

만성 저산소 환경에서 일차 배양된 신경세포에 recombinant erythropoietin이 미치는 영향과 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)와의 상호 작용

김 현

고신대학교 의과대학 해부학교실

Effects of recombinant erythropoietin and interaction with brain-derived neurotrophic factor in primary cultured cortical neuron in chronic hypoxia.

Hyun Kim

Department of Anatomy, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Chronic hypoxia has been associated with change in neurovascular behavior, mediated, in part, by erythropoietin (EPO) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). EPO, a hematopoietic growth factor, and BDNF could act as a neurotrophic factor. In the present study, I investigated the characteristics of BDNF and EPO expressions by primary cultured cortical neuron in vivo and in vitro and tested the hypothesis that EPO and BDNF serve protective functions in chronic hypoxia. In addition to expressing EPO, neurons increased their expression of BDNF, markedly with treatment of recombinant EPO under hypoxia. Also exogenous EPO increased phosphorylation of trkB, receptor of BDNF. Finally, exogenous EPO decreased apoptosis of cultured neurons as evaluated by expression of PARP via its own function and induction of BDNF expression. These data support an interaction with EPO and BDNF in maintenance of primary cultured cortical neuron in chronic hypoxia.

Key words : erythropoietin (EPO), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), trkB, chronic hypoxia

서 론

조산(premature birth)은 정신지체(mental retardation), 인식기능(cognitive function) 저하와 간질성 발작(epileptic seizures)등의 운동 장애 (motor handicap) 등의 발생빈도를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 조산아의 두 가지 중요한 문제는 뇌실내출혈 (intraventricular

hemor) 및 만성폐질환 (chronic lung disease)으로 알려져 있으며, 뇌실내출혈이나 만성폐질환등은 주산 (perinatal period)에서 신생아의 사망률을 증가시키는 중요한 요인 중의 하나이다.¹⁾(Vannucci, 1990) 그 동안 저산소증이 세포사멸(cell death)을 유발하는 기전에 대해 많은 보고가 있다. 그러나 저산소증으로부터 세포를 보호할 수 있는 방법은 아직 뚜렷하게 증명되지 않고 있다.²⁾(Bernaudin et al., 2002)

최근에 신생아의 저산소증에서 신경손상의 기전을 밝히고 그 치료법을 개발하는 분야에 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 BDNF와 같은 neurotrophic factor나 VEGF 그리고 EPO와 같은 cytokine의 역할에 주목하고

교신저자 : 김 현
주소: 602-703, 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 해부학교실
TEL. 051-990-6410 FAX. 051-990-6431
E-mail: drhkim@kosin.ac.kr

· 본 연구는 고신대학교 의과대학 연구비 일부 지원에 의해 이루어짐

만성 저산소 환경에서 일차 배양된 신경세포에 recombinant erythropoietin이 미치는 영향과 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)와의 상호 작용

있다. VEGF가 저산소증에서 혈관재형성과 신경세포 방어 기능을 가지고 있음이 보고되었다^{3,4)}.

BDNF는 neurotrophin family의 일종으로서 receptor tyrosine kinase인 trk family receptor와 결합하여 다양한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. Trk receptor family에는 trkA, trkB, trkC등이 있으며 이 중 trkB가 BDNF와 결합하게 된다. BDNF는 발달 중인 중추신경계나 말초 신경계에서 신경세포의 발달, 성장, 분화 등을 증진시키는 것으로 알려져 있으며, 손상된 신경세포의 재생에도 관여하는 것으로 보고되었다. BDNF는 신경아교세포(glia cell)에서 주로 분비하는 것으로 알고 있으나 최근의 연구에서는 신경세포와 혈관내피세포도 분비하는 것으로 보고되고 있다.

저산소증환경에서 BDNF는 신경세포를 방어하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 저산소증 동물모델에서 BDNF를 뇌실강내 주입 (intra-ventricular injection)하여, 신경 손상을 감소시켰다는 보고가 있다. 특히 만성저산소증은 astrocyte나 brain endothelial cell에서의 BDNF의 생산과 분비를 현저히 증가시킨다. 이러한 보고들과 실험 결과들은 BDNF가 저산소증에 의한 뇌세포의 세포사멸(apoptosis)을 막아주는 것을 증명하고 있다.

또한 그 동안 조혈작용에 관여하는 것으로 알려진 EPO가 신경세포방어 기능을 가지고 있음이 알려졌다⁵⁾.

EPO는 주로 성인의 신장에서 생산되는 것으로 알려져 있으나 그 외의 조직 즉, 폐나 고환, 그리고 뇌에서도 발현되는 것으로 확인되었다. 그리고 이러한 조직에서 다양한 기전을 통하여 특징적인 조절기능을 가지고 있음이 밝혀졌다. 조직학적으로 뇌에서는 주로 cortex와 hippocampus 그리고 caudate nucleus에서 발현되는 것으로 알려져 있으나, EPO mRNA는 그 외의 부위에서도 발현하고 있다고 보고되었다.^{6,7)} 나아가 EPO는 사람의 성인 뇌척수⁸⁾, 별모양아교세포(astrocyte)⁹⁾, 그리고 신경세포¹⁰⁾등에서 발견되었다.

