



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

신경세포의 허혈-재관류 손상에서
칼리스타틴의 역할

Role of Kallistatin on
ischemia-reperfusion neuronal injury

2021년 2월

서울대학교 대학원
임상의과학과 임상의과학 전공
김 하 영

신경세포의 허혈-재관류 손상에서 칼리스타틴의 역할

지도교수 서길준

이 논문을 의학 박사 학위논문으로 제출함

2020년 10월






서울대학교 대학원

임상의과학과 임상외과학 전공

김 하 영

김하영의 박사 학위논문을 인준함

2021년 1월

위원장	김만표	
부위원장	서길준	
위원	박희표	
위원	조유환	
위원	최성혁	

초록

서론: 허혈-재관류 손상은 조직으로의 산소공급이 저하되며 발생하는 허혈 이후 재관류가 이루어짐으로써 발생하는 일련의 과정으로 심정지 후 증후군, 심근경색 및 뇌경색 후 재관류, 패혈증 등의 주요 기전으로 알려져 있다. 기존 연구들에 따르면 허혈-재관류 손상의 초기에 NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 산화효소가 관여하며, 산화 스트레스를 발생시키는데 심정지 후 증후군에서 발생하는 뇌손상의 주요 기전은 허혈-재관류 손상에 의해 활성산소가 생성되어 세포자멸사가 진행되는 것으로 심정지 이후의 신경학적 예후는 여전히 불량하다. 최근 단백질학 연구를 통해 병원 밖 심정지 후 자발순환이 회복된 환자들의 낮은 혈중 칼리스타틴 농도가 심정지의 불량한 신경학적 예후와 관련이 있다는 사실을 밝혀냈다. 칼리스타틴(Kallistatin)은 SERPINA4 유전자에 의해 암호화되어 있으며 인간 혈장에서 발견되고 항염증, 항산화 성질을 지닌 단백질로 칼리스타틴은 NADPH 산화효소의 활성을 억제하여 항산화 작용에 기여하는 것으로 알려졌다. 본 연구는 칼리스타틴이 결핍된 인간 신경세포에 허혈-재관류 손상과정을 유발시켜 NADPH 산화효소의 발현이 증가함에 따라 활성산소가 과도하게 만들어지고 산화손상이 악화될 수 있음을 규명하고자 하였다.

방법: 인간 신경세포에 SERPINA4 small interfering RNA(siRNA) 형질주입을 시행하여 칼리스타틴 knockdown 신경세포를 제작하고 이후에 칼리스타틴의 발현 정도를 측정하였다. 허혈-재관류 손상을 유발하기 위해 칼리스타틴 knockdown 신경세포와 control siRNA 형질주입 신경세포에 60분간 산소-포도당 결핍(Oxygen-glucose deprivation, OGD) 처리 시행 후 23시간동안 재산소화(Reoxygenation, Reoxy)과정을 시행하였으며 세포 생존도를 측정하였다. 또한 칼리스타틴 knockdown 신경세포와 control siRNA 형질주입 신경세포 및 각각에 산소-포도당 결핍 처리한 실험군에서 칼리스타틴 농도를 측정하였고 NADPH 산화효소(Nox-1), hydrogen peroxide, caspase-3 발현 정도를 측정하여 산화스트레스와 세포자멸사 정도를 비교하였다.

결과: SERPINA4 siRNA 형질주입은 칼리스타틴의 발현을 억제하였고 60분간 산소-포도당 결핍과 23시간 동안 재산소화는 control siRNA와 SERPINA4 siRNA를 처리한 세포군 모두에서 세포 생존도를 감소시켰다. OGD/Reoxy과정을 거친 control siRNA 형질주입 세포군에서 칼리스타틴의 발현이 감소하는 것을 확인하였

으며($p < 0.001$) 또한 control siRNA군과 비교하여 SERPINA4 siRNA 형질주입한 세포군에서 칼리스타틴 발현이 억제된 것을 확인하였다. ($p < 0.001$) 산화스트레스를 측정하기 위해 칼리스타틴 knockdown 세포군과 이 세포군에 OGD/Reoxy 과정을 거친 그룹간 비교 시 칼리스타틴 knockdown 세포군에 비해 칼리스타틴 knockdown 세포군에 OGD/Reoxy 과정을 거쳤을 때, NADPH 산화효소 발현이 증가하는 것을 확인하였고($p < 0.001$) hydrogen peroxide 농도도 더 증가하는 것을 확인하였다. ($p < 0.001$) Control siRNA 세포군과 칼리스타틴 knockdown 세포군에 각각 OGD/Reoxy 과정을 거쳤을 때, caspase-3 발현이 상승하는 것을 확인하였고 칼리스타틴 발현이 억제된 세포군에 OGD/Reoxy 과정을 거쳤을 때 세포자멸사가 가장 촉진됨을 확인하였다. (Control siRNA: $p < 0.05$, SERPINA4 siRNA: $p < 0.01$)

