

Bcl-XL 유전자 과발현에 의한 사람 신경 원조 세포주의 생존율 증강 효과

아주대학교 의과대학 신경외과학교실,¹ 뇌질환 연구센터,²
안영환¹ · 신용삼¹ · 윤수한¹ · 조기홍¹ · 조경기¹ · 김승업²

Increased Viability by Over-Expression of Bcl-XL in a Human Neural Progenitor Cell Line

Young Hwan Ahn, M.D.,¹ Yong Sam Shin, M.D.,¹ Soo Han Yoon, M.D.,¹
Ki Hong Cho, M.D.,¹ Kyung Gi Cho, M.D.,¹ Seung Up Kim, M.D.²

Department of Neurosurgery,¹ Brain Disease Research Center,² Ajou University School of Medicine,
Suwon, Korea

Objective : This study is aimed whether bcl-xl could protect C4 cells from the cell death induced by serum deprivation.

Methods : The transient transfection of the bcl-xl gene was made with a LipofectAMINE reagent. An immunohistochemical assay and Western-blotting were performed to examine the bcl-xl transfection into the C4 cells. In order to analyze the effect of the bcl-xl transfection, the number of cells on the well plate were serially counted each day, for 5 days, from the 2nd to the 6th day after transfection. The number of GFP-positive cells in the defined fields, following serum deprivation, was counted using fluorescence microscopy, and the total number of viable cells, including transfected cells, were also assessed.

Results : Immunocytochemical staining showed positive cells in 52% of nestin staining, 60% of GFAP and 20% of MAP-2. The number of cells decreased after transfection using the LipofectAMINE in the serum free medium ($p < 0.001$). Western blotting using an anti-human bcl-xl antibodies showed that bcl-xl was expressed in both the non-transfected and bcl-xl transfected C4 cells. Cell death in the C4 cells, and the number of cells, were serially monitored each day for 5 days. In the bcl-xl transfected cells, the cell death induced by serum deprivation was significantly inhibited and delayed compared to that in the control cells ($p < 0.001$).

Conclusion : It is suggested that the bcl-xl transfected human neural progenitor cells might improve the survival of the grafted cells, and may be an alternative source of cells for neural transplantation in degenerative diseases.

KEY WORDS : Bcl-XL · Human neural progenitor cell · Overexpression · Transfection.

서론

태아 중뇌세포를 이용한 동종 뇌이식은 1989년 처음으로 보고²¹ 된 이후 현재까지 시도되고 있는 파킨슨병의 세포 치료법의 하나이다^{3-5,7,20}. 파킨슨병의 증상은 흑질 내 신경세포의 약 60~80% 정도가 감소되어 발생되며, 효과적인 증상의 치료를 위해 사람 태아 세포를 이식하는 경우에 파킨슨씨병 환자의 한쪽 증상을 위해서 최소한 4개체 이상의 태아 중뇌 조직이 필요하다³¹. 그 이

유는 이식 생존율이 5~10% 이하로 매우 낮고, 충분한 양의 신선한 태아 조직 확보가 현실적으로 어렵기 때문이다^{1,5,7,20}. 유전공학적 으로 도파민이나 영양인자(trophic factor)를 분비하도록 제작된 세포^{21,43}, 돼지 태아 중뇌 세포(porcine embryonic ventral mesencephalic tissue)^{15,35}, 자가 부신수질세포²⁵, polymer-encapsulated 세포 등을 이용한 이식¹² 등이 새로운 이식 원으로 개발되었고, 최근에는 타이로신 수산화 효소와 L-DOPA 생산에 관여하는 보조인자(co-factor)를 동시에 발현하도록 제작된 성상 세포(astrocyte)²⁴, 9L 신경육종(gliosarcoma) 등을 이용한 세포 이식²¹ 등이 파킨슨씨병 치료에 시도되었으나 이상적인 효과를 얻지 못하고 있는 실정이다.

사람 뇌 내의 신경간세포(neural stem cell)는 다양한 세포로 분화할 수 있고 자기증식(self renewal)이 가능하다^{33,37}. 특히 이식

• Received : September 29, 2003 • Accepted : November 26, 2003
• Address for reprints : Young Hwan Ahn, M.D., Department of Neurosurgery, Ajou University School of Medicine, Suwon 442-721, Korea
Tel : 031) 219-5234, Fax : 031) 219-5238
E-mail : yhahn@ajou.ac.kr

Over-Expression of Bcl-XL

한 신경간세포가 생체 내에서 신경세포(neuronal cell)로 분화하고 이식 부위 주변으로 이동하는 소견이 확인되면서 이식원으로서의 사람 신경간세포가 최근 주목받기 시작하고 있다³⁹⁾. 그러나 이들 신경 원조 세포도 이식 생존율이 낮아 이식한 세포의 생존율을 높이는 것은 이식 치료 성공의 가장 중요한 인자 중 하나이다³⁸⁾.

세포고사(apoptosis)는 파킨슨씨병에서의 신경세포 변성의 중요한 기전 중의 하나이다³¹⁾. 세포고사와 관련된 유전자인 bcl-2의 과발현이 유도된 PC12 세포는 도파민 독성에 대한 저항력을 보이고²⁸⁾, β -아밀로이드(amyloid)에 의한 세포고사도 차단하였다는 보고가 있다⁴⁰⁾. 또한, bcl-2 과발현이 수산화 도파민(6-hydroxy dopamine, 6-OHDA)에 의한 흑질(substantia nigra) 신경 세포 손상을 예방한다는 보고 등이 있다⁴⁵⁾. 세포고사와 bcl-2는 신경계 발생에 중요하며⁸⁾, 뇌의 발육 과정 중 bcl-w 및 bcl-xl의 m-RNA가 대뇌피질, 해마, 시상부, 척수 및 후신경절(dorsal root ganglia) 등에서 높게 발현되고¹⁸⁾, bcl-xl은 태생 직후뿐만 아니라 성인의 중추신경계 내에서도 발현된다¹⁷⁾. Eves 등은 신경 세포주를 이용하여 세포고사를 유도하고 bcl-2 및 bcl-xl이 신경세포의 생존을 높여 준다고 보고하였다¹³⁾.

