

# 신생 흰쥐 대뇌의 바닥핵에서 허혈-저산소손상에 의한 신경세포의 Apoptosis와 AIF의 발현양상의 변화에 관한 분석

이 영 일

단국대학교 의과대학 해부학교실

**초 록 :** 흰쥐 뇌의 바닥핵(basal ganglia)을 이루는 주요 구성성분인 꼬리조가비핵(caudate-putamen)과 창백핵(globus pallidus)에서의 허혈-저산소손상(hypoxic ischemic injury)에 의한 AIF(apoptosis inducing factor)의 시간에 따른 발현양 변화를 생후 7일 된 신생흰쥐의 허혈-저산소모델을 이용해 확인하고 이를 정량분석하였다. 바닥핵에서의 AIF의 발현변화는 수술 후 꼬리조가비핵에서는 12시간 경과 후에, 그리고 창백핵에서는 24시간 경과 후에 가장 높게 나타났으며 48시간 경과군에서는 다시 대조군의 수준 또는 그 이하로 감소되어 나타났다. 또한 본 연구에서는 AIF의 발현이 신경세포에만 국한되어 나타나는 것인지 여부를 신경세포와 신경아교세포(neuroglial cell)에 대한 이중면역형광염색(double-immunofluorescence staining)을 통해 알아봄으로써 미성숙한 뇌에서 허혈-저산소손상에 의한 AIF의 작용기전이 신경세포는 물론 바닥핵을 구성하는 신경아교세포에서도 나타남을 확인하였다.

AIF는 허혈-저산소손상으로 인한 미성숙 뇌의 바닥핵에서의 세포자멸사(apoptosis) 기전과 깊은 관련이 있음이 확인되었으며 이는 뇌허혈에 취약한 미성숙 신경세포의 손상기전을 연구하는데 있어서 중요한 단서를 제공할 것으로 판단된다. 아울러 뇌허혈을 비롯한 급성뇌손상으로부터 신경세포를 보호하기 위한 치료법 개발에 있어서 AIF와 관련된 병태생리의 중요성은 더욱 부각될 것으로 전망된다.

**찾아보기 낱말 :** 바닥핵, 세포자멸사, AIF(apoptosis inducing factor), 흰쥐, 허혈, 저산소증, 신경아교세포

## 서 론

주산기(perinatal period)의 허혈-저산소손상(hypoxic-ischemic damage)은 신경계통에 커다란 피해를 주며 신생아(neonate) 신경계통질환의 가장 중요한 원인이기도 하다. 따라서 최근에는 신생아의 허혈-저산소손상과 관련된 병태생리와 치료법 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kabakus *et al.*, 2005). 허혈(ischemia)에 의한 뇌(brain)의 손상은 일반적으로 대뇌겉질(cerebral cortex)이나 해마(hippocampus) 등의 부위에서 현저한 것으로 알려져 있으나, 신생아에서는 사이뇌(간뇌, diencephalon)와 더불어 바닥핵(기저핵, basal ganglia)에 속하는 꼬리조가비핵(caudate putamen), 그리고 창백핵(담창구, globus pallidus) 등에도 신경세포의 손상이 두드러지며 경우에 따라 허혈에 의한 뇌

의 손상이 바닥핵에 집중되어 나타나기도 한다(Volpe, 1995). 바닥핵은 일반적으로 운동조절을 담당하는 대뇌겉질 밑(subcortical) 부위에 존재하는 핵들의 집합이라 할 수 있다. 이러한 바닥핵의 기능이상은 파킨슨병(Parkinson's disease)에서 나타나는 떨림(tremor)이나 경직(rigidity)과 같은 증상, 헌팅턴병(Huntington's disease)에서 나타나는 비틀기(writhing movement) 증상 등을 초래하게 됨으로 임상적으로 그 중요성이 매우 높은 부위라 할 수 있다.

뇌의 허혈-저산소손상에 의한 세포사멸의 주요 기전은 세포자멸사(apoptosis)라 불리는 신경세포의 사망에 의한 것으로서 미성숙한 신생 뇌에서도 허혈-저산소손상이 신경세포의 세포자멸사를 현저하게 일으키는 것으로 보고되었다(Chang, 2002; Shin *et al.*, 2004). 특히 신경계통에서 일어나는 세포자멸사는 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease) 등을 포함하는 퇴행성 뇌신경질환(degenerative neuronal disease)과 허혈(ischemia)에 의한 뇌신경세포의 사멸과 관련하여 그 중요성이 부각되고

