원 저

대한뇌졸중학회지 제7 권 제2호 2005년 11월
VOLUME 7, NUMBER 2, NOVEMBER, 2005

영구적 국소 대뇌 허혈 생쥐 모델에서 활성 산소종에 의한 세포고사 유도인자의 핵내 이동과 세포고사

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 미생물학교실[1], 뇌 연구소

조양제 · 이용현 · 조경주 · 이두재 · 김현우 · 김현정 · 이병인 · 조상래[1] · 김경환

Nuclear Translocation of Apoptosis Inducing Factor and Subsequent DNA Fragmentation by Reactive Oxygen Species After Permanent Focal Cerebral Ischemia in Mice

Department of Neurology and Microbiology[1], Yonsei University College of Medicine, Brain Research Institute

Yang-Je Cho, M.D., Yong Hyun Lee, M.S., Kyoung-Joo Cho, M.S., Doo Jae Lee, Ph.D., Hyun-Woo Kim, B.S., Hyun-Jung Kim, B.S., Byung In Lee, M.D., Sang-Nae Cho, Ph.D.[1], and Gyung Whan Kim, M.D., Ph.D.

Background: Recently, the mitochondrial proapoptotic protein, apoptosis-inducing factor (AIF), and its nuclear translocation have been reported in caspase-independent neuronal apoptosis. However, it is not elucidated whether oxidative signaling is involved in the nuclear translocation of AIF and subsequent caspase-independent apoptotic cell death. We investigated whether oxidative signaling induces nuclear translocation of AIF and subsequent caspase-independent apoptosis-associated DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia (FCI). **Methods**: Adult male ICR mice were subjected to permanent FCI by intraluminal suture blockade of middle cerebral artery. Immunohistochemistry and Western blot analysis were performed. Large-scale DNA fragmentation was evaluated by pulse field gel electrophoresis and apoptotic cell death was quantified. Manganese tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), which mimics mitochondrial superoxide dismutase, was used to determine whether the production of reactive oxygen species is required for the induction in AIF translocation. **Results**: Western blot analysis showed that the nuclear translocation of AIF occurred as early as 2 hours after permanent FCI. Immunostaining for AIF also confirmed early nuclear translocation of AIF after permanent FCI. Large-scale DNA fragmentation was detected 8 hours after permanent FCI. MnTBAP-treatment attenuated AIF translocation and blocked large-scale DNA fragmentation. Caspase-3 activity was similarly inhibited between the pan-caspase inhibitor- and MnTBAP-treated mice, but the amount of apoptosis-associated DNA fragmentation in the MnTBAP-treated mice was less than in the pan-caspase inhibitor-treated mice ($P<0.001$). In addition, infarction volume was also decreased by MnTBAP. **Conclusions**: These results suggest that reactive oxygen species induce the caspase-independent nuclear translocation of AIF and subsequent apoptosis-associated DNA fragmentation after permanent FCI.

(Korean Journal of Stroke 2005;7(2): 214~223)

Key Words: Apoptosis, Ischemic brain injury, Oxidative stress, Apoptosis-inducing factor

책임저자 : 김 경 환
서울특별시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 신경과학교실
TEL : 82-2-2228-1600
FAX : 82-2-393-0705
E-mail : gyungkim@yumc.yonsei.ac.kr

서 론

활성 산소종(reactive oxygen species)은 직접적으로 세포손상을 입히거나 간접적 신호전달체계를 통해 세포손상을 가져옴으로써, 뇌졸중을 포함한 여러 중추신경

계 질환에서 병인론적으로 중요한 역할을 한다[1]. 그 중, 특히 과산화 음이온(superoxide anion)은 세포고사(apoptosis) 신호전달경로의 활성에 관여하며 대뇌 허혈의 중요한 병태생리 기전으로 알려져 있다[1-4].

세포사멸(cell death)에는 세포괴사(necrosis)와 세포고사(apoptosis)가 있으며, 세포괴사는 심한 중추 허혈로 인해 미토콘드리아가 ATP 생산을 못하게 되어 세포사멸을 일으키는 반면, 좀 더 미약한 허혈부위(e.g. ischemic penumbra)에는 미토콘드리아와 사멸 막 수용체(death-receptor pathway) 및 그 신호전달 과정들을 통한 DNA 분절(fragmentation)이 일어나 세포사멸이 유도된다고 알려져 있다[5]. 미토콘드리아는 세포고사 조절자로서의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며[6], 미토콘드리아 외부막의 투과성 변화가 일어날 경우 세포고사를 일으키는 단백질들이 방출되는데, 이들은 cytochrome ***c*** 와 SMAC (second mitochondria-derived activator of caspase)/DIABLO (direct inhibitor-of-apoptosis protein binding protein with low pI), 세포고사 유도 인자(apoptosis-inducing factor, AIF), endonuclease G 등이 있다[7]. 그 중 caspase는 세포고사의 최종단계에 작용하는데, 활성화된 caspase에 의해 caspase-activated DNase (CAD)가 작용하여 DNA 분절을 일으키고, 활성화된 caspase 자체도 핵골격단백질을 분해함으로써 세포사멸을 일으키게 된다[6,8].

최근 caspase를 통하지 않고 세포고사를 유도하는 새로운 대체경로의 존재를 시사하는 연구들이 발표되었는데[9,10], 여러 증거들에 의해 AIF가 이러한 caspase 비의존성 경로의 핵심기폭제(key initiator)역할을 하는 것으로 여겨지고 있다[11]. AIF는 미토콘드리아에 존재하는 세포고사 효과기(effector) 역할을 하는 물질로 염색질(chromatin) 응축과 대단위(~50 kbp) DNA 분절을 유도한다[6, 8]. AIF는 미토콘드리아에서 핵내로 이동(translocate)함으로써, caspase 비의존성 세포고사를 매개하는 것으로 보고되고 있으며[6,12], 그 증거로 caspase를 억제해도 AIF의 세포고사활동은 저하되지 않는 것을 관찰할 수 있다[6,12-15].

최근 AIF의 핵내 이동이 랫트[16,17]와 마우스[11]를 사용한 일과성 국소 대뇌 허혈, 랫트의 일과성 전 대뇌 허혈[18], 그리고 신생아 랫트 뇌에서 저산소증 허혈 유도 모델 연구[19]에서 증명되었다. 그러나 활성 산소종, 특히 과산화 음이온이 AIF의 핵내 이동에 기여하는지의 여부는 명확히 규명되지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 활성산소종이 AIF의 핵내 이동에 관여한다는 가설 하에, 과산화 음이온 억제제(superoxide scavenger)인 manganese tetrakis(4-Benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP) [20]를 사용하여 영구적 국소 대뇌 허혈 후 발생하는 과산화 음이온에 의해 AIF가 핵내로 이동하는지 조사하였으며, 이러한 AIF의 핵내 이동이 caspase 비의존성 경로를 통해 일어나는지, 또한 이를 통한 DNA 분절현상을 일으키는지를 확인하였다.