본 연구자들은 사람 신경 원조 세포주에 bcl-xl 유전자를 이입하여 과발현을 유도하면 증식과 생존이 증강되므로 궁극적으로 이식의 효과를 높여 줄 수 있다고 가정하고, bcl-xl 유전자를 사람 신경 원조 세포주인 C4 세포에 이입하고 세포 배양 환경에서 bcl-xl 유전자 과발현이 세포 생존율에 어떤 영향을 주는지를 관찰하였다.

대상 및 방법

대상 및 재료

사람 신경 원조 세포주인 C4 세포를 대상으로 하고, 대상 균을 '유전자 이입군' 두 군과 '대조군' 두 군 등으로 나누었다. C3-EGFP-bcl-xl을 이입한 C4 세포(C3-EGFP-bcl-xl-C4 cells) 균을 'bcl-xl 유전자 이입군' 으로, C3-EGFP(EGF) 벡터만 이입한 C4 세포(C3-EGFP-C4 cells) 균을 '유전자 이입 음성대조군' 으로 분류하였다. 유전자 이입을 시행하지 않은 C4 세포를 '음성대조군' 으로 하고, bcl-xl이 이입된 신경세포 (bcl-xl-neuron)를 '양성 대조군' 으로 이용하였다.

C4 세포는 브리티시 콜롬비아 대학(University of British Columbia, UBC, Canada)으로부터, bcl-xl c-DNA는 미 국립 보건원(NIH, MD, USA)에서 제공받았다. C3-EGFP 플라스미드(plasmid)는 Clontech Laboratories Inc.(Palo Alto, CA)에서, 그리고 LipofectAMINE과 사람 섬유아세포 성장인자(human basic fibroblast growth factor, h-bFGF)는 Life Technolo-

gies(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)에서 구입하였으며, 기타 재료는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입되었다. 웨스턴 블롯(Western blot analysis)을 위한 bcl-xl 다클론성 항체(polyclonal antibody)는 Santa Crus(USA)에서 구입하였다. Green fluorescent protein(GFP)을 추적용 표식자로 이용하기 위해 bcl-xl에 C3-EGFP 벡터를 PCR을 이용하여 시발물질(primer)은 5'-CTG TAG GCT TGA ATT CAA + GTG + ATG TCT CAG AGC AAC CGG GAG CTG GTG-3', 및 5'-CTA CAG GAA YYC YCY AYY YCC CYA CYA AAG AGT GAG CCC AGC AGA ACC ACG CCG-5' 로 PCR 방법에 의해 제작하였다. 사람 신경원조세포주의 유지와 배양을 위해 사람 섬유아세포 성장 인자 20ng/ml가 포함된 UBC1(University British Columbia 1) 배지를 사용하였다. UBC1 배지에는 human insulin, catalase, superoxide dismutase, glutathione, ascorbic acid, biotin, vitamine B12, tocopherol, Zinc sulfate, hydrocortisone, human transferrin, progesterone, putrescine dihydrochloride, sodium selenite 등을 포함한 여러 가지 성분이 포함되어 있다.

방법

C4 세포의 배양 유지 및 면역 화학 염색

C4 세포의 배양 및 유지를 위해 UBC1 배지를 이용하고, 세포분열 촉진제로 섬유아세포성장인자를 첨가하였다. 2~3일에 한번씩 배지를 교환하였으며, 신경 원조 세포로서의 특성 유지 여부를 면역 화학 염색 및 웨스턴 블롯 등으로 확인하였다.

면역 화학 염색을 위해 아비딘-바이오틴-효소 복합체(avidin-biotin enzyme complex, ABC) 법을 사용하였다. 신경 원조 세포로서의 특성을 확인하기 위하여 사람 nestin 항체를 이용하여 nestin 염색을 시행하였다. 대조군으로 성숙 신경세포를 이용하였다. 1차 항체로 사람에 특이성을 가진 nestin, 1:100(UBC, Canada)을 이용하였다. 2차 항체는 goat anti-mouse FITC, 1:128(Sigma)와 goat antirabbit TRITC, 1:100(Cappel)을 사용하였다.

Bcl-xl 이입, 웨스턴 블롯 및 발현 특성 관찰

Bcl-xl과 C3-EGFP 벡터를 제한 효소 EcoR1로 소화(digestion)시킨 후 겔-전기영동(gel-electrophoresis)에 의해 분리하고 다시 결합시켜 C3-EGFP-bcl-xl을 제작하였다. DH5 대장균을 수용성 있는 세포(competent cell)로 사용한 비등법(heat-shock method)을 이용하여 C3-EGFP-bcl-xl을 형질변환(transformation)하였다. Qiagen plasmid purification Maxi kit(Qiagen GmbH, Germany)를 이용한 대규모 정제법으로 증폭 및 형질 변환된 대장

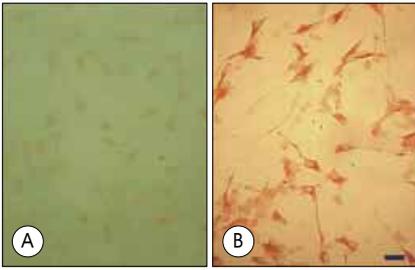


Fig. 1. Immunocytochemical staining for nestin in the parental C4 cells. Human neural progenitor cells show a strong immunoreactivity to the nestin antibody (B), but not in the mature neuronal cells (A). Scale bar : 20 μ m.