\*본 연구는 2004학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

\*교신저자: 이영일

Tel: 041-550-3855, Fax: 041-556-6461, E-mail: anat104@dku.edu

있다(Bursch & Ellinger, 2005). 세포자멸사에 직간접적으로 관여하는 여러 인자들 중 현재까지 비교적 비중 있고 중요한 것으로 밝혀진 caspase (cystein protease with aspartate-specificity) (Cryns & Yuan, 1998)는 세포자멸사를 유발시키는 매우 중요한 요소임은 분명한 사실이지만 caspase의 작용과는 독립적으로 신경세포의 세포자멸사를 유발시키는 기전이 존재함이 점차 밝혀지고 있다(Rideout & Stefanis, 2001; Cregan *et al.*, 2002). 실험동물모델을 이용하여 뇌허혈에 의한 신경세포의 세포자멸사 기전을 연구한 실험에서도 caspase를 억제하였을 경우 세포자멸사가 억제되지 않는 신경세포들이 있음을 보고하였다(Rideout & Stefanis 2001; Zhan *et al.*, 2001). 뿐만 아니라 경우에 따라서는 caspase가 정상적으로 활성화 되어도 caspase에 대한 억제가 신경세포의 세포자멸사 자체를 억제하지는 못하는 것으로 판명되었다(Stefanis *et al.*, 1999; D'Mello *et al.*, 2000). 따라서 이러한 연구결과들은 caspase가 억제 되더라도 세포자멸사를 유발시킬 수 있는 독립적인 기전이 가동됨을 암시하는 것이다. 비교적 최근에 규명된 AIF (apoptosis-inducing factor)는 분자량이 67 kDa인 caspase 비의존성 세포자멸사 효과기 (effector)로서, caspase계열의 활성화와 관계 없이 세포자멸사를 유발시키는 것으로 알려져 있다(Susin *et al.*, 1999; Daugas *et al.*, 2000). AIF는 미토콘드리아 (mitochondria)의 속막과 바깥막 사이에 존재하는 플라보단백 (flavoprotein)으로서 세포가 특정한 세포사멸신호를 받게 되면 미토콘드리아로부터 핵 (nucleus)으로 전위하는 특징을 갖고 있다(Zhu *et al.*, 2003). 또한 AIF는 caspase 계열의 활성화와 무관하게 분리된 핵 또는 세포에서 염색질 (chromatin)의 농축 (condensation)과 DNA의 절단현상을 일으킴이 입증되었다(Susin *et al.*, 1999, 2000; Daugas *et al.*, 2000). 아데노바이러스 (adenovirus)를 매개로 AIF를 overexpression 하였을 경우 Bax 또는 caspase와는 무관하게 신경세포가 사멸한다는 Cregan 등(2002)의 연구결과 역시 AIF가 독립적인 기전에 의해 신경세포의 사멸을 유발한다는 주장과 일치한다. 뿐만 아니라 p-53에 의해 유발되는 신경세포의 세포자멸사는 caspase 계열을 차단했을 경우에도 효과적으로 일어남이 보고되었다(Cregan *et al.*, 2002). 이처럼 caspase 계열의 작용과 관계없이 세포사멸을 단독으로 유발시킬 수 있는 AIF를 통하여 세포자멸사의 기전과 이에 관여하는 인자들에 대한 연구 계기를 만들어 주었다.

이처럼 AIF는 뇌의 허혈-저산소손상 기전의 중요한 부분을 차지하고 있으며 이와 같은 손상에 취약한 미성숙 뇌의 바닥핵 (basal ganglia)에서 AIF의 발현양상 변화를 관찰해야 할 필요성이 높은 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐 뇌의 바닥핵 (basal ganglia)을 이루는 주 요소로서 허혈-저산소손상에 취약한 꼬리조가비핵 (caudate-putamen)과 창백핵 (globus pallidus)에서의 손상 후 시간에 따른 AIF

의 발현양 변화를 생후 7일 된 신생흰쥐에서 확인하고 이를 정량분석하였다. 또한 본 연구에서는 AIF와 별아교세포 (astrocyte)의 표지단백인 GFAP (glial fibrillary acidic protein)에 대한 이중면역형광염색 (double-immunofluorescence staining)을 이용하여 AIF의 발현변화가 신경세포는 물론 바닥핵을 구성하는 다른 뇌세포에도 나타날 수 있음을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 온동맥폐쇄 (common carotid artery occlusion)를 통한 동물모델의 구축

실험군으로는 생후 7일 된 SD (Sprague-Dawley) 흰쥐를 사용하였다. 실험동물의 마취는 zoletil-50<sup>®</sup>을 복강 (abdominal cavity)에 주사하여 유도하였으며 노출된 온목동맥 (common carotid artery)을 결찰하여 뇌허혈을 유도하였다. 마취의 유도에서 회복까지의 전 과정에서 실험동물의 체온은 37°C가 유지되도록 하였으며 수술이 끝난 다음에는 저산소증 (hypoxia)을 유발시키기 위하여 바로 6%의 산소가 공급되는 저산소탱크에 2시간 동안 방치하였다 (Fig. 1A). 이 때 컨테이너 속의 산소농도는 O<sub>2</sub> 분석기 (O<sub>2</sub> Analyzer) (Fig. 1B)를 사용해 측정하였다. 세포자멸사를 확인하기 위한 실험에서는 허혈-저산소증의 유발 후 3시간, 6시간, 그리고 12시간 경과 후에 각각 고정하였으며 AIF의 발현변화를 알아보기 위한 실험에서는 허혈-저산소증의 유발 후 12시간, 24시간, 그리고 48시간 경과 후에 각각 고정하였다. 대조군 역시 생후 7일 된 SD 흰쥐를 사용하였으며 온목동맥의 결찰과 저산소증의 유발을 제외한 마취의 유도 및 회복과정을 실험군에서와 동일하게 수행하였다.

### 2. DNA break labeling (TUNEL assay)

세포자멸사 (apoptosis)때 일어나는 nuclear DNA fragmentation을 알아보기 위해 in-situ apoptosis detection kit 인 Apoptag kit (Oncor<sup>TM</sup>)을 사용하였다. 먼저 실험동물을 ether로 마취시킨 후 Bouin's fluid로 관류고정한 다음 뇌를 추출하여 brain-slicer로 부위별로 뇌를 자른 후에 동일 고정액에 4시간동안 후고정하였다. 그런 다음 Paraplast에 포매하여 4 μm 두께의 관상 연속절편 후 xylene에서 탈파라핀화 (deparaffinization)하고 PBS (0.05 M, pH 7.4)로 5분간 2회 세척하였으며 endogenous peroxidase quench를 위해 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 5분간 실온에서 반응시켰다. 그런 다음 reaction buffer 2방울에 Tdt (terminal deoxy-transferase) enzyme 1 방울을 가하여 만든 Tdt 용액을 100 μL씩 가하여 37°C에서 약 80분간 반응시켰다. 다시 10 mM PBS로 5분간 3회 세척



Fig. 1. Neonatal SD (Sprague-Dawley) rats in 6% O<sub>2</sub> container (A) and O<sub>2</sub> analyzer used for analysis of O<sub>2</sub> concentration within O<sub>2</sub> container (B). TUNEL positive nuclei (arrows) in caudate putamen after 12 hrs. of hypoxic-ischemic injury (C). Scale Bar=50 μm.