대상 및 방법

1. 영구적 국소 허혈 모델

본 실험에서 모든 실험동물연구방법은 연세대학교 의과대학실험동물위원회의지침을준수하였으며, Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)의 승인을 받았다. 수컷 ICR 마우스(3개월령, 35-40 g)(Daehan Biolink Co., Chunbuk, South Korea)를 나일론 봉합사를 이용해 중대뇌동맥을 폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO)함으로써 영구적 국소 허혈 모델을 적용하였다[3,21,22]. 안면 마스크를 사용하여 20% isoflurane과 함께 질소와 산소 혼합기체(70%/30%)로 마우스를 마취시켰고, 체온은 heating pad 및 lamp로 37±0.5 ℃를 유지하였다. 대퇴 동맥을 천자하여 혈압과 동맥혈 가스를 모니터 하였다(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). 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 삽입하고 6-0 실크로 단단히 고정시켰다. MnTBAP (Biomol International, Plymouth Meeting, PA, USA)와 vehicle(증류수)은 허혈 유도 30분 전에 뇌실 내로 주입하였다.

2. 세포 단백질의 분리

허혈 유도 후 각각 1, 2, 4, 24 시간에 대조군의 뇌조직과 허혈 유도군의 병변 부위의 뇌조직을 얻어내었다. 각각의 조직은 용해 완충액{120 mM HEPES-KOH pH 7.05, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl2, 1 mM Na-EDTA, 1 mM Na-EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, proteinase inhibitor cocktail (Sigma, St Louis, MO, USA), 250 mM sucrose}에서 균질화 시켰고, 미토콘드리아/세포질 층을 4 ℃에서 10분 동안 750×g로 원심분리 한 후 그 침전물을 다시 4 ℃에서 15분 동안 1,025×g로 원심분리 하였다. 핵이 포함된 침전물을 얼음에서 15분 동안 둔 다음, 완충액으로 재 부유 시켜 4 ℃에서 20분 동안 16,000×g로 원심분리 하여 핵 분획으로 사용하였다. 미토콘드리아 침전물을 얻기 위해 상층액을 4 ℃에서 15분 간 10,000×g로 원심 분리한 후, 미토콘드리아 침전물을 3% Ficoll 용액(120 mM mannitol, 30 mM sucrose, 25 M EDTA)에 녹이고, 6% Ficoll용액(240 mM mannitol, 60 mM sucrose, 50 M EDTA)으로 농도구배 후, 다시 상층액을 채취하여 4 ℃에서 25분 동안 16,000×g로 원심 분

리하여 미토콘드리아 분획으로 사용하였다[18,19,24]. 단백질정량은 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법을 이용하였다.

3. Western blot analysis

단백질은 6% polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리하고, polyvinylidene fluoride (PVDF) 막에 옮긴 후, 16시간 동안 3% skim milk (10 mmol/L Tris, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20)로 blocking 하였다. 그 후 일차항체로 1:200으로 희석한 goat anti-AIF polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 3% skim milk에 2시간 동안 blocking 시켰다. 막을 horseradish peroxidase-linked anti-goat IgG와 반응시켰고, ECL plus kit (Amersham International, Buckinghamshire, England)를 이용하여 필름에 감광시킨 다음 Image analyzer LAS-1000 plus (Fuji Film Co., Tokyo, Japan) 및 TINA 2.0소프트웨어(Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Straubenhardt, Germany)을 사용하여 정량 하였다[18,19,24].

4. 면역조직화학염색

Urethane으로 마취한 후 10 U/mL 헤파린이 첨가된 생리식염수와 3.7% 포름알데히드를 심장을 통해 관류시키고, 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌를 3.7% 포름알데히드에 고정시킨 후, vibratome으로 50 ㎛ 두께의 절편을 만들어 면역조직화학염색을 실시하였다[26]. 내재성 peroxidase는 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 0.3% Triton X-100과 0.65% NaN3, 1%의 H_2O_2로 30분간 반응시켜 제거하였다. 비특이적 면역반응을 차단하기 위해 60분 동안 20%의 rabbit serum에 반응시킨 후, 일차 항체인 1:200 anti-AIF로 4 ℃에서 16시간 반응시켰다. Vectastatin Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 면역반응을 시행하였고 diaminobenzidine (DAB; Sigma)으로 발색 시켰으며, methyl green으로 핵 대조염색을 실시하였다.

AIF 핵내이동을 확인하기 위해 마우스 neuron-specific nuclear protein (NeuN; Chemicon, Temecula, CA, USA)과 goat polyclonal anti-AIF로 이중 형광 염색을 실시하였다. NeuN의 형광 표지 반응을 위해 단일항체 kit (DAKO ARK kit; Dako, Carpinteria, CA, USA)를 사용하여 비특이적 면역 반응 차단 과정과 바이오틴화 과정을 실시하였다. AIF의 형광 표지 반응을 위해 위의 방법으로 AIF 염색 실시 후 avidin이 연결된 fluorescent avidin DCS (50 μg/mL; Vector Laboratories)와 Cy™ 3가 연결된 1:200 anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 슬라이드에 올려 LSM510 confocal laser scanning 현미경(Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)으로 관찰하였다.

5. in situ 과산화 음이온 라디칼 검출

허혈 후 발생하는 과산화 음이온을 확인하기 위해 허혈 후 4시간에 oxidized hydroethidine (HEt) 검출법을 사용하였다[2,21,22,26]. HEt (Molecular Probes)를 dimethylsulfoxide (DMSO)에 100 mg/mL로 용해시킨 후 PBS완충액으로 1:100 비율로 희석시켰다. ICR 마우스를 희생시키기 1시간 전에 200 μℓ HEt을 정맥 내 주입하고 심장을 통해 10 U/mL 헤파린이 첨가된 생리식염수와 3.7% 포름알데히드로 관류한 후 뇌를 적출하였다. 3.7% formaldehyde로 16시간 동안 4 ℃에서 고정시킨 다음 vibratome을 사용하여 50 ㎛의 두께로 절편을 만들었다. 조직 절편이 준비된 즉시 뇌 절편을 유리판 위에 올리고 현미경으로 관찰하였다. 핵 대조염색은 Hoechst 33258 (Molecular Probes)을 사용하였다. Oxidized Het의 발현강도와 패턴분석을 위해 computerized digital camera system 형광 현미경(Ex = 510-550 nm, Em>580 nm; BX51, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하였고 이미지 분석 프로그램으로 분석하였다(MetaMorpho imaging, version 5.0; Molecular devices, Downington, PA, USA)[3,26].