결론: 칼리스타틴이 결핍된 인간신경세포에 산소-포도당 결핍과 재산소화 과정은 세포 생존도를 감소 시키며 NADPH 산화효소 발현을 더욱 증가시켜 산화 스트레스를 증가 시켰으며 hydrogen peroxide가 더 많이 생성되었고 caspase-3가 더 많이 생성되어 세포자멸사를 촉진시켰다. 이러한 결과는 추후 칼리스타틴이 항산화 및 항세포사멸 작용에 영향을 미쳐 인간 신경 세포의 허혈-재관류 손상에 대한 신경 보호 작용을 할 수 있는 실마리를 제공할 수 있음을 시사한다.

주요어: 신경세포, 칼리스타틴, 활성산소물질, 산화스트레스, 세포자멸사, 허혈-재관류 손상, NADPH 산화효소

학번: 2018-32841

목차

초록.....	3
목차.....	5
그림 목록.....	7
I. 서론.....	8
II. 연구 방법.....	10
2.1 세포주 및 세포 배양.....	10
2.2 칼리스타틴 knockdown 인간 신경세포 제작.....	10
2.3 허혈-재관류 손상모델.....	10
2.4 세포 생존도 측정.....	11
2.5 칼리스타틴 농도 측정.....	11
2.6 산화 스트레스 및 세포자멸사 측정.....	11
2.7 통계분석.....	12
III. 결과.....	13
3.1 칼리스타틴 knockdown 인간신경세포의 SERPINA4 유전자 발현..	13
3.2 산소-포도당 결핍 시간에 따른 세포 생존도 측정.....	13
3.3 칼리스타틴 농도 측정.....	15

3.4 산화 스트레스 및 세포자멸사 측정.....	16
IV. 고찰.....	20
V. 결론.....	23
참고문헌.....	24
초록(영문).....	29

그림 목록

Figure 1. SERPINA4 mRNA expression after SERPINA4 small interfering RNA transfection.....	13
Figure 2. Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation(OGD/Reoxy) time dependent effect on human neuronal cells.....	14
Figure 3. The cell viability of oxygen-glucose deprivation/reoxygenation effect on control and kallistatin knockdown human neuronal cells.....	15
Figure 4. The kallistatin Level of control and kallistatin knockdown human neuronal cells on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation.....	16
Figure 5. The NADPH oxidase(Nox-1) expression of control and kallistatin knockdown human neuronal cells on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation.....	17
Figure 6. The hydrogen peroxide level of control and kallistatin knockdown human neuronal cells on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation.....	18
Figure 7. The caspase-3 expression of control and kallistatin knockdown human neuronal cells on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation.....	19
Figure 8. NADPH oxidase, cleaved caspase 3 western blot result of control and kallistatin knockdown human neuronal cells on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation.....	19

I. 서론

허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)은 조직으로의 산소공급이 저하되며 발생하는 허혈 이후 재관류가 이루어짐으로써 발생하는 일련의 임상적, 실험적 결과들을 일컫는다.¹ 이러한 허혈-재관류 손상은 심정지 후 증후군, 심근경색 및 뇌경색 후 재관류, 폐혈증과 중증 외상, 수술 후 합병증 등의 병태 생리에 관여하는 것으로 알려져 있다.² 기존 연구들에 따르면 허혈-재관류 손상의 초기에 NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 산화효소에 의해 활성산소가 과도하게 발현되면^{3,4} 활성산소 의존적인 세포 내 신호전달 경로가 활성화되어 전염증 사이토카인이 방출되며 이로 인해 산화 스트레스가 발생한다.⁵⁻⁷ 세포막과 특히 에너지 대사 및 세포자멸사 신호전달에 중요한 역할을 하는 미토콘드리아의 기능장애 또한 발생하게 된다.⁸ 인체는 이러한 산화적 손상을 예방하기 위해 초과산화물 불균등화 효소(Superoxide dismutase, SOD), 카탈라제(Catalase), 글루타치온(Glutathione) 산화환원 주기와 같은 효소를 이용한 자체적인 항산화 방어체계를 지니고 있으며 이를 통해 활성산소물질에 의한 세포손상을 예방한다.^{9,10} 하지만 활성산소물질의 양이 생체의 자체적인 항산화 방어 능력을 넘어 생성되게 되면 산화 스트레스가 발생하게 된다.^{11,12}