EPO는 쥐의 뇌에서 저산소증에 반응하여 그 발현이 증가하는 것으로 알려져 있으며¹¹⁾, 다양한 in vivo, 혹은 in vitro 뇌손상모델에서 EPO가 신경세포를 방어하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다¹²⁾. 저산소 환경에서의 EPO가 발현이 증가하는 것은 hypoxic-inducible factor (HIF)에 의해 유도 되는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 최근에

는 EPO를 투여한 경우 중추신경계 전구세포들의 분화와 생존을 유도하며¹⁴⁾, 저산소증에 노출된 후 신경세포들의 분화를 유도하는 것으로 보고되고 있다¹⁵⁾.

최근 저자의 연구 결과에서 BDNF를 투여한 뇌혈관내피세포에서 VEGF의 receptor 중의 하나인 FLK1의 발현이 증가한 것을 증명한 바 있다. 그 결과는 만성 저산소증에서 적응하는 뇌신경세포들이 다양한 cytokine을 autocrine 혹은 percaline의 방식으로 분비할 뿐 아니라 cytokine이 또 다른 종류의 cytokine의 기능을 유도하는 것으로 가정할 수 있다. 병적 상태에서 세포사멸을 막는 인체의 반응은 cytokine의 상호 작용으로 나타나며, 그 기능이 한층 증폭될 수 있다.

나아가 이러한 상호 작용을 규명하는 것은 만성 저산소증에서의 치료 방법 연구에 있어서도 필수적일 것이다. 이에 저자는 만성 저산소증에서 배양된 신경세포에서 EPO의 투여가 신경세포의 세포사멸을 감소시킬 뿐 아니라 neurotrophic factor의 일종인 BDNF의 작용을 증폭시킴으로 신경세포 방어능력을 증가시킨다는 것을 증명하고자 이 연구를 시행하였다.

연구 대상과 방법

1. 만성저산소 환경에서의 흰쥐 사육

비치명적 만성저산소에 노출시킨 쥐는 임신한 Sprague-Dawley Rat 을 사용하였다. 임신 15일째 되는 흰쥐를 완전히 밀폐된 저산소상자(hypoxic chamber)에서 매일 3시간씩 3일간 사육하였다. 저산소가스는 10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂로 구성하였다. (한국산업가스주) Hypoxia에서 3일 간 사육한 흰쥐를 임신 18일째 경추 탈골을 시행하여 희생시킨 후 태아를 추출하였다. 쥐의 뇌를 추출하여 western blotting을 위한 단백질 추출과 조직학적 연구를 위한 고정을 시행하였다. 이때 실험에 사용한 쥐는 실험군과 대조군으로 구분하여 각각 6마리였다.

2. 배자 대뇌 피질 신경세포의 일차 배양

임신 15일 된 mice로 부터 배자를 추출하고 그 배자의 종뇌(telencephalon)로 부터 Sestan 등¹⁶⁾이 서술한 방법에 의해 신경세포를 분리하였다. 분리된 세포들을

poly-L-ornithine과 laminin으로 코팅된 plastic petri dish에서 배양을 시작하였다. 배양액은 neurobasal media에 sodium pyruvate solution, Fetal Bovine Serum, L-glutamine solution, B26 supplement, Pen/strep solution (GIBCO co.)를 조합하여 제조하였다. 세포들은 3일 동안 저산소 환경에 노출시켰다. 이때 완전히 밀폐된 저산소 박스 (hypoxic box)에서 배양하였으며, 저산소가스의 조성은 상기된 것과 같았다. 배양 중 매일 배양액의 반을 교체하였다. 배양을 시작한 지 3일 후 저산소환경에 노출된 신경세포의 배양액에 recombinant EPO (Santa Cruz Biotechnology Inc)를 5 unit를 투여하였다. 그 후 3일 간 계속해서 저산소증에서 배양하였다.

3. Western Blotting 기법

일차 배양한 발생 15일 신경세포와 발생 18일 된 배자의 뇌에서 단백질을 추출하여 western blotting을 시행하였다. 추출 방법은 통상적인 방법을 사용하였다³⁾. Lysates는 modified RIPA buffer(50mM Tris-HCl, pH7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1g/ml Aprotinin, leupeptin, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF)를 이용하여 만들었다. 일차항체로는 anti-PARP(Cell signaling technology, 1:1000), anti-TrkB(Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), anti-PY(Cell signaling technology, 1:1000), anti-BDNF (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000)를 사용하였다. 면역 반응을 감지하기 위해서Pierce supersignal detection reagent (Pierce Co.)를 사용하였으며, membrane을 Kodak hyperfilm에 노출시켰다. 각 band의 density의 정도를 서로 비교하기 위하여 평판스캐너를 이용하여, 현상된 film의 scanned image를 얻었으며, 분석은 KODAK Biomax Program을 이용하였다.

4. 면역조직화학염색 (Immunohistochemistry)

뇌에서의 BDNF의 발현을 관찰하기 위하여 통상적인 avidin-biotin complex (ABC) method에 의한 면역조직화화법을 이용하였다. 일차 항체로는 rabbit anti-BDNF (Santa Cruz Biotechnology Inc, 1:100)를 사용하였다.

