,^{10,11} MAPK signaling의 상위 단계는 잘 알려져 있지 않다.

Ask1은 MAPKKK의 하나로 여러 세포에 광범위하게 존재하는 170 kD의 단백질로 이의 발현은 세포분화와 세포고사에 있어 필수적인 것으로 여겨진다.¹²⁻¹⁴ 이는 Ask1이 여러 종류의 세포에서 세포고사를 유도하는 것으로 보고되었다.¹⁵⁻¹⁷ Ask1은 스트레스 상황에서 활성화되어 MAPK cascade들인 SEK1-JNK(c-Jun NH2-terminal kinase) 신호경로와 MAPKK3/MAPKK6-p38 신호경로를 통해 세포고사를 유도하며,¹⁸ Ask1을 과발현 또는 억제시키는 유전자 조작을 통해, Ask1을 활성화하는 대표적인 자극들은 oxidative stress,^{14,19} TNF- α (tumor necrosis factor- α),^{15,20,21} lipopolysaccharide²²로 TRAF2나 TRAF6와 같은 activator를 거쳐 Ask1을 활성화하며, 이러한 활성화의 조절은 여러 경로들에서 공통적으로 Ask1-Trx(thioredoxin) system에 의해 이루어진다.^{16,21} 이 외에도 Ask1이 angiotensin II type 1 receptor에 의해서 활성화되거나²³ Daxx를 통해 Fas signaling에 관여한다는 것이 보고되어 있다.¹⁵ 이와 같이 Ask1/SEK1/JNK cascade가 대뇌 허혈에서 세포고사를 유도하지만, 아직도 대뇌 허혈, 특히 일과성 국소 허혈에 의해 유도되는 MAPK cascade의 상위전달체계나 Ask1의 활성화기전 및 발현 양상, 세포사멸이나 혹은 세포생존에 있어서의 역할은 정확하게 규명되지 않았다. 대뇌 허혈과 관련된 Ask1의 활성화에 대해서는 Zhang 등이 랫트 전대뇌 허혈 모델에서의 Ask1 활성을 보고했을 뿐이다.^{24,25}

본 연구는 마우스 일과성 국소 대뇌 허혈 모델에서 세포고사에 관여하는 Ask1의 발현 양상을 조사하고, 아울러 세포고사와의 연관성을 조사하였다. 또한 Ask1 표적 small interfered RNA (siRNA)를 이용하여 대뇌 허혈 치료의 표적으로서 Ask1의 효용성을 알아보려고 한다.

연구대상 및 방법

일과성 대뇌 국소 허혈 모델

본 연구의 모든 실험동물 연구방법은 Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)의 승인을 받은 연세대학교 의과대학 실험동물위원회의 지침을 준수하였다. 수컷 ICR 마우스 (Institute of Cancer Research (USA), 3개월령, 35~40 g) (Orient, Gyeonggi-do, South Korea)를 나일론 봉합사를 이용해 한시적으로 중대뇌동맥을 폐색 (middle cerebral artery occlusion: MCAO)함으로써 일과성 국소 대뇌 허혈 모델을 적용하였다.²⁶ 안면 마스크를 사용하여 2% isoflurane과 함께 질소와 산소 혼합기체 (70%/30%)로 마우스를 마취시켰고, 체온은 heating pad 및 lamp로 37±0.5℃를 유지하였다. 정중경부를 절개하여 외경동맥을 노출시킨 후, 열처리로 끝을 무디게 만든 11.0 mm 길이의 5-0 수술용 나일론 봉합사 (Ethicon, Edinburg, UK)를 외경동맥을 통해 내경동맥으로 삽입하여 중대뇌동맥 혈류를 차단하였으며, 1시간 후에 나일론을 제거하여 혈류를 회복시켰다.²⁷ 그리고 중대뇌동맥의 혈류 차단 및 혈류 회복을 확인하기 위해 Laser Doppler Flowmeter (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, USA)를 이용하여 혈류를 측정하였다 (n=5).