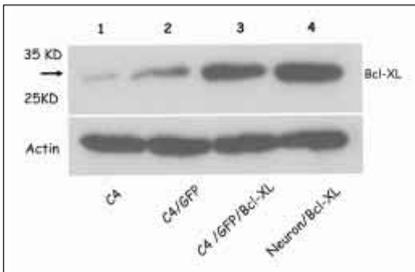


Fig. 2. Western blot showing bcl-xl expression in four different kinds of the C4 cells following transfection. Lane 1, C4 cells ; lane 2, C3-EGFP-C4 cells; lane 3, C3-EGFP-bcl-xl-C4 cells; lane 4, bcl-xl-neurons. The total cell extracts were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and hybridized with rabbit antibodies against bcl-xl. The arrow indicates the location of the bcl-xl proteins with a Mw 30 KD in cultured cells. The bcl-xl expression is detected more strongly in the bcl-xl transfected C4 cells than in the non-transfected control cells.

인한 후, 배양액을 모두 제거하고 유전자 이입을 위해 혈청을 제거한 DMEM(0.8ml)을 배지에 넣었다. A 용액(100 μ l 혈청 제거 배지에 희석한 3 μ g의 DNA를 포함)과 B 용액(100 μ l 혈청 제거 배지에 희석된 LipofectAMINE 6 μ l를 첨가)를 각각 제작하였다. 제작된 두 용액을 잘 섞고 상온에서 15~20분 동안 배양하여 DNA-리포솜(liposome) 복합체가 형성되도록 하였다. DNA-리포솜 복합체를 형성한 A 용액과 B 용액의 혼합액(200 μ l)을 세포를 배양하고 있는 조직 배양판에 넣고, 균일하게 분포하도록 가볍게 흔들어 섞어 준 후에 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기 내에서 5시간 동안 배양하였다. 배양 후 20% 소 혈청(fetal bovine serum)을 포함하고 있는 DMEM 1ml를 각 배양판에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기 내에서 16 시간 동안 배양하였다. 10% 소혈청을 첨가한 DMEM으로 배지를 갈아주고 이입된 유전자가 발현할 수 있도록 24~48시간동안 배양하였다.

C3-EGFP-bcl-xl이 이입 된 C4 세포(C3-EGFP-bcl-xl-C4

cells)로부터 C3-EGFP-bcl-xl과 C3-EGFP 벡터를 증폭하였다. 추출한 DNA 농도를 자외선 분광 광도계와 아가로스 겔(agarose gel)을 이용한 정량분석을 통하여 평가하였다.

웨스턴 블롯 및 세포수 계산을 위한 일시적 유전자 이입을 위해 6-well 조직 배양판, 그리고 동초점 현미경 관찰을 위해서 슬라이드 커버글라스에 신경세포를 배양할 수 있도록 준비하였다. 2 \times 10⁶개의 C4 세포를 각 배양판에 깔고 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기 내에서 24시간 이상 배양하여 세포의 밀도가 50~70% 정도임을 확

인한 후, 배양액을 모두 제거하고 유전자 이입을 위해 혈청을 제거한 DMEM(0.8ml)을 배지에 넣었다. A 용액(100 μ l 혈청 제거 배지에 희석한 3 μ g의 DNA를 포함)과 B 용액(100 μ l 혈청 제거 배지에 희석된 LipofectAMINE 6 μ l를 첨가)를 각각 제작하였다. 제작된 두 용액을 잘 섞고 상온에서 15~20분 동안 배양하여 DNA-리포솜(liposome) 복합체가 형성되도록 하였다. DNA-리포솜 복합체를 형성한 A 용액과 B 용액의 혼합액(200 μ l)을 세포를 배양하고 있는 조직 배양판에 넣고, 균일하게 분포하도록 가볍게 흔들어 섞어 준 후에 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기 내에서 5시간 동안 배양하였다. 배양 후 20% 소 혈청(fetal bovine serum)을 포함하고 있는 DMEM 1ml를 각 배양판에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기 내에서 16 시간 동안 배양하였다. 10% 소혈청을 첨가한 DMEM으로 배지를 갈아주고 이입된 유전자가 발현할 수 있도록 24~48시간동안 배양하였다.

균으로부터 C3-EGFP-bcl-xl과 C3-EGFP 벡터를 증폭하였다. 추출한 DNA 농도를 자외선 분광 광도계와 아가로스 겔(agarose gel)을 이용한 정량분석을 통하여 평가하였다. 웨스턴 블롯 및 세포수 계산을 위한 일시적 유전자 이입을 위해 6-well 조직 배양판, 그리고 동초점 현미경 관찰을 위해서 슬라이드 커버글라스에 신경세포를 배양할 수 있도록 준비하였다. 2 \times 10⁶개의 C4 세포를 각 배양판에 깔고 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기 내에서 24시간 이상 배양하여 세포의 밀도가 50~70% 정도임을 확

세포고사 유도 후 유전자 이입 세포의 시간별 변화

세포고사는 혈청 및 세포 분열 촉진제를 배지에서 제거(serum deprived condition)하여 유도하였다. LipofectAMINE을 이용하여 C3-EGFP-bcl-xl과 C3-EGFP를 혈청제거 환경에서 유전자 이입하고 혈청포함 배지 내에서 bcl-xl이 발현할 수 있도록 48시간 동안 배양한 후 배양액을 혈청제거 DMEM으로 교환하여 세포고사를 유도하였다.

세포고사의 유도는 DNA fragmentation 방법을 이용하여 확인하였다.

배양한 세포를 detergent가 들어가 있는 용해액을 이용하여 세포막을 깨고 단백질을 제거하였다. DNA를 분리해 내고 RNase를 이용하여 RNA를 제거하였다. 1.2% 아가로스 겔을 만들고 DNA를 loading 하였다. ethidium bromide에 의해 DNA를 UV 하에서 확인하였다.