6. Pulse Field Gel Electrophoresis

AIF에 의해 유발되는 대단위 DNA분절현상(large-scale DNA fragmentation) 여부를 조사하기 위해 Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)를 시행하였다. 마우스를 우레탄으로 마취시킨 후 적출한 뇌의 병변 부위를 얼음상에서 분리하였다. 대조군으로는 정상 대조군의 뇌 조직을 사용하였다. Chromosomal DNA 표본을 agarose plug에 준비한 후 CHEF Mammalian Genomic DNA Plug kit (Bio-Rad Hercules, CA, USA)를 사용하여 PFGE를 시행하였다[25]. Kit 내의 세포 현탁 완충액으로 균질화 시킨 조직(15~20 mg)은 50 ℃의 2% low melting point (LMP) agarose와 혼합하여 주형에 옮겨 agarose plug를 만들었다. 이 plug를 50 ℃, 1 mg/mL proteinase K 용액에서 16시간 정체 반응시켰다. 단백질이 제거된 DNA만 들어있는 agarose plug를 완충액으로 씻어내고 well에 넣은 후 LMP agarose로 밀봉했다. PFGE는 CHEF-DR III Pulse Field Electrophoresis Systems (Bio-Rad)를 사용하여 실시하였다. DNA 조각들은 1.2% agarose gel에 14 ℃에서 17시간 동안 전기영동하여 분리했다. 범위강도는 전 180 V, 후 120 V이고 선형램프에서 시작과 마지막 변환시간

은 0.1 ~ 10초로 설정했다. Gel은 ethidium bromide (EtBr)로염색하여 UV로 관찰하였다.

7. MnTBAP 처리

생성된 과산화물 제거를 위해 50 μg/μℓ의 MnTBAP 를 MCAO 30분전에 뇌실 내로 주입하였다(2μℓ, mediolateral = 1.0 mm; anteroposterior = 0.2 mm; dorsoventral = 3.1 mm). 실험군은 MnTBAP를 주입하고 대조군은 vehicle을 주입하였다.

8. Caspase-3 활성 측정

Caspase-3 활성측정을 위해서 활성화된 caspase-3에 의해 기질의 N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (DEVD-AFC) 절단부위를 특이적으로 인식하여 생물학적 발광을 내는 ELISA시약(Oncogene, San Diego, CA, USA)을 사용하였다. 세포질 표본은 Western blot 분석에서 시행한 방법과 동일한 방법으로 준비하였고, 활성 측정을 위해 20 μg의 단백질을 사용하였다. 단백질을 kit내에 제공된 caspase buffer E (20 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, and 4 mM dithiothreitol)에 용해시킨 후 37 ℃에서 45분 동안 반응시켰다. 형광은 luminescence spectrometer SL50B (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)(excitation/emission: 400/505 nm for AFC)를 사용하여 측정하였다.

9. Caspase inhibitor 처리

Pan-caspase inhibitor인 N-Benzyloxycarbonyl-val-ala-asp-(O-methyl)-fluoromethyl ketone (z-VAD.fmk; Sigma)를 5 μℓ Hamilton syringe (Hamilton, Reno, NV, USA)를 사용하여 뇌실(2 μℓ, mediolateral = 1.0 mm; anteroposterior = 0.2 mm; dorsoventral = 3.1 mm)로 MCAO 30분 후에 주입하였다. 실험군은 z-VAD.fmk (125 μg/μℓ)를 0.3% DMSO에 녹여 주입하고 대조군은 vehicle로 0.3% DMSO를 주입하였다[23].

10. AIF와 DNA 분절현상을 분석하기 위한 이중형광 염색

AIF의 면역조직화학 염색은 앞서 기술된 방법으로 실시하였고, DNA분절의 형광 표지를 위해 fluorescent isothiocynate (FITC)가 결합된 1:200 anti-goat IgG (Jackson Immunoresearch)로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 씻어낸 조직은 50 μℓ terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated uridine 5'-triphosphate biotin nick-end labeling (TUNEL) 반응 혼합액(terminal deoxynucleotidyl transferase and fluorecein-dUTP; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)으로 37 ℃의 어두운 곳에서 60분 동안 반응시켰다. Vectashield (Vector Laboratories)를 사용하여 봉입하고 LSM510 confocal laser scanning 현미경(Carl Zeiss)으로 관찰하여 분석하였다.

11. 세포고사 정량

세포고사 시에 나타나는 DNA 분절현상을 정량하기 위해 histone 단백 연관 DNA 조각들에 대해 특이적인 ELISA시약(Cell death detection kit, Roche Diagnostics)을 사용하여 세포고사에 의해 생성된 oligo-DNA 조각들을 검출하였다[23]. 표본들은 병변 부위와 대조 부위의 중대뇌동맥 구역 전체를 얻어내었다. 각 시간대별 신선한 뇌 조직을 분리하고, 5배의 차가운 균질화 완충액(50 mM KH2PO4, 0.1 mM EDTA, pH 7.8)과 Teflon homogenizer로 균질화 한 후 750×g에서 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 분리해서 10,000×g에서 20분 동안 spin한 후 100,000×g로 4 ℃에서 60분 동안 원심 분리하였다. 다시 세포질에 해당되는 상층액을 얻어낸 후 kit 내에 제공된 방법에 따라 ELISA를 사용하여 측정하였다.

12. 뇌경색 크기 측정

Vehicle(증류수) 투여군과 MnTBAP 투여군으로 나누어 비교하였으며, 투여 후 15분 지나 MCAO를 시행하여 영구적 국소허혈을 유도한 후, 24시간째에 마우스를 희생시켜 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 brain matrix를 이용하여 전두부에서부터 2 mm 두께로 잘라 관상 절편화하였다. 각각의 절편을 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)에 담가 37 ℃에서 15분간 배양하여 염색하였으며, 평판 스캐너를 이용하여 1200 dpi로 스캔 한 후, MetaMorpho imaging (version 5.0; Molecular devices)을 이용하여 뇌경색 면적과 두께를 곱하여 부피를 구하고, 이를 경색 부위 대뇌 반구 부피와 비교하였다 [22,24].