조직 내에 존재하는 peroxidase의 활성화를 방지하기 위하여 조직절편을 3% H₂O₂가 포함된 60% methanol 용

액에 30분 동안 두었으며, 비특이적 항원-항체 반응을 방지하기 위하여normal blocking solution (10% normal goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% triton X-100 in PBS)에서 60분 동안 반응시켰다. 그 후 1차 항체와 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직절편을 2차 항체 및 avidin-biotinylated enzyme complex reagent (Vector Co.)에 실온에서 각각 30분 동안 반응시켰다. 이때 사용한 2차 항체는 anti-rabbit biotinylated IgG (Vector Co.)를 1:200으로 희석하여 사용하였다. Peroxidase와 결합하는 기질 용액으로 AEC 용액 (VECTOR Co.)을 사용하여 3분간 반응시켰다. 면역 화학 반응이 끝난 조직 절편을 Mayer's hematoxylin 용액 (Sigma Co.)에 1분간 반응시킴으로 대조 염색을 실시하였고, 수용성 봉입액 (Shandon Co.)을 사용하여 봉입한 후, 광학현미경으로 관찰하고 현미경용 ProgRes Digital camera (Jenoptik Co.)를 이용하여 촬영하였다.

결 과

만성 저산소 환경에서 사육된 흰쥐 태아의 대뇌에서 BDNF의 발현

발생 18일 제 배자의 대뇌를 추출하여 BDNF의 발현을 관찰하였다. BDNF는 뇌의 전반에 걸쳐 발현되었으며, 그리고 정상 실험군에서 BDNF의 발현은 신경세포 뿐 만 아니라 혈관내피세포에서도 관찰되었다. 만성 저산소 환경에서 3일 간 사육한 흰쥐의 태아의 뇌에서는 BDNF의 발현이 현저하게 증가하였다. BDNF는 신경세포 뿐 아니라 혈관내피세포에서도 발현이 현저하게 증가하였다 (Fig. 1).

만성 저산소 환경에서 사육한 흰쥐 태아의 대뇌에서 EPO의 발현을 관찰하였다. 정상 실험군에서는 EPO의 발현이 뚜렷하지 않았으나, 만성 저산소 환경에서 사육한 흰쥐 태아의 대뇌에서는 EPO의 발현이 증가하였다. 그 결과는 이전 연구와 일치하였다.

이러한 결과는 만성 저산소 환경이 신경세포의 BDNF와 EPO의 발현을 증가시켰음을 나타내는 것이다.

만성 저산소 환경에서 일차 배양된 신경세포에 recombinant erythropoietin이 미치는 영향과 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)와의 상호 작용

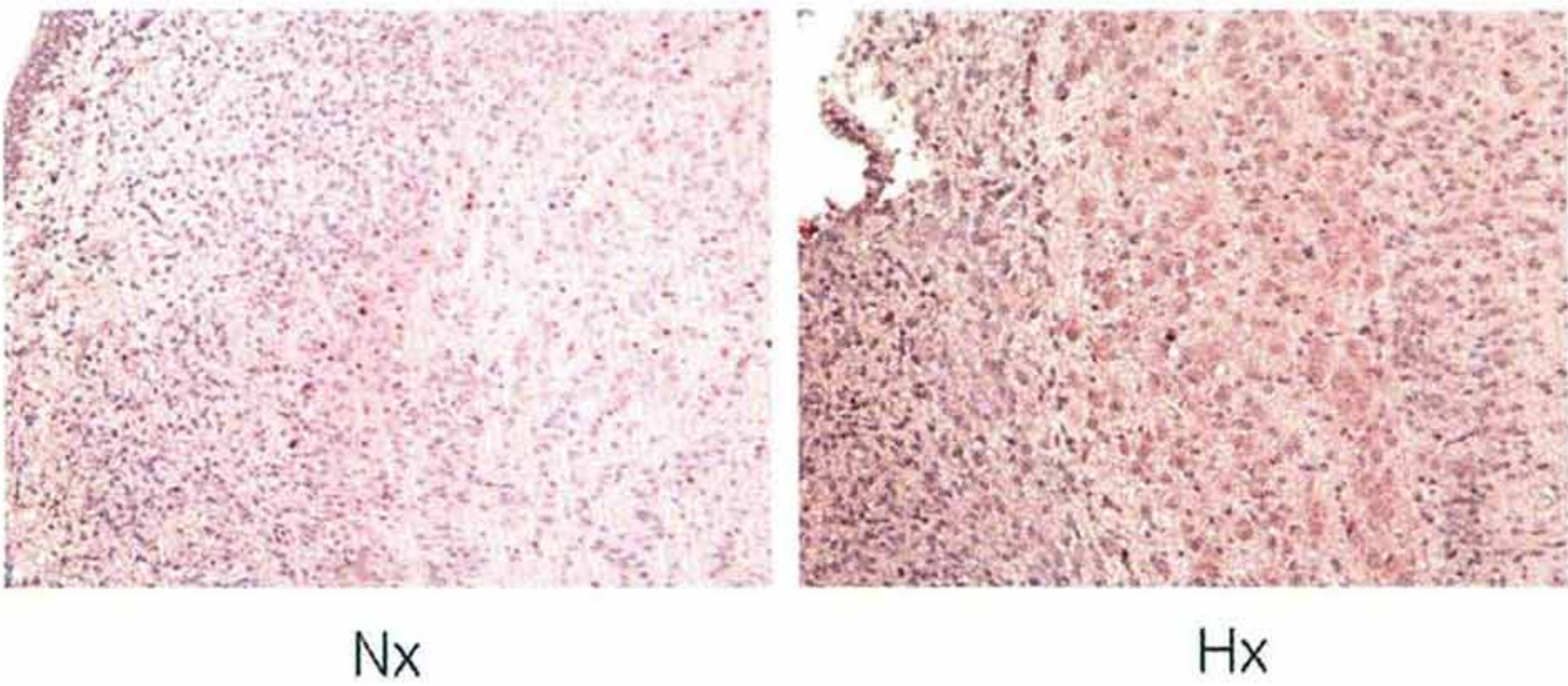


Fig 1. Expression of BDNF in the cerebral cortex of E18 rat. In hypoxia (Hx), BDNF expression increases more than normoxic brain. (Nx : Normoxia, Hx : Hypoxia)

합성된 EPO가 저산소증에 노출된 신경세포의 자살을 막아준다.

