뇌혈관 내피세포의 허혈 손상에 의한 nuclear factor kappa B 활성화의 역할

연세대학교 대학원

의 학 과

심 규 대

뇌혈관 내피세포의 허혈 손상에 의한 nuclear factor kappa B 활성화의 역할

지도교수 안 영 수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

심 규 대

심규대의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2002 년 12 월 일

감사의 글

논문이 나오기까지 끊임없이 지도 편달해 주신 안영수 선생님께 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 남용택 선생님, 김동구 선생님, 박전한 선생님, 이광훈 선생님께도 감사 드립니다. 누구보다도 논문을 위해 많이 애써준 이진우 선생님께도 지면을 빌려 감사 드립니다.

저를 낳아주시고 키워주신 부모님과 아내 채수진, 그리고 예쁜 채연이와 근용이에게 이 논문을 바칩니다.

저 자 씀

차 례

그림 및 표 차례
국문요약 ····· 1
Ⅰ. 서 론 ····· 3
Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 7
1. 세포 배양 ····· 7
2. Oxygen glucose deprivation – in vitro ischemia ····· 7
3. 약물처리 ····· 8
4. 현미경을 이용한 세포 사멸 분석 ····· 8
5. MTT 측정법을 이용한 세포 사멸 분석 ····· 9
6. 핵 단백, 세포질 단백의 분리 ····· 9
7. 젤 지연분석 ····· 10
8. Western blot ····· 10
9. 세포면역염색법 ····· 11
Ⅲ. 결 과 ····· 12
1. 배지 탈산소화 ····· 12
2. OGD에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸 ····· 13
3. OGD에 뒤따른 재관류가 뇌혈관 내피세포 사멸에 미치는 영향 ··· 15
4. OGD에 의한 NF-κ B 활성화 ····· 16
5. OGD에 의한 NF-κ B 활성화 기전 ····· 17
6. PDTC+$ZnSO_4$가 OGD에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과 NF-κ B 활성화에 미치는 영향 ····· 19
7. Sodium salicylate가 OGD에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과 NF-κ B 활성화에 미치는 영향 ····· 20
8. CAPE가 OGD에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과 NF-κ B 활성화에 미치는 영향 ····· 21
9. OGD 및 NF-κB 억제제가 세포 생존/사멸 관련 단백에 미치는 영향 22
Ⅳ. 고 찰 ····· 23
Ⅴ. 결 론 ····· 28

참고문헌 ····· 29
영문요약 ····· 35

그림 차례

그림 1. 배지 탈산소화 ····· 12
그림 2. OGD에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸 ····· 14
그림 3. OGD에 뒤따른 재관류가 뇌혈관 내피세포 사멸에 미치는 영향 ····· 15
그림 4. OGD에 의한 NF-κB의 활성화 ····· 16
그림 5. OGD에 의한 IκBα 32Ser의 인산화 여부 ····· 18
그림 6. OGD에 의한 p65의 핵내 이동 ····· 18
그림 7. OGD에 의한 IκBα 43Tyr의 인산화 여부 ····· 19
그림 8. PDTC+ $ZnSO_4$가 OGD에 의한 NF-κB 활성화와 세포 사멸에 미치는 영향 ····· 20
그림 9. Sodium salicylate가 OGD에 의한 NF-κB 활성화와 세포 사멸에 미치는 영향 ····· 21
그림 10. CAPE가 OGD에 의한 NF-κB 활성화와 세포 사멸에 미치는 영향 ····· 22
그림 11. OGD 및 sodium salicylate가 p53, bax, bcl-2의 단백 양에 미치는 영향 ····· 22

국문요약

뇌혈관 내피세포의 허혈 손상에 의한 nuclear factor kappa B 활성화의 역할

뇌졸중은 사망률 1위를 차지하는 주요 질병이다. 뇌졸중은 뇌의 혈행 장애로 인한 허혈 (ischemia)에 의해 뇌신경세포가 사멸하여 그 신경학적 증상을 나타내며, 사망, 불구의 결과를 낳는다. 최근 뇌신경세포의 사멸 뿐 아니라 뇌혈관 내피세포도 뇌졸중의 중요한 병태 생리를 담당한다고 알려져 그 관심이 고조되고 있는 바, 뇌혈관 내피세포의 백혈구 부착 인자 (leukocyte adhesion molecule) 발현 및 이에 의한 뇌실질 염증, blood-brain barrier (BBB)의 손상에 의한 뇌 부종, 뇌혈관 내피세포 사멸에 의한 뇌 실질 출혈 등으로 요약할 수 있다. Nuclear factor kappa B (NF-κB)는 염증, 세포 생존/사멸에 중요한 역할을 하는 전사인자이다. 본 실험에서는 허혈의 *in vitro* 모델인 oxygen glucose deprivation (OGD)을 이용하여, NF-κB가 허혈에 의한 뇌혈관 내피세포 사망에 미치는 영향을 연구하였다. 뇌혈관 내피세포주인 bEnd.3 세포에 OGD 처리하면, 그 기간에 비례하여 세포 사멸이 나타났으며, NF-κB가 활성화되었다. 이 때 OGD에 의한 세포 사멸은 있으나, 뒤따른 재관류에 의한 추가 손상은 없어, 이 후의 실험에서는 OGD에 의한 손상에 초점을 두었다. NF-κB 활성화는 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 이용하여 확인하였고, 본 실험에서 활성화되는 NF-κB는 p65/p50 heterodimer와 p50/p50 homodimer였다. OGD에 의한 뇌혈관 내피세포의 NF-κB 활성화 기전은 대표적인 NF-κB 활성화인 TNFα 에 의한 경우와는 그 기전이 다른 바, IκBα 32Ser의 인산화 및 proteasome에 의한 파괴 과정이 나타나지 않았으며, 허혈/재관류의 경우 나타난다는 IκBα 42Tyr의 인산화도 나타나지 않았다. OGD에 의해 활성화되는 NF-κB가 세포 생존인자인지, 사멸인자인지 혹은 이 경우

의 세포 사멸에 관계 없는 인자인지 알아보기 위해 세 종류의 NF-κB 억제제인 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) + zinc, sodium salicylate, caffeic acid phenethyl ester (CAPE)를 사용하였다. 이 세 약물은 공히 NF-κB를 억제하였으며, 세포 사멸을 증가 시켰다. 이러한 결과가 나타난 기전을 알기 위해 세포 생존/사멸 단백 중 NF-κB에 의해 조절되는 것으로서 p53, bax, bcl-2를 Western blot으로 측정하여 보았으나 이 단백들이 양적으로 변화하지 않아, 적어도 이 세 NF-κB 억제제의 효과는 이 세 가지 세포 생존/사멸 관련 단백을 경유하지 않았다. 결론적으로, OGD에 의한 뇌혈관 내피세포의 NF-κB 활성화는 세포 생존 인자로 판단된다.

핵심되는 말 : 뇌혈관 내피세포, 세포 사멸, NF-κB

뇌혈관 내피세포의 허혈 손상에 의한 nuclear factor kappa B 활성화의 역할

<지도교수 **안영수**>
연세대학교 대학원 의학과

심 규 대

Ⅰ. 서 론

뇌졸중 (Stroke)은 1997년 통계청이 발표한 사망원인통계연보에 의하면 인구 십만 명당 사망률 73.5명으로 1위를 차지하고 있다. 뇌졸중은 이환 된 환자에게 심각한 기능부전을 초래하여 가족의 절대적인 보호 및 의료기관에서의 장기간의 치료를 필요로 하게 되므로 사회 경제적인 문제로 대두되어진다. 뇌졸중은 원인에 따라 혈전색전성 및 출혈성으로 분류한다. 그러나, 선행 원인에 관계없이 뇌졸중은 신경 조직에 공급되는 혈행 장애로 인한 산소와 포도당의 결핍, 즉 허혈 (ischemia)로 발생되며 결국 중추신경계의 신경세포가 사멸되어 보행운동과 감각신경 및 심각한 인지력의 손상을 가져오는 것으로 그 병태생리를 요약할 수 있다.[1]

다른 조직과 달리 뇌는 짧은 기간의 허혈에 의해서도 큰 손상을 입는 바, 뇌졸중의 병태생리는 주로 뇌신경세포 손상에 중점을 맞추어 뇌신경세포 사멸과 관련된 기전에 관하여 연구가 이루어져 왔다. 뇌신경세포는 에너지 소모가 많기 때문에 허혈에 의한 포도당과 산소의 부족은 빠른 ATP 고갈을 일으킨다. 뇌신경세포는 -65 mV의 안정막전위 (resting membrane potential)를 유지하기 위해 지속적인 Na^+-K^+-ATPase의 활성을 필요로 하므로, 허혈에 의한 ATP 고갈은 안정막 전위의 상승을 유도하고, 이에 의해 허혈 자극을 받은 뇌

신경세포는 많은 활동 전위를 생성하게 된다.[2] 이는 흥분성 신경 전달물질인 glutamate의 분비를 증가 시키고, 과도한 양의 glutamate는 세포내 칼슘 농도를 지속적으로 높게 만들어 세포를 사멸하게 한다. 이러한 흥분성 신경 전달물질에 의한 뇌신경세포의 손상을 흥분독성 (excitotoxicity)이라고 한다.[2] 또한 허혈 기간 동안 활성 산소류 등을 제거하는 시스템이 억제되므로, 뒤따른 재관류 는 활성 산소류의 폭발적 증가를 일으키고 이는 지질 peroxidation, 단백 산화 등의 기전으로 조직 손상을 심화시킨다.[3,4]