Ask1 표적 siRNA 제작 및 투여방법

Ask1의 발현을 조절하는 mRNA를 억제하기 위해 siRNA를 제작하였다 (Ambion, TX, USA, sense, GCUCGUAAUUUAUACACUGtt; antisense, CAGUGUAUAAAUUACGAGCtt; conc, 5 μ M). siRNA는 SiPORT NeoFX (Ambion, TX, USA)와 osmotic pump (Alzet, USA)를 사용하여 3일에 걸쳐 100 μ L를 뇌실에 주입하였다 (mediolateral=1.0 mm; anteroposterior=0.2 mm; dorsoventral=3.1 mm).

Ask1 표적 siRNA 처리 및 Semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용한 발현도 측정

Ask1의 발현을 조절하는 mRNA 억제를 위해 5 μ M의 siRNA를 middle cerebral artery occlusion (MCAO)을 시행하기 전 3일에 걸쳐 뇌실내로 주입하였다 (2 μ L, mediolateral=1.0 mm; anteroposterior=0.2 mm; dorsoventral=3.1 mm). 실험군은 siRNA를 주입 (n=9) 하고 대조군은 vehicle (중류수, n=9)을 주입하였다. 또한 siRNA

처리 후 Ask1의 mRNA 발현도를 측정하기 위해 RT-PCR을 수행하였다.

뇌조직에서 전체 RNA를 guanidine isothiocyanate, phenol, chloroform 등을 이용하여 추출한 후, cDNA를 합성하고 이를 주형으로 PCR을 수행하였다. Ask1에 대한 primer는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 nucleotide database에서 제공되는 cDNA sequence를 응용하여 설정하였다(primer, 5'-TGC TCA CAG CGA TGC CAA AG-3'; reverse, 5'-GAA GCT ACT GCA GGA GGG TA-3'). Semiquantitative PCR은 30 cycles(94°C for 30 sec, 60°C for 1 min, 72°C for 1 min)를 수행하여 1% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 Ask1는 949 bp, GAPDH는 285 bp에서 band를 관찰하였다. 영상분석프로그램(TINA)을 이용하여 밀도를 분석한 후, GAPDH와 비교하여 Ask1의 상대적인 발현량을 계산하였다.

in situ 과산화 음이온 검출 및 정량

허혈 후에 발생하는 과산화 음이온 확인을 위해 산화hydroethidine (HEt) 검출법을 사용하였다. HEt(Molecular Probes)를 dimethylsulfoxide(DMSO)에 100 mg/mL로 용해시키고 이 용액을 PBS로 1 : 100 비율로 희석시켰다. ICR 마우스를 isoflurane으로 마취시킨 후 200 μ L HEt을 정맥내 주입하고 1시간 경과 후에 희생시켰다. 심장을 통해 10 U/mL 헤파린에 첨가된 생리식염수와 3.7% 포름알데히드로 관류 후 뇌를 적출하였다. 16시간 동안 4°C에서 후고정 시킨 후 vibratome을 사용하여 30 μ m의 두께로 절편을 만들었다. 뇌조직 절편이 준비된 즉시 슬라이드에 올리고 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 Ex=495 nm, Em=595 nm에서 관찰하였다. 핵 염색에는 Hoechst 33258(Molecular Probes)을 사용하였다. 정량 비교를 위해 허혈 부위 피질 조직과 대조군 피질 조직을 구분하였으며, 전산화된 분석 프로그램(MetaMorpho Imaging, version 5.0; Molecular devices, Downington, PA, USA)으로 분석하였다.

Western blot detection of Ask1

조직은 50 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 12 mM b-glycerophosphate, 3 mM dithiothreitol(DTT), 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Triton X-100 및 각각 5 mg/mL의 leupeptin, pepstatin A와 aprotinin(Sigma, St Louis, MO, USA)이 첨가된 차가운 균질화