후 anti digoxigenin-peroxidase를 각각의 슬라이드에 점적하여 실온에서 약 30분간 반응시키고 10 mM PBS로 5분씩 3회 세척하였다. 그런 다음 0.02%의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 첨가된 0.05% DAB 용액으로 실온에서 약 5분간 발색시키고 마지막으로 0.5% methyl green으로 1분간 대조염색을 시행한 다음 탈수 및 투명화 과정을 거쳐 현미경으로 관찰하였다.

### 3. AIF 면역조직화학염색 (AIF Immunohistochemistry)

Ether로 마취시킨 신생 흰쥐에 peristaltic pump를 이용하여 0.12 M PBS 용액을 1분간, 그리고 4% paraformaldehyde가 들어있는 phosphate buffer (0.12 M)를 10분간 주입한 다음 안구 앞쪽의 이마뼈 (frontal bone)을 절단하여 두개골을 열고 뇌를 적출 하였다. 뇌절편기 (brain slicer)에 적출한 뇌를 놓은 다음 면도날로 4~6 mm 간격으로 관상절개 (coronal section)하여 관류고정액과 동일한 고정액에 16~18시간 동안 후고정하였다. 12%의 sucrose가 첨가된 0.12 M PBS 용액에 조직을 1시간 동안 담가두고 같은 용액을 1시간마다 두 번 더 교환해 주었으며, 16%의 sucrose와 18%의 sucrose가 첨가된 0.12 M PBS 용액들도 같은 방법으로 3번씩 교환해 주었다. Sucrose 처리를 한 조직은 냉각포매제 (OCT compound)에 포매하여 액체질소에 의해 온도가 낮아진 알코올 속에 넣어 30초 동안 얼렸다. 냉동절단 (cryosection)은 10 μm 두께로 시행하였으며 젤라틴 (gelatin)으로 코팅된 슬라이드에 부착시켰다. 면역조직화학 염색의 각 단계는 먼저 0.012 M PBS에서 5분씩 3회 세척한 후 rabbit anti-AIF (1 : 2,000; K0411006 KOMA Biotech™) 다클론항체 (polyclonal antibody)와 0.5 mg/mL bovine serum albumin, 그리고 1.5% goat serum이 들어있는 1차 항체 용액에서 24시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 0.012 M PBS에서 5분씩 3회 세척한 다음 biotinylated anti-rabbit IgG (Vectastain kit™)를 1 : 200으로 희석하여 30분 동안 실온에서 반응시켰다. 다시 0.012 M PBS에서 5분씩 3회 세척하고 avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain kit의 A용액 1 : 100, B용액 1 : 100, 0.3% Triton X-100)에서 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이 후 다시 0.012 M PBS에서 5분씩 3회 세척하였고 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 포함한 DAB 용액에서 7~12분간 실온에서 발색반응을 시켰다.

### 4. 이중면역형광염색 (Double Immunofluorescence Staining)

조직의 처리에서부터 항체의 반응까지는 위의 면역조직화학염색과 유사한 과정으로 진행하였다. 다만 일차항체로는 polyclonal rabbit anti-AIF (1 : 2,000 K0411006 KOMA Biotech™)와 monoclonal mouse anti-GFAP (1 : 500; 61566 BD Bioscience™)를 사용하여 24시간 동안 4°C에서 반응시켰으며 이차항체로는 Cy3-linked mouse IgG (1 : 500; PA-43002 Amersham Bioscience™)와 Cy2-linked rabbit IgG (1 : 500; PA42004 Amersham Bioscience™)를 사용하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이차항체의 반응이 끝난 후에는 0.012 M PBS에서 5분씩 3회 세척 후 바로 dry mounting medium을 사용해 coverglass를 씌웠다. 관찰은 공초점주사

