

## 저산소성 허혈성 손상을 받은 신생 흰쥐 뇌 해마에서 Fas와 FasL 단백질 발현

단국대학교 의과대학 소아과학교실\*, 해부학교실†, 생명과학 연구소‡, 첨단과학대학 생물학과§

장영표\*, † · 김명주† · 이영일† · 임익제\* · 조재주\* · 김종완§ · 여성문§

### Fas/FasL expression in the hippocampus of neonatal rat brains following hypoxic-ischemic injury

Young Pyo Chang, M.D.\* †, Myeung Ju Kim, M.D.†, Young Il Lee, M.D.†  
Ik Je Im, M.D.\*, Jae Ju Cho, M.D.\*, Jong-Wan Kim§ and Sung Moon Yeo, Ph.D.§

Department of Pediatrics\* and Anatomy†, Institute of Life Science‡, College of Medicine,  
Department of Biological Science§, Dankook University, Cheonan, Korea

**Purpose :** Fas is a cell surface receptor that transduces apoptotic death signals. Interaction of extracellular domain of Fas with Fas ligand(FasL) triggers the apoptotic process in many diseases. We investigated the expression of Fas and FasL in the hippocampus of 7-day-old newborn rat brains following hypoxia-ischemia injury.

**Methods :** The 7-days-old newborn rats were exposed to 8 percent oxygen for two hours after the ligation of right common carotid arteries. The newborn rats were killed and their brains were removed at 12, 14 and 48 hours after hypoxic-ischemic injury. The expressions of Fas and FasL of the right hippocampus were observed by western blotting and immunofluorescent staining.

**Results :** Fas and FasL were strongly expressed in the right hippocampus ipsilateral to the ligation of the common carotid artery by western blotting at 12 hours following hypoxic-ischemic injury, and then slowly decreased. The immunofluorescent expressions of Fas and FasL strongly increased in the CA1 area of the right hippocampus at 12 and 24 hours following hypoxic-ischemic injury. The immunofluorescent expression of Fas decreased at 48 hours, but the expression of FasL persisted strongly at 48 hours following hypoxic-ischemic injury.

**Conclusion :** The interaction of Fas with FasL on the cell surface may be involved in neuronal injury following hypoxic-ischemic injury in the developing brain. (Korean J Pediatr 2006;49:198-202)

**Key Words :** Fas, Fas ligand, Newborn, Brain, Hypoxia, Ischemia

### 서 론

저산소성 허혈성 뇌손상에서 세포사멸(apoptosis)은 뇌세포 사망의 주요 기전이다<sup>1, 2)</sup>. 미성숙 신생 뇌에서도 저산소성 허혈성 손상이 뇌세포의 사멸을 현저하게 일으키는 것이 관찰된다<sup>2-5, 6)</sup>. Fas(CD 95 또는 Apo-1)는 TNF superfamily 수용체 중에 하나로서 45 kD의 transmembrane type의 수용체이다<sup>7)</sup>. 세포표면

에서 Fas 수용체는 Fas ligand와 결합하여 세포 내 신호 전달 체계를 활성화시켜 세포사멸을 유발한다. Fas와 FasL는 성인 뇌 뿐만 아니라 미성숙 뇌의 저산소성 허혈성 손상 시 그 발현이 크게 증가하고 세포사멸에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다<sup>8-10)</sup>. 그러나 미성숙 뇌에서 아직 Fas/FasL의 발현과 Fas/FasL가 뇌세포 손상 등에 어떤 역할을 할 것인지에 대한 연구는 매우 부족하다. 이에 연구자들은 생후 7일된 미성숙 흰쥐의 뇌에 저산소성 허혈성 손상을 유발하여 Fas/FasL 등의 발현을 관찰하여 뇌세포 손상의 기전을 이해하는데 도움을 받고자 본 연구를 시행하였다.

본 연구는 2004년도 단국대학교 의료원 생명과학연구소 연구비 지원으로 연구되었음.

접수 : 2005년 9월 14일, 승인 : 2005년 10월 24일

책임저자 : 장영표, 단국대 부속병원 소아과

Correspondence : Young Pyo Chang, M.D.