EPO가 만성 저산소 환경에 노출된 신경세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 배양 중인 신경세포에 recombinant EPO를 투여한 후 세포 사멸의 정도를 관찰하였다. 세포 사멸을 확인하기 위하여 임신 15일 된 쥐의 대뇌피질 신경세포에서 세포사멸을 나타내는 단백질인 PARP의 발현을 관찰하였다. 5 units의 EPO를 투여한 신경세포에서 PARP의 발현이 현저하게 감소하였다 (fig 2). 이러한 결과는 만성 저산소증이 대뇌피질 신경세포의 사멸을 유도하는 것을 증명하였으며, EPO가 만성 저산소증에 의한 신경세포의 사멸을 방어하는 것을 증명하는 것이다.

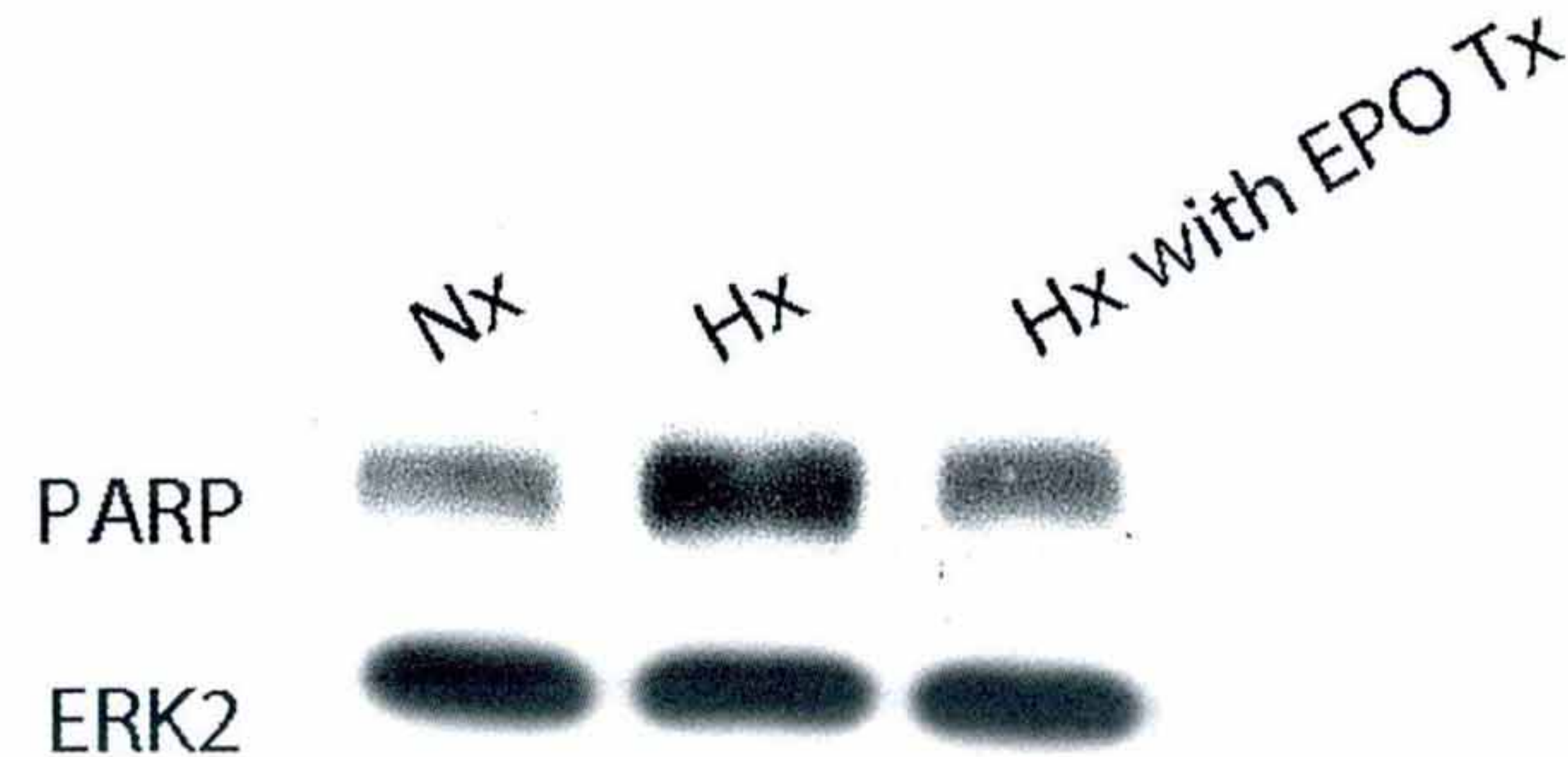


Fig 2. Representative western blots for activated PARP in lysates of normoxic (Nx), hypoxic (Hx) primary cultured neuron in the presence or absence of 5 units of recombinant EPO (EPO). PARP appears to be involved in DNA repair in response to environmental stress. Cleavage of PARP facilitates cellular disassembly and serves as a marker of cells undergoing apoptosis. Note that there are significant changes in expression of cleaved PARP in EPO treated cultures. The result represent that rEPO inhibits the apoptosis of neurons by hypoxia.