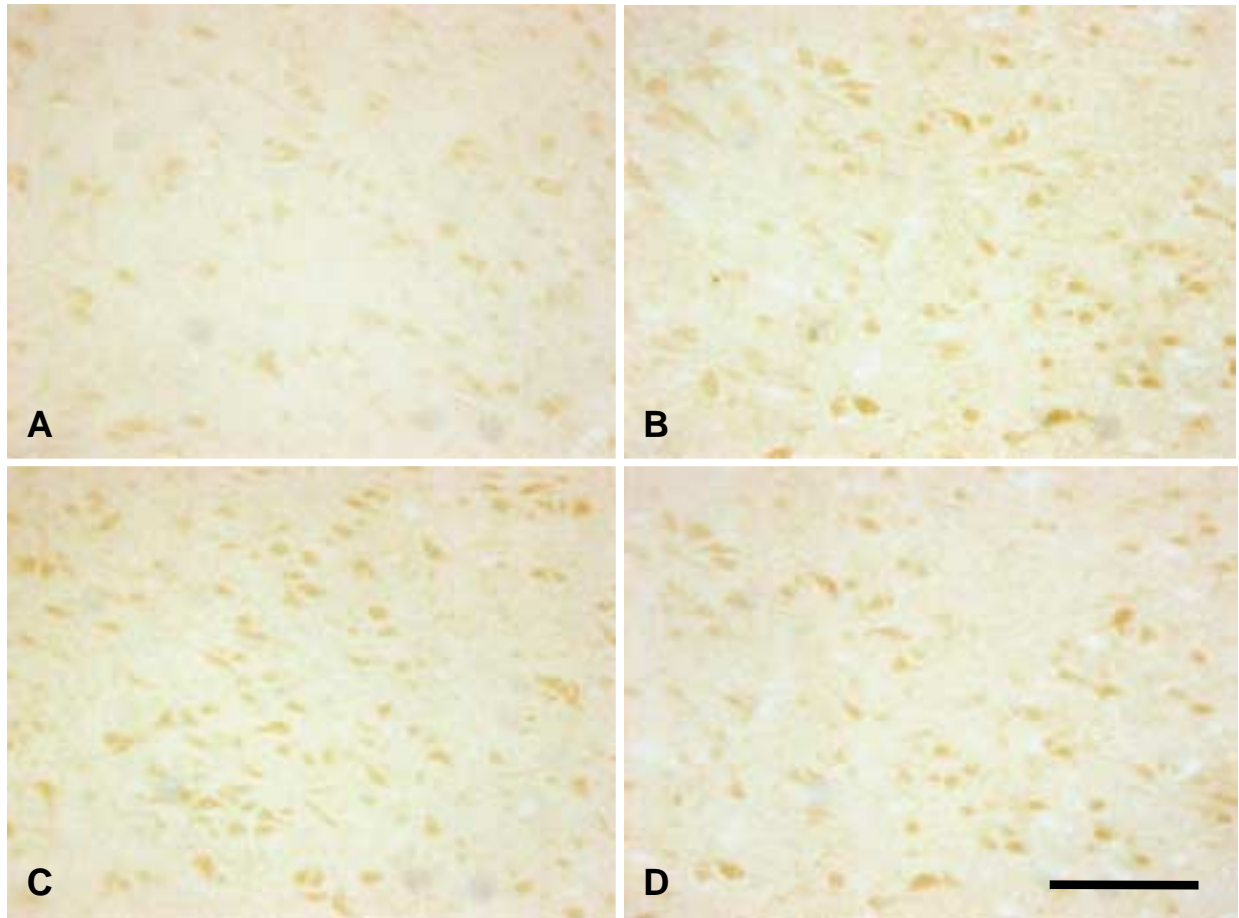


Fig. 2. Changes of AIF immunoreactivity in caudate putamen after hypoxic-ischemic injury. A. control, B. 12 hrs. C. 24 hrs. D. 48 hrs. Scale Bar=50  $\mu$ m.

현미경 (confocal microscope, Carl Zeiss LSM 510 META™) 을 통해 같은 현미경 시야에서 각각의 형광이미지를 얻고 이를 다시 합체 (merge)하여 GFAP 양성의 세포에서 AIF가 발현되는지 여부를 관찰하였다.

#### 5. AIF Western Blotting

흰쥐의 머리를 길로틴 (guillotine)으로 절단해 뇌를 적출한 다음 뇌절편기를 이용해 2 mm 두께의 관상단면절편을 만들고 직경 1 mm의 주사바늘을 이용해 바닥핵의 꼬리조가비핵 (caudate putamen)과 창백핵 (globus pallidus) 부위에서 뇌조직을 추출하였다. 단백질의 양이 각각 50  $\mu$ g으로 동일하게 만든 무세포 추출물에 증류수와 bromophenol blue dye를 첨가한 후 5분간 끓여 식힌 후 원심분리하여 전기영동 (electrophoresis)하였다. 전기영동이 끝난 후에는 4°C에서 12시간 동안 단백질을 nitrocellulose filter로 이동 (transfer)시켰다. Nitrocellulose filter를 분리한 다음에는 1:4,000으로 희석한 polyclonal rabbit anti-AIF (K0411006

KOMA Biotech™)로 3시간 동안 처리하였다. 다시 1:2,000으로 희석한 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (170-6515 Biorad™)를 2차항체로 사용하여 3시간 처리한 후 enhanced chemiluminescence (ECL Western blotting detection reagents, Amersham Pharmacia Biotech™) 방법으로 발색하였다. 최종적으로 결과에 대한 정량적인 분석을 위해 이미지분석시스템 (image-analysis system, Vilber Lourmat™)을 사용해 면적백분율 (area percentage)을 구하였다.

## 결 과

### 1. 신경세포의 세포자멸사 (TUNEL assay)

실험적으로 허혈-저산소손상 (hypoxic-ischemic injury)을 유발시켰을 때 바닥핵 (basal ganglia)에 존재하는 세포들에서 세포자멸사 (apoptosis)가 일어나는지 여부를 파악하기 위한 간접적인 방법으로 수술 후 바로 저산소탱크에서 2시간 방치한 다음 3시간과 6시간, 그리고 12시간이 경과한 신