이렇게 뇌졸중에 의한 신경세포 사멸의 경로는 흥분독성과 산화적 스트레스 (oxidative stress)에 의한 necrosis로 주로 설명되어 왔으나, 최근 뇌졸중에서 apoptosis에 의한 세포 사멸이 존재한다는 증거가 제시되고 있다. 뇌 허혈 및 뇌 손상 후 염색질의 응축 및 응고, 세포질의 수축, DNA 분절 (fragmentation), cycloheximide에 의한 세포 사멸 방지 등이 그 증거이다.[5] 이런 apoptosis는 glutamate 길항제나 항산화제에 의해 세포 사망의 정도가 감소되지 않고, apoptosis를 억제하는 약물인 caspase 3 억제제나 bcl-2 과발현 등에 의해 그 정도가 감소된다고 알려졌다.[5]

하지만, 뇌졸중 발생 시에 허혈 자극을 가장 먼저 받는 세포가 뇌혈관 내피세포이므로 그 분자생물학적, 세포생물학적 병리기전의 시작은 뇌신경세포가 아니라 뇌혈관 내피세포일 것이다. 최근 신경세포의 사멸 뿐 아니라 뇌혈관을 구성하는 내피세포가 중요한 병태 생리를 담당한다는 증거들이 제기되고 있다.[6] 뇌의 소혈관은 다른 조직의 소혈관들과는 다른 구조를 가지고 있어, 뇌 실질 내로의 물질 이동을 철저하게 감시하고 있다. 뇌혈관 내피세포, 성상세포 (astrocyte)의 종단 (end foot) 및 이 사이의 기저판 (basement membrane)으로 이루어 지는 혈뇌장벽 (blood-brain barrier, BBB)이 이러한 기능을 담당한다.[7]

뇌혈관 내피세포는 허혈 자극에 의해 여러 가지 백혈구 부착 인자 (leukocyte adhesion molecule)를 발현하고, 염증 매개물질을 방출한다. 이는 뇌 조직 실질의 염증을 일으켜 조직 손상을 가중시킨다.[8,9] 또한 허혈은 뇌혈

관 내피세포 사이의 tight junction을 손상시키고, matrix metallo-protease (MMP)의 발현을 증가시킴으로서 BBB 장벽을 느슨하게 하여, 뇌 실질의 부종을 일으키며 이는 뇌압을 상승시켜 뇌 허혈을 심화시키고, 심한 경우 뇌 탈장을 일으킨다.[6] 특히 허혈에 의해 뇌혈관 내피세포가 사멸하는 경우, 치료적인 재관류 즉 혈전용해 치료 시, 혹은 자연적인 재관류 시 뇌졸중에 이은 뇌내 출혈을 야기할 수 있다. 이런 경우를 hemorrhagic transformation이라 하며, 매우 치명적이므로, 허혈에 의한 뇌혈관 내피세포의 사멸은 뇌졸중의 병태생리 및 치료전략에 있어서 매우 중요한 부분이 된다.[10-12]

Nuclear factor kappa B (NF-κB)는 1986년 B cell에서 immunoglobulin kappa chain을 만들어 내는 데에 필요한 transcription factor로서 발견되었으며, 그 이후 많은 연구를 통하여, 염증 등의 면역 반응에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 알게 되었다.[13] 하지만, NF-κB의 주 구성원인 p65 제거 형질전환 마우스가 발생 단계에서 간 세포 (hepatocyte)의 괴사를 일으켜 사망하고, 파괴되지 않는 mutant IκB에 의해 apoptosis가 증대되는 등의 실험적 증거들에 의해 NF-κB가 세포 사멸을 억제하는 (anti-apoptotic) 역할을 한다는 것이 알려져 그 중요도가 한층 가중되게 되었다.[14]

NF-κB는 이합체로 이루진 바, p65, p50, p52, cRel, RelB 등 5가지 단백이 동일이합체 (homodimer) 혹은 상이이합체 (heterodimer)를 이루고 있다.[15] 활성화되지 않은 NF-κB는 inhibitor κB (IκB) 단백에 의해 세포질에 억류되어 있는데, 이는 IκB가 NF-κB 이합체와 결합하여, NF-κB가 가지고 있는 nuclear localization sequence (NLS)를 가리고 있기 때문이다.[15] UV, reactive oxygen species (ROS), TNFα , interleukin (IL)-1β 등 염증 싸이토카인 등에 의해 NF-κB가 활성화되는데, 이런 자극에 의해 IκB kinase (IKK) complex가 활성화되고 이에 의한 IκB의 인산화, IκB의 polyubiquitination, proteasome에 의한 IκB의 파괴가 폭포수 반응으로 일어나, NF-κB의 NLS가 노출되어 NF-κB가 핵 안으로 들어가게 되어 전사인자로서 기능하게 된다.[16]

많은 유전자의 promoter 부분에 NF-κB 결합 부위 즉, κB site가 존재하여, NF-κB 활성에 따라 그 유전자의 발현이 조절된다. TNFα , IL-2,3,6,8, TGF-β , MnSOD, Calbindin, Proenkaphaline, Bcl-2 family members, p53, IκBα , intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, iNOS, cyclooxygenase (COX)-2, amyloid precursor protein (APP), transglutaminase, glial fibrillar acidic protein (GFAP), endothelial cell leukocyte adhesion molecule (ELAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, e-selectin, T cell recepter alpha, beta chains, α_2-microglobulin, c-rel, c-myc, interferon regulatory factor (IRF)-1 등 많은 유전자의 발현이 NF-κB 활성에 의해 그 발현이 조절된다. 이러한 유전자들을 살펴보면, NF-κB가 염증 등 면역반응, 세포 생존/사멸에 매우 중요한 역할을 담당하는 것을 알 수 있다.[15,16]

NF-κB 활성을 변화시키는 약물들은 면역억제제로 개발되어 각종 염증성 질환에 사용되고 있으며, 항암 화학요법의 한 부분을 담당할 것으로 기대된다. 또한, 신경퇴행성 질환 등의 예방, 치료의 경우 세포 사멸을 억제할 목적으로 사용될 것이다.

뇌혈관 내피세포의 NF-κB는 허혈성 자극에 대한 반응으로 활성화되며 이에 의해 염증 반응을 매개하는 여러 종류의 싸이토카인, 백혈구 부착 인자 (leukocyte adhesion molecule) 등의 발현이 증가된다. 이는 결과적으로 허혈 및 허혈 후 재관류에 의한 조직의 염증 반응을 야기하여 조직 손상을 증가시킨다.[17-19] 하지만, 허혈성 자극에 의한 뇌혈관 내피세포의 NF-κB 활성화가 뇌혈관 내피세포의 사멸에 어떤 영향을 미치는 지는 밝혀진 바가 없다. 따라서, 허혈성 자극의 *in vitro* 모델로서 oxygen glucose deprivation (OGD)을 사용하고, 뇌혈관 내피세포로서 마우스의 뇌혈관 내피세포종에서 유래한 세포주인 bEnd.3를 이용하여, 뇌 허혈 시 NF-κB 활성화가 뇌혈관 내피세포의 사멸에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 이를 통하여 뇌졸중 상황에서 조직 손상을 감소시킬 수 있는 약물의 조건을 제시하여, 효과적인 치료전략을 세울 수 있을 것이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 세포 배양

마우스의 뇌혈관 내피세포종에서 유래한 세포주인 bEnd.3 cell (ATCC, Manassas, VA, USA)을 10% fetal bovine serum (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)이 포함된 Dullbeco' s modified Eagle' s media (DMEM, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. 이 배지의 $NaHCO_3$ 양은 2.2 g/L로 하여, 37℃, 5% CO_2 환경에서 유지하였다. 모든 실험은 $3x10^4$ cells/cm^2의 세포 농도로 세포를 분주한 후 16-24 시간에 실시하였다.

2. Oxygen glucose deprivation (OGD) - i*n vitro* ischemia

OGD는 준비된 세포에서 산소와 포도당을 포함한 모든 영양분 및 에너지원을 제거하는 것이고, 재관류는 OGD 후에 산소와 포도당을 재공급하는 과정이다. Balanced salt $solution_0$ (BSS_0, NaCl 116 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, $MgSO_4$ 0.8 mM, KCl 5.4 mM, NaH_2PO_4 1 mM, $NaHCO_3$ 26.2 mM, pH 7.4)은 영양분 및 에너지원이 없는 완충액이고, 여기에 포도당 5.5 mM을 추가한 것이 $BSS_{5.5}$이다. BSS_0를 산소가 없는 혼합가스 (CO_2 5%, H_2 10%, N_2 85%)로 bubbling하여 산소를 제거한 것이 deoxyBSS_0이며, 세포의 배지를 deoxyBSS_0로 두 번 세척 후 deoxyBSS_0로 교체하여 anaerobic chamber (Forma scientific Inc, Marietta, OH, USA)에 넣어 37℃로 배양하는 과정을 OGD로 하였고, OGD 상태에 있던 세포를 anaerobic chamber에서 꺼내 산소를 포함하고 있는 $BSS_{5.5}$로 배지를 교환해 주는 과정을 재관류로 하였다.

