

허혈성 신경세포손상이 아밀로이드 전구단백질의 대사에 미치는 영향

아주대학교 의과대학 신경과학교실, 서울대학교 의과대학 생화학교실*, 연세대학교 의과대학 신경과학교실[†]

이필휴 황은미* 목인희* 허 균 최일생[†]

Effect of Ischemic Neuronal Insults on Amyloid Precursor Protein Processing

Phil Hyu Lee, M.D., Eun Mi Hwang, Ph.D.*, Inhee Mook-Jung, Ph.D.*, Kyoong Huh, M.D., Il Saing Choi, M.D.[†]

Department of Neurology, Ajou University School of Medicine, Suwon;

Department of Biochemistry, Seoul National University School of Medicine, Seoul,*

Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine[†], Seoul, Korea

Background: In spite of the different pathogenesis and exclusive respect in the diagnosis of Alzheimer's disease (AD) and vascular dementia (VaD), recent epidemiological and pathological studies indicates that ischemic stroke have an important role in the pathogenesis of both VaD and AD. However, the association of ischemic stroke and AD on the cellular and molecular level is still unknown. We evaluated the effect of ischemic neuronal insult on the regulation of amyloid precursor protein (APP) processing.

Methods: We used an in vitro model of cerebral ischemia (oxygen-glucose deprivation, OGD) to evaluate the effect of ischemic insult on the amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways using human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y, and primary cultured cells of Tg2576 APP transgenic mouse.

Results: Ischemic insult significantly increased the beta amyloid (A β) production in the primary cultured cells of Tg2576 APP transgenic mice ($p < 0.001$). A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM 10), a candidate of α secretase, was markedly increased in the early stage of ischemic insult (up to 2 hours of OGD, $p < 0.001$; 4 hours of OGD, $p < 0.05$), which was followed by the decreased level of ADAM 10 expression in a later stage ($p < 0.001$). However, the protein and mRNA expression of β site cleavage enzyme (BACE) and BACE activity were not significantly different between the group of ischemic insult and control. By contrast, the activity of γ secretase was significantly increased after 4 hours of ischemic insult, as compared to controls.

Conclusions: This study demonstrates that the ischemic neuronal insults increase the production of A β via activation of the amyloidogenic pathway, which may link the role of ischemic insults to the pathogenesis of AD.

J Korean Neurol Assoc 23(2):241-248, 2005

Key Words: Ischemic neuronal insult, Amyloid precursor protein, Beta-amyloid, α , β , γ secretase

서 론

임상적으로 치매는 크게 알츠하이머병, 혈관성 치매 및 혼합성으로 분류하는데, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, Fourth Edition¹의 진단 기준에 의하면 대뇌 내 뇌혈관 병변의 존재는 알츠하이머병 진단의 제외 기준이다. 따라서 알츠하이머 병과 혈관성 치매는 진단 과정에서 상호 배타적인 관계에 놓이게 되며, 이는 양자의 상호 연관성에 대한 연구에 제한점이다.² 최근 역학 연구에 의하면 고혈압, 당뇨, 고지혈

Received June 10, 2004 Accepted July 30, 2004

* Kyoong Huh, M.D.

Department of Neurology, Ajou University School of Medicine,

San 5 Woncheon-dong, Paldal-gu, Suwon, 442-749, Korea

Tel: +82-31-219-5175 Fax: +82-31-219-5178

E-mail: phisland@chol.net

증 및 심장질환 등의 뇌혈관 질환의 위험 인자들은 혈관성 치매 뿐만 아니라 알츠하이머병의 발생률을 증가시킨다고 한다.³⁻⁸

병리학적 소견상 알츠하이머병의 약 30~40%가 뇌경색을 동반하고, 혈관성 치매의 약 40%에서 알츠하이머병의 병리학적 소견인 neurofibrillary tangle과 노인반(senile plaque)이 관찰된다.⁹⁻¹¹ 이 역시 뇌혈관 병변과 알츠하이머병의 연관성을 뒷받침해 주는 소견으로서, 뇌경색에 의한 뇌혈관 병변은 알츠하이머병의 임상 발현에 대한 역치를 낮춰 초기 알츠하이머 병의 증상 발현에 중요한 역할을 할 것으로 추정하고 있다.^{12,13}

최근 들어 분자유전학과 분자신경생물학 분야의 발전으로 알츠하이머 병의 병인이 규명되고 있으며, 이 중 대표적인 것이 beta amyloid (A β) 학설이다. A β 는 α -, β -, γ -secretase로 불리는 단백질효소의 조합에 의하여 아밀로이드 전구단백질(amyloid precursor protein; APP)로부터 대사되는데, 이는 sAPP α 를 형성하여 세포성장 및 세포보호의 효과를 보이는 non-amyloidogenic pathway와 A β 를 형성하여 세포 손상을 초래하는 amyloidogenic pathway로 대별된다.¹⁴⁻¹⁷ 쥐를 이용한 만성 저관류(chronic hypoperfusion) 모델에서는 알츠하이머병의 특징적 병리 소견인 A β 가 발현되고, 이는 저관류 정도 및 시간에 비례하여 나타난다.^{18,19} 또한 acute ischemic model에서도 허혈성 뇌손상 자체가 APP processing에 영향을 주어 A β 의 생성을 증가시킨다.²⁰⁻²²