EPO는 신경세포의 BDNF의 발현의 증가를 유도한다.

신경세포에서 EPO의 투여가 BDNF의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 만성 저산소 환경에서 사육한 흰쥐 태아의 대뇌피질 신경세포에 EPO를 투여하였다. 만성저산소 환경에서 사육한 신경세포에서의 BDNF의 발현은 정상 실험군에 비해 증가하였다 (fig 3). 이는 면역조직화학법에 의한 in situ 실험의 결과와 일치하는 것이다.

합성 EPO를 투여한 신경세포에서 BDNF의 발현은 정상 실험군에 비해 증가하였으며, 만성 저산소 환경에서 사육한 실험군에 비해서도 더욱 증가하였다 (fig 3). EPO에 의해 유도된 BDNF가 실제 활성화가 되는 지를 확인하기 위하여 그 수용체인 trkB의 인산화 정도를 western blotting 기법을 이용하여 확인하였다. 만성 저산소 환경의 신경세포에서 인산화된 trkB의 발현이 증가하였다. 또한 EPO를 투여한 실험군에서 인산화된 trkB의 발현이 증가하였으며, EPO를 투여하지 않은 실험군에 비해 인산화된 trkB의 발현이 더욱 증가하였다 (fig 4).

이러한 결과는 recombinant EPO가 만성 저산소증에 의한 신경세포의 사멸을 억제하는 것은 그 자신의 특성에 의한 것 뿐 아니라, EPO가 neurotrophic factor인 BDNF의 발현을 증가시키고, 증가된 BDNF가 수용체인 trkB의 인산화를 증가시킴으로서 신경세포의 사멸을 방어한다는 것을 증명하는 것이다.