13. 통계학적 분석

데이터들은 mean±SD로 표현하였다. 여러 집단간의 통계학적 비교는 ANOVA를 사용하였고, 두 집단간의 차이는 t-test를 통해 실시되었으며(StatView; SAS Institute Inc, Cary, NC, USA), $p<0.05$, $p<0.001$을 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 생리학적 자료

체온, 혈압 및 동맥혈 가스 분석 결과, ICR 마우스에서 FCI 이전과 이후, 그리고 MnTBAP 처리군과 비 처리군 간의 생리학적 자료에 유의한 차이가 없음을 보여주었다 (Table 1).

2. 영구적 국소 대뇌 허혈 유도 후 AIF의 핵내 이동

Western blot 분석에서 AIF는 영구적 MCAO 1시간 후부터 병변 부위의 핵과 미토콘드리아에서 ~67kDa 분자량의 위치에서 확인되었으며. 대조 부위의 세포핵에서는 거의 검출되지 않았다(Fig. 1A). AIF의 핵내 농도는 허혈 유도 후 4 시간과 24 시간에서 더욱 증가되었는데 시간에 따른 핵내 AIF의 증가는 통계학적 분석으로 유의성이 있었다(optical density(OD): Ctr, 0.8±0.2; 1 h, 8.0±0.37; 2 h, 11.87±0.38; 4 h, 14.75±0.4, 24 h, 28.87±0.79; ANOVA, $p<0.001$)(Fig. 1A). 이와 대조적으로 미토콘드리아 AIF는 대조 부위와 병변 부위 모두에서 검출되었지만, 병변 부위에서는 영구적 허혈 유도 후 1, 2, 4 시간에서는 감소하다가 24 시간에서는 다시 증가하였다. 미토콘드리아 AIF는 대조 부위와 비교했을 때, 영구적 국소 대뇌 허혈 후 2 시간과 4 시간에서 유의하게 감소되는 것으로 나타났다. 그러나 대조 부위와 비교했을 때 허혈 유도 후 24 시간에서는 현저히 증가되었다(OD: Ctr, 25±0.95; 1 h, 20.25±1.25; 2 h, 17.25±0.95; 4 h, 14.50±1.29; 24 h, 31.25±2.67; ANOVA, $p<0.001$)(Fig. 1A).

3. AIF의 면역형광 염색으로 AIF의 핵내 이동현상 확인

영구적국소 허혈유도 후병변부위의피질부에서 AIF의 핵내 이동을확인하기위한면역조직화학 염색에서, 대조군에서는 AIF의 핵내 면역활성이 거의 검출되지 않았으나 병변 부위에서는 허혈 후 시간의 경과에 따라 AIF의 핵내 면역활성이 점차적으로 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 1B). AIF와 NeuN 이중 형광염색에서는 대조 부위에서는 AIF의 면역형광활성이미토콘드리아가 위치하는세포질 내에서만 점상으로 약하게 염색되어 나타나는 반면(Fig. $1C_{1-3}$), 병변 부위에서는 AIF 면역형광활성이 NeuN양성 세포 핵내에강하게염색되는것이 관찰되었다(Fig. $1C_{4-6}$).

4. MnTBAP 처리군에서의 과산화 음이온 생산의 억제

과산화 음이온은 세포질에서 oxidized HEt가 적색 입자 형태로 관찰되는데(Fig. 2A, arrow heads), 영구적 허혈 유도 후 4 시간에서 vehicle 처리군의 허혈부위에서는 정상부위에 비해 산화 HEt가 현저히 증가된 반면(Fig. 2B), MnTBAP를 처리한 군(Fig. 2D)의 병변부위 산화 HEt는 정상부위(Fig. 2C)에 비해 별로 증가하지 않아 MnTBAP처리군과 vehicle 처리군 사이에 의미 있는 차이를 보였다(OD: vehicle, 0.68±0.03; MnTBAP, 0.33±0.05; unpaired t-test, $P<0.001$).

5. MnTBAP 처리군에서의 AIF의 핵내 이동 감소

영구적 허혈 유도 4시간 후에, MnTBAP 처리군과 vehicle 처리군(Fig. 3A)에서 Western blot분석을 통해 AIF 단백질 발현을 비교하였다. MnTBAP 처리군에서는 AIF 핵내 이동이 vehicle 처리군에 비해 현저히 감소하였다(OD: vehicle, 11.92±0.94; MnTBAP, 2.60 ± 0.27; unpaired t-test, $P < 0.001$)(Fig. 3A). 반대로, 미토콘드리아내의 AIF는 MnTBAP 처리군에서 증가를 보였다. 비허혈조직에서의 AIF 핵내 이동은 MnTBAP 처리군과 vehicle 처리군간에 거의 차이가 없었다(data not shown).

또한 영구적 허혈 유도 후 4 시간에서 면역조직화학염색을 통한 AIF 핵내 활성을 비교하였는데, MnTBAP 처리군이 vehicle 처리군에 비해 병변 부위에서의 핵내 AIF 면역활성반응이 감소된 것이 관찰되었다(Fig. 3B).

6. 영구적 국소 허혈 후 MnTBAP 처리군에서의 대단위 DNA 분절현상억제

영구적 허혈 후 8 시간부터 ~50kbp 크기의 대단위 DNA 조각들이 PFGE에서 검출되었으며, 허혈 후 14 시간과 24 시간에서 현저히 증가되었고(Fig. 4A), 이러한 대단위 DNA 분절현상은 대조군에서는 나타나지 않았다. 대단위 DNA 분절현상은 MnTBAP 처리군에서는 나타나지 않았고, 이는 vehicle 처리군과는 대조를 보였다(Fig. 4B).

7. Caspase와 독립적 경로를 통한 AIF 핵내 이동과 세포고사

Western blot 분석을 통해 vehicle 처리군과 caspase 저해제인 z-VAD.fmk 처리군에서 AIF 발현양은 별다른 차이가 없음을 알 수 있었다(OD: vehicle, 11.62±0.69; z-VAD.fmk, 11.16±0.82, NS) (Fig. 5A). 영구적 허혈 유도 24 시간 후에 AIF와 TUNEL 이중 면역조직화학염색을 실시하였는데(Fig. 5Ba), 허혈부위에서 TUNEL 양성 세포와 AIF 양성 세포들은 대부분 일치를 보였다(Fig. 5Ba3, arrow heads). Vehicle, z-VAD.fmk, MnTBAP의 서로 다른 세 가지 조건에서 영구적 허혈 유도 24 시간 후 나타나는 caspase-3 활성과 DNA 분절현상을 관찰하였는데, z-VAD.fmk와 MnTBAP 처리군에서 vehicle 처리군에 비해 caspase-