상술한 바와 같이 허혈성 뇌졸중과 알츠하이머병에 대한 의학 연구 및 병리 연구 결과와는 달리 분자생물학적 단계에서의 양자 간 상호 연관성은 아직도 규명 중에 있다. 본 연구는 허혈성 신경세포손상이 아밀로이드 전구단백의 대사와 연관된 신호전달체계 중 허혈성 신경세포손상이 작용하는 부위를 규명하고 이를 바탕으로 허혈성 신경세포손상이 알츠하이머병의 병인에 중요한 역할을 할 것이라는 점을 제시하고자 한다.

대상과 방법

1. oxygen-glucose deprivation

배양 배지는 glucose-free 용액(116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 1.8 mM CaCl₂, 10 mg/l phenol red)으로 대체 후, oxygen deprivation을 위해 95% N₂/5% CO₂로 약 1시간 정도 bubbling한다. 이후 oxygen-glucose deprivation media를 37°C로 가열하고 airtight anoxic chamber 안에서 1, 2, 4, 6, 8시간 노출시킨다. Oxygen-glucose deprivation condition의 제거는 세포를 anoxic chamber에서 제거 후 oxygenated

media로 교체해 주는 것으로 이루어진다. 24시간 경과 후 cell lysate와 media를 따로 분리한다.

2. 세포 배양

1) Transgenic mice 일차 배양 세포

Swedish APP 가족형 알츠하이머 돌연변이(familial AD mutant human APP)인 Tg 2576의 생후 1일 혹은 2일째 fetus brain을 적출하여 일차 배양세포를 얻는다. 과정을 요약하면 다음과 같다. 적출된 fetus brain을 phosphate buffered saline 이 들어있는 dish에서 해부현미경상에서 뇌막 및 혈관을 제거한 후 메스를 이용해서 잘게 자른 후 DNase (500 uL) 들어 있는 튜브로 옮기고 37°C에서 30분 동안 흔들여 준다. 이후 primary culture media (5% FBS, 5% HS, P/S, 1/1000 gentamycin, 1/1000 fungizone, DMEM)와 잘 섞은 후 코팅된 dish에 넣는다. 2일에 한번 배지를 갈아주고 약 7일간 배양한 후 실험에 들어간다.

2) SH-SY5Y 세포주 배양

본 연구에 사용된 세포는 인간 neuroblastoma 세포주인 SH-SY5Y였다. 10% fetal bovine serum 및 penicillin/streptomycin (Sigma, St. Louis, MO)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, GibcoBRL, Grand Island, NY) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세대 배양은 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 세포들을 washing한 다음 dish에 물리적인 충격을 가하여 세포들을 떨어뜨려 적당한 수의 세포들을 새로운 dish에 옮겨 배양하였다.

3. A β 측정

Transgenic mouse 일차 배양세포를 이용하여 허혈성 신경세포손상 후 A β 양의 변화를 측정하기 위하여 human A β sandwich ELISA kit (Biosource, Camarillo, CA)를 사용하였다. 인간 A β 의 N terminus에 특이한 monoclonal 항체가 도장된 96 well microliter strip에 동일량의 단백질을 추출하고 (100 ug)과 A β peptide standard를 첨가한 후 인간 A β 1-40에 특이한 rabbit antibody를 첨가한다. 부착된 rabbit antibody는 horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit antibody를 이용하여 검출할 수 있다. 이후 tetramethylbenzidine substrate를 첨가하고 30분간 incubation 후 stop solution을 첨가한 후 450 nm OD에서 그 값을 읽으며 그 값은 picogram/milliter로 나타낸다.

4. β -site cleavage enzyme (BACE) activity

배양된 세포를 PBS로 2회 세척한 후 lysis buffer (20 mM MES pH6.0, 0.15 M NaCl, 0.5% Triton X-100)에서 30분간 방치한다. Sonication하고 1000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리한 후 정량하여, BACE activity 측정에 이용한다. 10 ug의 lysate와 50 uM의 fluorescence substrate (Mca-(Asn670, Leu671)-Amyloid β /A4 Protein Precursor770 (667-676)-Lys (Dnp)-Arg-Arg amide; Bachem, Bubendorf, Switzerland), specific inhibitor ((Asn670, Sta671, Val672)-Amyloid β /A4 Protein Precursor770 (662-675), Bachem, Bubendorf, Switzerland)를 0.15 M acetate buffer (pH 5) 내에서 반응시킨 후 2시간이 경과한 후에 excitation 328 nm, emission 393 nm에서 fluorescence luminometer (LS-55, perkin elmer)로 측정한다.