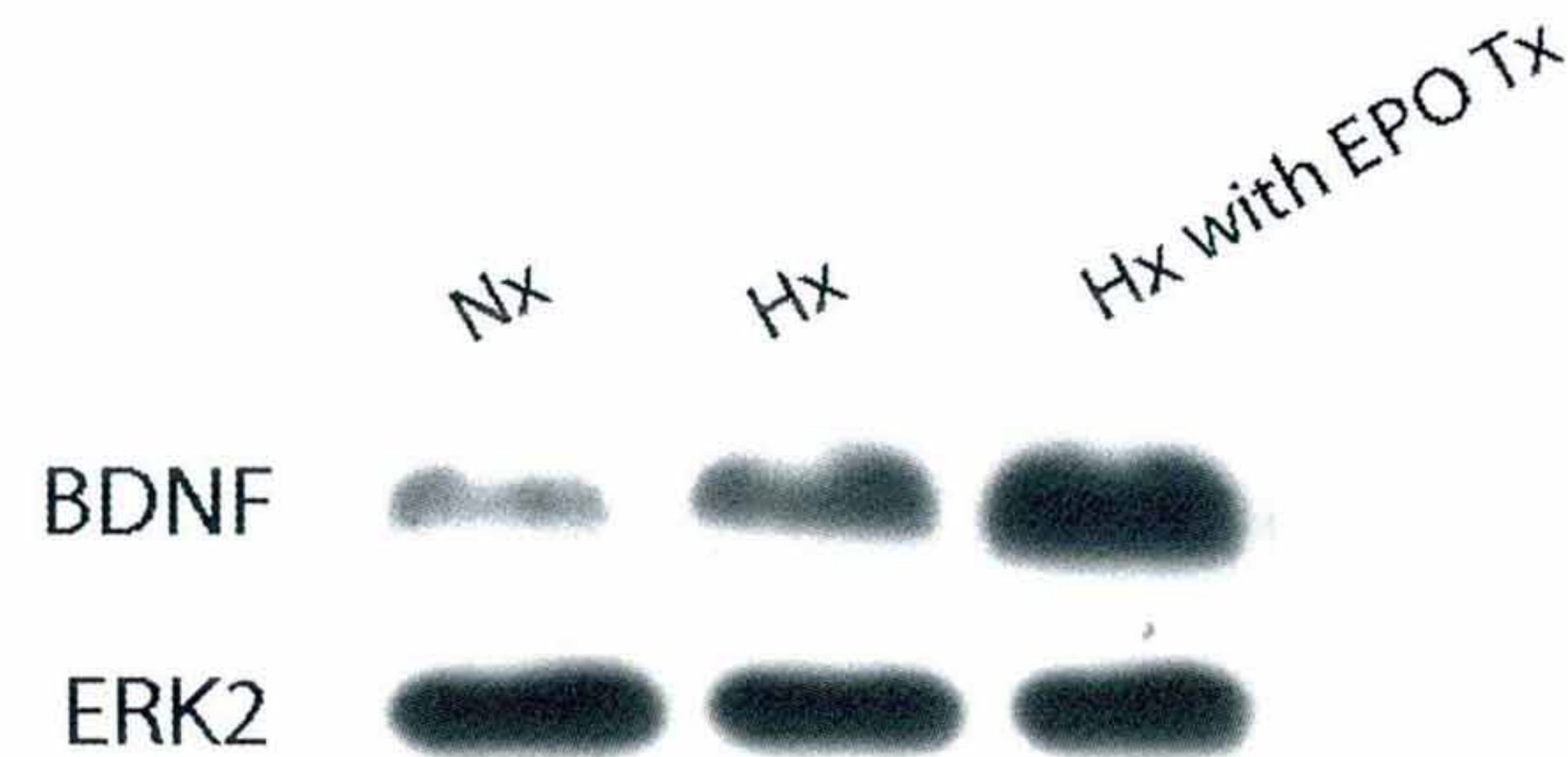


Fig 3. Representative western blots for BDNF expression in lysates of normoxic (Nx), hypoxic (Hx) primary cultured neuron in the presence or absence of 5 units of recombinant EPO (EPO). Note the increases in band intensity in the cultures treated with 5 units of EPO. This result represents EPO induces expression of BDNF.



Fig 4. Representative western blots for phosphorelated trkB expression in lysates of normoxic (Nx), hypoxic (Hx) primary cultured neuron in the presence or absence of 5 units of recombinant EPO (EPO). Note the increases in band intensity in the cultures treated with 5 units of EPO. This result represents EPO induces activation of trkB.

고 찰

만성저산소증은 조산아에 있어 비교적 흔히 볼 수 있는 문제이다¹⁷⁾. 조산(preterm birth)은 신생아에 있어 심각한 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다. 특히 주산기(perinatal period)에서 신생아의 사망률을 증가시키는 중요한 요인 중의 하나이다¹⁾. 저산소증은 인식능력(cognitive function) 이상, 간질발작, 신경계 이상 등을 유발한다. 그 동안 많은 연구를 통해서 저산소증이 세포사(cell death)를 유발하는 기전에 대해 많은 지식이 축적되어 있으나, 저산소증으로부터 세포를 보호할 수 있는 방법은 아직 뚜렷하게 발견되지 않고 있다³⁾.

만성 저산소증은 뇌에서 혈관재형성을 유발하는 것으로 알려져 있다. 그리고 그 기전과 영향에 관해 최근 많은 연구가 이루어지고 있다. 이러한 혈관재형성은 만성 저산소증에 관한 일종의 적응을 위한 뇌의 반응으로 간주하고 있다^{18,19)}. 이러한 혈관재형성 현상은 혈관 내피 세포성장인자(vascular endothelial growth factor, 이하 VEGF)가 관여하는 것으로 보고하였다²⁰⁾.

저자의 최근 연구에서 만성저산소증 환경에 놓인 쥐의 뇌에서 BDNF (brain-derived neurotrophic factor)의 형성이 증가하였고, BDNF가 brain endothelial cell의 증식과 혈관형성을 유도하며, apoptosis에 빠지는 것을 막아주는 것으로 보고되었다²¹⁾.

최근에 들어서 뇌의 발달과 뇌의 저산소-경색증에서

의 erythropoietin(EPO)의 역할이 주목받아왔다. 전통적으로 EPO는 적혈구의 분화와 증식을 조절하는 것으로 널리 알려져 있으며²²⁾, 세포막 표면에 존재하는 수용체(EPOR)와 결합하여, 세포 내 신호 전달 과정을 거쳐 anti-apoptotic 과정을 거치게 된다¹³⁾.

EPO가 측두엽, 전두엽 등 대뇌에서 발현된다는 것이 알려지기 시작하였으며¹¹⁾, 대뇌에서 EPO를 발현하는 세포로는 astrocyte⁹⁾, 신경세포²⁾ 등으로 알려져 있다. 그러나 중추신경계에 존재하는 다른 세포들에서의 발현은 아직 확실하지 않다. 또한 EPOR은 중추신경계의 다양한 세포에서 발현이 되는데 신경세포나 astrocyte 그리고 혈관 내피 세포 등에서 관찰된다^{23, 24)}.

EPO가 저산소증에서 신경세포들을 방어하는 기전에 관해서는 잘 알려져 있지 않았다. 그러나 적혈구 전구세포에서 apoptosis를 방어하는 기전은 잘 알려져 있어 아마도 신경세포나 혈관내피세포에 있어서도 비슷한 기전에 의해 세포를 방어할 것으로 생각하고 있다. 저산소증에 의한 신경세포의 중요한 손상 기전으로 신경 흥분성 독성이 알려져 있는데, EPO가 glutamate의 exocytosis를 방해하여 glutamate의 역할을 막는 것으로 보고되었다²⁵⁾. 또한 신경세포에서 glutamate receptor가 과도하게 활성화되면 NO가 과도하게 생산되며 NO로 인하여 신경세포가 사멸하게 한다. 이때 EPO는 NO에 의한 신경세포의 손상을 방지한다²⁶⁾.