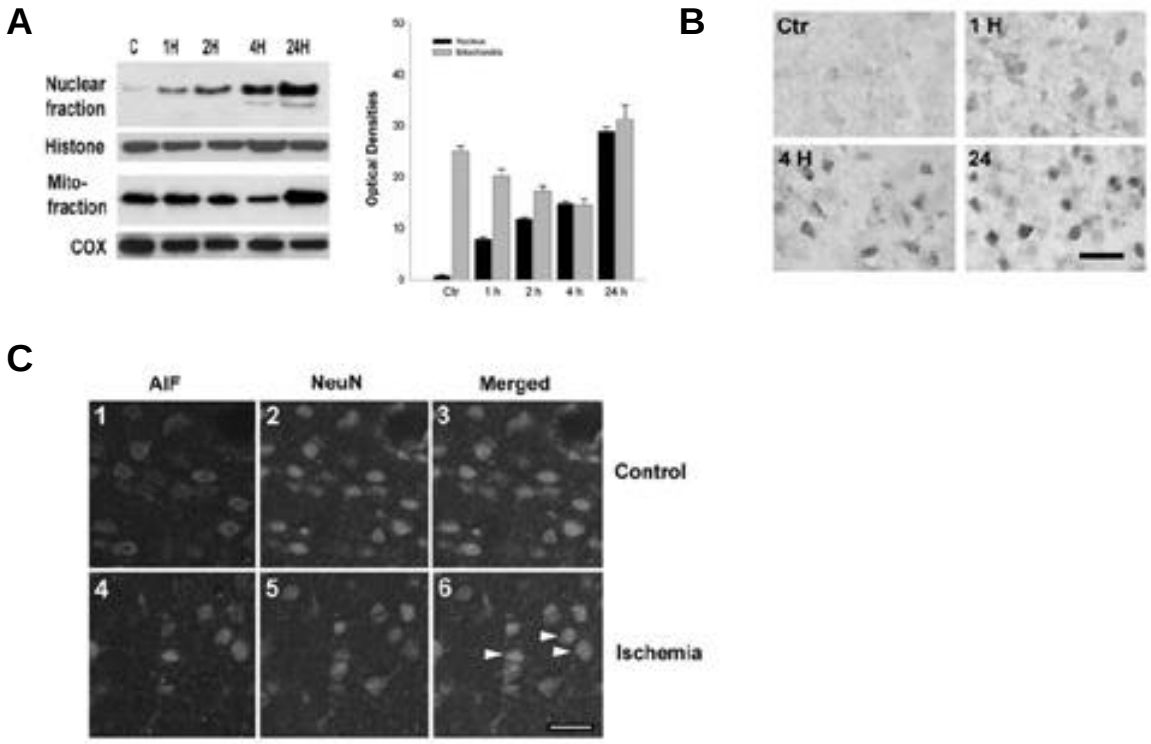

Figure 1. Western blot analysis, immunohistochemical staining, and double labeling immunofluorescence with AIF and NeuN after permanent FCI. (A) Western blot analysis of AIF confirmed successful separation of nuclear and mitochondrial fractions and early nuclear translocation of AIF. Histone and COX were used as the internal controls in the nuclear and mitochondrial fractions each. (B) Immunohistochemistry revealed a time-dependent increase of AIF nuclear translocation. Scale bar = 50 ㎛. (C) Double labeling immunofluorescence with AIF and NeuN at 4 hours after permanent FCI. AIF (C1), NeuN (C2), and combined AIF and NeuN (C3) in the non-ischemic cortex were shown respectively. AIF (C4), NeuN (C5) and combined AIF and NeuN (C6) immunohistochemistry in the ischemic cortex after permanent FCI were revealed also. AIF immunoreactivity was intensely visible in the nucleus at 4 hours after permanent FCI (arrow heads). FCI, focal cerebral ischemia; AIF, apoptosis inducing factor; NeuN, neuron-specific nuclear protein; Mito-, Mitochondrial; Ctr, control. Scale bar = 20 ㎛.

Table 1. Summary of the selected physiological variables of the ICR mice, measured at the time of baseline (before MCAO), ischemia (after MCAO), and before and after MnTBAP treatment. There were no statistically different parameters among the groups. Abbreviations: MCAO, middle cerebral artery occlusion; MnTBAP, manganese tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin. n = 4~5 per each group

	ICR	MnTBAP treated ICR
	Mean value ± SD	Mean value ± SD
	Before MCAO	Before MnTBAP treatment
pH	7.4 ± 0.1	7.5 ± 0.1
PCO2(mm Hg)	29 ± 5	28.0 ± 2.0
PO2(mm Hg)	153.5 ± 4.5	169 ± 9.0
BP	83.6 ± 6.5	79.9 ± 7.1
Temperature(℃)	36.8 ± 0.3	37.1 ± 0.7
	After MCAO	After MnTBAP treatment
pH	7.4 ± 0.1	7.5 ± 0.1
PCO2(mm Hg)	29.5 ± 6.5	24.8 ± 1.2
PO2(mm Hg)	166.3 ± 6.4	165.2 ± 5.8
BP	87.3 ± 5.7	75.6 ± 5.5
Temperature(℃)	37.0 ± 0.2	37.5 ± 0.4

3 활성이 현저히 감소됨을 알 수 있었다(OD: vehicle, 445.70±15.10; z-VAD.fmk, 276.30±13.30; MnTBAP, 287.00±10.00; ANOVA, p<0.001)(Fig. 5Bb). 하지만, z-VAD.fmk 처리군과 MnTBAP 처리군간의 caspase-3 활성도 비교는 별 차이가 없었다. 세포고사 정량법을 통해 나타난DNA 분절현상의 정도는 vehicle 처리군에 비해 z-VAD.fmk 처리군과 MnTBAP 처리군에서 현저히 감소되었다(OD: vehicle, 515.00±58.00; z-VAD.fmk, 399.00±31.80; MnTBAP, 236.00±49.00; ANOVA, p<0.001)(Fig. 5Bc). 또한 MnTBAP 처리군에서 DNA 분절현상은 z-VAD.fmk 처리군에 비해 의미 있게 적은 것으로 나타났다(P<0.001). TTC staining을 통해 MnTBAP와 vehicle 처리군간에 뇌경색의 차이를 비교하였는데(Fig. 5C), MnTBAP 처리군에서 뇌경색 크기가 의미 있게 감소함을 알 수 있었다.(㎣: vehicle, 92.28±14.85; MnTBAP, 36.16±1.21; unpaired t-test, p<0.001)

고 찰

본 실험을 통해 저자들은 활성 산소종, 특히 과산화 음이온이 영구적 국소 대뇌 허혈 모델에서 caspase 비 의존성 AIF의 핵내 이동을 유도하며, 이로 인한 세포고사, 즉 DNA 분절현상을 일으키는 것을 최초로 확인하였다. 결과를 요약하면, 첫째, 영구적 국소 대뇌 허혈 2시간 후부터 미토콘드리아 분획에서 AIF의 양이 감소되면서 반대