Tel : 041)550-3937 Fax : 041)550-3905

E-mail : ychang@dankook.ac.kr

대상 및 방법

1. 실험동물에 저산소성 허혈성 뇌손상 유발

생후 7일된 Sprague-Dawley 신생 흰쥐를 가벼운 에테르 마취 하에 목 정중선에서 피부를 절개하여 우측 경동맥을 노출하고 4번 실로 이중 결찰 후 전기 응고 방법으로 경동맥을 절단한 후 피부를 봉합하였다. 이 과정은 8분 이내에 시행함을 원칙으로 하였다. 이후 20-30분 정도 마취에서 회복되기를 기다린 후 어미에게 돌려보내 약 2-3시간 정도 안정시킨 후 섭씨 37도의 항온 수조에 부분적으로 잠긴 밀폐된 chamber내에서 8% 산소와 92% 질소로 혼합된 기체에 2시간 동안 노출시켜 저산소성 허혈성 손상을 주었다. 대조군은 우측 경동맥을 노출 후 결찰이나 절단 없이 피부봉합을 하였고 허혈 손상 및 저산소 폭로는 가하지 않았다.

2. Western blotting

저산소성 허혈성 손상에 노출시킨 3마리의 쥐를 저산소성 허혈성 손상 후 12, 24, 48시간에 각각 1마리씩 뇌를 적출하여 경동맥 결찰 쪽인 오른쪽 해마를 분리하였다. 이 과정을 5회 반복하여 대조군 5마리를 포함한 총 20마리의 쥐의 뇌에서 오른쪽 해마를 분리하였다. 분리된 해마를 -80℃에 얼린 후 조직을 갈아서 원심분리 과정을 거쳐 단백질을 분리하였다. 이후 anti-Fas, anti-FasL 항체와 반응시킨 후 chemiluminescent detection system으로 반응을 관찰하였다. Semiquantitative densitometry로 정량적으로 표시하였으며, 정량화된 값을 평균±표준편차로 표시하였고 시간에 따라 대조군과 비교하였다. 결과는

Wilcoxon rank sum test, ANOVA 등으로 검정하였고 통계적 유의 수준은  $P < 0.05$ 로 하였다.

3. 면역형광염색

저산소 폭로 후 일정한 시간에 10% formalin으로 관류, 고정하고 적출한 뇌를 냉동 보관하였다. 보관된 뇌를 cryocut으로 coronal section하여 얻어진 뇌절편에 Fas, FasL에 대한 면역형광염색을 하였다. Fas 항체는 토끼 다클론 항체(rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz, USA)를 사용하였고, FasL은 염소 다클론 항체(goat polyclonal antibody, Santa Cruz, USA)를 사용하였다. 이차 항체는 antirabbit IgG antibody(Vector)를 사용하였다. 뇌절편을 1차 항체와 incubation 시킨 후 다시 biotinylated anti-rabbit IgG와 반응시켰다. 이후 Cy-3 conjugated streptavidin으로 발광 과정을 거친 후 CA1 해마 부위를 면역형광현미경으로 관찰하였다.

결과

1. 신생 흰쥐 뇌 해마에서 Fas/FasL 단백질 발현의 Western blotting 결과

저산소성 허혈성 뇌손상 후 12시간에 경동맥이 결찰된 오른쪽 해마에서 Fas와 FasL 단백질의 발현은 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 1,  $P < 0.05$ ). 이후 Fas와 FasL 단백질의 발현은 손상 후 24시간과 48시간에 점차 감소하였는데, Fas 단백질의 감소가 보다 현저하였다.