저산소증에 의해 손상 받은 신경세포에서 EPO의 역할을 확인하기 위해서는 세포내 신호전달경로를 증명하는 것이 중요하다. 신경세포방어에 있어 EPO의 작용은 AKT나 MAPK, ERK의 phosphorylation에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있으며²⁷⁾, 최근에는 NF-kB의 활성화에 의해 위와 유사한 작용이 이루어지는 것으로 보고되었다²⁸⁾. 특히 NF-kB는 EPO의 신경세포방어기전에서 뿐만 아니라 신경줄기세포에서 astrocyte로의 분화에도 활성화하는 것으로 보고되었다²⁹⁾. 이러한 NF-kB의 활성화는 JAKS2와 stat-5의 phosphorylation에 의해 이루어지며, stat-5와 NF-kB는 DNA와 결합하여 anti-apoptotic gene의 발현을 유도한다³⁰⁾.

EPO가 신경세포방어기전을 가지고 있다는 것은 다양한 실험에 의해 밝혀지고 있다. 특히 대뇌 허혈증(cerebral ischemia)에 의해 EPO와 EPOR의 발현이 증가

만성 저산소 환경에서 일차 배양된 신경세포에 recombinant erythropoietin이 미치는 영향과 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)와의 상호 작용

하며³¹⁾, 측뇌실에 EPO를 주입하면 신경세포의 사멸을 방지할 수 있다. 또한 EPO는 신경세포사이의 연결(synapse)을 증가시킴으로 신경세포의 기능을 회복시킨다³²⁾. 이러한 동물 실험의 결과들은 허혈성 신경세포손상에 있어 EPO의 투여가 신경세포의 손상을 감소시킬 수 있음을 보여준다. 나아가 사람의 경우에도 EPO를 투여한 경우 마찬가지로 결과가 나타나 EPO가 치료제로서 가능성이 있음을 제시하고 있다.

Chong 등³³⁾에 의하면 무산소환경이나 free radical에 의해 유도된 신경세포의 사멸을 EPO가 감소시킬 수 있음을 보고하였다. 이들은 신경세포에 의해 형성된 EPO는 세포의 손상을 막는데 부족하며, EPO를 외부적으로 투여해야 만이 가능하다고 보고하였다. 외부에서 투여한 EPO는 AKT phosphorylation을 증가시키고 caspase 1, 3, 8의 활성을 유도하는 것으로 보고하였다. Spandou 등³⁴⁾에 의하면 한 쪽 carotid artery를 결찰하고 1시간이 경과한 후 대뇌를 적출하고 EPO의 발현을 관찰한 결과 EPO의 발현이 증가하였다고 보고하였다. 그러나 EPOR 경우는 24시간 이내에 발현이 현저하게 증가하여 EPO와 EPOR의 발현이 시간에 따라 차이가 있음을 관찰하였다.

신생아기에 저산소증에 의한 신경세포 손상을 받은 경우 mental retardation이나 기억장애, 인식장애 등의 후유증이 남을 수 있다. Kumral 등은 새로 태어난 쥐가 저산소 환경에 놓인 경우 위와 같이 학습장애가 나타나는데, EPO를 투여하게 되면 이러한 장애를 줄여 주는 것으로 보고하였다. 저자들은 주산기 때 저산소증에 의한 뇌의 발달 장애를 EPO가 감소시킬 수 있으며, EPO가 조산아의 저산소증 치료에 사용될 수 있다고 주장하였다³⁵⁾.

본 실험에서 만성저산소 환경이 쥐의 대뇌에서 BDNF의 발현을 증가시켰다. 이 결과는 만성 저산소 환경이 신경세포에서의 BDNF의 발현을 유도하는 것으로 생각된다. 그러나 만성 저산소 환경이 HIF의 생산을 유도하며 HIF에 의해 BDNF가 유도되는 지, 다른 어떤 기전을 통해 BDNF의 발현이 유도되는 지는 아직 보고된 바가 없다.

본 실험에서 recombinant EPO의 투여가 만성저산소증에 의한 신경세포 손상을 방어하는 것을 증명하였다. 지

금까지의 다른 연구와 마찬가지로 EPO의 투여가 신경세포의 생존을 유도하는 것을 본 실험에서도 증명할 수 있었다. 일시적이고 치명적인 허혈성 저산소증을 실험한 많은 연구와 달리 치명적이지는 않지만 만성저산소증에 의한 신경세포의 손상과 그 적응을 연구한 본 실험에서도 EPO의 역할이 허혈성신경손상 실험과 유사하게 나타났음을 알 수 있었다. 신경세포의 손상을 나타내는 PARP의 발현이 만성저산소증 실험군에서는 증가하였으나 EPO를 투여한 쥐에서는 현저하게 감소하였음을 관찰하였다.

더욱 흥미로운 결과는 EPO가 BDNF의 발현을 유도한다는 것이다. 이러한 결과는 EPO와 BDNF 사이의 어떤 상호 작용이 있음을 알 수 있다. 앞선 연구에서 보고된 바와 같이 EPO는 만성 저산소 환경에서 anti-apoptotic 기능을 수행한다. 이러한 기능은 EPO 자체의 성상 뿐 아니라 BDNF의 분비를 유도함으로 anti-apoptotic 기능을 더욱 증폭시킨다고 생각된다.