완충액에서 균질화시켰다. 균질화시킨 조직을 15,000 \times g에서 20분 동안 원심 분리한 후 상층액을 취해 단백질 함유량을 분석하였다. 동일량의 단백질이 함유된 샘플에 2x sample 완충액(125 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 1 mM DTT, 그리고 0.002% bromophenol blue, pH 6.9)을 첨가하고 5분간 끓였다. 단백질은 6% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리하고 polyvinylidene fluoride(PVDF, Millipore, MA, USA) 막에 이동시켰다. 단백질 분자량은 무지개 표지자(rainbow marker)의 이동 거리에 따른 상대적인 거리로 측정하였다. 단백질이 이동된 막은 0.1% Tween 20이 포함된 TBS(50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7.3)로 두 번 세척하였으며, 이 후 비특이반응을 제거하기 위해 5% skim milk가 함유된 TBS로 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 일차 항체로는 Ask1(1 : 1,000, Cell Signaling technologies, Beverly, MA, USA)에 대한 다클론성 항체를 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 막을 0.1% Tween 20이 함유된 TBS로 10분씩 3번 세척하였다. Horseradish peroxidase(1 : 1,000 in TBS plus 5% skim milk)가 결합된 이차 항체로 반응시킨 다음, chemiluminescence's detection system인 ECL plus kit(Amersham International, Buckinghamshire, England)으로 발색시켰다.

면역조직화학염색

대조군을 포함하여, 재판류 후 0시간, 1시간, 4시간, 24시간에 urethane으로 마취시킨 생쥐를 10 U/mL 헤파린이 첨가된 0.9% 생리식염수와 3.7% 포름알데히드로 관류시켜 조직을 준비하였다(n=3, each). 뇌를 적출하여 16시간 동안 후고정을 시키고, 사용할 때까지 30% sucrose에 저장하였다. 뇌조직을 드라이아이스에서 얼린 후 cryostat section을 이용해, 20 μ m 두께로 관상(coronal) 절편을 만들었다. 면역조직화학염색은 avidin-biotin 방법을 채택하였다.²⁷ 절편을 실온에서 1시간 동안 blocking 시킨 다음, 일차 항체로 rabbit anti-Ask1 다클론성 항체(1 : 100, Cell Signaling technologies)를 반응 후 PBS로 세척하고, Cy 3.18-conjugate(1 : 200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) 2차 항체를 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다.

Ask1와 DNA fragmentation 이중염색

Ask1의 면역조직화학염색은 상기 염색방법으로 실시하였고, 조직을 세척한 후 50 μ L terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated uridine 5'-triphosphate biotin

nick-end labeling(TUNEL) 반응 혼합액(terminal deoxynucleotidyl transferase and fluorescein-dUTP; Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)으로 37°C의 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. Vectashield(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 봉입제로 사용하였으며 LSM 510 confocal laser scanning 현미경(Carl Zeiss)으로 관찰, 분석하였다. Fluorescein은 excitation(Ex)=495 nm, emission(Em)=515 nm에서, Cy3.18은 Ex=550 nm과 Em=565 nm에서 관찰하였고, LSM510 confocal laser scanning 현미경(Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)을 사용하여 관찰하였다.

뇌경색 크기 측정

증류수(Vehicle) 투여군과 siRNA 투여군으로 나누어 비교하였다. 국소대뇌허혈 후 24시간째에 마우스를 희생시켜 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 brain matrix를 이용하여 전두부 부터 1 mm 두께로 잘라 관상 절편화하였다. 각각의 절편을 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)에 담가 37°C에서 15분간 배양하여 염색하였으며,²⁸ 평판 스캐너를 이용하여 1200 dpi로 스캔하였다.

통계학적 분석

데이터들은 mean±SD로 표현하였다. 여러 집단간의 통계학적 비교는 비모수검정인 Kruskal-Wallis test를 사용하였으며, 두 집단 간에 차이는 t-test를 통해 실시되었으며(StatView; SAS Institute Inc, Cary, NC, USA), P<0.05 또는 P<0.001을 기준으로 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

허혈/재관류 동안 중대뇌동맥의 혈류량 변화

중대뇌동맥의 혈류량은 중대뇌동맥을 폐색 10분 전, 폐색 10분 후 그리고 재관류 10분 후에 수치를 측정하였으며, 개체 간의 유의적 차이는 없었다(%: 폐색 10분 전, 100±0, 폐색 10분 후, 14.4±6.3, 재관류 10분 후, 97.3±4.0,

mean±SD, n=5).