5. γ -Secretase-mediated Peptide Cleavage Assay

γ -secretase activity를 측정하기 위해, solubilized membranes을 50 mM Tris-HCl, pH 4.5, 2 mM EDTA, 0.2% CHAPS (w/v)가 포함된 100L의 assay buffer에 넣고 37°C에서 incubation한다. Peptide substrate (Nma-GGVVIA TVK(Dnp) rrr-NH₂)는 펩트론에서 합성 정제하였다.²³ Solubilized membrane (2 ug)을 8 M peptide와 37°C에서 incubation한다. Incubation 후에, 20,000 x g에서 10분간 원심분리하고 얼음으로 옮긴다. Supernatant를 96-well plate (Nunc, Nunc)로 옮기고 excitation wavelength 355 nm와 emission wavelength 440 nm에서 plate reader (LS-55, Perkin Elmer)로 fluorescence를 측정하여 Microsoft Excel software로 분석한다. Solubilized membrane을 분획하기 위한 방법은 다음과 같다. 먼저 1 ml of 1x protease inhibitor mixture (Roche Applied Science)를 넣은 hypotonic buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA)에 cells을 재부유한 후 homogenizer를 이용하여 homogenize한다. Postnuclear supernatant 준비를 위해, homogenate를 4°C에서 15분간 1,000 x g로 원심분리한다. Supernatant로부터 membranes을 분리하기 위해 4°C에서 45분간 20,000 x g로 원심분리한다. Membranes은 100L의 RIPA buffer를 넣고 재부유한 후 4°C에서 45분간 20,000 x g로 원심분리한다.

6. RT-PCR

BACE mRNA level을 측정하기 위하여 neuroblastoma cell line SH-SY5Y에서 Trizol (Gibco, Grand Island, NY)을 이용하여 total RNA를 추출한 후 정량한다. 1 ug의 total RNA에 20 ug/ml oligo dT primer (Promega, Madison, WI)와 1 ul 10 mM dNTP (Takara, Kyoto, Japan), 1 ul MMLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI)를 첨가하여 20 ul가 되도록 한 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시켜서 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 1 ul에 BACE 특이적 primer인 5'-CTTTGTGGAGA TGGTGGACA-3'와 5'-TCATAATACCACTCCGCCG-3'를 이용하여 Taq polymerase로 94°C로 2분간 annealing한 다음, 94°C에서 1분, 56°C에서 30분, 72°C에서 1분간 30회 PCR하였다.

7. Western Blot

1) 단백질 추출

실험에 사용된 세포를 PBS로 세척 및 회수하여 4°C에서 900 x g로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 1xRIPA를 첨가하여 교반 및 sonication 후 얼음 위에 30분간 방치한 다음 4°C에서 19,300 x g로 20분 동안 원심분리하였다. 상층액을 회수하여 bicinchoninic acid (BCA, Sigma, St. Louis, MO)로 단백질 정량 후 필요한 실험에 사용하였다.

2) 전기영동

SDS가 포함된 10% polyacrylamide (PAGE)를 만들고, 준비된 protein sample을 전기영동 후 transfer buffer (0.25 M Tris, 1.92 M Glycin, PH 8.3~8.4)를 사용해서 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 transfer 하였다. TBST (200mM Tris, 1.37 M NaCl, 0.05% Tween 20) 용액에 5% non-fat milk를 녹여 30분 동안 blocking 한 후 각각의 조건에 맞는 일차 항체를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. TBST로 5~10분씩 6번 세척 후 이차항체(HRP)를 1시간 동안 반응시키고 다시 TBST로 5~10분씩 6회 wash 후 enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England) 용액으로 반응시켜 형광 발색을 내게하였다.

3) 항체들

Total APP를 확인하기 위해서 APP의 C-terminal을 인지하는 Rb767 antibody를 사용하였고, α - 및 β -secretase의 발현을 확인하기 위해 ADAM 10 (Chemicon, Temecula, CA)과 BACE (Oncogene)을 사용하였으며, 적절한 Horseradish

peroxidase (HRP)-secondary antibody와 1시간 동안 배양한 후 ECL substrate (Amersham Biosciences, Piscataway, NY)와 반응시켰으며, Imaging System (Las-1000, Fujifilm Medical Systems, Stamford, CT)을 이용하여 정량하였다.

8. 통계 처리

대부분의 결과는 최소 3회 반복하였고 평균±표준오차로 표시하였으며 각 군 간의 유의성은 ANOVA 및 Student-Newman-Keuls multiple comparison test로 분석하였다.

결 과

1. 허혈성 신경세포손상 후 Aβ 및 APP 생성의 변화

허혈성 신경세포손상이 뇌조직 내 Aβ 생성에 영향을 주는지 알아보하고자, Tg 2576 primary culture 세포에 4시간의 허혈성 신경세포손상을 가하였으며, 이후 세포 내 Aβ 양을 허혈성 신경세포손상을 가하지 않은 대조군과 비교하였다. 허혈성 신경세포손상은 Tg2576 primary culture 세포 내 Aβ 양을 증가시켰다($p < 0.001$, Fig. 1-A). 허혈성 신경세포손상이 APP 발현에