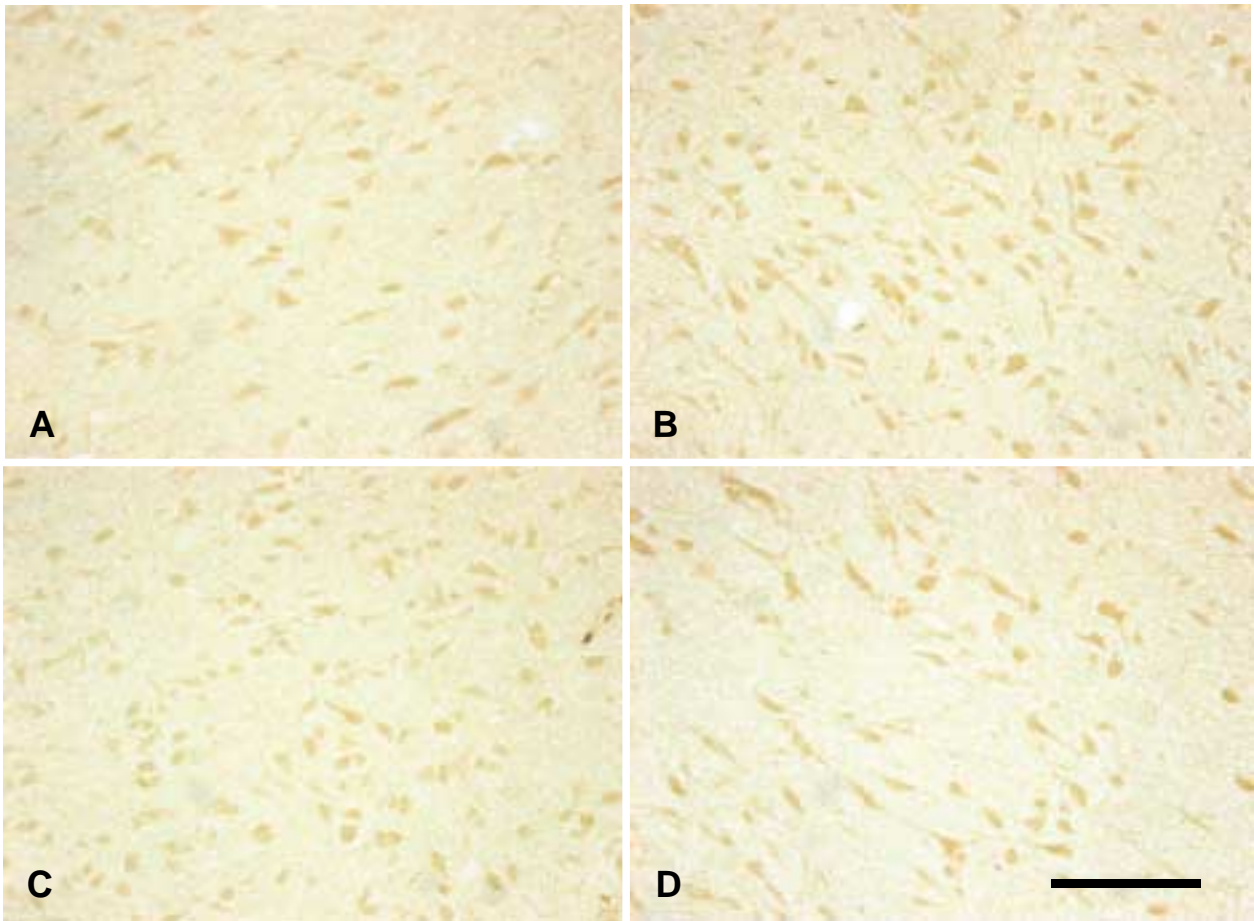


Fig. 3. Changes of AIF immunoreactivity in globus pallidus after hypoxic-ischemic injury. A. control B. 12 hrs. C. 24 hrs. D. 48 hrs. Scale Bar=50µm.

생흰쥐들을 대상으로 각각 TUNEL assay를 시행하였다. TUNEL 양성반응은 수술 후 12시간이 지난 군의 바닥핵에서 관찰할 수 있었으며 수술 후 3시간과 6시간이 지난 군에서는 TUNEL 양성반응이 거의 관찰되지 않았다. TUNEL 양성반응을 보인 신경세포의 핵은 바닥핵 중에서도 주로 꼬리조가비핵(caudate putamen)에서 많이 관찰 되었으며 (Fig. 1C) 대조군 신생흰쥐의 뇌에서는 바닥핵 뿐만 아니라 대뇌겉질(cerebral cortex), 해마(hippocampus) 등의 부위에서도 TUNEL 양성반응을 보인 세포의 핵을 거의 관찰할 수 없었다.

2. AIF에 대한 면역조직화학염색 (Immunohistochemistry)

허혈-저산소손상(hypoxic ischemic damage)을 유발시킨 신생 흰쥐의 바닥핵에서 세포속 AIF의 양적 변화를 살펴 보기 위해 수술 후 경과 시간대별로(12, 24, 48시간) 각각 AIF에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 대조군과 비교 하였다. AIF에 대한 면역염색은 정상 대뇌반구(cerebral

hemisphere)의 모든 부위에서 비교적 고르게 확인되었으나 그 발현 정도는 비교적 작았다. 이에 반해 경색이 유발된 신생흰쥐의 바닥핵에서는 꼬리조가비핵을 중심으로 창백핵, 그리고 배쪽창백핵(ventral pallidum) 등에서 AIF에 대한 면역염색성이 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 꼬리조가비핵에서의 AIF로 면역염색된 세포의 수는 허혈-저산소손상을 유발시킨 군에서 대조군에 비해 증가되었으며 이러한 변화는 수술 후의 경과 시간에 관계없이 비슷한 정도로 나타났다(Fig. 2). 창백핵에서의 AIF 변화 역시 꼬리조가비핵과 비슷하게 증가하는 양상으로 나타났으나 그 변화의 정도가 꼬리조가비핵에서처럼 현저하지는 않았으며, 48시간 경과군에서는 AIF로 면역염색된 세포의 수가 다시 대조군의 수준으로 줄어드는 것이 관찰되었다(Fig. 3).