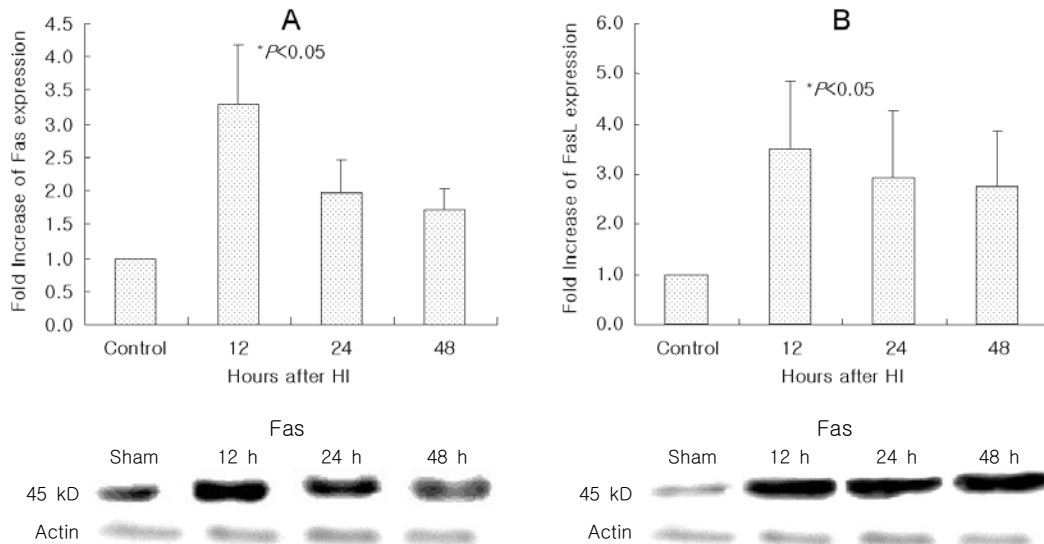
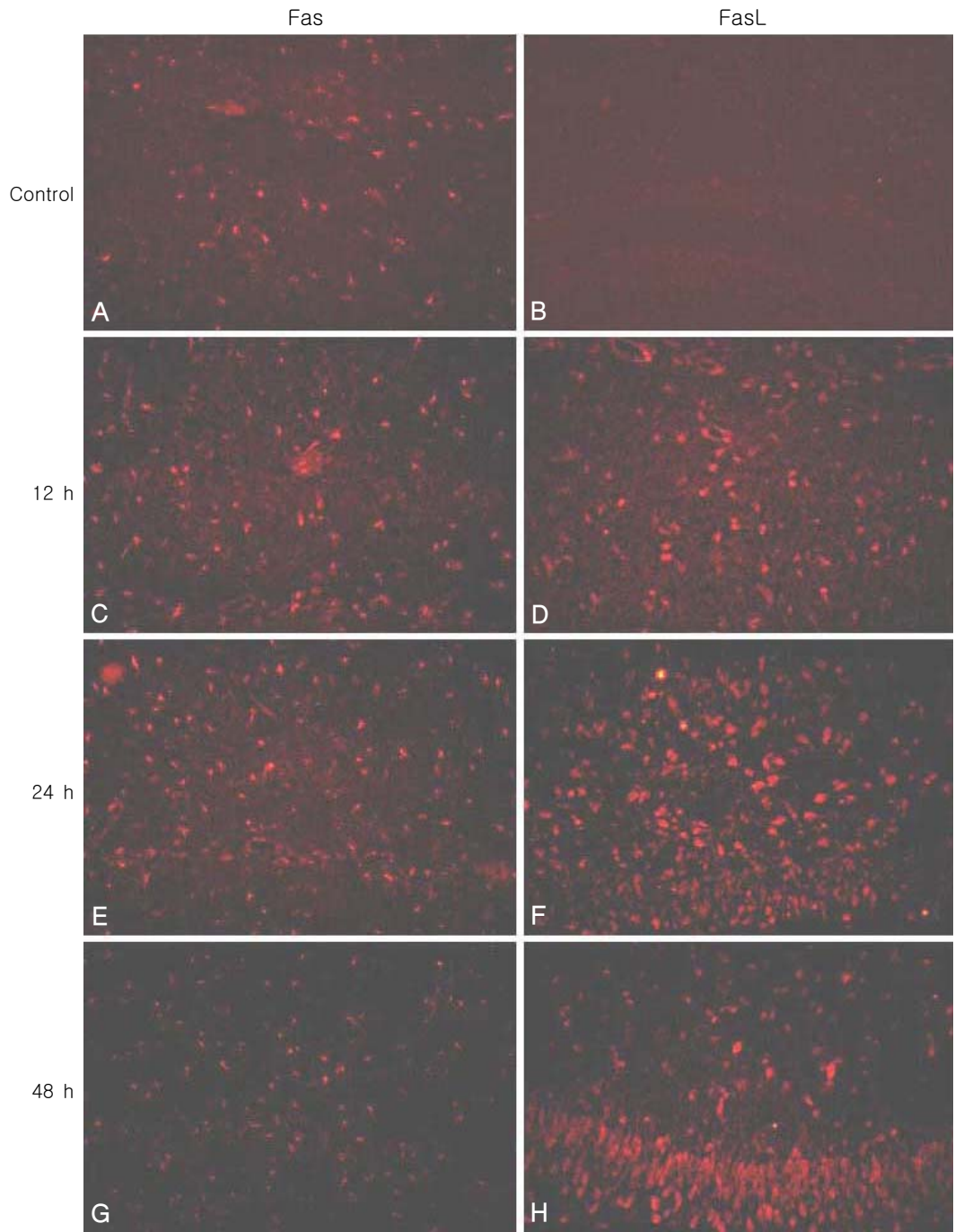


Fig. 1. Fas(A) and Fas ligand(B) were strongly expressed by western blotting at 12 hours following hypoxic-ischemic injury in the right hippocampus ipsilateral to the ligation of the common carotid artery, and then slowly decrease(n=5). Values represent as mean±SD.