세포 생존을 평가하기 위하여 세포수를 확인하는 방법을 이용하였다. 각 군의 세포를 혈청-포함 및 혈청-제거 배지에서 배양하고 세포수를 배양 1일부터 5일까지 매일 일정한 시간에 확인하고 시간 경과에 따른 세포수의 차이를 비교하였다. 세포 배양판을 9등분하고, 형광현미경 하에서 GFP 발현으로 발광하고 있는 유전자 이입 세포의 수 확인을 일정한 5군데에서 200배 배율(HPF)에서 확인한 후 전체 배지 내의 세포수를 환산하였다. GFP 발현 세포수를 확인한 후에 세포를 트립신 처리로 배지에서 분리한 후 각 배양판의 총 세포수를 hemacytometer를 이용하여 매일 확인하고 시간 변화에 따른 세포수의 변화를 비교하였다. 전체 세포수는 트립신

Over-Expression of Bcl-XL

처리에 의한 희석률(2배), 1 ml 내에서의 세포수(10,000) 등을 고려하여 계산하였다.

ANOVA를 이용하여 통계학적 분석을 시행하여 $P < 0.05$ 인 경우만을 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

Bcl-xl을 C4 세포에 일시적 유전자 이입을 시행하고 시간 경과에 따른 생존 세포의 수를 비교하고 다음의 결과를 얻었다.

C4 세포의 배양 유지 및 면역 화학 염색

연구에 사용된 C4 세포의 특성을 확인하기 위해 면역화학 염색을 시행하였다. 세포분열 촉진제를 첨가한 UBC1 배지에서 배양 및 유지한 C4 세포는 면역 화학 염색상 nestin 염색에 양성인 소견을 보여 사람 신경 원조 세포의 특성을 지닌 세포로 확인되었다^{14-16,44} (Fig. 1).

Bcl-xl 유전자 이입, 웨스턴 블롯 및 발현 특성 관찰

LipofectAMINE을 이용한 일시적 유전자 이입 15시간 후 GFP의 발광 유무로 유전자 이입 여부를 확인하였으며, 유전자 이입률에 의한 발광률이 C3-EGFP-bcl-xl 이입군에서 13.6%, C3-EGFP 이입군에서 1.4%였다(data not shown).

음성 대조군의 C4 세포에서 bcl-xl이 발현 하는지를 확인하고, C4 세포에서의 이입 유전자 발현 양상을 비교하기 위해 웨스턴 블롯 검사를 시행하였다. Bcl-xl 항체에 대한 웨스턴 블롯 검사상 C4 세포군과 C3-EGFP-C4 세포군에서 모두 30KD 근처에서 밴드를 형성하는 소견이 확인되었으나 C4 세포에서는 그 발현 정도가 약하였고 C3-EGFP-bcl-xl-C4 세포군과 bcl-xl-neuron 군에서는 강한 띠가 형성되었다(Fig. 2).

유전자 이입 15 시간 후에 2,000배 이상의 고배율 동초점 현미경 하에서 C4 세포 내에서의 GFP의 발광 양상을 관찰하고 C3-EGFP-C4 세포(유전자이입 음성대조군)에서는 GFP가 세포질과 핵 내에서 모두 발현되나, C3-EGFP-bcl-xl-C4 세포군에서는 bcl-xl이 주로 세포질 내에서만 발현되는 양상을 보였다(Fig. 3). 세포고사를 유도하기 전에는 bcl-xl의 세포질내 발현 양상이 균질하게 발광하는 양상을 보였으나 세포고사를 유도하고 난 후에는 비균질한 모양으로 세포질 내에서 뭉쳐지는 양상을 보였다. 유전자 이입 후 3일과 5일에 추적 확인한 C3-EGFP-bcl-xl-C4 세포군에서의 발광 발현은 시간이 가면서 점차 감소하는 양상을 보였으나 그 발광정도가 C3-EGFP-C4 세포군에 비해 상대적으로 강하게 남는 소견을 보였다.

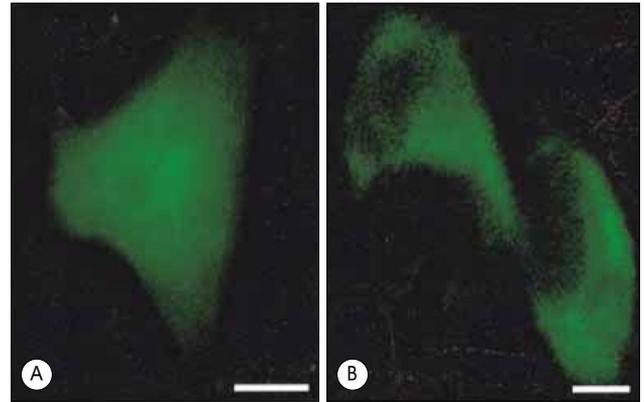


Fig. 3. Fluorescent photomicrographs of the C4 cells. The C3-EGFP-C4 cells show diffuse green fluorescence expression throughout the cell(A). In the C3-EGFP-bcl-xl-C4 cells, the green fluorescence is observed only in the cytoplasm(B). Scale bar : 5 μ m.