허혈 후 발생하는 과산화 음이온의 확인

마우스에서 일과성 국소 대뇌 허혈 유도 후, ROS가 Ask1을 활성화시키는 것을 확인하기 위해 과산화 음이온을 *in situ* oxidised hydroethidine (HEt, red)를 검출하여 확인하였으며, 핵 대조염색으로 Hoechst(blue)를 시행하였다(Fig. 1A). HEt의 붉은색 입자 흡광도를 정량화하여 그래프로 그려 통계적 유의성을 확인하였다(Fig. 1B)(optical density (O.D.): Normal control, 2,150.8±2,145.1; I/R 1h, 372,037.2±135,413.8; mean±SD, n=5, **P<0.001). 일과성 국소 대뇌 허혈 유도 후 1시간째인 조직에서 산화 HEt가 현저히 증가된 반면(Fig. 1, I/R 1h), 대조군의 정상 조직에서의 산화 HEt는 거의 증가하지 않았다(Fig. 1, Normal control).

허혈 유도 후 시간에 따른 Ask1 발현 양상

허혈 및 재관류 이후 조직에서, Ask1의 시간에 따른 발현 변화양상을 확인하기 위하여 Western blot analysis를 시행하였다. Western blot analysis를 통해 나타난 Ask1의 발현은 155 kDa 분자량에서 관찰되었으며(Fig. 2A), 재관류 후 1시간부터 24시간까지 점진적으로 증가세를 보였다(Nor., Normal control; O.D.: Nor., 100±0; 1 h, 168.9±75.3; 2 h, 206.9±42.8; 4 h, 274.0±94.8; 24 h 388.8±114.2 mean±SD, n=5, *P<0.05)(Fig. 2B).

siRNA 처치에 의한 Ask1 발현억제 및 세포고사, 뇌경색 감소

siRNA는 서열 특이적인 mRNA를 분해하는 기능을 가지므로, Ask1에 대한 siRNA를 처치한 후에 재관류 24시간 후 siRNA 처리군과 vehicle 처리군(Fig. 3)에서 Western blot analysis와 RT-PCR, 면역조직화학염색을 통해 Ask1의 발현과 세포고사를 비교하였다.

재관류 24시간 후 RT-PCR(Fig. 3A-a)과 Western blot analysis(Fig. 3A-b)모두에서 Ask1의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). siRNA 처리군에서는 Ask1

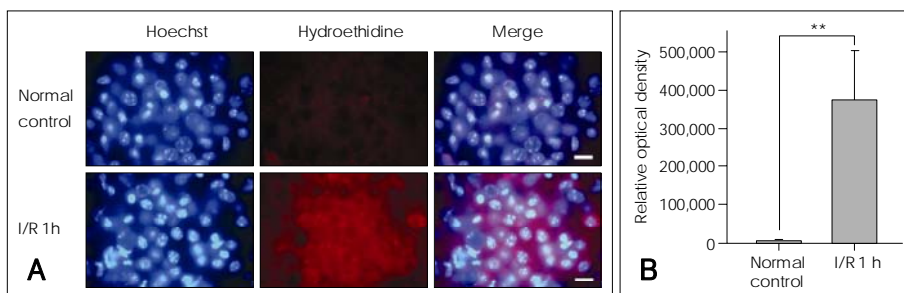


FIGURE 1. *In situ* detection of superoxide anion. A: Perinuclear-oxidized hydroethidine signals (red) as a production of O₂⁻ were detected as early as 1 hour after ischemia/reperfusion. B: Pannel shows quantified values of hydroethidine signals. **P<0.001. Scale bars=20 μm.