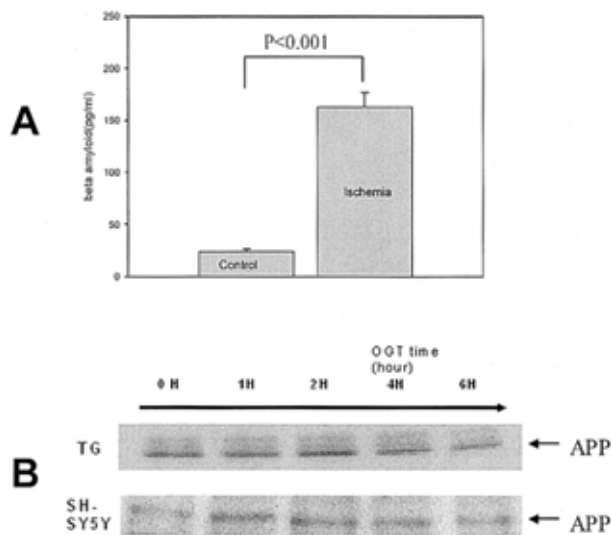


Figure 1. The effect of ischemic insults on Aβ production. In primary cell culture of Tg 2576, Aβ1-40 is significantly increased in the group of ischemic insult (oxygen glucose deprivation 4 hours), as compared non-ischemic group (A). The expression of APP in Tg 2576 and SH-SY5Y cell lines (B). There are no significant changes in expression of APP following ischemic insult.

영향을 주는지 알아보하고자 Tg 2576 primary culture 세포와 SH-SY5Y 세포주에서 허혈성 신경세포손상의 시간대별 APP 발현의 차이를 관찰하였다. 두 세포 모두에서 정상 대조군과 허혈성 신경세포손상을 가한 군 및 허혈성 신경세포손상의 시간대별 군 간에는 APP 발현의 차이는 없었다(Fig. 1-B).

2. 허혈성 신경세포손상이 non-amyloidogenic pathway 에 미치는 영향

허혈성 신경세포손상의 ADAM 10 발현에 대한 영향을 알아보기 위하여 먼저, 8시간 OGD 조건 하에서 ADAM 10 변화를 관찰하였다. 8시간 동안의 허혈성 신경세포손상에 노출된 군은 정상군에 비하여 약 60% 이상으로 ADAM 10의 발현이 감소되었다($p < 0.01$, Fig. 2). 다음으로 허혈성 신경세포손상의 기간과 ADAM 10의 변화 간의 관계를 알아보기 위하여 OGD의 기간을 1, 2, 4, 6시간별로 달리하여 관찰하였다. 흥미롭게도 허혈성 신경세포손상 초기에는 ADAM 10 발현이 증가되었으며, 이는 약 OGD 4시간째까지 증가된 채로 유지되는 양상이었다. 그러나 OGD 6시간째는 정상 대조군보다 ADAM 10의 발현이 감소되었다($p < 0.01$, Fig. 3). 또한 이러한 허혈성 신경세포손상 초기의 증가된 ADAM 10의 발현은 현미경적 소견상의 세포사 변화 및 각 시간별 LDH의 변화와 의미 있는 상관 관계를 보였다.

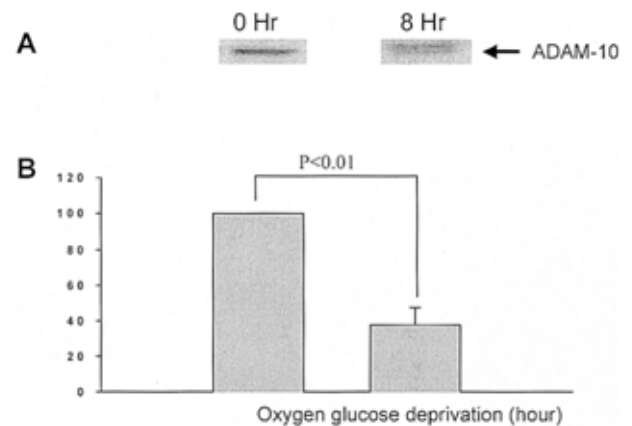


Figure 2. The effect of ischemic insults on ADAM 10 expression. ADAM 10 expression following 8 hour oxygen-glucose deprivation condition is markedly decreased in SH-SY5Y cells, as compared to non-ischemic group ($p < 0.001$). Western blot for ADAM 10 is shown (A). The graph shows quantification of ADAM 10 expression expressed as % of controls (non-ischemic insult group (B).

3. 허혈성 신경세포손상이 amyloidogenic pathway에 미치는 영향

1) β -secretase에 대한 영향

ADAM과 동일한 실험 조건 하에서 허혈성 신경세포손상에 따른 BACE 발현의 변화를 확인하고자 하였다. 허혈성 신경세포손상을 가한 군과 정상군 간의 BACE 발현의 차이는 관찰되지 않았고, 이는 1, 2, 4, 6시간별 OGD 조건 하에서도 차이가 없었다(Fig. 4-A). 실제 기존의 보고들에 의하면 알츠하이머병 환자들의 뇌 조직내 BACE 발현에는 변화가 없음에도 불구하고 mRNA 단계 혹은 BACE activity에는 차이가 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 BACE의 mRNA 변화 유무를 확인하고자 동일한 조건에서 RT-PCR 방법을 사용하였으며 동시에 BACE activity를 측정하였다. 허혈성 신경세포손상을 가한 군과 정상군간의 BACE mRNA의 유의한 양적 차이는 관찰되지 않았고, 1, 2, 4, 6시간별 OGD 조건 하에서도 각 군간 BACE mRNA의 유의한 양적인 차이는 없었다(Fig. 4-B). BACE activity도 허혈성 신경세포손상을 가한 군과 정상군 및 1, 2, 4, 6 OGD 시간별 군 간에도 활성도의 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 4-C).