**Fig. 2.** Fas(A, C, E, G) and Fas ligand(B, D, F, H) were strongly expressed in the CA1 area of the right hippocampus ipsilateral to the ligation of the common carotid artery by immunofluorescent staining at 12(C, D) and 24 hours(E, F) following hypoxic-ischemic injury(200×). The expression of Fas decreased at 48 hours(G), but the expression of FasL persisted strongly at 48 hours following hypoxic-ischemic injury(H).

**2. 신생 흰쥐 뇌 해마에서 Fas/FasL 단백질 발현의 면역형광염색 결과**

Fas 면역형광발현은 저산소성 허혈성 뇌손상 후 12시간과 24시간에 경동맥이 결찰된 오른쪽 해마의 CA1 영역에서 대조

군에 비해 현저히 증가하였고, 48시간에는 감소함이 관찰되었다 (Fig. 2). FasL 면역형광발현은 저산소성 허혈성 뇌손상 후 12시간과 24시간에 경동맥이 결찰된 오른쪽 해마의 CA1 영역에서 대조군에 비해 현저히 증가하였고, 48시간에도 여전히 대조군에

비해 증가해 있음이 관찰되었다(Fig. 2). 이러한 관찰 소견은 western blotting 관찰 결과와 일치하였다.

## 고 찰

뇌신경세포는 저산소성 허혈성 손상을 받으면 세포표면의 세포사멸 유발 수용체(pro-apoptotic receptor)들의 활성화가 일어나고, 세포사멸과 관련된 다양한 세포내 신호 전달체계가 활성화되어 세포가 사망하게 된다. 세포표면의 세포사멸 유발 수용체(pro-apoptotic receptor)들 중 tumor necrosis factor(TNF)와 interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) 등의 cytokine들의 수용체가 저산소성 허혈성 손상 시 뇌조직에서 현저하게 발현됨이 증명되어 있다<sup>5)</sup>.

Fas(CD 95 또는 Apo-1)는 TNF superfamily 수용체 중에 하나로서 45 kD의 transmembrane type의 수용체이다<sup>7)</sup>. Fas 수용체의 활성화는 세포사멸을 유발하는데, 이는 Fas 수용체가 Fas ligand(FasL)와 결합하여 세포 내에 여러 단계의 신호 전달체계의 활성화 과정을 통해 이루어진다. FasL는 세포표면의 단백질로 TNF와 많은 유사함을 가진다. 세포표면으로부터 분리된 FasL은 세포표면의 Fas와 결합하여 세포사멸을 유발하는데 이는 면역 세포에서 잘 알려져 있다<sup>7)</sup>.

중추 신경계에서 Fas와 FasL의 발현은 Park 등<sup>8)</sup>이 Fas가 정상 생쥐 뇌의 해마, 대뇌, 소뇌 등에서 정상적으로 발현됨을 보고하였고, Bechmann 등<sup>9)</sup>이 astrocyte에서도 FasL가 발현되고, 손상 시 FasL의 발현이 증가함을 보고하였다. Choi 등<sup>10)</sup>은 인간 태아와 성인의 뇌에서 분리한 astrocyte에서 Fas와 FasL가 정상적으로 발현됨을 보고한 바 있으며, 이들은 뇌손상 시 interleukin, TNF 등과 함께 그 발현이 증가함을 보고하였다. 그 외에 Fas 발현은 Alzheimer 병, 다발성 경화증, Parkinson 병 같은 면역 기전이 관계된 질환에서 현저히 발현될 뿐 아니라, 면역반응이 일어나지 않는 여러 신경계 질환에서도 중요한 역할을 할 것으로 추측되고 있다<sup>11-23)</sup>.