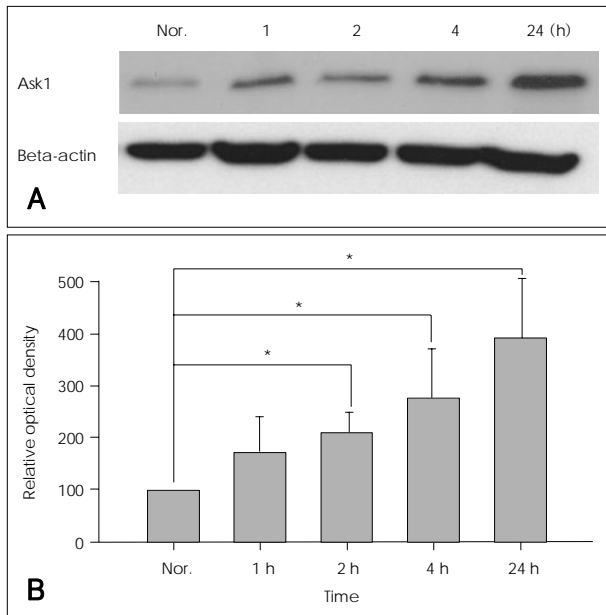


FIGURE 2. Western blot analysis for Ask1. A: Expression of Ask1 was increased 1 hour and sustained up to 24 hours after ischemia/reperfusion. B: The expressions of Ask1 were presented by quantitative graphs. * $P < 0.05$. Nor.: normal control.

의 mRNA양이 vehicle 처리군에 비해 현저히 감소하였으며(O.D.: veh, 100 ± 0 ; siRNA, 11.1 ± 15.2 ; mean \pm SD, $n=5$, ** $P < 0.001$) (Fig. 3A-a), Western blot analysis에서도 siRNA 처리에 의해 Ask1의 단백질 발현이 감소하였음을 확인하였다(O.D.: veh, 100 ± 0 ; siRNA, 35.7 ± 19.5 ; mean \pm SD, $n=5$, ** $P < 0.001$) (Fig. 3A-b). 또한 siRNA 처리 후에 시행한 Ask1 (red)과 TUNEL (green) 이중형광 염색에서도 Ask1 발현과 TUNEL 반응이 동일 세포에서 일어날 뿐만 아니라, siRNA 처리에 의해 Ask1 발현과 TUNEL 반응이 모두 감소함을 확인하였다(Fig. 3B). Ask1의 발현억제가 실제로 허혈에 의한 뇌 손상을 보호하는지 확인하기 위하여, TTC 염색을 통해서 각 군간의 병변의 크기를 비교한 결과 siRNA 처리군이 vehicle을 처리한 군보다 병변의 크기가 작았음을 확인할 수 있었다(Vehicle, $96.7 \pm 42.5 \text{ mm}^3$; siRNA, $25.3 \pm 17.2 \text{ mm}^3$; mean \pm SD, $n=5$, * $P < 0.05$) (Fig. 4).

고 찰

본 연구는 마우스에서 일과성 국소 대뇌 허혈 이후 Ask1의 발현이 유도되고 세포고사가 일어남을 보였다(Fig. 2, 3). 또한 Ask1의 발현을 조절하는 mRNA를 silencing하는 small interference RNA (siRNA)를 이용하여 Ask1의 발현을 억제하였으며 세포고사를 억제하고 뇌경색을 감소