3. 바닥핵(basal ganglia)의 신경아교세포(neuroglial cell)에서의 AIF 발현

흰쥐 바닥핵의 허혈-저산소손상(hypoxic-ischemic dam-

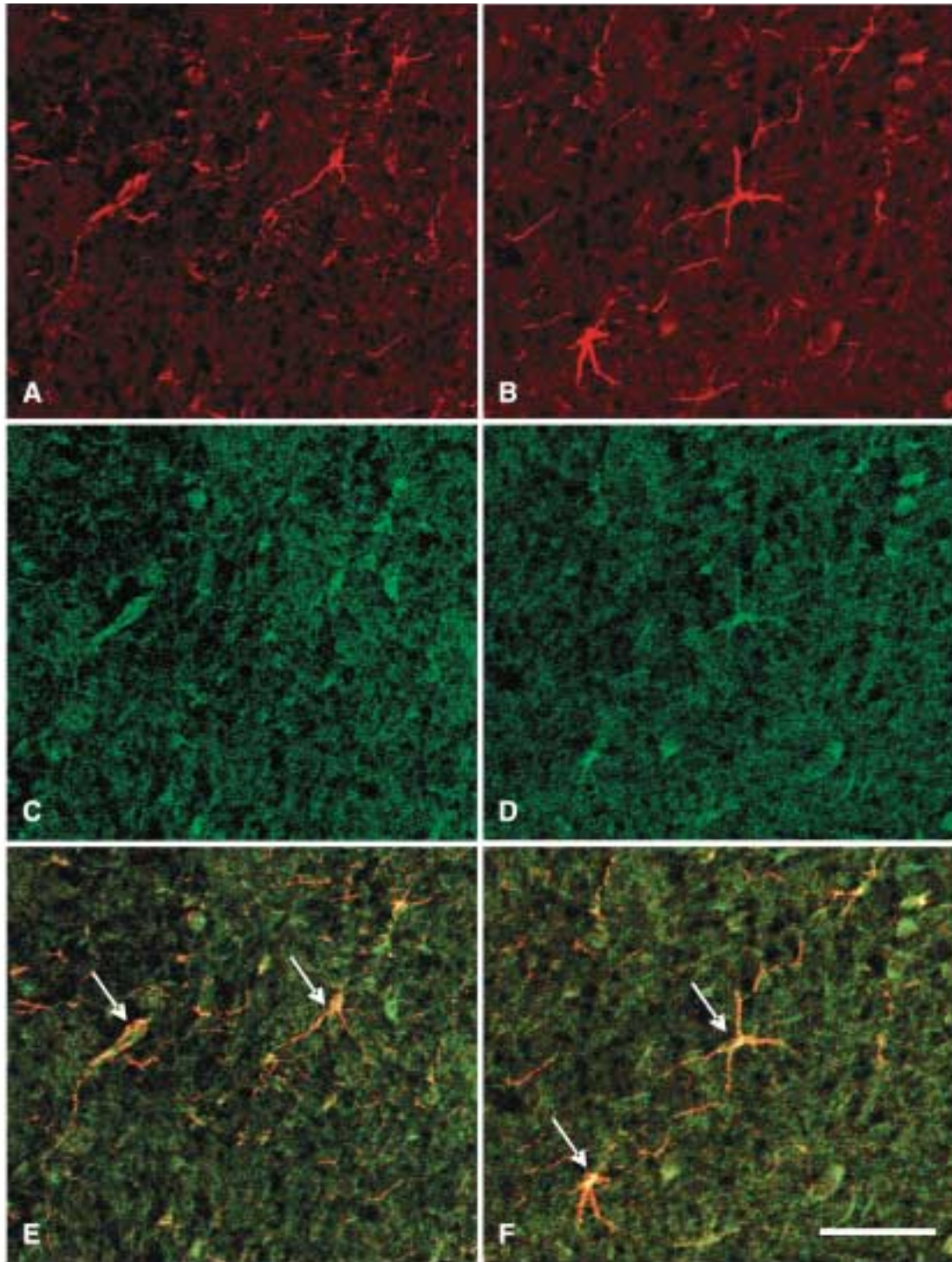


Fig. 4. Double immunofluorescence staining with GFAP and AIF in basal ganglia of neonatal rat brain. GFAP positive glial cells (astrocytes) in caudate putamen (A) and globus pallidus (B) after 24 hrs. of hypoxic-ischemic injury. AIF positive cells in caudate putamen (C) and globus pallidus (D) after 24 hrs. of hypoxic-ischemic injury. Merged images of A to C (E) and B to D (F). Note localization of AIF in glial cells (arrows). Scale Bar=25  $\mu$ m

age)에 의한 AIF의 발현이 단지 신경세포에 국한되는지 여부를 확인하기 위하여 수술 24시간 경과 군에서 AIF와 별

아교세포 (astrocyte)에서 특이적으로 발현되는 단백질인 GFAP에 대한 이중면역형광염색 (double-immunofluores-

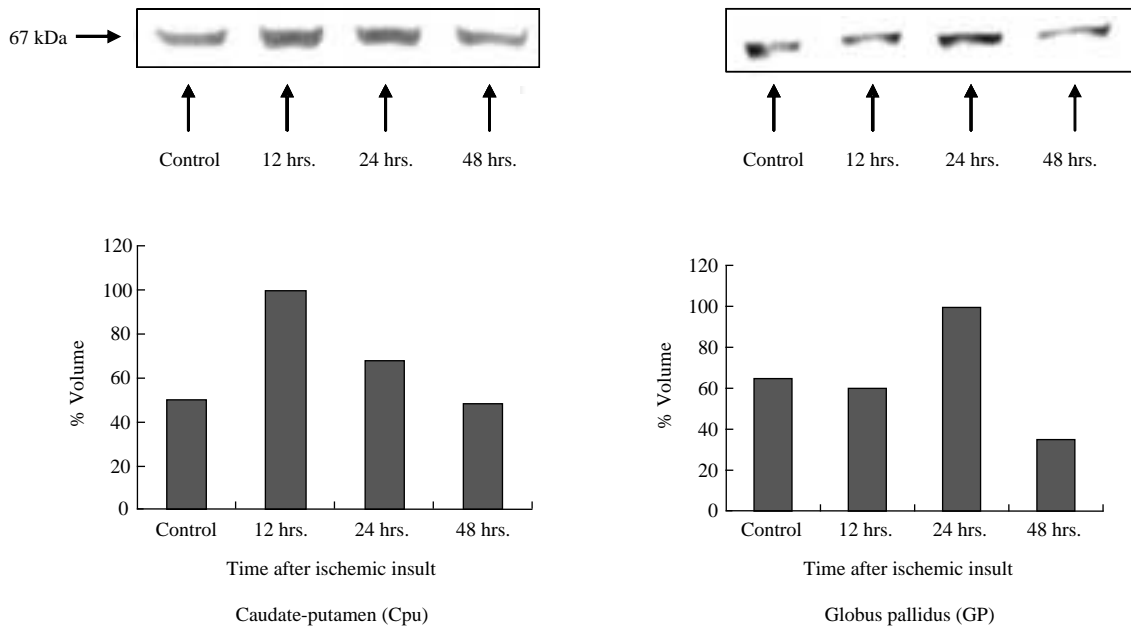


Fig. 5. Western Blot analysis of AIF according to the time course after hypoxic-ischemic injury in caudate putamen (left) and globus pallidus (right).

cence staining)을 시행하였다. GFAP에 의해 면역염색된 세포는 세포돌기들이 뚜렷하게 관찰되는 전형적인 별아교세포의 형태를 취하고 있으며 (Fig. 4A, B) AIF가 발현되는 세포들 (Fig. 4C, D) 중 일부는 별아교세포에서도 발현됨이 동일한 현미경 시야를 합체 (merge)해본 결과 확인되었다 (Fig. 4E, F). 별아교세포에서의 AIF 발현은 꼬리조가비핵과 창백핵을 비롯한 바닥핵의 거의 모든 부위에서 관찰되었으며, 이처럼 신경세포 뿐만 아니라 신경아교세포에서도 AIF가 발현되는 현상은 신생흰쥐의 바닥핵에서 뿐만 아니라 대뇌겉질 (cerebral cortex)의 여러 부위에서도 나타나는 현상이 확인되었다 (그림 생략).