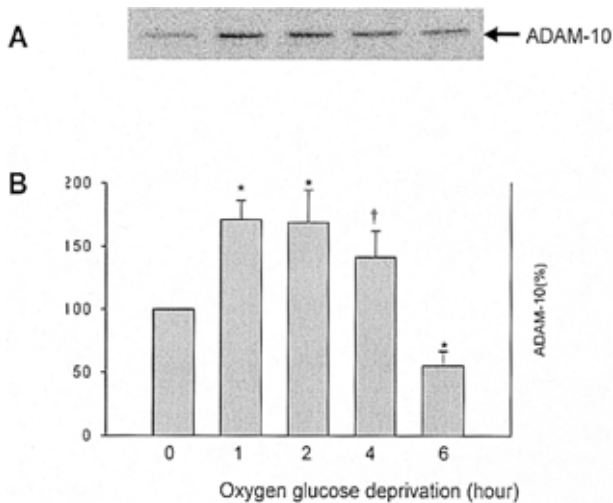


Figure 3. ADAM 10 expression following the duration of oxygen-glucose deprivation (OGD) in SH-SY5Y cells. Western blot for ADAM 10 is shown (A). The graph shows quantification of ADAM 10 expression expressed as % of controls (non-ischemic insult group (B) and ADAM 10 expression is significantly increased in 1 and 2 hours of OGD ($p < 0.001$) and increased ADAM 10 expression remained until 4 hours of OGD ($p < 0.05$). In 6 hours of OGD, ADAM 10 expression is markedly decreased ($p < 0.001$).

* $p < 0.001$, † $p < 0.05$

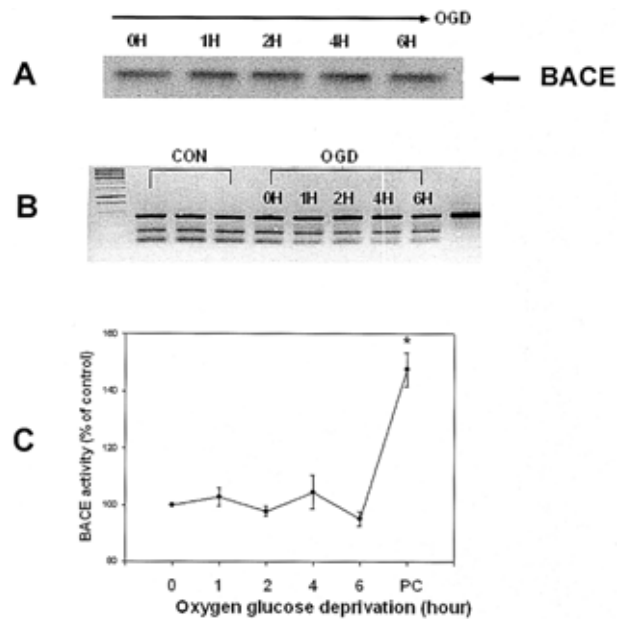


Figure 4. The expression of BACE after ischemic insults. In SH-SY5Y cells, the expression of BACE protein (A) and mRNA (B) in following 0, 1, 2, 4, 6 hour oxygen glucose deprivation are not significantly different between the groups. CON: controls, OGD: oxygen glucose deprivation. BACE activities (C) between the groups of OGD 0, 1, 2, 4, 6 hour were not significantly different except for the PC group. PC; positive control. * $p < 0.001$

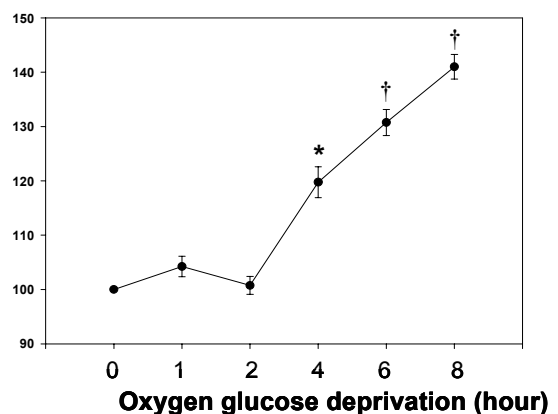


Figure 5. γ -secretase activity after ischemic insults. In SH-SY5Y cells, γ -secretase activity with respect to duration of oxygen glucose deprivation. γ -secretase activity in OGD 4, 6, and 8 hours is significantly increased than in non-ischemic group (OGD 0 hour). * $p < 0.05$, † $p < 0.001$

2) γ -secretase에 대한 영향

허혈성 신경세포손상의 기간에 따른 γ -secretase 활성도를 알아보기 위하여 0, 1, 4, 6, 8시간별 OGD 조건 하에서 실험을 하였다. 흥미롭게도 γ -secretase의 활성도는 OGD 4시간째부터 허혈성 신경세포손상을 가하지 않은 군에 비하여 의미 있게 증가하였다(Fig. 5).