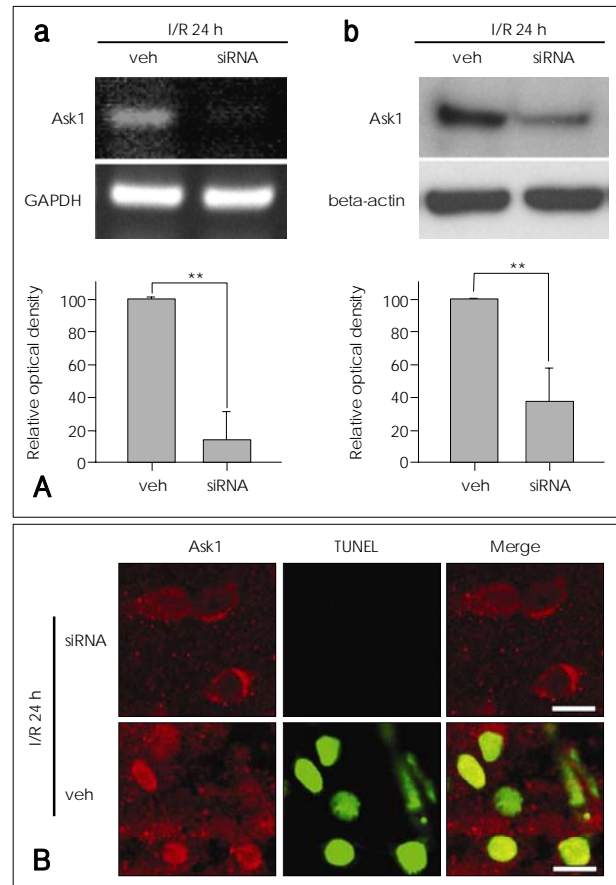


FIGURE 3. Effects of Ask1 targeted siRNA. Semiquantitative RT-PCR for Ask1 mRNA (Aa) and western blot assay for Ask1 protein (Ab) was performed 24 hours after ischemia/reperfusion in siRNA-treated or vehicle-treated mice. The gene and protein expressions of Ask1 were presented by quantitative graphs. ** $P < 0.001$ (A, lower panel). B: In siRNA-treated mice, Ask1 expression was low and no TUNEL positive cells were detected 24 hours after ischemia/reperfusion; however, an overlap between Ask1 and TUNEL staining was detected 24 hours after ischemia/reperfusion in vehicle treated-mice. Scale bars = $10 \mu\text{m}$.

시켰다(Fig. 3, 4).

이번 연구에서는 일과성 국소 대뇌 허혈에 의해 일어나는 세포고사 과정에 Ask1의 단백질 발현 및 활성화가 관여함을 관찰할 수 있었으며(Fig. 2, 3), 이 같은 결과는 Ask1(-/-) embryonic fibroblast에서 세포고사의 억제와¹⁹ 배양세포에서 Ask1을 과발현시키면 H_2O_2 나 $\text{TNF-}\alpha$ 에 반응하여 세포고사를 촉진한다는 연구결과,^{16,18,20} *in vitro*에서 Ask1을 활성 allele로 조작한 세포에서 세포고사가 증가한다는 결과²⁹ 및 랫트 척수손상시 24시간 내에 Ask1 발현이 최대로 증가한다는 *in vivo* 실험결과³⁰와도 일치한다.

또한 랫트 전대뇌 허혈 모델에서 허혈에 의한 Ask1의 활성이 증가했다는 보고^{24,25}와는 달리, 본 연구에서는 Ask1의 단백질 발현량이 허혈 후 시간이 지남에 따라 증가하는 결과를 보였다(Fig. 2). 본 연구 결과는 Ask1 단백질량의

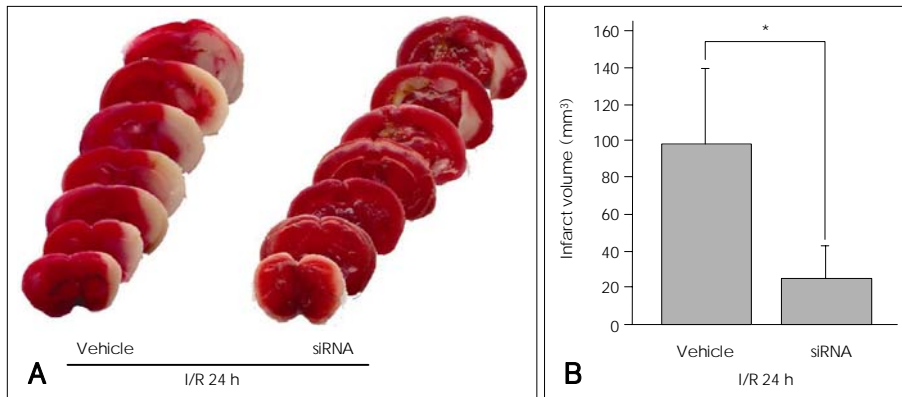


FIGURE 4. The comparison of infarct volume between vehicle- or siRNA-treated mice. **A:** Scanned representative images of an entire TTC stained in ischemic injured brain sections. The infarcted areas remain unstained (white). **B:** The graph represents quantified infarct volume in two groups. * $P < 0.05$.

증가가 Ask1의 활성화를 유도하고, 활성화된 Ask1이 ischemic neuronal cell death에 중요한 역할을 한다는 것을 제시하고 있다(Fig. 3B). 또한 Ask1의 발현을 차단하기 위해 Ask1 표적 siRNA를 처리함으로써, apoptotic cell death가 유의하게 감소하였으며 이는 본 연구의 가설을 뒷받침한다(Fig. 3).