3. 약물처리

Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), $ZnSO_4$ (Sigma, St. Louis, MO, USA)는 phosphate buffered saline (PBS)에 녹여 무균여과한 후 사용하였으며, sodium salicylate (Sigma, St. Louis, MO, USA)는 BSS_0, $BSS_{5.5}$에 20 mM로 녹여 pH 7.4로 정적한 후, 무균여과하여 사용하였다. Sodium salicylate는 처리 농도가 높아 삼투압에 대한 영향이 크므로, NaCl의 양을 줄여 삼투압을 310±5 mosm/L로 조절하였다. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE, Calbiochem, Darmstadt, Germany)는 99% ethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)에 100 mM로 녹여 사용하였다. CAPE 처리의 경우, 대조군에 동량의 ethanol을 처리하였다.

4. 현미경을 이용한 세포 사망 분석

세포의 사멸 혹은 생존을 측정하기 위한 기본적인 방법은 광학현미경 상에서 하나하나 셈하는 것이다. 현미경 상에 보이는 세포 중 사멸한 세포를 알아내기 위한 방법으로 propidium iodine (PI) 염색과 trypan blue 염색을 사용하였다. PI를 1 g/mL로 처리하여 30 분 배양 후, 형광현미경에서 excitation 546 nm, emission 590 nm 필터로 관찰하였다. PI는 세포가 사멸하면 세포 안으로 이동하여 DNA에 결합, 붉은 형광을 내고, 세포가 살아있으면 세포 안으로 들어가지 못해 형광을 띠지 못한다. 세포에 0.4% trypan blue를 처리하여 1 시간 배양한 후, 배지를 제거하고 PBS를 첨가한 후 광학현미경으로 관찰하여 검게 염색된 세포는 죽은 것으로, 염색되지 않은 세포는 살아있는 세포로 하여 센다. 대조군의 살아있는 세포 수에 대한 백분율을 세포생존율로 하였다.

5. MTT 측정법을 이용한 세포 사망 분석

24 well plate에 세포를 분주한 후, 적정 자극 후에 MTT 측정법을 사용하였다. 세포에 MTT 염료를 1 mg/mL의 농도로 처리하여 1 시간 배양한 후, MTT의 환원으로 인한 보라색의 formazan 결정을 용출 용액 (25% dimethylforamide, 10% SDS)에 12시간 이상 녹여 570 nm에서의 흡광도를 spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다. 처리군의 OD_{570}과 손상 받지 않은 군의 OD_{570}과의 비율을 세포 생존율 (cell viability)로 하였다.

6. 핵 단백, 세포질 단백의 분리

세포를 $1.8x10^6$이 되게 모아 차가운 PBS로 씻은 후, 1 packed cell volume (PCV)의 buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1 ㎍/mL leupeptin, 1 ㎍/mL aprotinin)에 부유 시켜 얼음에 10 분간 방치하였다. 27 게이지 바늘에 5-10번 통과시켜 세포막을 파괴시키고, 원심분리 하여 핵을 모으고, 세척, 분리하였다. 이 때의 상층액을 13,000 rpm, 4℃, 15분에서 원심분리 하여 그 상층액 만 취하면 세포질 단백 추출물이 된다. 분리된 핵으로부터 핵단백질을 추출하기 위해 2/3 PCV의 차가운 buffer B (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 420 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 1 ㎍/mL leupeptin, 1 ㎍/mL aprotinin, 0.5 mM PMSF, 25% glycerol)를 넣고 얼음에 30분 방치하였다. 30 분 후 buffer C (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 1 ㎍/mL leupeptin, 1 ㎍/mL aprotinin, 0.5 mM PMSF, 25% glycerol)를 2/3 PCV 만큼 넣어 13,000 rpm, 4℃, 15분에서 원심분리 하였다. 이 상층액이 핵단백질이다.

7. 젤 지연분석(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

동위원소로 표지한 NF-κB consensus oligonucleotide (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 즉 probe 0.0175 pmole (>10^4 CPM)과 1 ㎍의 poly dIdC를 포함한 10 μL의 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. 얼음 위에서 30 분 간 반응 시킨 다음 혼합물을 nondenaturing 6% polyacrylamide gel에 180V에서 2 시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동 후 젤을 진공 건조 시켜 자가방사기록 하였다. Competition assay와 supershift assay의 경우, probe를 넣기 전에 동위원소 표지하지 않은 oligonucleotide 혹은 항-NFκB 혈청 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 2 μL 넣어 반응시킨 후 probe를 첨가하였다.

8. Western blot

세포를 차가운 PBS로 두 번 씻은 다음, 50 mM Tris, pH 7.2, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, complete protease inhibitor cocktail (Roche, Manheim, Germany)이 포함된 용해 완충액을 넣고 긁어 1.5 mL 튜브에 모아, 30 분 간 얼음에 방치한 후 13,000 rpm, 4℃, 15 분에서 원심분리하였다. 50 ㎍의 단백질을 10% SDS-PAGE로 분리하고, nitrocellulose 막에 단백질을 이동부착하였다. 5% 탈지분유로 비특이 항체결합을 방지한 후, 1:1000으로 희석한 1차 항체와 1:5000으로 희석한 2차 항체 (HRP 포합된 IgG)를 반응시켰다. IκBα , p65, bax, bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), phospho-IκBα (New England Biolab, Beverly, MA, USA), p53 (Neomarker, Fremont, CA, USA)등의 항체를 사용하였으며, 최종적인 발색 반응에는 ECL kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)을 이용하였다.

9. 세포면역염색법 (immunocytochemistry)

커버 슬립에 $3x10^4$ cells/cm^2로 키워 예정된 처치 한 세포를 phosphate buffer (PB, 0.1 M Na_2HPO_4, pH 7.4)로 세척한 후, 4% paraformaldehyde로 고정하고, 0.2% triton X-100으로 세포막을 투과 가능케 하였다. 1% 소혈청 알부민으로 비특이 항원-항체 결합을 억제하고, anti-p65 항체를 1:1000으로 처리하여 4 시간 배양하고, 세척 후 이차항체 biotin이 포합된 anti-rabbit 항체 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 처리하고, avidin-biotin을 이용한 ABC Vectastain kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 염색하였다. 이후, 순차적인 고순도의 에탄올 세척 및 xylene으로 탈수한 후, Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)로 마운트하여 광학현미경으로 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 배지 탈산소화 (Deoxygenation)

OGD는 허혈성 질환인 뇌경색 (뇌졸중)과 심근경색의 *in vitro* 모델이다. OGD를 수행하기 위해 BSS_0 배지의 산소를 제거하는 과정이 필수적인데 이를 위해 혼합 가스 (질소 85%, 수소 10%, 이산화탄소 5%)를 이용하여 bubbling 하였다. Bubbling을 수행하면서 dissolved oxygen meter (Corning, Corning, NY, USA)로 산소 포화도가 감소하는 것을 측정하였다 (그림 1). Bubbling 15 분에 의해 BSS_0 내의 산소 포화도는 0.5% 이하로 낮아졌다. 따라서, 이후의 실험에서 BSS_0의 탈산소화를 위해 30분 bubbling을 실시하였다.

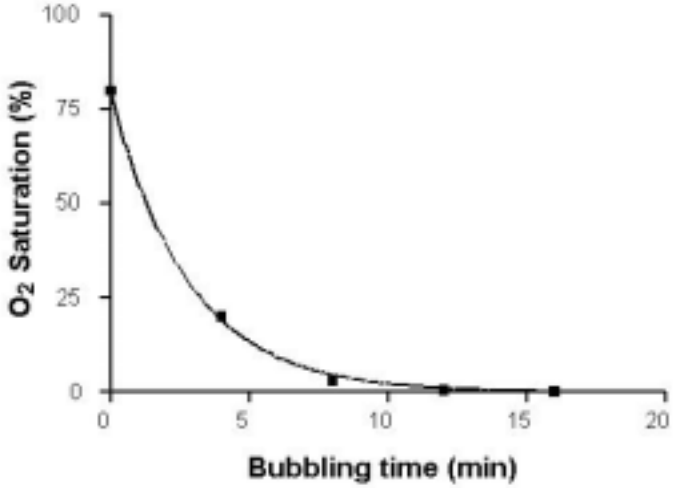

그림 1. 배지 탈산소화. 가스 탱크로부터 공급되는 혼합가스(질소 85%, 수소 10%, 이산화탄소 5%)를 syringe filter로 여과하여 2 mL 피펫을 통해 500 mL, 혹은 250 mL 병에 있는 BSS_0에 공급하였다. 공급하는 동안 4분 간격으로 dissolved oxygen meter를 이용하여 산소 포화도를 측정하였다.

2. OGD에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸

마우스의 뇌혈관 내피세포로부터 유래한 세포주인 bEnd.3 세포에 OGD 처리하면 세포가 사멸한다. 세포 사멸 시 광학 위상차 현미경 관찰 시 형태학적 특징은 세포와 세포 사이의 경계가 사라지면서, 방추 모양의 세포가 그 형태를 잃는 것으로 요약할 수 있다 (그림 2A, 왼쪽 아래). 세포가 사멸했다는 것은 propidium iodine 염색을 통해 확인하였다 (그림 2A, 오른쪽 아래).