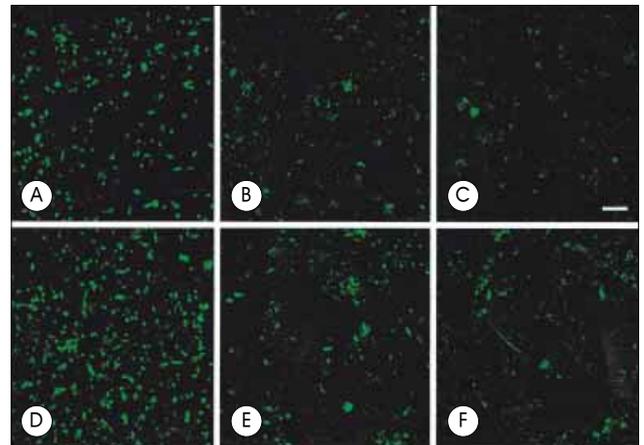


Fig. 4. Changes in GFP expression in the culture dishes containing C3-EGFP-C4 cells(A, B and C), and another containing C3-EGFP-bcl-xl-C4 cells(D, E and F), under serum deprived conditions. The cells were cultured with serum for 15 hours(A and D), and then deprived of serum for 3 days(B and E) and 5 days(C and F). After 72 hours of incubation under serum deprivation conditions, a distinct difference in the number of cells are observed between the culture wells containing the C3-EGFP-C4 cells and C3-EGFP-bcl-xl-C4 cells. Scale bar : 50 μ m.

세포고사 유도 후 유전자 이입세포의 시간별 변화 관찰

세포고사의 유도는 DNA fragmentation 방법으로 확인되었다. 대조군과 실험군에서 유전자 이입 15시간 후부터 혈청-제거 방법으로 세포고사를 유도하고 세포수를 확인하였다. 세포고사를 유도한 당일의 세포수가 C3-EGFP-bcl-xl-C4 세포군에서는 9600개/배양판, C3-EGFP-C4 세포군에서는 3467개/배양판이었으나 음성 대조군에서 총 221000개/배양판의 소견을 보여 세포고사를 유도도에 상관없이 유전자 이입군에서의 세포수 감소가 현저하였다. 유전자를 이입하지 않은 군에서의 C4 세포 수는 세포고사 유도 직전과 직후에 변화가 없었으나 C3-EGFP-bcl-xl-C4 세포군과 C3-

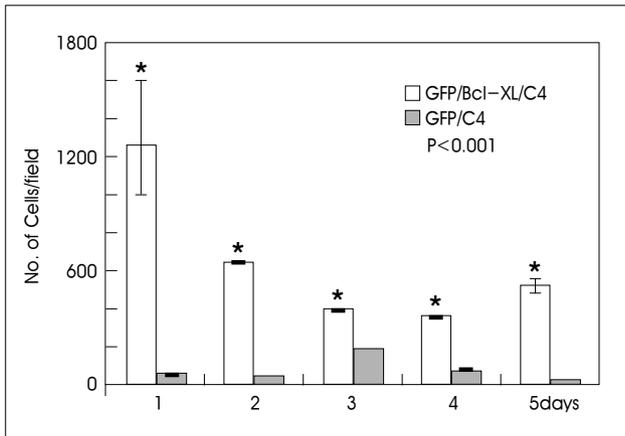


Fig. 5. Bar graph showing a quantitative assessment of the C3-EGFP-C4 cells and C3-EGFP-bcl-xl-C4 cells over time. Each time point represents the average SD of three independent trials. The number of cells in the well containing C3-EGFP-bcl-xl-C4 cells gradually decreased for 3 days and then increased gradually (n=3).

EGFP-C4 세포군에서는 세포고사를 유도 후 세포수의 차이가 현저하였다. 즉, 이입 직후 C3-EGFP-bcl-xl-C4 세포군과 C3-EGFP-C4 세포군이 각각 9600개/배양판 및 3467개/배양판의 세포수를 보였으나 세포고사 유도 후 3일과 5일에 GFP 발현 정도와 발광세포의 수가 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였다(Fig. 4). C3-EGFP-bcl-xl-C4 세포군에서는 혈청 제거 당일에는 평균 1302 개/HPF였으나 그 수가 점차 감소하여 3일째에는 456개/HPF로 감소하였다. 그러나 5일째에는 세포수가 589개/HPF로 오히려 증가하였다. 한편, C3-EGFP-C4 세포군에서는 세포고사 유도 당일 세포수가 평균 48개/HPF였으나 3일째에는 168개/HPF로 증가하였다가 5일째에는 세포수가 32개/HPF로 다시 감소하는 소견을 보였으며 이는 통계학적으로 유의하였다 ($P < 0.001$) (Fig. 5).

고찰

신경간세포가 다기능 잠재(pluripotency) 및 자가증식(self-renewal)의 특성이 있고, 생쥐(mouse) 뿐만 아니라³³⁾ 사람의 중추신경계 내에도 있다는 것이 밝혀져 있다⁶⁾. 신경간세포들은 신경 원조 세포 및 신경전구 세포(precursor cell)를 거쳐 신경세포(neuron)나 신경교세포(glial cell)로 분화하므로 손상 받은 신경계의 복구에 이용 가능하다고 추정되어 이들 세포를 이용한 세포 치료 연구가 활발히 이루어지고 있다³¹⁾. C4 세포는 사람 태아에서 분리된 신경간세포에 V-myc 유전자를 retrovirus를 이용하여 형질 도입(transduction)하여 제작하고, 섬유아세포 성장인자를 첨가한 UBC1 배지에서 배양하고 유지되었다. 이 세포가 신경 원조 세포로서의 특성을 유지하고 있는 것을 nestin을 이용한 면역 화학적 염

색을 통하여 확인하였다^{14,16,17,44)}. 신경간세포에서 신경교세포와 신경세포로 분화해 가는 과정에 있는 세포로 추정되었다. 신경간세포를 이식하면 생체 내에서 숙주세포와 융화하면서 이동한다고 보고하고 있다³⁹⁾. 그러나 생체 내에 이식하는 신경간세포들이 생체 내에서 도파민 생산세포로 분화하려면 이식 세포가 장기간 생존해야 한다. Svendsen 등이 신경간세포가 이식 2주 후가 되면서 현저히 감소하고, 이식 후 20주가 경과한 파킨슨씨병 모델 백서 10마리 중에서 2마리에서만 타이로신 수산화 효소 발현 신경세포가 양성으로 나타난 것은 이식한 세포 중에서 도파민 생산 세포로 분화할 시간적 여유를 가지지 못했기 때문이라고 추정하였다³⁹⁾. 따라서 기존의 다른 이식원과 마찬가지로 새로운 이식원으로서의 가능성이 있는 신경간세포에서의 생존을 증강은 매우 중요하다.