저산소성 허혈성 뇌손상을 유발한 동물실험들에서도 중추 신경계에 Fas 또는 FasL의 발현이 증가함이 보고된 바 있는데, Martin-Villaba 등<sup>17)</sup>은 middle cerebral artery(MCA) 폐색으로 허혈 손상을 유발한 성인 쥐에서 CD 95L과 TRAIL의 발현이 증가함을 보고하였고, Li 등<sup>18)</sup>은 척추 압박 손상에서도 Fas와 FasL의 발현이 oligodendrocyte에서 증가함을 보고하였다. Rosenbaum 등<sup>19)</sup>은 MCA를 폐색 시킨 쥐에서 역시 Fas와 FasL의 발현을 관찰하였는데 Fas는 신경세포와 microglia에서 발현이 증가함을 보고하였다. 미성숙 뇌에서의 연구는 Felderhoff-Mueser 등<sup>24)</sup>이 생후 7일된 신생 흰쥐에 한쪽 경동맥을 영구 결찰 후 8% 산소에 노출시킨 저산소성 허혈성 뇌손상 모델에서 Fas가 해마에 증가함을 보고하였고, Fas agonist를 대뇌로 주사하면 해마에 세포사멸이 발생함을 보고한 바 있다. Northington 등<sup>25)</sup>은 생후 7일된 신생 흰쥐에 저산소성 허혈성 손상을 유발하면 Fas 수용체의 발현이 증가하고 caspase 3의 발현과 세포사

멸이 증가함을 보고하였다. Van Landeghem 등<sup>26)</sup>은 13명의 신생아 부검에서 pontosubicular neuronal necrosis에서 세포사멸과 함께 Fas의 발현이 증가하고 FasL는 astrocyte와 microglia에서만 증가함을 보고하였다.

이상과 같이 Fas와 FasL는 성인 뇌 뿐만 아니라 미성숙 뇌의 저산소-허혈 손상 시 신경세포 뿐 아니라 교원세포에서도 그 발현이 크게 증가하고 세포사멸에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 그러나 미성숙 뇌에서 아직 Fas/FasL의 발현과 Fas/FasL가 astrocyte 등의 glial cell에서의 발현 및 뇌세포 손상 등에 어떤 역할을 할 것인지에 대한 연구는 매우 부족하다.

본 연구에서는 Felderhoff-Mueser 등<sup>24)</sup>의 연구와 Northington 등<sup>25)</sup>의 연구에서처럼 저산소성 허혈성 손상 초기에 해마에서 Fas의 발현이 증가함을 보여 주었고, Fas 뿐만 아니라 FasL도 비슷하게 증가함을 보여 주었다. 본 연구를 통해 미성숙 신생 흰쥐의 저산소성 허혈성 뇌손상 모델에서도 뇌세포 손상에 Fas와 FasL의 상호 관계가 중요한 역할을 담당할 것으로 추측할 수 있었다. 그러나, 저산소성 허혈성 뇌손상에서 신경세포와 교원 세포가 Fas/FasL의 활성화를 통해 어떻게 상호 작용을 하는지를 규명하기 위해서는 신경세포와 교원세포에서 각각 Fas와 FasL가 어떻게 발현되는 지에 대한 연구가 향후 필요할 것으로 여겨진다.

## 요 약

**목적 :** Fas는 세포표면 수용체로 세포사멸 신호를 전도한다. 많은 질환에서 세포표면의 Fas가 Fas ligand(FasL)와 결합하여 세포사멸 과정을 유발하게 된다. 연구자들은 7일된 신생 흰쥐에 저산소성 허혈성 손상을 유발한 후 뇌 해마에서 Fas와 FasL의 발현을 관찰하고자 하였다.

**방법 :** 7일된 신생 흰쥐를 오른쪽 총 경동맥 영구 결찰 후 8% 산소에 2시간 노출시켰다. 저산소성 허혈성 손상 후 12, 24, 48시간에 뇌를 적출 냉동 보관하였다. Western blotting 방법과 면역형광염색 방법으로 냉동 보관된 뇌의 경동맥을 결찰한 오른쪽 해마에서 Fas와 FasL의 발현을 관찰하였다.

**결과 :** Fas와 FasL의 발현은 저산소성 허혈성 손상 후 12시간에 경동맥이 결찰된 오른쪽 해마에서 크게 증가하고 이후 감소하는 것을 western blotting 방법에 의해 관찰하였다. Fas와 FasL의 면역형광발현은 오른쪽 해마의 CA1 영역에서 손상 후 12시간과 24시간에 대조군에 비해 증가하였다. Fas의 면역형광발현은 손상 후 48시간에 감소하였으나 FasL의 면역형광발현은 손상 후 48시간에도 지속되었다.