이 세포 사멸을 정량화하기 위해 LDH 활성 측정을 하려하였으나, 본 실험 시스템에서 세포 사멸에 의한 LDH 방출 시 LDH 활성이 유지되지 않아 다른 세포 사멸 측정을 사용해야 했다 (자료 생략). 따라서, MTT 측정법을 사용한 결과, OGD 2 시간 처리만으로도 세포의 MTT 환원도가 매우 감소함을 알았으나, 정상적인 배양 배지인 DMEM을 공급하여 주면 MTT 환원도가 2시간이내에 회복됨을 알게 되었다 (그림 2B). 따라서 이는 영양소 부족에 의한 MTT 환원도 감소이며, 세포사멸을 측정하기위해서는 OGD 수시간→DMEM 2 시간→MTT 측정의 방법을 사용하기로 하였다. 이는 trypan blue 염색을 이용하여 사멸한 세포의 개수를 측정하는 방법과 상응하는 관계를 보였다 (자료 생략).

OGD 기간에 따른 세포사멸 정도를 측정한 결과, OGD 8시간부터 세포 사멸이 나타나기 시작해서, 10시간이면 30~40%, 12시간이면 50~60%의 세포 사멸을 보였다 (그림 2C).

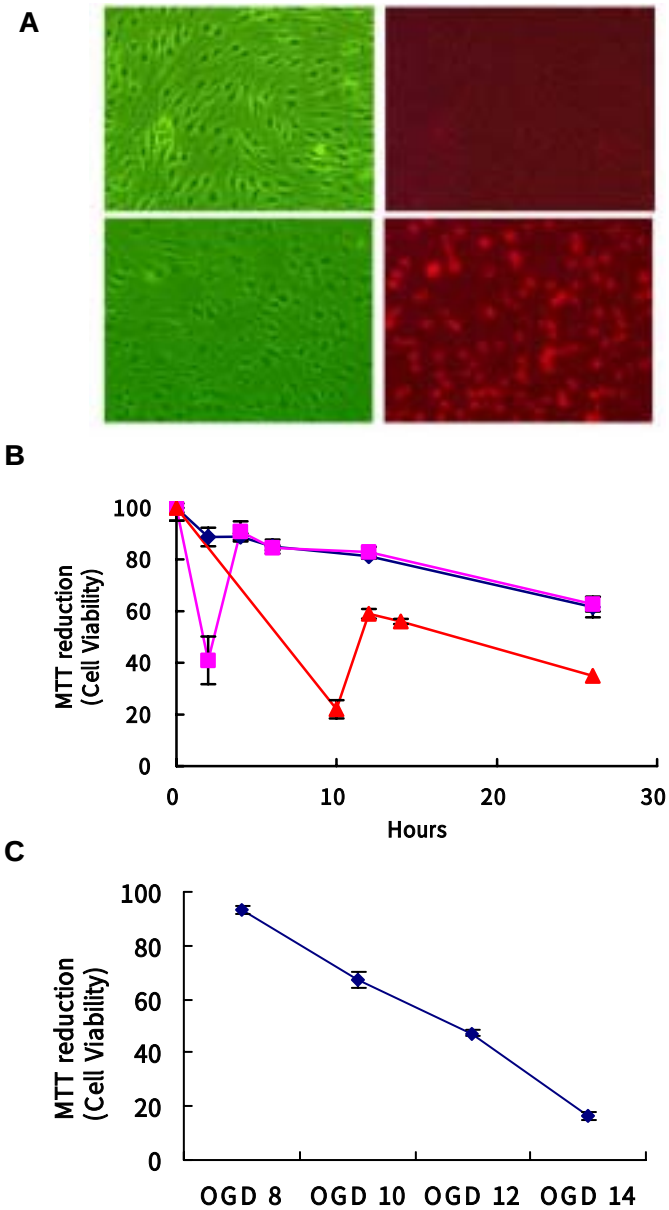

그림 2. OGD에 의한 뇌혈관 내피세포의 사멸. A. bEnd.3 세포를 $3x10^4$ $/cm^2$의 밀도로 배양하여 $BSS_{5.5}$ (위), OGD (아래) 14시간 처리한 것이다. 왼쪽은 위상차 현미경으로, 오른쪽은 propidium iodine 염색하여 사멸한 세포를 형광 현미경으로 찍은 사진이다. B. ◆는 $BSS_{5.5}$로 배지를 교환하여 시간 별로 MTT 환원도를 측정한 것이고, ■와 ▲는 각각 OGD 2시간 후, 10시간 후 $BSS_{5.5}$를 이용한 재관류를 시행하면서 시간별로 세포 사멸을 측정한 것이다. C. OGD를 시간별로 수행하여 그 MTT 환원도를 측정하였다.

3. OGD에 뒤따른 재관류가 뇌혈관 내피세포 사망에 미치는 영향

뇌졸중이나 심근경색 등 허혈성 질환에서 허혈 기간의 조직 괴사도 중요한 병리 기전이지만, 이에 뒤따르는 재관류 또한 매우 중요한 병리 기전으로 알려져 있다. 따라서, 재관류에 의해 뇌혈관 내피세포 손상이 가중되는 지를 MTT 측정법으로 확인하였다. $BSS_{5.5}$ 처리군을 100%로, 즉 대조군으로 하였고, OGD 8 시간, 10 시간 후, $BSS_{5.5}$로 재관류하면서 MTT 환원도를 측정한 결과, OGD에 의한 세포 사멸 후, 재관류에 의한 세포 사멸은 나타나지 않았다 (그림 3). 이는 재관류 손상이 없음을 의미한다.

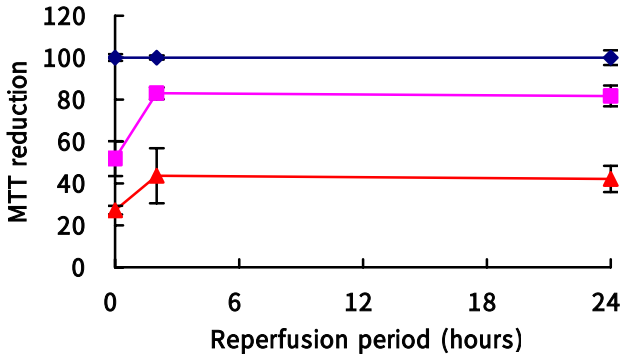

그림 3. OGD에 뒤따른 재관류가 뇌혈관 내피세포 사망에 미치는 영향. ◆는 OGD 처리 없이 $BSS_{5.5}$로 배지를 교체하여 시간 별로 MTT assay를 한 것이다. ■와 ▲는 각각 OGD 8 시간, 12시간 처리 후, 재관류하며 시간 별 MTT assay를 한 것이다.

4. OGD에 의한 NF-κB 활성화

OGD 처리 시 NF-κB의 활성을 알아보기 위해 젤 지연분석을 수행한 결과 NF-κB의 활성은 OGD 기간에 따라 증가하였다 (그림 4A). Competition assay를 실시한 결과 동위원소 표지 되지 않은 wild type NF-κB consensus oligonucleotide를 표지 소식자보다 100배 이상으로 넣으면, 그 밴드가 사라지고, mutant나 다른 종류의 oligonucleotide를 넣으면 밴드가 사라지지 않는 것으로 보아 NF-κB 특이 밴드임을 확인하였고, supershift assay에서 윗 밴드는 anti-p65 항체, anti-p50 항체에 의해 그 진하기가 감소하였고, 아래 밴드는 anti-p50 항체에 의해서만 그 진하기가 감소하였으므로 두 밴드 구성은 p65/p50 heterodimer와 p50/p50 homodimer이며, 이 세포주의 NF-κB는 주로 p65/50 heterodimer임을 알 수 있었다 (그림 4B, 4C).

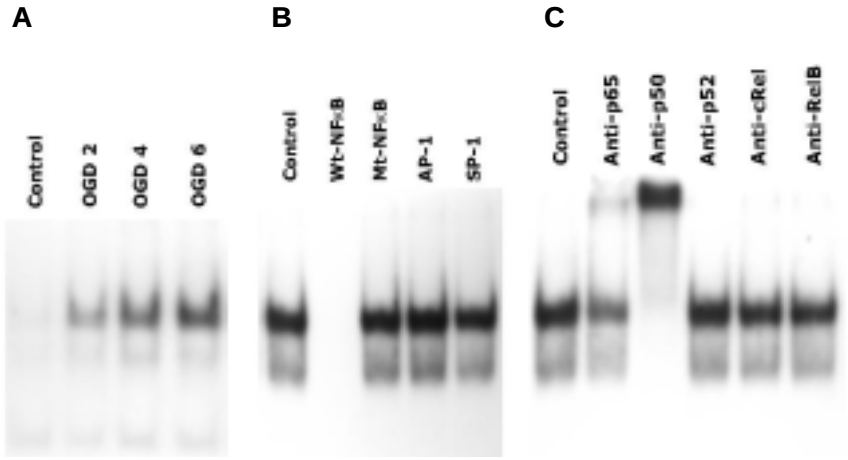

그림 4. OGD에 의한 NF-κB의 활성화. A. 100 mm dish의 bEnd.3 세포에 OGD 처리를 하여 젤 지연분석을 실시한 것이다. B. Competition assay. 동위원소로 표지하지 않은 wild type과 mutant NF-κB consensus oligonucleotide, AP-1, SP-1 consensus oligonucleotide를 이용하였다. C. Supershift assay. NF-κB의 5 가지 구성 성분에 대한 항체를 핵 단백과 반응시킨 후 probe를 넣어 젤 지연분석을 실시한 것이다.