여러 대뇌 허혈 모델에서 ROS가 증가하여 세포고사를 유발한다는 사실은 잘 알려져 있으며,^{1,2} 과발현된 ROS는 Ask1이 일과성 대뇌 허혈 이후 활성화되는 과정에 관여한다.^{14,19} 현재까지 밝혀진 ROS에 의한 Ask1의 활성화기전은, resting state에서 Ask1은 homo-oligomer를 이루고 여기에 환원된 thioredoxin (Trx)가 붙어있는 불활성 상태로 존재하다가, ROS에 의해 Trx가 산화되면 Ask1 oligomer에서 떨어져 나감으로써 Ask1 oligomer의 구조적 변화를 일으켜, Thr845 residue의 autophosphorylation을 통해 활성화 된다.^{16,20,21,31} 하지만 Ask1의 발현 양상 및 이의 조절에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. E2F family 중 하나인 E2F1은 cell cycle 조절과 apoptosis 간의 fail-safe homeostasis의 역할을 한다. 최근 E2F1에 의해 Ask1의 transcription이 증가되며, 이는 E2F1이 MAPK pathway를 조절하거나 증가된 Ask1이 다시 E2F1의 activity를 증가시키는 positive feedback의 역할을 할 것이라는 연구결과들이 보고되었다.^{32,33} 이는 Ask1의 발현 양상의 변화가 여러 apoptosis pathway 간의 매개자 역할을 할 가능성을 제시하는 것으로, 본 연구에서 관찰한 cerebral ischemia 직후의 Ask1 발현 증가(Fig. 2) 기준에 알려진 Ask1/SEK/JNK pathway의 활성화뿐 아니라 다른 apoptosis pathway, 특히 E2F1 signaling에 관여할 가능성에 대해서 추후 연구가 진행되어야 할 것이다.

본 연구 결과는 Ask1 발현 시작 이후 허혈 후 24시간까지 지속적으로 증가하였으며(Fig. 2), Ask1과 TUNEL 이중형광염색에서 두 물질이 허혈 24시간 후에 같은 세포

에서 염색됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). siRNA 처리에 의한 Ask1의 발현 억제 결과, siRNA 처리군에서 Ask1의 발현감소와 그에 따른 DNA fragmentation이 억제되었으며(Fig. 3) 뇌경색의 병변크기가 감소되는(Fig. 4) 치료적 효과를 보였다. 이러한 연구결과는 위에서 언급한 Ask1이 산화적 스트레스에 의한 세포고사에 선택적으로 관련한다는 보고들과 일치한다.

결론적으로 본 연구에서는 일과성 국소 대뇌 허혈에서 ROS에 의한 산화적 스트레스가 MAPKKK인 Ask1 단백질의 조기발현을 유도하였으며, 이에 따라 세포고사가 일어남을 확인하였다. 또한 Ask1 단백질량이 증가하고, 그 이후에 세포고사가 일어났으며, Ask1의 mRNA를 억제하는 siRNA를 투여하면 Ask1의 발현이 억제되며, 세포고사 및 뇌경색이 감소함을 보였다. 다만 본 동물질환모델에서 과발생된 ROS와 Ask1의 발현 양상에 대한 직접적인 인과관계 및 조절에 관한 신호전달체계의 메커니즘에 대해서는 좀 더 심도 있는 연구가 필요한 실정이다. 과생성된 ROS에 의한 초기반응 개시자로서의 Ask1에 대한 연구가 좀 더 이루어진다면 향후 뇌경색을 비롯한 여러 뇌신경 질환을 이해하고 치료하는데 현실적이고, 응용 가능한 도움이 될 것이다.