**결론 :** 세포표면에서 Fas와 FasL의 발현과 그들의 결합은 저산소성 허혈성 손상을 받은 미성숙 뇌의 신경세포 손상에 기여할 것으로 추측되었다.

## References

- 1) Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol* 2000;17:113-20.
- 2) Chang YP. Cellular and biochemical mechanism of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Korean Pediatr Soc* 2002; 45:560-7.
- 3) Dell'Anna E, Chen Y, Engidawork E, Andersson K, Lubec G, Luthman J, et al. Delayed neuronal death following perinatal asphyxia in rat. *Exp Brain Res* 1997;115:105-15.
- 4) Yue X, Mehmet H, Penrice J, Cooper C, Cady E, Wyatt JS, et al. Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997;23:16-25.
- 5) Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Koo JN, Choe G, Syn HC, et al. High expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:406-11.
- 6) Chang YP, Shin DH, Lee E, Kim JW, Kwon BS, Jung MK, et al. Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 2004;354:64-8.
- 7) Eischen CM, Leibson PJ. The Fas pathway in apoptosis. In: Kaufmann SH, editor. *Apoptosis*. London: Academic Press, 1997:107-32.
- 8) Park C, Sakamaki K, Tachibana O, Yamashita T, Yamashita J, Yonehara S. Expression of fas antigen in the normal mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252: 623-8.
- 9) Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F. FasL(CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 1999;27:62-74.
- 10) Choi C, Park JY, Lee J, Lim JH, Shin EC, Ahn YS, et al. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , or IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 1999;162:1889-95.
- 11) Dowling P, Shang G, Raval S, Menonna J, Cook S, Husar W. Involvement of the CD95(APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1996;184: 1513-8.
- 12) Ciusani E, Frigerio S, Gelati M, Corsini E, Dufour A, Nespolo A, et al. Soluble Fas(Apo-1) levels in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 1998; 82:5-12.
- 13) Nishimura T, Akiyama H, Yonehara S, Kondo H, Ikeda K, Kato M, et al. Fas antigen expression in brains of patients with Alzheimer-type dementia. *Brain Res* 1995;695:137-45.
- 14) Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, Pham DG, Robinson N, Martin GM, et al. Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 1997;17:4212-22.
- 15) Mogi M, Harada M, Kondo T, Mizuno Y, Narabayashi H, Riederer P, et al. The soluble form of Fas molecule is elevated in parkinsonian brain tissues. *Neurosci Lett* 1996;220: 195-8.
- 16) Vogt M, Bauer MK, Ferrari D, Schulze-Osthoff K. Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95(APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells. *FEBS Lett* 1998;429:67-72.
- 17) Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, et al. CD95 ligand(Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 1999;19: 3809-17.
- 18) Li GL, Farooque M, Olsson Y. Changes of Fas and Fas ligand immunoreactivity after compression trauma to rat spinal cord. *Acta Neuropathol(Berl)* 2000;100:75-81.
- 19) Rosenbaum DM, Gupta G, D'Amore J, Singh M, Weidenheim K, Zhang H, et al. Fas(CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2000;61:686-92.
- 20) Bechmann I, Lossau S, Steiner B, Mor G, Gimsa U, Nitsch R. Reactive astrocytes upregulate Fas(CD95) and Fas ligand(CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. *Glia* 2000;32:25-41.
- 21) Jin K, Graham SH, Mao X, Nagayama T, Simon RP, Greenberg DA. Fas(CD95) may mediate delayed cell death in hippocampal CA1 sector after global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:1411-21.
- 22) Tan Z, Levid J, Schreiber SS. Increased expression of Fas (CD95/APO-1) in adult rat brain after kainate-induced seizures. *Neuroreport* 2001;12:1979-82.
- 23) Padosch SA, Popp E, Vogel P, Bottiger BW. Altered protein expression levels of Fas/CD95 and Fas ligand in differentially vulnerable brain areas in rats after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2003;338:247-51.
- 24) Felderhoff-Mueser U, Taylor DL, Greenwood K, Kozma M, Stibenz D, Joashi UC, et al. Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol* 2000;10:17-29.
- 25) Northington FJ, Ferriero DM, Flock DL, Martin LJ. Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 2001;21:1931-8.
- 26) van Landeghem FK, Felderhoff-Mueser U, Moysich A, Stadelmann C, Obladen M, Bruck W, et al. Fas(CD95/Apo-1)/Fas ligand expression in neonates with pontosubicular neuron necrosis. *Pediatr Res* 2002;51:129-35.