5. OGD에 의한 NF-κB 활성화 기전

NF-κB 활성화 기전으로서 가장 잘 밝혀진 것이 TNFα 에 의한 NF-κB 활성화인데, 이 경우, TNFα 는 IκB kinase (IKK)를 활성화시키고, 활성화된 IKK 는 IκBα 를 인산화시켜, polyubiquitination이 가능하게 하며, 그 결과 IκBα 가 proteasome에 의해 파괴되어 세포질에 있던 NF-κB가 핵 안으로 이동하게 되어 NF-κB가 활성화된다. OGD에 의한 NF-κB 활성화의 경우도 TNFα 의 경우와 유사한지를 보기 위하여 IκBα 와 32Ser-phosphorylated IκBα 의 양 변화를 Western blot으로 확인하였다. TNFα 를 처리하면, 처리 후 15분에 IκBα 가 인산화되어 파괴되었다가 시간이 지나면서 다시 생성되는 반면, OGD 처리에 의한 NF-κB가 활성화되는 경우, IκBα 의 양이 변하지 않았으며, 32Ser의 인산화도 나타나지 않았다 (그림 5A, 5B, 5C). 하지만 NF-κB의 구성 요소인 p65의 핵 안으로의 이동은 Western blot 및 세포면역염색법으로 확인되어, 이 세포주의 OGD에 의한 NF-κB 활성화는 TNFα 에 의한 NF-κB 활성화와는 다른 기전이 관여하는 것으로 생각된다 (그림 6A, 6B). 허혈/재관류에 의해 TNFα 에 의한 NF-κB 활성화와는 다른 기전, 즉 IκBα 의 파괴없이 나타나는 NF-κB 활성화로 알려진 것이 42Tyr 인산화에 의한 NF-κB 활성화이다.[20,21] IκBα 42Tyr이 인산화되면 IκBα 의 파괴없이 IκBα 와 NF-κB가 분리되어 NF-κB가 활성화된다는 것이다. 이를 확인하기 위해 anti-IκBα 항체로 면역침전한 후, anti-IκBα 항체와 anti-phosphotyrosine 항체로 Western blot하였다. Tyrosine phosphatase 억제제인 pervanadate 처리에 의해 IκBα 의 크기가 증가하였으며, anti-phosphotyrosine 항체가 결합하므로 이는 IκBα 의 tyrosine 인산화 때문인 것이다. 하지만, OGD에 의해서는 그런 현상이 나타나지 않았으므로 본 실험 조건에서 OGD에 의한 NF-κB 활성화의 경우, 42Tyr 인산화에 의한 NF-κB 활성화는 없다 (그림 7).

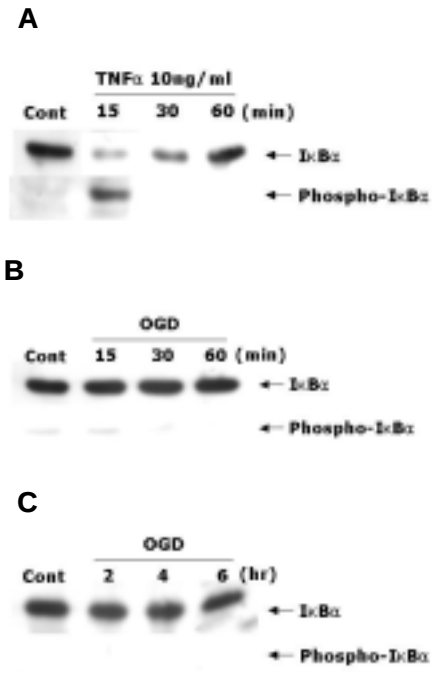

그림 5. OGD에 의한 IκBα 32Ser의 인산화 여부. IkBa A. B. C. TNFα 처리 후 15, 30, 60 분, OGD 처리 후, 15, 30, 60 분, 2, 4, 6시간의 IκBα 와 32Ser이 인산화 된 IκBα 의 양변화를 Western blot으로 측정한 것이다.

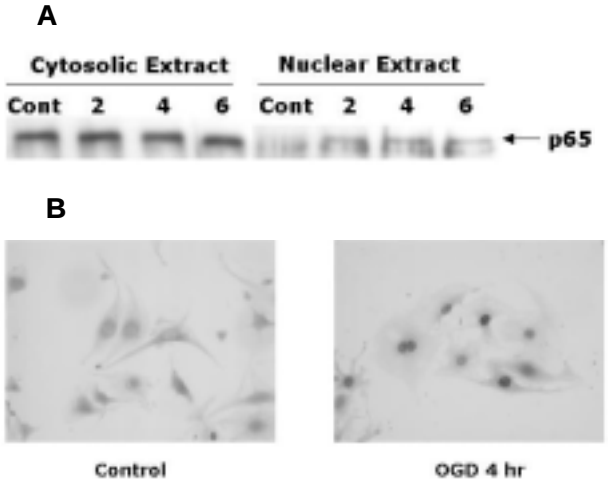

그림 6. OGD에 의한 p65의 핵내 이동. A. OGD에 의해 NF-κB가 활성화 될 때, 세포질 단백과 핵 단백을 분리하여 각각 p65의 양 변화를 Western blot으로 측정한 것이다. B. $BSS_{5.5,}$ OGD 4 시간 처리 후, p65 항체를 이용한 세포면역염색을 실시하였다

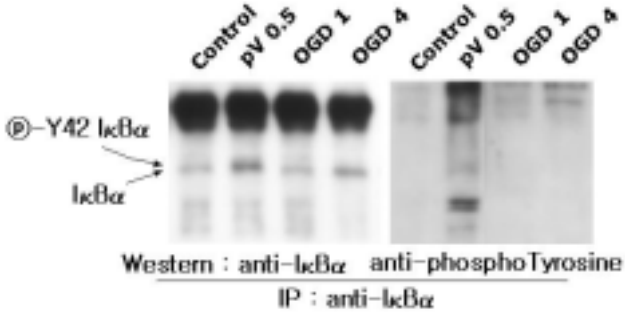

그림 7. OGD에 의한 IκBα 의 42Tyr의 인산화 여부. Pervanadate(pV) 30분, OGD 1시간, 4시간 처리한 세포질 단백을 항-IκBα 항체로 면역침전한 후, 항-IκBα 항체, 항-phosphotyrosine 항체로 Western blot하였다.

6. PDTC+ $ZnSO_4$가 OGD에 의한 뇌혈관 내피세포 사망과 NF-κB 활성화에 미치는 영향

NF-κB는 세포 생존에 필요한 단백이라는 증거가 여러 가지 세포 사멸 모델에서 제시되고 있는 바, OGD에 의한 뇌혈관 내피세포의 사멸 시에 NF-κB의 역할을 알아보고자 OGD 처리 전 2시간과 OGD 기간 동안 NF-κB 억제제를 처리하여 NF-κB를 억제할 경우, 그 세포 사멸이 어떻게 되는 지를 알아보았다. NF-κB의 억제제로 널리 알려진 PDTC가 NF-κB를 억제하는 데에 혈청, 그 중에서도 아연 이온이 필요하다는 사실을 보고한바 있어,[22,23] PDTC 50 μM과 $ZnSO_4$ 0.5 μM, 1 μM, 2 μM을 처리하여 NF-κB를 억제하였다. PDTC, $ZnSO_4$를 배지에 넣고 OGD 처리한 후 젤 지연분석을 실시한 결과, OGD 4 시간에 의한 NF-κB 활성화가 완전하게 억제되었으며, 이 때 아연 이온의 농도에 비례하게 세포 사멸이 증가하였다 (그림 8A, 8B).

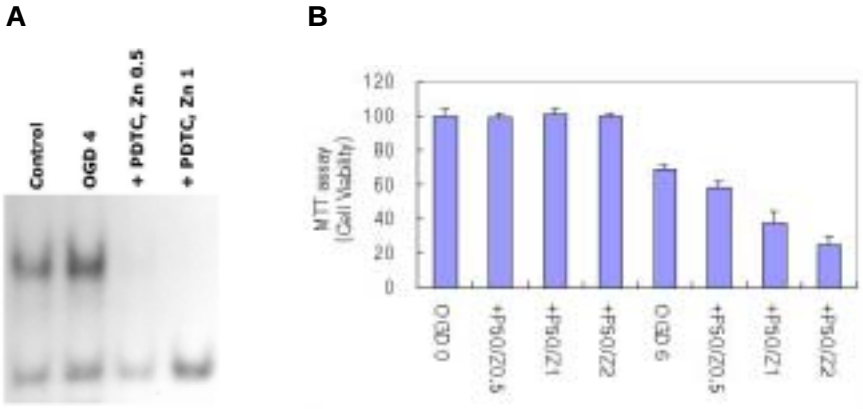

그림 8. PDTC+ $ZnSO_4$가 OGD에 의한 NF-κB 활성화와 세포 사멸에 미치는 영향. OGD 처리 시 PDTC 50 μM과 $ZnSO_4$ 0.5 μM, 1 μM, 2 μM를 포함한 BSS_0를 만들어, OGD 처리 하였다. OGD 처리 후 젤 지연분석(A)과 MTT 측정법(B)을 실시하여 NF-κB의 활성과 세포 생존을 측정하였다.