최근에는 자연적인 퇴화와 연관된 세포사가 환경적 영향에 의한 효과와 복합적으로 발생 할 것으로 생각하고 있고¹¹⁾, 도파민성 신경세포의 점진적 사멸 기전에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다³⁰⁾. 특히 세포고사가 주목을 받고, 흑질 내 세포사의 병태 생리도 세포고사로 추정하고 있다¹¹⁾.

Bcl-2는 세포 증식 촉진보다 세포사의 시작을 멈추게 하는 기능을 가지고 있다^{32,34,36)}. Bcl-2 계는 구조상 4개의 도메인(domain)을 가지고 있으며, 막유착(membrane anchor)역할을 하는 C-말단부 꼬리(C-terminal tail) 유무에 따라 여러 가지로 나누는데⁸⁾, bcl-2⁴¹⁾ 와 bcl-xl은 C-말단부 꼬리와 항-세포고사 기능이 있는 경우이다. Bcl-2의 작용 기전은 아직 밝혀지지 않았다⁴⁹⁾. 세포간 또는 세포내 신호에 의해서 세포고사-촉진-단백(proapoptotic protein)인 bax가 활성화 되는데, bcl-2나 bcl-xl이 활성화 된 Bax를 차단하지 못하면 미토콘드리아에서 세포질 내로 Cytochrome-C가 방출된다. 방출된 Cytochrome-C는 세포질 내 Caspase를 활성화시켜 세포 내 단백질 분해를 유도하여 세포가 죽게 된다. 그런데 bcl-2가 Cytochrome-C의 미토콘드리아 투과성을 조절하여, Cytochrome-C의 유리를 막음으로써 세포사를 예방한다는 보고가 있다⁴¹⁾. Eves 등이 혈청을 제거한 배지 환경으로 세포고사를 유도하고 신경세포주(H19-7 세포)에서 bcl-2 및 bcl-xl이 모두 이들 세포의 생존을 높이고 이들에 의한 생존을 증강 효과가 이들의 동시 발현(coexpression)에 의해 증강되지 않아 서로 다른 시점에서 신경세포의 세포고사를 차단할 것으로 추정하였다¹³⁾. 세포고사를 유도하는 환경을 유도하고 흰쥐 대뇌 피질 신경 세포²³⁾, 흰쥐 태생 신경세포²⁾, 흰쥐 해마세포²⁶⁾ 등을 이용한 bcl-2에 생존 증강에 대한 연구는 최근 보고되고 있으나 bcl-2 계 유전자에 대한 연구는 주로 그 기전에 대한 연구에 초점이 맞추어져 있으며, 신경간세포나 신경원조 세포에 대해서는 bcl-2 및 bcl-xl의 발현이 확인된 정도이다²⁾. Offen 등은 bcl-2가 이입된 도파민 신경세포에서 도파민에 노출

시켜 24시간 내에 90% 이상이 사멸하는 정도의 빠른 세포사를 유도하였으나²⁹⁾, 본 연구자는 혈청을 제거한 일반 배지에서 신경간세포를 배양하여 세포고사를 서서히 유도하고¹³⁾, 사람 신경 원조 세포를 이용하여 그 변화를 관찰하였다. 본 연구자는 동초점 현미경 고배율 시야에서 이입된 bcl-xl의 발현이 사람 신경 원조 세포 내의 세포질에 국한되어 있음을 확인하고 이러한 소견이 세포고사가 유도된 환경에서도 지속적으로 관찰되는 소견을 확인하였다. bcl-2는 신경세포내 세포질에서 발현되고³³⁾, 미토콘드리아의 막에 부착한다¹⁹⁾는 것은 잘 알려져 있으나 bcl-xl의 신경간세포나 원조 세포 내에서의 발현 양상이 확인되고, 세포고사 과정에서의 GFP 발광 양상이 시간별로 변화를 보여 세포질 내에서의 발광부위가 군데 군데 뭉쳐지면서 약해지는 특징을 보였다. Gonzalez-Garcia는 bcl-2 원종양유전자(protooncogene)가 태생 단계에서 신경세포 내에 발현된 후 성인의 중추신경계 내에서는 발현이 억제된다고 보고하였고¹⁵⁾, bcl-2가 흑질 내 도파민 신경세포를 포함한 신경세포에서 발현이 되나 모든 신경세포에서 발현되는 것은 아니며 신경교세포에서는 발현되지 않는다⁴²⁾. 본 연구자는 사람 신경원조세포주인 C4 세포 내에서 사람 bcl-xl 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 통해 C4 세포 내에서의 bcl-xl의 발현을 확인하였다. 특히 퇴행성 뇌질환 환자의 신경세포 내 bcl-2 발현이 정상인과 차이가 없어 이 부위에서의 세포사가 다른 유전자에 의해 조절되고 있을 가능성이 있고⁴²⁾, bcl-xl은 성인의 중추신경계 내에서도 발현이 되고 있어¹⁷⁾ 본 연구자가 bcl-2 계 유전자 중에서 bcl-xl의 발현을 유도한 것은 bcl-2에서 기대할 수 없는 효과를 bcl-xl에서 기대할 수 있다고 추정하기 때문이다.