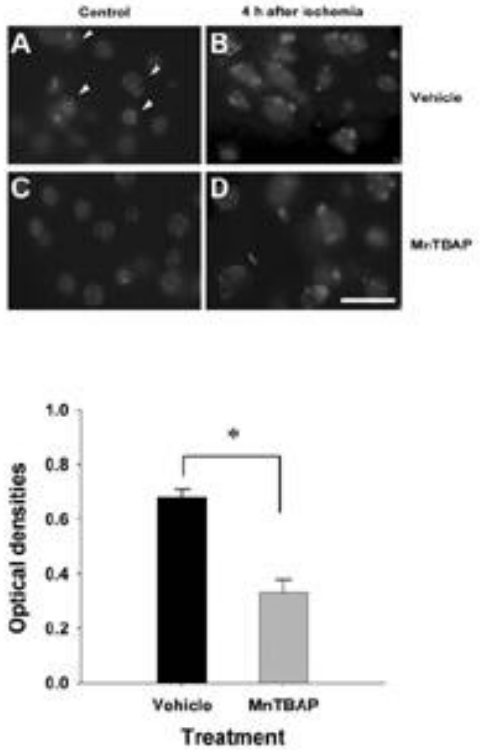

Figure 2. Representative photomicrographs showing the production of superoxide radicals by the detection of oxidized HEt in both the MnTBAP- and vehicle-treated mouse brain at 4 hours after permanent FCI. Perinuclear expression of oxidized HEt signals (arrow heads) is shown in the contralateral nonischemic brain (A), whereas profound increase of oxidized HEt signals in the cytosol are observed in the ischemic brain of vehicle-treated mice brain (B). Expression of oxidized HEt signals is barely detected in nonischemic brain (C), whereas slightly increased cytosolic expression of oxidized HEt signals is observed in ischemic brain of MnTBAP-treated mice (D). MnTBAP, manganese tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin; HEt, hydroethidine. Scale bar = 20 ㎛.

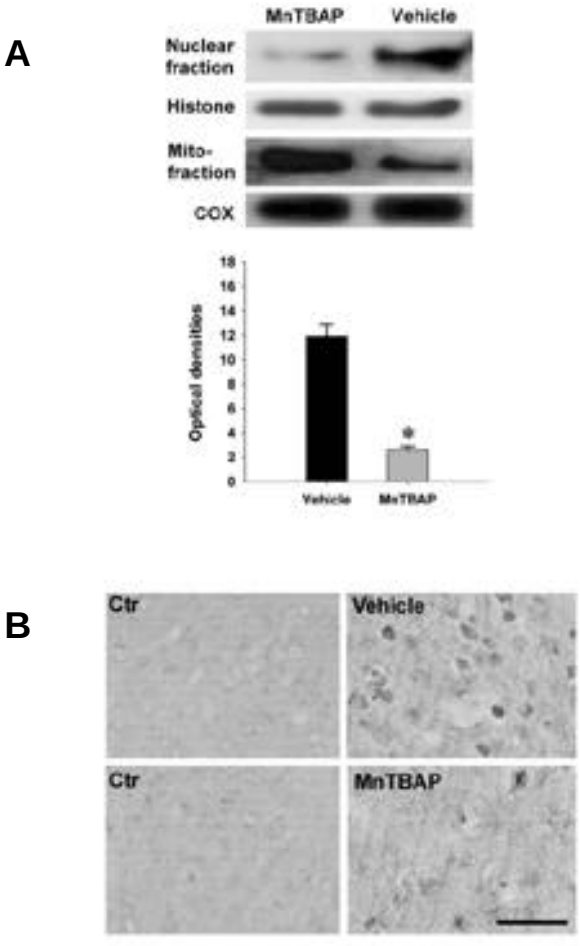

Figure 3. Inhibition of AIF translocation after MnTBAP treatment. (A) Comparisons of AIF expression between MnTBAP- and vehicle-treated mice by Western blot analysis showed decrease of AIF nuclear translocation by MnTBAP. (B) Immunohistochemistry after permanent FCI revealed significant reduction of AIF expression in MnTBAP-treated mice. Scale bar=50 ㎛.

로 핵 분획에서는 증가하는 것을 보여주었다(Fig. 1A). 이는 면역조직화학염색과 AIF와 NeuN 이중면역형광염색을 통해서도 확인할 수 있었다(Fig. 1B, C). 둘째, MnTBAP를 처리한 군에서 영구적 국소 대뇌 허혈로 인한 과산화 음이온의 생산이 감소됨을 oxidized HEt 감소를 통해 입증하였다(Fig. 2). 셋째, 허혈 후 AIF의 핵내 이동은 MnTBAP를 처리한 군에서 유의하게 감소함을 확인하였다(Fig. 3). 이는 과산화 음이온이 AIF 핵내 이동을 유도한다는 명확한 증거라 할 수 있다. 넷째, vehicle을 투여한 대조군에서는 영구적 국소 대뇌 허혈 24시간 후 발생하는 대단위 DNA 분절현상이 많이 관찰되었고, MnTBAP 처리군에서는 이러한 현상이 차단됨을 PFGE를 이용하여 입증하였다(Fig. 4). 마지막으로 AIF의 핵내 이동이 pan-caspase 저해제인 z-VAD.fmk에 의해 억제되지 않음을 정량적으로 밝혔으며 이는 AIF가 caspase 비 의존성 경로임을 시사하는 결과이다. 또한 z-VAD.fmk 처리군과 MnTBAP 처리군 모두 비슷한 정도의 caspase 활성도 감소라는 결과를 보였지만, 영구적 국소 허혈 이후 z-VAD.fmk 처리군 보다 MnTBAP 처리군에서 DNA 분절현상이 유의하게 감소되었다. 또한 MnTBAP 처리군에서는 뇌경색 크기를 줄이는 것을 확인하였다(Fig. 5). 위의 결과들을 볼 때 영구적 대뇌 국소 허혈 후 발생하는 과산화 음이온에 의해, 세포고사 초기