7. Sodium salicylate가 OGD에 의한 뇌혈관 내피세포 사망과 NF-κB 활성화에 미치는 영향

Salicylate계 약물은 항염증, 진통, 해열, 항혈전 등의 약리작용을 지닌 유서 깊은 약물로서, cyclooxygenase 억제 효과가 그 약리 작용을 나타낼 것으로 생각하였으나, 최근 NF-κB를 억제한다는 사실이 밝혀져 그 약리 작용을 한층 더 이해하게 되었다.[24] 또한, salicylate가 뇌졸중 시 신경 세포의 사멸을 억제한다는 보고가 있어, 그 기전으로 NF-κB 억제 작용을 지목하고 있다.[25] 본 연구진은 또 다른 NF-κB 억제제로서 salicylate를 사용하여 OGD에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸에 미치는 영향을 알아보았다. Sodium salicylate 10 mM 이상에서 NF-κB 활성화가 억제 효과가 나타나며, 세포 사멸은 증가하였다 (그림 9A, 9B).

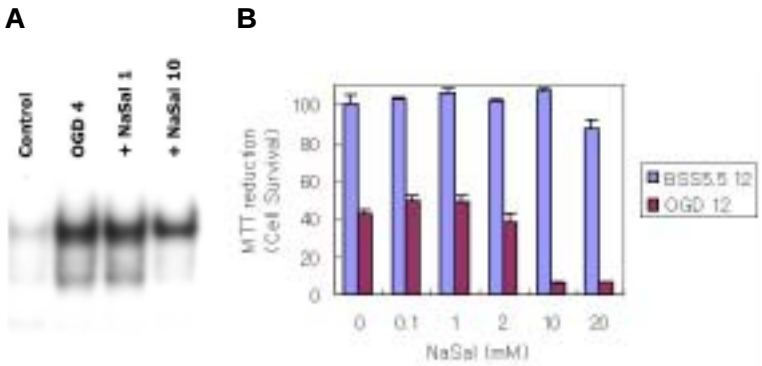

그림 9. Sodium salicylate가 OGD에 의한 NF-κB 활성화와 세포 사멸에 미치는 영향. OGD 처리 시 Na Salicylate 5 mM, 10 mM를 처리하였다. OGD 처리 후 젤 지연분석(A)과 MTT assay(B)를 실시하여 NF-κB의 활성과 세포 생존을 측정하였다.

8. CAPE가 OGD에 의한 뇌혈관 내피세포 사망과 NF-κB 활성화에 미치는 영향

CAPE는 꿀벌의 벌집 성분인 프로폴리스의 주요 활성 물질로서, 항염증 효과와 강력한 항산화 효과를 가진 물질로 알려져 있으며,[26-28] 이는 NF-κB 억제제로서의 CAPE는 NF-κB가 핵 안으로 들어가는 것을 막는 것 때문인 것으로 알려져 있다.[29] CAPE를 NF-κB 억제제로 사용하여 전술한 바 있는 OGD에 의한 NF-κB 활성화와 세포 사멸에 대한 효과를 알아보았다. CAPE를 0.2 μM, 2 μM 처리 시 OGD에 의한 NF-κB 활성화가 억제되고, 20 μM 처리 시에는 OGD에 의한 세포 사멸이 20%에서 90%로 증가하였다 (그림 10A, 10B).

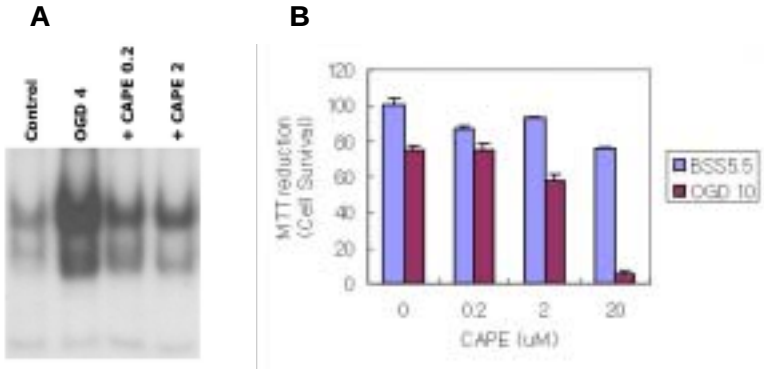

그림 10. CAPE가 OGD에 의한 NF-κB 활성화와 세포 사멸에 미치는 영향. OGD 처리 시 CAPE 0.2 μM, 2 μM를 포함한 BSS_0를 만들어, OGD 처리 하였다. OGD 처리 후 젤 지연분석(A)과 MTT 측정법(B)를 실시하여 NF-κB의 활성과 세포 생존을 측정하였다.

9. OGD 및 NF-κB 억제제가 세포 생존/사멸 관련 단백에 미치는 영향

NF-κB 억제제가 OGD에 의한 세포 사멸을 증가시키므로, 그 기전을 알아보기 위해 NF-κB와 관련성이 많다고 알려진 p53, bax, bcl-2 등의 세포 생존/사멸 관련 단백의 양적 변화를 Western blot으로 알아보았다. OGD 10 시간에 의해, 그리고 sodium salicylate를 함께 처리한 군에서도 이들 단백의 양적인 변화는 나타나지 않았다. 따라서, NF-κB 억제제가 OGD에 의한 bEnd.3 세포의 사멸을 증가시키는 데에 적어도 p53, bax, bcl-2는 관여하지 않는 것으로 생각된다 (그림 11).

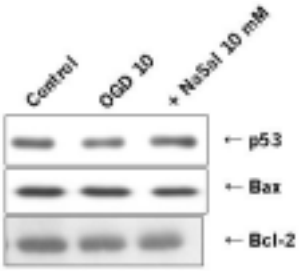

그림 11. OGD 및 sodium salicylate가 p53, bax, bcl-2의 단백 양에 미치는 영향. $BSS_{5.5}$, OGD, sodium salicylate 10 mM+ OGD의 세 그룹을 10 시간 처리 후, 세포질 단백을 추출하여 Western blot을 실시하였다.

Ⅳ. 고 찰

최근 뇌졸중의 병태 생리에서 뇌혈관 내피세포가 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 특히, NF-κB가 다양한 허혈 자극에 의해 활성화 되고, 허혈 시의 조직 염증에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 하지만 NF-κB는 면역반응 뿐 아니라 세포의 생존, 사멸에 중요한 역할을 담당하므로, 뇌허혈 상황에서 뇌혈관 내피세포의 NF-κB 활성이 뇌혈관 내피세포의 사멸에 미치는 영향을 밝히고자 하였다.

먼저, OGD에 의한 뇌혈관 내피세포주인 bEnd.3의 세포 사멸 양상을 보았다. OGD 8 시간까지는 매우 적은 세포 사멸을 보이다가, 10 시간이면 30-40% 정도의 세포 사멸이 나타났다. 이는 소의 뇌혈관 내피세포 (bovine cerebral endothelial cell, BCEC)를 이용한 허혈성 세포 사멸 실험에서의 세포 사멸정도와 흡사하나, 세포가 수축하고, 얇아지면서 사멸하는 BCEC의 경우와는 그 형태학적 소견이 다르다.[30,31]

이 때, NF-κB가 활성화 되는 데, TNFα 에 의한 NF-κB 활성화의 경우와는 달리, IκBα 32Ser의 인산화가 나타나지 않았으며, IκBα 의 양도 변하지 않았다. 이는 이 세포주의 OGD에 의한 NF-κB 활성화 기전이 TNFα 에 의한 NF-κB 활성화의 경우와는 다름을 암시한다.[32] 이는 허혈/재관류에 의해 NF-κB가 활성화되는 경우, IκBα 32Ser의 인산화가 나타나지 않고, 42Tyr의 인산화가 중요한 역할을 하며, IκBα 파괴 과정이 불필요하다는 보고와 일치한다.[20,21] 따라서, 이를 확인하기 위하여 IκBα 42Tyr의 인산화를 anti-phosphotyrosine 항체를 이용한 방법으로 확인하여 보았으나, 이 세포주의 OGD에 의한 NF-κB 활성화의 경우에는 42Tyr의 인산화가 나타나지 않았다. 최근 장기간의 NF-κB의 활성화에 IκBβ C-terminal PEST domain의 인산화가 관여한다는 보고가 있으므로 IκBβ 의 인산화가 OGD에 의한 NF-κB 활성화를 매개할 가능성이 남아있다.[33]

본 연구에서 세포사멸 측정을 위해 MTT 측정법을 사용하였다. 많은 경우

세포사멸 측정 시 lactate dehydrogenase (LDH) 측정법을 사용하는 데, LDH 측정법은 세포가 사멸하면 세포 안에 있는 LDH가 배지로 유출되는 성질을 이용한 것으로서, 배지로 유출된 LDH의 효소 활성이 안정적으로 유지되어야 하는 기본 전제조건을 가지고 있다.[34] 본 연구의 세포 사멸의 경우, 배지로 유출된 LDH의 효소 활성이 시간에 따라 급격히 감소하여 12 시간이 경과하면 그 효소 활성을 거의 잃게 되므로, 세포 사멸 정도를 LDH 측정법으로 측정하지 못하였다 (자료 생략). 차선책으로 MTT 측정법을 사용하였는데, 이는 살아있는 세포의 MTT 환원 능력을 측정하는 것이므로, 세포 사멸 정도를 측정하려면 세포가 증식하는 효과는 없어야 한다는 것과, 세포의 MTT 환원 능력이 살아있는 세포의 양에 의해서만 변하고 다른 자극에 의해서는 변하지 않아야 한다는 것이 전제 조건이다. 본 연구에서 사용한 세포주는 혈청이 없으면 분열하지 않고 (자료 생략), OGD/재관류 과정은 혈청이 없이 진행되므로 전자의 조건은 문제가 되지 않았다. 하지만, 후자의 조건이 문제가 되었는데, OGD 2 시간에 의해 세포 사멸은 전혀 없는 데도 불구하고, MTT 환원 능력이 감소하게 되었다. 이는 영양분을 보충하여 주면 2 시간 이내에 회복되므로 MTT 측정법 시행 전에 영양분을 2 시간 씩 보충하는 방법을 사용하게 되었다. 결과적으로 현미경 상에서 trypan blue 염색법으로 세포 사멸정도를 측정한 것과 일치하는 세포 사멸 측정법으로서 MTT 측정법을 사용하였다.