본 연구에서는 C3-EGFP-bcl-xl-C4 세포군에서 세포고사 유도 후 3일째까지 감소하던 C4 세포의 수가 다시 증가하는 양상을 보이고, C3-EGFP-C4 세포군에서는 일시적으로 수가 증가하다가 다시 감소하는 소견을 보였다. 이러한 소견은 세포고사 유도 후 bcl-xl이 이입된 C4 세포 내에서 발현되어 단백을 생산하여 효과를 나타내기까지 소요되는 시간이 약 48시간이 소요되었다는 것을 의미하는 것으로 생각된다. Minn 등도 세포고사를 유도하고 포유세포(mammalian cell, 293cell)에 유전자 이입한 bcl-xl의 발현까지 24~48시간 정도가 소요된다고 보고하였다²⁸⁾. 따라서 이러한 포유세포에서의 bcl-xl 발현까지의 소요 시간이 본 연구자의 사람 신경간세포에서도 비슷한 소견을 보였으나 bcl-xl 발현에 의한 세포수의 변화 양상은 Chao 등의 경우에는 bcl-xl 이입 군에서는 5일째까지 25%의 세포가 지속적으로 감소하였으며⁹⁾, 대조군에서는 2일째에 현저한 감소(90% 이상)를 보인다고 보고하였으나¹⁰⁾ 본 연구 결과에서는 C3-EGFP-C4 세포군에서 이입 후 2일째까지 세포수가 일시적으로 증가하다가 다시 감소하는 소견을 보여 혈청제

거 환경에서도 신경 원조 세포의 생존은 48시간 정도 유지 될 수 있음을 의미하는 것으로 추정하고 있다.

본 연구자는 bcl-xl의 발현을 사람 신경 원조 세포주인 C4 세포에서 확인하고 bcl-xl을 과발현 시키면 세포고사를 억제하거나 지연시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 장기간 도파민이 결핍되어 있던 나이든 백서에서 태생 백서의 도파민 신경 세포와 신경초세포(schwann cell)를 동시에 이식하면 신경초세포에서 분비하는 신경인성 인자에 의해 이식세포의 생존과 행동 증상까지 호전시켰다는 보고가 있다¹⁰⁾. 이는 bcl-xl 유전자 이입세포를 이용한 이식에서 더 좋은 결과를 예상할 수 있다는 가능성을 시사하는 것으로서, bcl-xl의 과발현이 유도된 신경 원조 세포는 이식되는 신경간 또는 원조 세포의 이식 후 신경세포로 분화할 수 있는 시간적인 여유를 가지게 되는 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

결론

사람 신경원조세포주인 C4 세포에 bcl-x를 일시적 유전자 이입하고 세포고사를 유도한 후 시간 경과에 따른 생존 세포의 수의 변화를 관찰하고, bcl-xl 이입 세포 군에서 현저한 세포 생존 증강이 확인되어 bcl-xl 이입이 이식 세포의 생존율을 높여 줄 수 있는 하나의 방안이 될 수 있을 것으로 추정된다.

• Acknowledgement

본 연구는 아주대학교 뇌질환연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의한.

References

1. Ahn YH, Emgard M, Brundin P : Ultrastructural characterization of dissociated embryonic ventral mesencephalic tissue treated with neuroprotectants. **Cell Transplant** **12** : 235-241, 2003
2. Banasiak KJ, Cronin T, Haddad GG : bcl-2 prolongs neuronal survival during hypoxia-induced apoptosis. **Brain Res Mol Brain Res** **72** : 214-225, 1999
3. Bjorklund A, Lindvall O : Cell replacement therapies for central nervous system disorders. **Nat Neurosci** **3** : 537-544, 2000
4. Brundin P, Pogarell O, Hagell P, Piccini P, Widner H, Schrag A, et al : Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazardoids in Parkinson's disease. **Brain** **123** : 1380-1390, 2000
5. Brundin P, Strecker RE, Widner H, Clarke DJ, Nilsson OG, Astedt B, et al : Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease : immunological aspects, spontaneous and drug-induced behavior and dopamine release. **Exp Brain Res** **70** : 192-208, 1988
6. Buc-Caron MH : Neuroepithelial progenitor cells explanted from human fetal brain proliferate and differentiate in vitro. **Neurobiol Dis** **2** : 37-47, 1995
7. Castilho RF, Hansson O, Brundin P : Improving the survival of grafted embryonic dopamine neurons in rodent models of Parkinson's disease. **Prog Brain Res** **127** : 203-231, 2000
8. Chan WY, Yew DT : Apoptosis and bcl-2 oncoprotein expression in the