또한 recombinant EPO의 투여가 BDNF의 수용체인 trkB의 활성화를 유도하는 것이다. recombinant EPO를 투여한 실험군에서 trkB의 활성화가 증가하였다. 이러한 사실은 EPO가 trkB의 활성화에 직접 영향을 미치는 것을 보여 주는 것이다. Nitta 등에 의하면 EPO가 강력한 혈관형성인자인 VEGF 수용체의 발현을 증가시키는 것으로 보고된 바 있다³⁶⁾. 또한 최근의 저자의 연구에 의하면 recombinant BDNF가 VEGF의 인산화를 증가시킨다²¹⁾. 이러한 연구들은 growth factor들 사이에 상호 작용이 있으며, 이러한 상호 작용에 의해 세포의 생존을 좀 더 강력하게 유도한다는 것을 가리키고 있다.

이러한 결과들은 만성저산소증에서 신경세포의 사멸을 방어하는 데 EPO가 중요한 역할을 하고 있음을 증명하는 것이다. 또한 BDNF와의 상호작용에 의해 신경 세포 사멸을 더욱 효과적으로 방어하고 있음을 증명하였다. 이러한 결과들은 EPO가 만성저산소증에 의해 손상 받은 신경세포들을 치료하는 치료제로서의 가능성을 보여주는 것으로 나아가 만성저산소증에 의한 장기적인 후유증을 감소시킬 수 있음을 제시한다.

참고문헌

1. Vannucci RC : Current and potentially new management strategies for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 85:961-968, 1990
2. Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET, Petit E, Schumann-Bard P : Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:393-403, 2002
3. Ogunshola OO, Antic A, Donoghue MJ, Fan SY, Kim H, Stewart WB, Madri JA, Ment LR : Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J Biol Chem* 277:11410-11415, 2003
4. Svensson B, Peters M, König HG, Poppe M, Levkau B, Rothmundt M, Arolt V, Kogel D, Prehn JH : Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1170-1175, 2002
5. Strunk T, Hartel C, Schultz C : Does erythropoietin protect the preterm brain? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89:364-368, 2004
6. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E : A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:643-651, 1999
7. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H : Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 101:271-276, 2001
8. Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Trentz O, Bauer C : Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int* 51: 416-418, 1997.
9. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M : Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 8: 666-667, 1996.
10. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P : Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 4044-4049, 2001
11. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M : Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 : 3717-3720, 1995
12. Dame C, Juul SE, Christensen RD : The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential *Biol Neonate*. 79 : 228-235, 2001
13. Wenger RH : Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases hypoxia-inducible transcription factors and O₂-regulated gene expression. *Faseb J* 16: 1151-1162, 2002
14. Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R : Enhanced proliferation survival and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 20: 7377-7383, 2000
15. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S : Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 21 9733-9743, 2001
16. Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P : Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 286: 741-746, 1999
17. Poets CF, Stebbens VA, Richard D, Southall DP : Prolonged episodes of hypoxemia in preterm infants undetectable by cardiorespiratory monitors. *Pediatrics* 95: 860-863, 1995
18. Harik SI, Behmand RA, LaManna JC : Hypoxia increases glucose transport at blood-brain barrier in rats. *J Appl Physiol* 77: 896-901, 1994
19. Chow J, Ogunshola O, Fan SY, Li Y, Ment LR, Madri JA : Astrocyte-derived VEGF mediates survival and tube stabilization of hypoxic brain microvascular endothelial cells in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 130: 123-132, 2001
20. Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA : Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J Biol Chem* 279: 33538-33546, 2004
21. Fisher JW : Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 1-14, 2003
22. Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, Mackenzie ET, Petit E : Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 30: 271-278, 2000
23. LaManna JC, Vendel LM, Farrell RM : Brain adaptation to chronic hypobaric hypoxia in rats. *J Appl Physiol* 72: 2238-2243, 1992
24. Liu C, Shen K, Liu Z, Noguchi CT : Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem* 272: 32395-32400, 1997
25. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Corica F, Frisina N : The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 228-236, 2003
26. Digicaylioglu M, Lipton SA : Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 412: 641-647, 2001
27. Chong ZZ, Lin SH, Kang JQ, Maiese K : Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1 3 and 8. *J Neurosci Res* 71: 659-669, 2003
28. Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M : Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* 33:

만성 저산소 환경에서 일차 배양된 신경세포에 recombinant erythropoietin이 미치는 영향과 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)와의 상호 작용

891-896, 2003

29. Lee SM, Nguyen TH, Park MH, Kim KS, Cho KJ, Moon DC, Kim HY, Yoon do Y, Hong JT : EPO receptor-mediated ERK kinase and NF-kappaB activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 1087-1095, 2004
30. Juul S : Erythropoietin in the central nervous system and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage. *Acta Paediatr Suppl* 91: 36-42, 2002
31. Wen TC, Rogido M, Genetta T, Sola A : Permanent focal cerebral ischemia activates erythropoietin receptor in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 355: 165-168, 2004
32. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R : In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 635-640, 1998
33. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K : Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia Akt1 Bad and caspase-mediated pathways. *Br J Pharmacol* 138: 1107-1118, 2003
34. Spandou E, Papoutsopoulou S, Soubasi V, Karkavelas G, Simeonidou C, Kremenopoulos G, Guiba-Tziampiri O : Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. *Brain Res* 1021: 167-172, 2004
35. Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, Kiray M, Genc S, Duman N, Koroglu TF, Ozkan H, Genc K : Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res* 153: 77-86, 2004
36. Nitta K, Uchida K, Kimata N, Honda K, Horita S, Hayashi T, Ishizuka T, Kobayashi H, Kawashima A, Yumura W, Nihei H : Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in human crescentic glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 52: 76-82, 1999