허혈 그 자체에 의한 세포 사멸 뿐 아니라, 뒤따라오는 재관류 또한 심각한 손상을 야기하는 것으로 알려져 있는데, 이는 허혈 기간 동안 활성 산소류 (reactive oxygen species)를 억제하는 시스템이 하향 조정되어 있다가, 재관류 시 많은 양의 산소를 감당하지 못하여 그 독성이 나타나는 것으로 알려져 있다.[35-38] 뇌혈관 내피세포의 재관류 손상은 뇌졸중 치료, 특히 혈관조형술 (angioplasty)을 이용한 재관류 시에 중요한 면을 가지고 있으므로 그에 대한 연구를 수행하였다. OGD 처리 후, 재관류 하여 그 시간에 따른 세포 생존을 측정한 결과 재관류 기간의 시간에 따른 세포 생존 감소율은 OGD를 수행하지 않은 대조군과 다르지 않았다. 이는 재관류가 특별한 손상을 일으키지 않

았음을 의미하며, 뇌혈관 내피세포는 재관류 손상에 저항성을 가진 것으로 생각된다. 돼지의 뇌혈관 내피세포를 이용한 실험에서 재관류 손상이 있다는 보고가 있으나,[39] 이 경우 세포 사멸을 LDH 측정법으로 측정하여 그에 의한 오류가 생길 가능성을 배제할 수 없다. 즉, 세포가 사멸하고 난 다음 LDH가 유출되는 데 시간이 필요한 바, 재관류에 의해서 세포가 더욱 사멸했다기 보다는 LDH가 배지로 유출되는 데 시간이 걸리기 때문인 것으로 생각된다.

여러 가지 세포 사멸의 경우에서 NF-κB의 활성이 증가되면 세포 사멸을 억제하는 효과가 있다.[14,40] 허혈 자극 시 NF-κB가 활성화 되는 바, 이 NF-κB의 활성화가 OGD에 의한 bEnd.3 세포 사멸에 대한 영향을 알아보고자 세 종류의 NF-κB 억제제를 사용하였다. PDTC는 NF-κB 억제제로 잘 알려진 약물인 데,[41-43] 그 작용 기전이 zinc ionophore라는 것을 밝힌바 있어,[22,23] PDTC + $ZnSO_4$를 NF-κB 억제제로서 처리하였다. PDTC 50 μM, Zinc 0.5 μM 처리에 OGD에 의한 NF-κB가 완전하게 억제되었으며, 이 때 OGD에 의한 세포 사멸은 한층 증가되었다. 이는 OGD 자극에 의한 NF-κB 활성화가 세포의 사멸을 억제하는 인자였으며, 그 활성화를 억제하였기 때문에 세포 사멸이 증가한 것으로 생각할 수 있다. 이는 TNFα 처리 자체만으로는 세포 사멸이 나타나지 않지만, 이 때 NF-κB의 작용을 억제하면 세포 사멸이 나타나는 경우와 마찬가지로,[44] 한 가지 자극이 세포 사멸 신호와 세포 생존 신호를 동시에 활성화 시키기 때문에, 세포 생존 신호를 억제하면 세포 사멸이 한층 가중되는 경우로 생각된다.

Salicylate계 약물들은 항염, 진통, 해열, 혈액응고억제 등의 효과를 가진 약물로서 cyclooxygenase의 억제가 주된 작용 기전일 것으로 생각되어 왔으나,[45] NF-κB를 억제하는 작용이 중요한 역할을 한다는 것과 뇌졸중의 예방 및 뇌졸중 시 신경 세포 사멸을 억제한다는 사실이 최근에 알려졌다.[24,25,45-47] 본 연구에서 sodium salicylate를 NF-κB 억제제로 사용하였는데, 이 경우 역시 OGD에 의한 세포 사멸이 증폭되었다. 이는 PDTC + $ZnSO_4$의 경우와 마찬가지로, NF-κB 활성화를 억제하는 효과 때문인 것으로 생각되며, 따라서 OGD

에 의한 NF-κB 활성화는 세포 생존 인자라는 가설을 지지한다.

꿀벌 벌집 성분인 프로폴리스의 활성 물질로 알려진 CAPE는 항염증, 항암 효과 등을 가진 강력한 항산화제로 소개되었다.[26-28] 뿐만 아니라 CAPE 자체가 inducible nitric oxide synthase 억제 작용을 가지고 있다는 보고도 있다.[48] 최근 이 약물이 허혈/재관류 손상에 의한 산화 스트레스를 감소시킨다는 보고가 있어 뇌졸중 때의 보호적 효과가 있음을 암시하였다.[49] 본 연구에서는 CAPE를 NF-κB 억제제로 사용하였는데,[27] 이 경우도 마찬가지로 OGD에 의한 세포 사멸을 증가시키는 것으로 나타났다. 이는 CAPE의 NF-κB 억제 효과 때문으로 생각된다.

본 연구에서 세 가지의 NF-κB 억제제는 OGD에 의한 NF-κB 활성화를 억제하였고, OGD에 의한 bEnd.3 세포의 사멸을 증가시켰으므로, OGD에 의한 NF-κB 활성화는 세포 생존 인자로 생각된다.

한편, OGD에 의한 세포 사멸 시 그 사멸기전을 알아보기 위해, NF-κB와 연관성이 큰 세포 생존/사멸 단백인 p53, bax, bcl-2 단백의 양적 변화를 측정하여 보았으나, 이들 세 단백은 세포 사멸 시 변화하지 않는 것으로 나타났다. 사람 제대정맥 내피세포 (human umbilical vein endothelial cell)을 이용한 연구에서 OGD에 의해 세포가 사멸할 때, NF-κB는 아무 역할도 하지 않고, p53에 의해 세포 사멸이 나타난다는 보고도 있으나,[50] 이는 뇌혈관 내피세포가 지니는 다른 조직의 혈관 내피세포와는 다른 특이성에 기인한다고 생각된다. Bcl-2는 허혈에 의해 NF-κB 활성화에 의해 감소되므로, NF-κB를 억제하면, bcl-2 감소를 억제하여 세포 사멸을 억제한다는 보고가 있고,[51] 역으로 NF-κB 활성화에 의해 bcl-2가 증가되므로, NF-κB를 억제하면 세포 사멸이 증가된다는 보고도 있다.[52] 이런 다양한 현상은 각각의 허혈 모델의 특이성으로 생각되며, 보다 특이적으로 NF-κB을 변화시킬 수 있는 방법이 필요할 것으로 생각된다.

뇌졸중의 병태 생리에서 NF-κB의 세포 사멸에 대한 역할은 신경 세포에서 주로 연구되는 바, 허혈 후 재관류 시에 24 시간 이상 계속되는 지속적인

NF-κB 활성화가 신경 세포의 사멸을 유도한다고 알려져 있다.[53] 이렇게 NF-κB 활성화가 세포 사멸 인자로 작용하는 경우는 신경 세포에서 주로 이야기되어지며, 대부분의 다른 세포의 사멸에서 NF-κB는 세포 생존 인자로 이야기된다. 본 연구에서는 뇌졸중 발생 시 뇌혈관 내피세포의 NF-κB 활성화는 세포 생존인자라는 것을 보였다. 뇌 허혈 손상에 중요한 신경 세포와 혈관 내피세포에서 NF-κB의 역할이 반대라면 NF-κB의 활성 조절은 좀 더 신중히 해야 할 것이다. 특히 아스피린의 사용은 혈전 형성을 예방하고, 신경 세포의 사멸을 억제하는 효과는 있지만, 혈관 내피세포의 손상을 증가시킬 수 있으므로, 아스피린의 예방적 투여가 조직 손상을 가중시킬 수 있다. 적어도 허혈 기간 내의 NF-κB 활성화는 혈관 내피 세포 생존에 도움이 되므로 억제하지 말고, 허혈 후 재관류 시의 지속적 NF-κB 활성화는 억제한다면 이런 상충된 부분을 해소할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 허혈 손상 시 뇌혈관 내피세포의 NF-κB 활성 변화 및 이에 의한 뇌혈관 내피세포의 손상에 대한 영향을 알아보고자 하였다.