- human fetal central nervous system. **Anat Rec** **252** : 165-175, 1998
9. Chao DT, Korsmeyer SJ : Bcl-2 family: regulators of cell death **Annu Rev Immunol** **16** : 395-419, 1998
 10. Collier TJ, Sortwell CE, Daley BF : Diminished viability, growth and behavioral efficacy of fetal dopamine neuron grafts in aging rats with long-term dopamine depletion: an argument for neurotrophic supplementation. **J Neurosci** **19** : 5563-5573, 1999
 11. Dunnett SB, Bjorklund A : Prospects for new restorative, neuroprotective treatment in Parkinson's disease. **Nature** **399** : A32-39, 1999
 12. Emerich DF, McDermott PE, Krueger PM, Frydel B, Sanberg PR, Winn SR : Polymer-encapsulated PC12 cells promote recovery of motor function in aged rats. **Exp Neurol** **122** : 37-47, 1993
 13. Eves EM, Boise LH, Thompson CB, Wagner AJ, Hay N, Rosner MR : Apoptosis induced by differentiation or serum deprivation in an immortalized central nervous system neuronal cell line. **J Neurochem** **67** : 1908-1920, 1996
 14. Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP et al : Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes : **Mol Cell Neurosci** **23** : 373-382, 2003
 15. Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, et al : Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients : preliminary results. **Cell Transplant** **9** : 273-278, 2000
 16. Gage F : Mammalian neural stem cells. **Science** **287** : 1433-1438, 2000
 17. Geschwind DH, Ou J, Easterday MC, Dougherty JD, Jackson RL, Chen Z, et al : A genetic analysis of neural progenitor differentiation. **Neuron** **29** : 325-339, 2001
 18. Gonzalez-Garcia M, Garcia I, Ding L, O'Shea S, Boise LH, Thompson CB, et al : bcl-X is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions neuronal cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A** **92** : 4304-4308, 1995
 19. Hamner S, Skoglosa Y, Lindholm D : Differential expression of bcl-w and bcl-x messenger RNA in the developing and adult rat nervous system. **Neuroscience** **91** : 673-684, 1999
 20. Karlsson J, Engard M, Brundin P : Comparison between survival of lazaro-treated embryonic nigral neurons in cell suspensions, cultures and transplants. **Brain Res** **955** : 268-280, 2002
 21. Leff SE, Rendahl KG, Spratt SK, Kang UJ, Mandel RJ : In vivo L-DOPA production by genetically modified primary rat fibroblast or 9L gliosarcoma cell grafts via coexpression of GTPcyclohydrolase I with tyrosine hydroxylase. **Exp Neurol** **151** : 249-264, 1998
 22. Lindvall O, Rehnström S, Brundin P, Gustavii B, Astedt B, Widner H, et al : Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. **Arch Neurol** **46** : 615-631, 1998
 23. Liu X, Zhu XZ : Roles of p53, c-Myc, bcl-2, Bax and caspases in serum deprivation-induced neuronal apoptosis : a possible neuroprotective mechanism of basic fibroblast growth factor. **Neuroreport** **29** : 10 : 3087-3091, 1999
 24. Lundberg C, Horellou P, Mallet J, Bjorklund A : Generation of DOPA-producing astrocytes by retroviral transduction of the human tyrosine hydroxylase gene : in vitro characterization and in vivo effects in the rat Parkinson model. **Exp Neurol** **139** : 39-53, 1996
 25. Madrazo I, Drucker-Colin R, Diaz V, Martinez-Mata J, Torres C, Becerril JJ : Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. **N Engl J Med** **2** : 831-834, 1987
 26. Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K, Kiyama H, Miyake S, et al : Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. **J Neurochem** **73** : 2037-2046, 1999
 27. McKay RDG : Stem cells in the central nervous system. **Science** **276** : 66-71, 1997
 28. Minn AJ, Kettlun CS, Liang H, Kelekar A, Vander Heiden MG, Chang BS, et al : bcl-x1 regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms. **EMBO J** **18** : 632-643, 1999
 29. Offen D, Ziv I, Panet H, Wasserman L, Stein R, Melamed E, et al : Dopamine-induced apoptosis is inhibited in PC12 cells expressing bcl-2. **Cell Mol Neurobiol** **17** : 289-304, 1997
 30. Olanow CW, Jenner P, Beal MF : Cell death and neuroprotection in Parkinson's disease. **Ann Neurol (Suppl)** **44** : 1-133, 1998
 31. Olanow CW, Kordower JH, Freeman TB : Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. **Trends Neurosci** **19** : 102-109, 1996
 32. Reed JC : Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. **J Cell Biol** **124** : 1-6, 1994
 33. Reynolds BA, Weiss S : Clonal nad population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. **Dev Biol** **175** : 1-13, 1996
 34. Romero F, Martinez-AC, Camonis J, Rebollo A : Aiolos transcription factor controls cell death in T cells by regulating bcl-2 expression and its cellular localization. **EMBO J** **18** : 3419-3430, 1999
 35. Schumacher JM, Ellias SA, Palmer EP, Kott HS, Dinsmore J, Dempsey PK, et al : Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. **Neurology** **14** : 1042-1050, 2000
 36. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y : Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. **Nature** **399** : 483-487, 1999
 37. Snyder EY, Macklis, JD : Multipotent neural progenitor or stem-like cells may be uniquely suited for therapy for some neurodegenerative conditions. **Clin Neurosci** **3** : 310-313, 1995-1996
 38. Starr PA, Wichmann T, van Horne C, Bakay RA : Intranigral transplantation of fetal substantia nigra allograft in the hemiparkinsonian rhesus monkey. **Cell Transplant** **8** : 37-45, 1999
 39. Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, Ter-Borg MG, Rosser AE, Tyers P, et al : Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. **Exp Neurol** **148** : 135-146, 1997
 40. Tan J, Town T, Placzek A, Kundtz A, Yu H, Mullan M : Bcl-X(L) inhibits apoptosis and necrosis produced by Alzheimer's beta-amyloid1-40 peptide in PC12 cells. **Neurosci Lett** **272** : 5-8, 1999
 41. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J : Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. **Science** **226** : 1097-1099, 1984
 42. Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Strada O, Boissiere F, Hibner U, et al : Expression of bcl-2 in adult human brain regions with special reference to neurodegenerative disorders. **J Neurochem** **69** : 223-231, 1997
 43. Wachtel SR, Bencsics C, Kang UJ : Role of aromatic L-amino acid decarboxylase for dopamine replacement by genetically modified fibroblasts in a rat model of Parkinson's disease. **J Neurochem** **69** : 2055-2063, 1997
 44. Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T, Miyata T, Okano H, Hori M, et al : Differential expression of Musashi1 and nestin in the adult rat hippocampus after ischemia. **J Neurosci Res** **15** : 750-756, 2002
 45. Yamada M : Herpes simplex virus vector-mediated expression of bcl-2 prevents 6-hydroxydopamine-induced degeneration of neurons in the substantia nigra in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA** **96** : 4078-4083, 1999