고 찰

본 연구는 허혈성 신경세포손상이 γ -secretase를 매개로 한 amyloidogenic pathway를 활성화시키고 허혈성 손상이 진행함에 따라 non-amyloidogenic pathway의 활성을 감소시키며, 이의 결과로 허혈성 신경세포손상 후 $A\beta$ 형성이 증가된다는 것을 보여준다. 반면, BACE를 매개로 하는 amyloidogenic pathway는 허혈성 신경세포손상에 대한 변화가 없었다.

ADAM 10은 non-amyloidogenic pathway를 담당하는 α -secretase의 대표적인 후보 중 하나이다.²⁴⁻²⁶ ADAM 10의 활성은 $A\beta$ 생성을 감소시키며 non-amyloidogenic pathway 대사물인 APP α 는 신경보호 작용을 지닌다.²⁶ 따라서 ADAM 10의 활성은 알츠하이머병의 병인에서 보호 작용을 하는 것으로 추정하며, 실제로 알츠하이머병 환자들의 뇌조직 내 및 뇌척수액 내 ADAM 10의 활성과 발현은 감소되어 있다.²⁷

허혈성 신경세포손상에서 ADAM 10의 역할에 대해서는 현재까지 불분명하다. 그러나, 최근 α -secretase의 다른 후보 중 하나인 TACE (TNF-convertingase/ADAM-17)가 OGD 조건 및 glutamate에 의한 신경세포손상 이후 증가한다는 보고 이후,^{28,29} 동물실험을 통한 ischemic preconditioning 하에서도 이들 protease가 증가하는 것으로 밝혀져 ischemic intolerance에 중요한 역할을 하는 것으로 추정하고 있다.³⁰ 또한 이러한 TACE에 의한 신경세포 보호 작용의 downstream은 nuclear factor- κ B 매개를 통한 anti-apoptotic 단백질의 증가가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 허혈성 신경세포손상 후 ADAM 10의 발현은 허혈성 신경세포손상의 지속 시간에 따라 달리하였다. 즉, 허혈성 신경세포손상 초기에는 ADAM 10의 발현이 증가하나, 이후 허혈성 신경세포손상이 지속될수록 ADAM 10의 발현은 감소하였다. 이러한 양상은 허혈성 신경세포손상 후 ADAM 10의 발현은 허혈성 신경세포손상의 지속 시간에 대한 역치가 존재하는 것처럼 보이는데, 본 연구에서는 약 4시간을 전후로 ADAM 10의 발현이 급격히 변화하였다. 만성 뇌허혈이 ADAM 10의 발현을 감소시킨다는 보고는 있었지만, 허혈성 신경세포손상의 지속 시간대별로 ADAM 10의 발현이 증감의 양상을 보인다는 사실

은 본 연구가 처음 밝혀낸 것이다. ADAM 10도 TACE와 유사한 작용을 할 것으로 생각되며, 본 연구에서 나타난 허혈성 신경세포손상 초기의 ADAM 10 증가도 허혈성 뇌 손상에 대한 신경세포 보호 작용의 보상 기전으로 추정된다. 향후 허혈성 신경세포손상과 연관된 ADAM 10의 역할 및 이와 연관된 downstream 신호체계의 규명이 필요할 것이다.

본 연구에서 허혈성 신경세포손상은 총 아밀로이드 전구단백질 양에는 영향을 주지 않고 신경세포 내 $A\beta$ 생성을 증가시켰다. 또한 증가된 $A\beta$ 는 amyloidogenic pathway 중 주로 γ -secretase의 활성에 기인하며, 반면 BACE의 활성 및 단백질 발현은 허혈성 신경세포손상에 영향이 없는 것으로 나타났다.

BACE가 알츠하이머병의 amyloidogenic pathway에서 $A\beta$ 생성에 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으나,^{31,32} 실제 알츠하이머병 환자에서 BACE에 대한 연구는 저자에 따라 서로 상이한 결과를 보이고 있다. Fukumoto 등과 Holsinger 등^{33,34}은 알츠하이머병 환자들의 뇌 조직내 BACE 활성도 및 발현이 증가한다고 보고하였으나, 다른 저자들에 의하면 BACE 및 BACE mRNA 발현은 정상 대조군과 비교 시 변화가 없었다.^{35,36} 따라서 본 연구에서는 허혈성 신경세포손상과 BACE와의 관계를 알아보기 위하여 BACE 발현, BACE mRNA 및 BACE의 활성을 동시에 허혈성 신경세포손상의 시간별로 측정하였다. 본 실험의 결과 BACE, BACE mRNA의 발현 및 BACE의 활성은 허혈성 신경세포손상에 영향을 받지 않았다. 단지 NT2 신경세포를 이용한 최근의 연구에서 oxidative stress가 BACE 단백질의 발현과 활성을 증가시키는 보고³⁷ 외에 허혈성 신경세포손상이 BACE 발현 혹은 활성도에 관한 보고는 본 연구가 처음이다.