REFERENCES

1. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27:1124-9.
2. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:2-14.
3. Murakami K, Kondo T, Epstein CJ, Chan PH. Overexpression of cuzn-superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. *Stroke* 1997;28:1797-804.
4. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Copin JC, Calagui B, Epstein CJ, et al. Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome c and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 1999;19:3414-22.
5. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, Sugawara T, Kawase M,

- Chan PH. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci* 2000; 20:2817-24.
6. Saito A, Hayashi T, Okuno S, Nishi T, Chan PH. Oxidative stress is associated with xiap and smac/diablo signaling pathways in mouse brains after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 2004;35:1443-8.
 7. Errede B, Levin DE. A conserved kinase cascade for map kinase activation in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:254-60.
 8. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999;79:143-80.
 9. Cobb MH. Map kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71: 479-500.
 10. Gu Z, Jiang Q, Zhang G. C-jun N-terminal kinase activation in hippocampal CA1 region was involved in ischemic injury. *Neuroreport* 2001;12:897-900.
 11. Ozawa H, Shioda S, Dohi K, Matsumoto H, Mizushima H, Zhou CJ, et al. Delayed neuronal cell death in the rat hippocampus is mediated by the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Neurosci Lett* 1999;262:57-60.
 12. Tobiume K, Inage T, Takeda K, Enomoto S, Miyazono K, Ichijo H. Molecular cloning and characterization of the mouse apoptosis signal-regulating kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;239:905-10.
 13. Hayakawa T, Matsuzawa A, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. The ASK1-MAP kinase pathways in immune and stress responses. *Microbes Infect* 2006;8:1098-107.
 14. Takeda K, Matsuzawa A, Nishitoh H, Ichijo H. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct* 2003;28:23-9.
 15. Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein daxx. *Science* 1998;281:1860-3.
 16. Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, et al. Ask1 is essential for jnk/sapk activation by traf2. *Mol Cell* 1998; 2:389-95.
 17. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998;17:2596-606.
 18. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian mapkkk that activates sapk/jnk and p38 signaling pathways. *Science* 1997;275:90-4.
 19. Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, et al. Ask1 is required for sustained activations of jnk/p38 map kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2001;2:222-8.
 20. Gotoh Y, Cooper JA. Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem* 1998;273:17477-82.
 21. Liu H, Nishitoh H, Ichijo H, Kyriakis JM. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol* 2000;20:2198-208.
 22. Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, et al. Ros-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* 2005;6:587-92.
 23. Izumiya Y, Kim S, Izumi Y, Yoshida K, Yoshiyama M, Matsuzawa A, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ Res* 2003;93:874-83.
 24. Zhang Q, Zhang G. Activation and autophosphorylation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) following cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2002;329:232-6.
 25. Zhang Q, Zhang G, Meng F, Tian H. Biphasic activation of apoptosis signal-regulating kinase 1-stress-activated protein kinase 1-c-jun N-terminal protein kinase pathway is selectively mediated by ca²⁺-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors involving oxidative stress following brain ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2003;337:51-5.
 26. Kondo T, Reaume AG, Huang TT, Carlson E, Murakami K, Chen SF, et al. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 1997;17:4180-9.
 27. Kim GW, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Early decrease in dna repair proteins, ku70 and ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2001;32:1401-7.
 28. Kim GW, Kondo T, Noshita N, Chan PH. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: Implications for the production and role of superoxide radicals. *Stroke* 2002;33:809-15.
 29. Hatai T, Matsuzawa A, Inoshita S, Mochida Y, Kuroda T, Sakamaki K, et al. Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J Biol Chem* 2000;275:26576-81.
 30. Nakahara S, Yone K, Sakou T, Wada S, Nagamine T, Niiyama T, et al. Induction of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) after spinal cord injury in rats: Possible involvement of ASK1-jnk and -p38 pathways in neuronal apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58: 442-50.
 31. Tobiume K, Saitoh M, Ichijo H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol* 2002;191:95-104.
 32. Tan J, Zhuang L, Jiang X, Yang KK, Karuturi KM, Yu Q. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a direct target of E2f1 and contributes to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through positive feedback regulation of E2f1 apoptotic activity. *J Biol Chem* 2006;281: 10508-15.
 33. Hershko T, Korotayev K, Polager S, Ginsberg D. E2f1 modulates p38 mapk phosphorylation via transcriptional regulation of ask1 and wip1. *J Biol Chem* 2006;281:31309-16.