#### 4. AIF의 시간대별 발현양상의 변화 (Western Blotting)

신생흰쥐의 뇌조직에 대한 허혈-저산소손상 (hypoxic ischemic damage)으로 초래되는 바닥핵에서의 AIF의 발현변화를 정량적으로 살펴보기 위해 꼬리조가비핵과 창백핵에서 AIF에 대한 Western Blotting을 수술 후 12, 24시간, 그리고 48시간이 지난 군에서 각각 시행하였다. 먼저 꼬리조가비핵에서의 AIF의 발현 양을 면적백분율 (% area)로 계산하였을 경우 수술 후 12시간이 경과하였을 때 가장 많은 발현양 (100%)을 보였고 24시간 경과군에서는 68%, 48시간 경과군에서는 대조군 (50%)과 비슷한 48%를 나타냈다. 한편 창백핵에서의 AIF 발현양은 수술 후 24시간이 경과하였을 때 가장 많은 발현양 (100%)을 보였고 12시간 경과군과 48시간 경과군에서는 각각 60%와 35%로 나왔으며 특

히 48시간 경과군에서는 대조군 (65%)보다 AIF의 발현양이 현저히 적은 것으로 나타났다 (Fig. 5).

### 고 찰

흰쥐의 바닥핵 (basal ganglia)은 사람에서와 유사하게 보통 줄무늬체 (선조체, corpus striatum), 배쪽줄무늬체 (ventral striatum), 배쪽창백핵 (ventral pallidum), 시상밑핵 (subthalamic nucleus) 그리고 흑색질 (substantia nigra) 등으로 구성된다. 이 중에서 꼬리조가비핵 (caudate-putamen)과 창백핵 (globus pallidus)으로 이루어진 줄무늬체는 흰쥐 대뇌의 바닥핵을 형성하는 주된 요소이다. 본 연구의 결과에서 알 수 있듯이 바닥핵에서 AIF 발현양의 변화는 손상 후의 시간대별로 비교적 현저하게 나타났으며 이로써 허혈-저산소손상이 아직 미성숙한 바닥핵의 신경세포들에게 커다란 위험요소로 작용하게 됨을 알게 되었다. 뿐만 아니라 바닥핵에 존재하는 신경아교세포 (neuroglial cell)에서도 AIF가 발현됨을 알 수 있었으며 이는 미성숙 뇌의 바닥핵에 가해지는 허혈-저산소손상으로 초래되는 세포자멸사의 기전이 단지 신경세포에만 국한되어 나타나는 것이 아님을 보여주고 있다. 허혈-저산소손상에 의해 바닥핵의 세포들에서 발현되는 AIF의 양적인 변화는 손상 후 12시간 (꼬리조가비핵) 또는 24시간 (창백핵) 경과 후에 가장 높게 나타났으며 48시간 경과군에서는 다시 대조군 수준으로 떨어지거나 대조군보다 오히려 더 적게 발현되는 양상을 보였다. 미성숙 뇌의

허혈-저산소손상에 의한 AIF의 핵전위 (nuclear translocation)를 확인한 Zhu 등(2003)은 대뇌겉질(cerebral cortex)과 해마복합체(hippocampal formation) 등의 부위에서 핵으로 전위된 AIF에 대한 정량분석을 통해 부위별로 약간의 차이는 있지만 대체로 손상 후 14시간 이내에 가장 높게 나타나는 것으로 보고하였다. 본 연구결과에서는 AIF의 발현양 증가가 전반적으로 이보다 늦게 나타나는 것으로 보아 AIF의 핵전위는 발현양의 변화에 앞서 나타나는 현상임을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 Zhu 등(2004)은 신생원쥐의 뇌에서 허혈-저산소손상 후 나타나는 caspase 계열의 활성화와 AIF의 핵전이(nuclear translocation)에 앞서 산화질소(nitric oxide, NO)의 활성이 증가함을 보고하였는데 줄무늬체에서의 NO의 활성변화가 손상 후 3시간과 8시간에 가장 높게 나타나고 그 후 점차 감소되는 추세를 보여 이 역시 본 연구에서 나타난 AIF의 양적 변화와 시간적으로 잘 조화되는 것을 알 수 있다. 따라서 미성숙 뇌에 유발되는 허혈-저산소손상은 일반적으로 산화질소의 활성 증가와 AIF의 핵전이, 그리고 AIF 발현양의 증가라는 순차적 변화를 예견할 수 있다. 하지만 본 연구에서는 바닥핵에서의 AIF 발현양의 변화만을 관찰한 것이므로 AIF의 핵전위와 이보다 앞서 나타나는 산화질소의 활성변화, 그리고 AIF 발현양의 증가가 실제로 미성숙 뇌의 모든 부위에서 일반적으로 나타나는 현상인지를 판단하기 위해서는 바닥핵 뿐만 아니라 이들 각 부위에서 AIF 발현양의 변화에 대한 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다.