Presenilin 1과 2는 각각 염색체 14번 및 1번에 위치하고 속발성 가족형 알츠하이머병의 약 50%를 차지하며 67%에서 동일한 아미노산 배열을 지닌다. PS-/- 생쥐로부터 유래한 세포에서 $A\beta$ 의 생성이 일어나지 않으며 presenilin mutant를 갖고 있는 가족성 알츠하이머병에서 fibrillogenic $A\beta$ 42 생성이 증가한다는 사실은 presenilin이 $A\beta$ 의 생성에 중요한 역할을 한다는 것을 제시한다.^{38,39} Presenilin은 8개의 transmembrane 부분을 갖는 단백질이며,^{40,41} endoplasmic reticulum과 Golgi에 주로 존재하고 소량은 세포 표면에 존재하며, 기존의 연구에 의하면 presenilin은 그 자체가 type1 transmembrane 단백질을 자르는 γ -secretase로서 기능하거나 혹은 다른 단백질과 복합체를 형성하여 γ -secretase 활성에 중요한 역할을 하는 단백질이다. Presenilin gene promotor에는 상대적으로 드문 hypoxia-inducible transcription factor HIF-1을 포함하고 있어서 감소된 산소 이용도의 민감한 지표로 작용할 가능성이

있다. 실제로 Lukiw 등은 허혈성 신경세포손상이 신생 생쥐의 망막 세포에서 presenilin 2 promoter에 결합하는 HIF-1-DNA를 유도하며, 이의 결과로 presenilin 2 RNA 및 단백질 발현이 증가한다는 사실을 보고하였다.⁴² 중뇌동맥의 일시적인 결찰을 통한 실험실적 뇌경색 모델을 이용하여, Pennypacker 등은 중뇌동맥 뇌경색 후 presenilin mRNA가 의미 있게 증가한다는 것을 관찰하였다.⁴³ 이 외에도 허혈성 손상은 신경세포 뿐만 아니라 심근세포에서도 presenilin의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다.^{44,45} 허혈성 신경세포손상 후 presenilin 발현이 증가한다는 보고와 더불어, 본 연구 결과는 허혈성 신경세포손상이 γ -secretase의 활성도를 증가시킨다는 것을 보여 준다. 또한 증가된 γ -secretase의 활성이 허혈성 신경세포손상 후 amyloidogenic pathway를 통한 A β 생성의 주된 역할을 하는 것으로 생각한다.

이러한 본 연구의 결과는 허혈성 신경세포손상이 amyloidogenic pathway를 활성화시키고 이의 결과로 A β 의 생성을 촉진하는 방향으로 아밀로이드 전구단백의 대사에 중추적인 영향을 준다는 사실을 제시한다. 향후 만성적 신경세포손상시 APP 대사 및 동물실험에서의 동일한 기전의 규명은 허혈성 뇌손상이 알츠하이머병의 병인에 미치는 영향에 대하여 보다 심도있는 이해를 제공할 것이다.