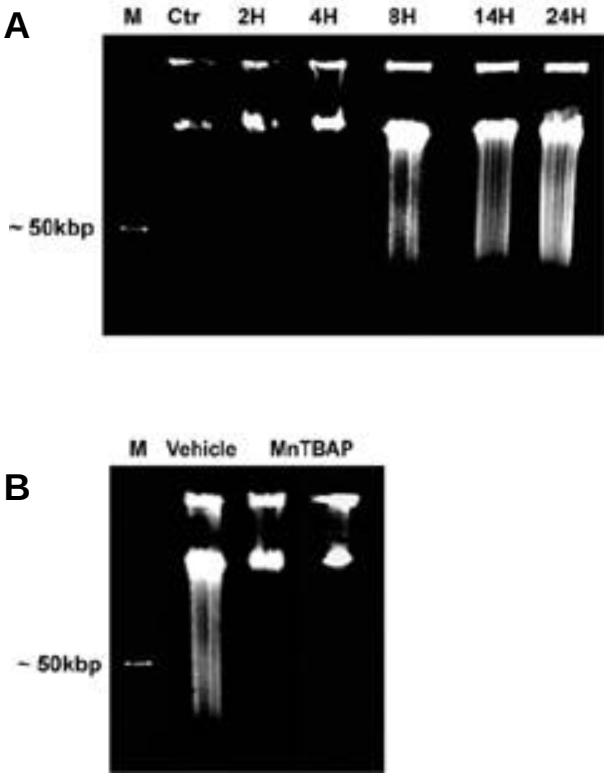

Figure 4. Representative photographic findings of large-scale DNA fragmentation using PFGE after permanent FCI and comparison between MnTBAP- and vehicle-treated mice. (A) Large-scale DNA fragmentation (mainly 50 kbp) was shown as early as 8 hours after permanent FCI. (B) The large-scale DNA fragmentation was blocked in the MnTBAP-treated mice at 24 hours after permanent FCI. PFGE, pulse field gel electrophoresis; M, marker; ctr, control.

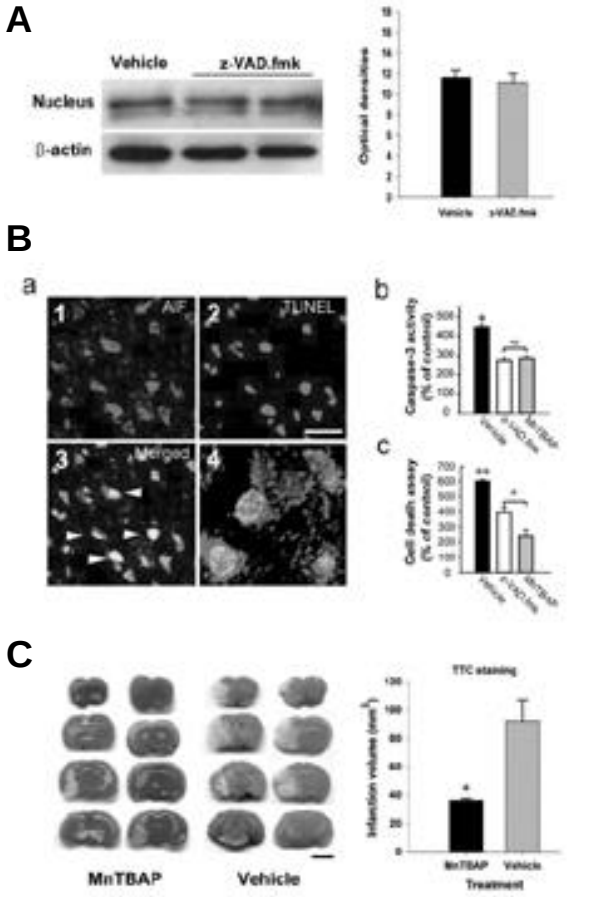

Figure 5. Western blot analysis, immunofluorescent staining, and TTC staining. (A) Nuclear translocation of AIF was not different between z-VAD.fmk- and vehicle-treated mice 4 hours after permanent FCI in Western blot analysis. (Ba) Immunofluorescent double-staining for AIF and TUNEL disclosed colocalization of AIF and TUNEL 24 hours after permanent FCI. AIF-positive cells (Ba1), TUNEL-positive cells (Ba2), combined AIF and TUNEL (Ba3), and high magnified result (Ba4). Colocalization of nuclear AIF and TUNEL-positive cells (arrow heads). Scale bar = 20 ㎛. (Bb) Comparison of caspase-3 activity (*P < 0.001) and apoptosis-associated DNA fragmentation by cell death assay (Bc) 24 hours after permanent FCI among the vehicle-, z-VAD.fmk- and MnTBAP-treated mice. (C) TTC staining of vehicle- and MnTBAP-treated mice showed significant decrease of infarction volume by MnTBAP-treatment, compared with vehicle-treatment. z-VAD.fmk, N-Benzyloxycarbonyl-val-ala-asp-(O-methyl)-fluoromethyl ketone; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated uridine 5'-triphosphate biotin nick-end labeling; TTC, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. Scale bar = 4 mm.

에 AIF가 미토콘드리아로부터 핵내로 이동하여 대단위 DNA 분절현상의 발생을 유발하는 것을 확인할 수 있다.

이번 실험에서는 활성 산소종, 특히 과산화 음이온의 감소가 AIF의 핵내 이동을 상당히 억제함을 보여주고 있는데, 이는 최근 peroxynitrite [25]나 신경 독소[27]가 처리된 신경 세포 배양 연구, 그리고 UV에 의해 유도된 세포사멸 연구[28] 등과 같은 여러 in vitro실험에서 AIF의 핵내 이동이 활성 산소종에 의해 유도된다는 사실과 부합하는 것이다. 활성 산소종이 AIF 핵내 이동을 유도하는 기전은 아직 정확히 알려져 있지 않으나, 한가지 가능한 가설은 유리기(free radical)가 미토콘드리아 membrane permeability transition (MPT)을 활성화시키고, 활성화된 MPT는 미토콘드리아 외막을 터뜨려 AIF와 같은 물질들을 방출시킨다는 것이다[2,12,28]. 또 다른 가설은 활성 산소종이 cytochrome c와 같은 세포고사 친화(proapoptotic) 물질의 redox 상태를 변화시킴으로써 AIF의 분비를 촉진하는 것으로 설명하고 있다[29]. 또한 Bcl-2 superfamily인 BID나 BAX들은 세포고사를 촉진하는 물질로 잘 알려져 있는데, 이들은 p53이 매개하는 신경세포사멸에 있어 AIF channel을 형성하며[15] herpes simplex 바이러스를 이용해 Bcl-2를 transfection시키면, AIF 핵내 이동을 차단하는 것으로 알려져 있다[17]. 활성 산소종은 이러한 BID나 BAX를 통하여 AIF 이동을 조절하는 것으로 보고되고 있다[30].