별아교세포(astrocyte)의 표지단백인 GFAP와 AIF에 대한 이중면역염색을 시행한 결과에서도 알 수 있듯이 신생원쥐 뇌의 바닥핵에 존재하는 신경아교세포에서도 AIF가 발현되었다. 이는 허혈-저산소손상에 의한 세포사멸기전이 신경세포에만 국한되어 나타나는 것이 아니며 따라서 미성숙한 뇌의 바닥핵에서의 세포사멸이 보다 광범위하게 나타나게 됨을 보여주고 있다. 본 연구에서는 GFAP 양성의 신경아교세포에 대한 허혈-저산소손상 후의 시간적 변화에 따른 AIF 변화의 정량적 분석은 할 수 없었고 단지 손상 후 24시간 경과군에서 AIF의 발현이 신경아교세포에서도 뚜렷이 나타남을 확인할 수 있었으므로 신경아교세포에서의 손상 후 AIF의 양적 변화가 신경세포와 동일할 것인지에 대한 의문은 향후 보완실험을 통해 밝혀낼 예정이다. 다만 최근 Anna 등(2005)은 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)에 의한 신경아교세포의 일종인 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)의 사멸기전에 AIF가 관여함을 보고하였으며, 미성숙 뇌의 허혈-저산소손상기전에 관여하는 산화질소(NO)에 의한 희소돌기아교세포의 세포사멸사에도 AIF가 관여함이 보고된 바 있다(Baud *et al.*, 2004). 이는 미성숙 뇌의 손상기전에 있어서 AIF가 관여하는 세포가 신경세포에만 국한되는 것이 아님을 보여주는 증거로서 신경

아교세포의 손실과 관련된 기능적 의미를 찾아보는 것 역시 향후 허혈-저산소손상에 의한 미성숙 뇌의 병태생리를 연구함에 있어서 중요할 것으로 사료된다. 끝으로 본 연구를 통하여 미성숙 뇌의 바닥핵을 구성하는 각종 세포들은 허혈-저산소손상에 의해 유발되는 세포사멸사를 겪는 과정에서 AIF가 밀접하게 관여함을 알 수 있었으며 향후 AIF와 관련한 미성숙 뇌에서의 허혈-저산소 손상이전을 뇌의 각 부위별로 계속 연구하여 이에 대한 구체적인 자료를 구축할 계획이다.

## 참 고 문 헌

- Anna J, Mariola M, Krzysztof T, Lukasz K, Cedric SR, Krzysztof S: Tumor necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor. *Brain* 128: 2675-2688, 2005.
- Baud O, Li J, Zhang Y, Neve RL, Volpe JJ, Rosenberg PA: Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *Eur J Neurosci* 20(7): 1713-1726, 2004.
- Bursch W, Ellinger A: Autophagy-a basic mechanism and a potential role for neurodegeneration. *Folia Neuropathol* 43 (4): 297-310, 2005.
- Chang YP: Cellular and biochemical mechanism of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Korean Pediatr Soc* 45: 560-567, 2002.
- 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* 158: 507-517, 2002.
- Cryns V, Yuan J: Proteases to die for. *Genes Dev* 12: 1551-1570, 1998.
- D'Mello SR, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P: Caspase-3 is required for apoptosis-associated DNA fragmentation but not for cell death in neurons deprived of potassium. *J Neurosci Res* 59: 24-31, 2000.
- 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* 14: 729-739, 2000.
- Kabakus N, Ay I, Aysun S, Soylemezoglu F, Ozcan A, Celasun B: Protective effects of valproic acid against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *J Child Neurol* 20(7): 582-587, 2005.
- Rideout HJ, Stefanis L: Caspase inhibition: a potential therapeutic strategy in neurological diseases. *Histol Histopathol* 16: 895-908, 2001.
- Shin DH, Lee E, Kim JW, Kwon BS, Jung MK, Chang YP: Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 354: 64-68, 2004.

- Stefanis L, Park DS, Friedman WJ, Greene LA: Caspase-dependent and independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons. *J Neurosci* 19: 6235-6247, 1999.
- 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, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G: Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446, 1999.
- Volpe JJ: Neurology of the Newborn, 3rd Ed. Pennsylvania, W.B. Saunders Company, pp. 279-307, 1995.
- Zhan RZ, Wu C, Fujihara H, Taga K, Qi S, Naito M, Shimoji K: Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome-c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 529-540, 2001.
- Zhu C, Qui 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* 86: 306-317, 2003.
- Zhu C, Xiaoyang W, Qiu L, Cacha PS, Henrik H, Klas B: Nitrosylation precedes caspase-3 activation and translocation of apoptosis-inducing factor in neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurochem* 90: 462-471, 2004.

# Changes of AIF (Apoptosis Inducing Factor) in the Basal Ganglia of Neonatal Rat Brain Induced by Hypoxic-ischemic Injury

Young Il Lee

Department of Anatomy, College of Medicine, Dankook University

---

**ABSTRACT** The caudate-putamen is generally referred to as the striatum or neostriatum, which is one of the main components of the basal ganglia and this designation, is especially relevant in the rat. In spite of the fact that it comprises one of the major parts in central nervous system, studies on how seriously vulnerable this area to cerebral ischemia especially in neonates is still remained. In this study, using neonatal (7 days postnatal) rats, we speculated the significance of AIF in the apoptotic neuronal cell death in basal ganglia induced by hypoxic-ischemic injury. For this study, we introduced permanent common carotid artery occlusion and then, exposed to 6% oxygen for 2 hours and the results are as follows:

1. There were tendency of increasing AIF immunoreactivity induced by hypoxic-ischemic insult in neonatal basal ganglia at 12 & 24 hrs after hypoxic-ischemic insult.
2. Western Blotting analysis showed increased AIF expression in basal ganglia at 12 hrs (caudate-putamen) & 24 hrs (globus pallidus) after hypoxic-ischemic insult.
3. Evidence of localization of AIF in glial cells as well as in neurons obtained by double-immunofluorescence staining.

Our results seem to provide evidences on the involvement of AIF in the apoptotic neuronal cell loss with hypoxic-ischemic insult in neonatal rat. Furthermore, localization AIF in glial cells as well as in neurons suggests involvement of neuroglial cells in the apoptotic pathway in neonatal basal ganglia induced by hypoxic-ischemic injury.

---

**Key words** : Hypoxic-ischemic injury, AIF, Basal ganglia, Neonate, Rat, Neuroglial cell