뇌는 혈액 공급에 가장 민감한 기관이며 신체 전체 산소의 20-25%를 담당하고 다른 장기보다 가장 높은 대사활동을 한다.¹³ 뇌는 심장, 간, 신장, 폐와 같은 장기에 비해 초과산화물 불균등화 효소, 카탈라제, 글루타치온 과산화효소와 같은 항산화작용을 하는 효소의 농도가 낮으며 산화손상에 매우 취약하다고 밝혀져 있다.¹⁴ 심정지가 발생하게 되면 산소 전달은 극적으로 감소하고 심각한 조직 저산소증으로 이어지며 허혈이 장기화 되면 또한 조직에 활성산소가 축적되고 심폐소생술 및 자발순환 회복으로 재관류되면서 활성산소가 조직에 널리 분포하게 되어 결국 심각한 허혈-재관류 손상을 일으키게 된다.¹⁵ 특히 뇌 신경세포의 허혈-재관류 손상은 앞서 언급한 것처럼 뇌라는 장기가 산화손상에 특히 취약하기 때문에 저산소성 뇌손상을 일으키며 이로 인해 자발순환이 회복되어 소생이 된 환자들의 상당수가 식물인간 상태로 빠지거나 일상생활이 불가능하게 되는 등 심각한 신경계 손상을 겪게 되고 신경학적 예후가 불량하게 된다.^{16,17} 그러나, 현재까지 심정지로 인한 허혈-재관류 손상에서 발생하는 활성산소의 생성을 억제하여 뇌 손상 치료에 기여하는 것은 목표체온치료가 유일하고 치료 약제는 아직 없으며¹⁸, 지난 수십년간 발견한

많은 생화학적 지표 중 neuron specific enolase와 S-100 protein이 신경손상 정도를 반영할 뿐¹⁹⁻²¹ 치료제로 개발이 된 것은 없다. 치료제의 개발을 위해서는 해당 물질의 결핍이 유의하게 신경학적 나쁜 예후와 관련이 있거나 해당물질의 보충이 신경학적 예후를 개선시켜 준다는 것이 입증되어야 한다.^{22,23}

최근 단백질학 연구를 통해 병원 밖 심정지 후 자발순환이 회복된 환자들 중 낮은 혈중 칼리스타틴 농도를 가진 생존자들이 심정지의 불량한 신경학적 결과와 관련이 있다는 사실을 밝혀냈다.²⁴ 칼리스타틴(Kallistatin)은 1986년 Chao 등에 의해 발견된 칼리크레인(kallikrein) 결합 단백질로 SERPINA4 유전자에 의해 암호화 되어 인간 혈장에서 존재하며^{25,26} 체내에서 다양한 작용에 관여하고 있음이 밝혀졌다. 인체 내에서 칼리스타틴은 주로 간에서 발견되지만 심장, 신장, 혈관과 같은 심혈관 기능 관련 조직에도 널리 분포한다.^{27,29} 칼리스타틴은 endogenous serine proteinase inhibitor로 칼리크레인과 결합할 수 있는 active site와 heparin-binding site의 두 가지 중요한 구조적 부분으로 구성된다. 칼리스타틴은 heparin-binding site를 통해서 항염증효과를 보이며,³⁰ 이러한 효과는 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 high mobility group box-1 (HMGB1)을 억제함으로써 나타난다.^{31,32} 또한 항산화 기능도 가지는데, 환원형 NADPH 산화효소의 활성을 저하시켜 활성산소물질의 생성을 억제하고³³ endothelial nitric oxide synthase(eNOS), Sirtuin 1(SIRT1), forkhead box protein O1(FoxO1)의 합성을 촉진하여 항산화작용에 기여한다.³²⁻³⁵ 칼리스타틴의 이러한 항산화, 항염증 작용을 이용한 연구로 최근 폐혈증 환자에서 칼리스타틴의 혈중 농도 감소 시 폐혈증의 중증도가 증가하며 임상 예후가 불량하다는 것이 보고되었고³⁶ 폐혈증 동물모델에서 칼리스타틴 투약 시 장기 손상이 줄어든다는 연구 결과도 보고되었다.^{31,37} 상기 연구들에서 밝혀낸 연관성을 통해 칼리스타틴이라고 하는 물질의 항산화 성질이 허혈-재관류 손상에서 발생하는 활성산소와 관련이 있으며 신경세포를 보호하는 역할을 수행해 뇌 손상에 기여할 수 있을 것이라고 추정할 수 있다.