REFERENCES

1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Association, 1994;4:138-142.
2. de la Torre JC. Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke* 2002;33:1152-1162.
3. Launer LJ, Ross GW, Petrovich H, Masaki K, Foley D, White LR, et al. Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Neurobiol Aging* 2000;21:49-55.
4. Petrovich H, White LR, Izmirlian G, Ross GW, Havlik R, Markesbery W, et al. Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS. Honolulu-Asia Aging Study. *Neurobiol Aging* 2000;21:57-62.
5. Forette F, Seux ML, Staessen JA, Thijs L, Birkenhager WH, Babarskiene MR, et al. Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *Lancet* 1998;352:1347-1351.
6. Ott A, Breteler MM, de Bruyne MC, van Harskamp F, Grobbee DE, Hofman A. Atrial fibrillation and dementia in a population-based study. The Rotterdam Study. *Stroke* 1997; 28:316-321.
7. Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM. Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam Study. *Neurology* 1999;53:1937-1942.
8. Breteler MM. Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective. *Neurobiol Aging* 2000;21:153-160.
9. Skoog I, Kalaria RN, Breteler MM. Vascular factors in dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1999;13 suppl 3:106-114.
10. Kalaria RN, Ballard C. Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1999;13 suppl 3:115-123.
11. Premkumar DR, Cohen DL, Hedera P, Friedland RP, Kalaria RN. Apolipoprotein E-epsilon4 alleles in cerebral amyloid angiopathy and cerebrovascular pathology associated with Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996;148:2083-2095.
12. Esiri MM, Nagy Z, Smith MZ, Barnettson L, Smith AD. Cerebrovascular disease and threshold for dementia in the early stages of Alzheimer's disease. *Lancet* 1999;354:919-920.
13. Snowden DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study. *JAMA* 1997;277:813-817.
14. Selkoe DJ. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 1998;8:447-453.
15. Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 1999;399:A23-31.
16. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987;325: 733-736.
17. Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett* 2000;483:6-10.
18. Bennett SA, Pappas BA, Stevens WD, Davidson CM, Fortin T, Chen J. Cleavage of amyloid precursor protein elicited by chronic cerebral hypoperfusion. *Neurobiol Aging* 2000;21:207-214.
19. Plaschke K, Martin E, Bardenheuer HJ. Effect of propentofylline on hippocampal brain energy state and amyloid precursor protein concentration in a rat model of cerebral hypoperfusion. *J Neural Transm* 1998;105:1065-1077.
20. Nihashi T, Inao S, Kajita Y, Kawai T, Sugimoto T, Niwa M, et al. Expression and distribution of beta amyloid precursor protein and beta amyloid peptide in reactive astrocytes after transient middle cerebral artery occlusion. *Acta Neurochir* 2001;143:287-295.
21. Shi J, Yang SH, Stubble L, Day AL, Simpkins JW. Hypoperfusion induces overexpression of beta-amyloid precursor protein mRNA in a focal ischemic rodent model. *Brain Res* 2000;853:1-4.
22. Lin B, Schmidt-Kastner R, Busto R, Ginsberg MD. Progressive parenchymal deposition of beta-amyloid protein in rat brain following global cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 1999;97:359-368.
23. Farmery MR, Tjernberg LO, Pursglove SE, Bergman A, Winblad B, Naslund J. Partial purification and characterization of gamma-secretase from post-mortem human brain. *J Biol Chem* 2003;278:24277-24284.
24. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3922-3927.
25. Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, et al. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 1998;273:27765-27767.
26. Asai M, Hattori C, Szabo B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, et al. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17

- as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301:231-235.
27. Bernstein HG, Bukowska A, Krell D, Bogerts B, Ansorge S, Lendeckel U. Comparative localization of ADAMs 10 and 15 in human cerebral cortex normal aging, Alzheimer disease and Down syndrome. *J Neurocytol* 2003;32:153-160.
 28. Hurtado O, Cardenas A, Lizasoain I, Bosca L, Leza JC, Lorenzo P, et al. Up-regulation of TNF-alpha convertase (TACE/ADAM17) after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. *Neuropharmacology* 2001;40:1094-1102.
 29. Hurtado O, Lizasoain I, Fernandez-Tome P, Alvarez-Barrientos A, Leza JC, Lorenzo P, et al. TACE/ADAM17-TNF-alpha pathway in rat cortical cultures after exposure to oxygen-glucose deprivation or glutamate. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:576-585.
 30. Cardenas A, Moro MA, Leza JC, O'Shea E, Davalos A, Castillo J, et al. Upregulation of TACE/ADAM17 after ischemic preconditioning is involved in brain tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:1297-1302.
 31. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 1999;402:537-540.
 32. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999;286:735-741.
 33. Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry M. Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002;59:1381-1389.
 34. Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002;51:783-786.
 35. Gatta LB, Albertini A, Ravid R, Finazzi D. Levels of beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 mRNAs in Alzheimer hippocampus. *Neuroreport* 2002;13:2031-2033.
 36. Preece P, Virley DJ, Costandi M, Coombes R, Moss SJ, Mudge AW, et al. Beta-secretase (BACE) and GSK-3 mRNA levels in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;116:155-158.
 37. Tamagno E, Bardini P, Obbili A, Vitali A, Borghi R, Zaccheo D, et al. Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol Dis* 2002;10:279-288.
 38. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998;391:387-390.
 39. Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 1997;3:67-72.
 40. Doan A, Thinakaran G, Borchelt DR, Slunt HH, Ratovitsky T, Podlisny M, et al. Protein topology of presenilin 1. *Neuron* 1996; 17:1023-1030.
 41. Lehmann S, Chiesa R, Harris DA. Evidence for a six-transmembrane domain structure of presenilin 1. *J Biol Chem* 1997;272:12047-12051.
 42. Lukiw WJ, Gordon WC, Rogaev EI, Thompson H, Bazan NG. Presenilin-2 (PS2) expression up-regulation in a model of retinopathy of prematurity and pathoangiogenesis. *Neuroreport* 2001;12 53-57.
 43. Pennypacker KR, Hernandez H, Benkovic S, Morgan DG, Willing AE, Sanberg PR. Induction of presenilins in the rat brain after middle cerebral arterial occlusion. *Brain Res Bull* 1999;48:539-543.
 44. Bazan NG, Lukiw WJ. Cyclooxygenase-2 and presenilin-1 gene expression induced by interleukin-1 beta and amyloid beta 42 peptide is potentiated by hypoxia in primary human neural cells. *J Biol Chem* 2002;277:30359-30367.
 45. Mohuczy D, Qian K, Phillips MI. Presenilins in the heart: presenilin-2 expression is increased by low glucose and by hypoxia in cardiac cells. *Regul Pept* 2002;110:1-7.