이번 연구에서 영구적 국소 대뇌 허혈 24시간 후 TUNEL 양성 세포와 AIF 양성 세포들은 대부분 일치를 보였는데(Fig. 5Ba), 이러한 결과는 외상성 뇌손상[25]이나 일과성 국소허혈[22], 저산소성 뇌허혈[19] 후에 핵내 AIF 양성을 보이는 뇌신경 세포가 TUNEL 양성을 보였다는 이전 보고들과 일치하는 것이며, 아마도 AIF의 핵내이동이 신경세포고사 기전에 관여한다는 것을 시사한다. 또한 이번 연구는 z-VAD.fmk 와 MnTBAP를 각각 처리한 군에서 caspase-3 활성도 억제의 차이가 없음에도 불구하고, MnTBAP 군에서 z-VAD.fmk에 비해 세포고사가 유의하게 적음(Fig. 5Bb-c)을 보여주고 있는데, 이는 과산화 음이온이 caspase 의존성 경로뿐만 아니라 caspase 비 의존성 경로를 통해 세포고사를 유도함을 보여주고 있다. 더욱이 MnTBAP를 처리함으로써 뇌경색 크기를 감소시킬 수 있었는데, 이는 과산화 음이온을 차단함으로써 국소대뇌허혈에서 뇌경색 크기가 감소한다는 이전 보고들과도 일치한다[22,24]. AIF가 endonuclease G와 같은 nuclease들을 활성화 시키며[6,7], CAD가 2단계 세포고사를 유발하기 위해서는 AIF가 관여하는 1단계 세포고사과정이 필요하다는 최근 보고[13]는 핵내 AIF가 세포고사에서의 일련의 과정들을 효과적으로 촉진시킬 것이라는 추측을 가능하게 한다. 따라서 본 연구에서처럼 MnTBAP를 투여하여 활성 산소종을 감소시키면, AIF의 핵내 이동을 통한 활성이 차단되어 endonuclease G와 같은 nuclease들을 불활성화시키고, 이는 caspase 비의존적 방법으로 nucleosomal DNA 분절화를 감소시키는 결과를 초래한다.

결론적으로, 이번 연구를 통해 활성 산소종, 특히 과산화 음이온은 영구적 국소 대뇌 허혈 이후에 발생하는 caspase 비 의존성 AIF 핵내 이동과 그에 따른 DNA 손상을 유도함을 밝혔다. 또한 MnTBAP에 의한 과산화 음이온 억제가 caspase 의존성 세포고사 경로뿐만 아니라 caspase 비 의존성 세포고사 경로를 차단하여 허혈에 의한 세포고사를 예방하고 뇌경색을 감소시킴을 보임으로써, 향후 세포치료에 응용할 수 있는 가능성을 시사하였다.

REFERENCES

1. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:2-14.
2. Murakami K, Kondo T, Kawase M, Li Y, Sato S, Chen SF, Chan PH. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci* 1998;18:205-13.
3. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Copin JC, Calagui B, Epstein CJ, Chan PH. 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.
4. Kim GW, Sugawara T, Chan PH. Involvement of oxidative stress and caspase-3 in cortical infarction after photothrombotic ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1690-1701.
5. Benchoua A, Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onteniente B. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* 2001; 21: 7127-34.
6. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, SiderovskiDP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-46.
7. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* 2003;22:4385-99.
8. Penninger JM, Kroemer G. Mitochondria, AIF and caspases - rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol* 2003;5:97-99.
9. Johnson, M. D., Kinoshita, Y., Xiang, H., Ghatan, S. & Morrison, R. S. Contribution of p53-dependent caspase

activation to neuronal cell death declines with neuronal maturation. *J Neurosci* 1999;19: 2996-3006.
10. Lankiewicz S, Marc Luetjens C, Truc Bui N, Krohn AJ, Poppe M, Cole GM, Saido TC, Prehn JH. S. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 2000;275: 17064-71.
11. Plesnila N, Zhu C, Culmsee C, Groger M, Moskowitz MA, Blomgren K. Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:458-66.
12. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb* J 2000;14:729-39.
13. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000;192:571-80.
14. Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Metivier D, Nieminen AL, Brothers G, Penninger JM, Kroemer G. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *Faseb J* 2001;15:758-67.
15. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 2002;158:507-17.
16. Ferrer I, Planas AM. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: Life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:329-39.
17. Zhao H, Yenari MA, Cheng D, Barreto-Chang OL, Sapolsky RM, Steinberg GK. Bcl-2 transfection via herpes simplex virus blocks apoptosis-inducing factor translocation after focal ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:681-92.
18. Cao G, Clark RS, Pei W, Yin W, Zhang F, Sun FY, Graham SH, Chen J. Translocation of apoptosis-inducing factor in vulnerable neurons after transient cerebral ischemia and in neuronal cultures after oxygen-glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:1137-50.
19. Zhu C, Qiu L, Wang X, Hallin U, Cande C, Kroemer G, Hagberg H, Blomgren K. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 2003;86:306-17.
20. Klann E. Cell-permeable scavengers of superoxide prevent long-term potentiation in hippocampal area ca1. *J Neurophysiol* 1998;80:452-7.
21. 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.
22. 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.
23. Saito A, Hayashi T, Okuno S, Ferrand-Drake M, Chan PH. Interaction between XIAP and Smac/DIABLO in the mouse brain after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:1010-9.
24. Kim GW, Lewen A, Copin J, Watson BD, Chan PH. The cytosolic antioxidant, copper/zinc superoxide dismutase, attenuates blood-brain barrier disruption and oxidative cellular injury after photothrombotic cortical ischemia in mice. *Neuroscience* 2001;105:1007-18.
25. Zhang X, Chen J, Graham SH, Du L, Kochanek PM, Draviam R, Guo F, Nathaniel PD, Szabo C, Watkins SC, Clark RS. Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor(AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *J Neurochem* 2002;82:181-91.
26. Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan PH. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: Role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J Neurosci* 2003;23:8733-42.
27. Fonfria E, Dare E, Benelli M, Sunol C, Ceccatelli S. Translocation of apoptosis-inducing factor in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress. *Eur J Neurosci* 2002;16:2013-6.
28. Murahashi H, Azuma H, Zamzami N, Furuya KJ, Ikebuchi K, Yamaguchi M, Yamada Y, Sato N, Fujihara M, Kroemer G, Ikeda H. Possible contribution of apoptosis-inducing factor(AIF) and reactive oxygen species(ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. *J Leukoc Biol* 2003;73:399-406.
29. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000;7:153-63.
30. Li D, Ueta E, Kimura T, Yamamoto T, Osaki T. Reactive oxygen species(ROS) control the expression of bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer* Sci 2004;95:644-50.