실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 실험적 허혈인 OGD에 의해 뇌혈관 내피세포는 사멸하였으며, 이 때 재관류에 의한 손상은 나타나지 않았다.

2. OGD에 의해 뇌혈관 내피세포의 NF-κB는 활성화되었다.

3. 이 경우 IκBα 의 32Ser 인산화, IκBα 42Tyr 인산화는 나타나지 않았다.

4. 세 가지 NF-κB 억제제인 PDTC, sodium salicylate, CAPE는 OGD에 의한 NF-κB 활성화를 억제하였고, OGD에 의한 뇌혈관 내피세포의 사멸을 증가시켰다.

5. 이 때 bcl-2, bax, p53 등의 세포 생존/사멸 관련 단백의 양은 변화하지 않았다.

이 모든 시험 결과에 근거했을 때, 허혈 손상 시 뇌혈관 내피세포의 NF-κB 활성화는 세포 생존 인자로 판단된다.

참고문헌

1. Rowland LP. Merritt' s Neurology. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2000. p.217-39.
2. Lee J, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. J Clin Invest 2000;106:723-31.
3. Excitotoxic cell death. Choi DW Biology of disease: free radicals and tissue injury. J Neurobiol 1992;23:1261-76
4. Freeman BA, Crapo JD. Lab Invest 1982;47:412-26
5. Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. Neurosurgery 1990;27:1-11
6. Del Zoppo GJ, Hallenbeck JM. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. Thromb Res 2000;98: V73-81.
7. Risau W, Wolburg H Development of the blood-brain barrier. Trends Neurosci 1990;13:174-8
8. Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. J Cereb Blood Flow Metab 1999;19:819-34.
9. De Vries HE, Kuiper J, de Boer AG, Van Berkel TJ, Breimer DD. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. Pharmacol Rev 1997;9:143-55.
10. Okada Y, Tamaguchi T, Minematsu K, Miyashita T, Sawada T, Sadishima S, et al. Hemorrhagic transformation in cerebral embolism. Stroke 1989;20:598-603.
11. Hornig CR, Dorndorf W, Agnoli AL. Hemorrhagic cerebral infarction: a prospective study. Stroke 1986;17:179-85.
12. Del Zoppo GJ, von Kummer R, Hamann GF. Ischaemic damage of brain

microvessels: inherent risks for thrombolytic treatment in stroke. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1998;65:1-9.

13. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 1986;46:705-16.
14. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-κB: Ten Years After. Cell 1996;87:13-20.
15. Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. Gut 1998;43:856-60
16. Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. J Neurochem 2000;74:443-56
17. Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung M-M, Thomas WS, del Zoppo GJ. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal ischemia and reperfusion. Stroke 1994;25:202-11.
18. Haring HP, Berg EL, Tsurushita N, Tagaya M, del Zoppo GJ. E-selectin appears in non-ischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. Stroke 1996;27:1386-92.
19. Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarc (Wistar rat). Am J Pathol 1994;144:188-99.
20. Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenckner EB, Mueller-Dieckmann C, et al. Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. Cell 1996;86:787-98.
21. Koong AC, Chen EY, Mivechi NF, Denko NC, Stambrook P, Giaccia AJ. Hypoxic activation of nuclear factor-kappa B is mediated by a Ras and Raf signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or

ERK2). Cancer Res 1994;54:5273-9.
22. Kim CH, Kim JH, Hsu CY, Ahn YS. Zinc is required in pyrrolidine dithiocarbamate inhibition of NF-κB. FEBS Lett 1999;449:28-32.
23. Kim CH, Kim JH, Moon SJ, Chung KC, Hsu CY, Seo JT, Ahn YS. Pyrithione, a zinc ionophore, inhibits NF-κB activation. Biochem Biophys Res Commun 1999;259:505-9.
24. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-κB by sodium salicylate and aspirin. Science 1994;265:956-9.
25. Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano F. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-κB activation. Science 1996;274:1383-5.
26. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. Experientia 1988;44:230-2.
27. Su ZZ, Lin J, Grunberger D, Fisher PB. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. Cancer Res 1994;54:1865-70.
28. Guarini L, Su ZZ, Zucker S, Lin J, Grunberger D, Fisher PB. Growth inhibition and modulation of antigenic phenotype in human melanoma and glioblastoma multiforme cells by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) Cell Mol Biol 1992;38:513-27.
29. Natarajan K, Singh S, Burke TR Jr, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93;9090-5.
30. Zhang J, Tan Z, Tran ND. Chemical hypoxia-ischemia induces

apoptosis in cerebromicrovascular endothelial cells. Brain Res 2000;877:134-40.

31. Xu J, He L, Ahmed SH, Chen SW, Goldberg MP, Beckman JS, Hsu CY. Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells. Stroke 2000;31:1744-51.
32. Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serine 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in reponse to diverse stimuli. EMBO J 1995;14:2876-83.
33. Pando MP, Verma IM. Signal-dependent and -independent degradation of free and NF-kappa B-bound IkappaBalpha. J Biol Chem 2000;275:21278-86.
34. Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J Neurosci Methods 1987;20:83-90.
35. Hallenbeck JM, Dutka AJ. Background review and current concepts of reperfusion injury. Arch Neuro 1990;47:1245-54.
36. Kontos HA. Oxygen radicals in CNS damage., Chem Biol Interact 1989;72:229-55.
37. Phillis JW. A ‘ radical’ view of cerebral ischemic injury. Prog Neurobiol 1994;42:441-8.
38. Traytsman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. J Appl Physiol 1991;71:1185-95.
39. Beetsch JW, Park TS, Dugan LL, Shah AR, Gidday JM. Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic

cerebral endothelial cells. Brain Res 1989;786:89-95.

40. Wang CY, Mayo MW, Baldwin Jr AS. TNF-α and cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF-κB. Science 1996;274:784-7.

41. Ferran C, Millan MT, Csizmadia V, Copper JT, Brosrjam C, Bach FH, et al. Inhibition of NF-kappa B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. Biochem Biophys Res Commun 1995;214:212-223.

42. Schreck R, Meier B, Männel DN, Dröge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κB activation in intact cells. J Exp Med 1992;175:1181-94.

43. Bessho R, Masubara K, Lubota M, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono T, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor kappa B activiation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes. Biochem Pharmacol 1994;48:1883-9.

44. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-α -induced apoptosis by NF-κB. Science 1996;274:787-89.

45. Carolei A, Prencipe M, Fiorelli M, Fieschi C. Severity of stroke and aspirin. Neurology 1986;36:1010-1.

46. Grotta JC, Lemak NA, Gary H, Fields WS, Vital D. Dose platelet antiaggregant therapy lessen the severity of stroke? Neurology 1985;35:632-6.

47. Joseph R, Han F, Tsering C, Grunfeld S, Welch KM. Platelet activity and stroke severity. J Neurol Sci 1992;108:1-6.

48. Song YS, Park EH, Hur GM, Ryu YS, Lee YS, Lee JY, et al. Caffeic acid

phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. Cancer Lett 2002;175:53-61.

49. Ozyurt H, Irmak MK, Akyol O, Sogut S. Caffeic acid phenethyl ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischaemia-reperfusion injury. Cell Biochem Funct 2001;19:259-63.

50. Stempien-Otero A, Karsan A, Cornejo CJ, Xiang H, Eunson T, Morrison RS, et al. Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis. J Biol Chem 1999;274:8039-45.

51. Matsushita H, Morishita R, Nata T, Aoki M, Nakagami H, Taniyama Y, et al. Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated bcl-2 suppression: in vivo evidence of the importance of NF-kappaB in endothelial cell regulation. Circ Res 2000;86:974-81.

52. Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek MP, et al. Pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor-κB and Bcl-2. J Neurochem 2000;75:683-93.

53. Clemens JA. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants. Free Radic Biol Med 2000;28;1526-31.

Abstract

Role of nuclear factor kappa B activation in ischemic injury of cerebral endothelial cells

Kyu Dae SHIM

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

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

Stroke is a leading cause of sudden death. The major pathophysiology of stroke is cerebral ischemia causing neuronal death. There is increasing evidence that ischemia-induced vascular damage is an integral step in the cascade of the cellular and molecular events initiated by cerebral ischemia. In the present study, the role of nuclear factor kappa B (NF-κB) activation during ischemic injury was investigated in cerebral endothelial cells. A mouse brain endothelioma-derived cell line, bEnd.3 was used and oxygen-glucose deprivation (OGD) was applied for *in vitro* stroke model. OGD activated NF-κB through a quite different mechanism from that of TNFα -induced NF-κB activation; no phosphorylation of IκBα 32Ser, no degradation of IκBα , and no phosphorylation of IκBα 42Tyr. OGD induced bEnd.3 cell death in a time-dependent manner. The extent of cell death was 40%, 60% and 90% after 10, 12 and 14 hours of OGD respectively. Reperfusion following OGD did not cause additional cell death, which means there is no reperfusion injury in case of cerebral endothelial cells. Three chemicals, sodium salicylate, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) known as NF-κB inhibitors,

inhibited OGD-induced NF-κB activation and increased OGD-induced bEnd.3 cell death in a dose dependent manner. There was no changes in the protein levels of p53, bax and bcl-2 which can be modulated by NF-κB activity. These results suggest that NF-κB activation would be a protective mechanism for OGD-induced cell death in bEnd.3.

Key Words : cerebral endothelial cells, cell death, NF-κB