본 연구의 가설은 칼리스타틴 발현이 억제된 신경세포가 허혈-재관류 손상에 취약하며 허혈-재관류 손상 과정에 NADPH 산화효소의 발현이 증가함에 따라 산화스트레스 및 세포자멸사가 더욱 활성화된다는 것이다. 본 연구는 칼리스타틴이 결핍된 인간 신경세포에 허혈-재관류 손상 과정을 유도하여 NADPH 산화효소의 발현이 증가함에 따라 활성산소가 과도하게 만들어지고 산화손상이 악화될 수 있음을 규명하고자 하였다.

II. 연구방법

2.1 세포주 및 세포배양

실험에 사용한 인간 신경세포(Human cortical neuron)(HCN-2, ATCC® CRL-10742™, Homo sapiens brain encephalitis)는 ATCC(American Type Culture Collection, Menassas, VA)에서 구입하여 사용하였으며 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 4 mM L-글루타민을 적용하고 1.5 g/L 중탄산나트륨, 4.5 g/L 포도당, 10% 소태아혈청(fetal bovine serum)을 포함한 배양 배지에서 배양하였다. 모든 세포 배양은 37°C의 공기 중에서 5% V/V의 CO₂의 가습 환경에서 유지 하였다. 계대배양은 10-12일마다 진행하였으며 2-3일마다 배지를 교체하였다.

2.2 칼리스타틴 knockdown 인간 신경세포 제작

배양 과정으로 거친 인간 신경세포 HCN-2의 일부는 칼리스타틴 발현 억제 실험군 형성을 위해 small interfering RNA(siRNA)를 이용한 형질주입(transfection) 과정을 거쳤다. HCN-2 인간 신경세포를 Accell siRNA 전달 배지에서 배양하고 산소-포도당 결핍 전에 한 개의 well당 1 μM Accell siRNA와 72시간 동안 함께 배양 하였다. Accell Human SERPINA4 siRNA-SMART pool (50nM siRNA/500 μl, Dharmacon, Lafayette, CO)를 사용하여 knockdown시켰으며 RISC-Free siRNA (E-016371-00-0050; Dharmacon)를 control siRNA로 사용하였다. 형질 주입 능력을 확인하기 위해 SERPINA4의 mRNA(messenger RNA) expression을 Real time PCR(polymerase chain reaction)로 확인하였다.

2.3 허혈-재관류 손상모델

허혈-재관류 손상 모델로 산소-포도당 결핍(Oxygen-glucose deprivation, 이하 OGD라 함)과 재산소화(Reoxygenation, 이하 Reoxy라 함) 모델을 만들기 위해 인간 신경세포 HCN-2를 24 well plate에 poly D-L Lysine을 코팅하여 well당 4만개 세포를 파종 한 후 48시간 배양하였고 이후 포도당 결핍 배지인 dulbecco's

modified eagle medium (DMEM), no glucose (11966025; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) culture media에 넣은 후, 95% 질소와 5% 이산화탄소로 구성된 hypoxic chamber (INCO108, Memmert, Schwabach, Germany)에 각각 30분, 60분, 90분간 노출시킨다. 30분, 60분, 90분간 산소-포도당 결핍 처리 이후 포도당이 없던 culture media를 growth media로 교체하고 95% 공기와 5% 이산화탄소로 구성된 chamber에서 23.5시간, 23시간, 22.5시간 동안 재산소화를 시킨다.(OGD/reoxygenation) OGD/reoxygenation 모델은 뇌 허혈-재관류 손상과 유사하며 산소 공급만 차단하는 것보다 더 신속하게 뇌 손상을 유발시킨다고 알려져 있다.³⁸

2.4 세포 생존도 측정

아무런 처리를 하지 않은 HCN-2 인간 신경세포군과 30분, 60분, 90분간 산소-포도당 결핍(OGD) 및 재산소화(Reoxygenation) 과정을 거친 인간 신경세포군 각각을 modified 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide를 사용한 tetrazole 분석 방법(MTT assay)을 이용하여 세포 생존도를 측정하였다. 각각 30분, 60분, 90분간 산소-포도당 결핍 처리를 한 후 세포 생존도 분석 결과에 따라 적절한 산소-포도당 결핍 시간(60분)을 결정하였고 control siRNA 신경세포군과 칼리스타틴 knockdown 인간 신경세포에서 각각 OGD/Reoxygenation 과정 유/무에 따른 세포 생존도를 측정하였다.

2.5 칼리스타틴 농도 측정

세포군은 control siRNA를 형질 주입한 신경세포군, SERPINA4 siRNA를 형질 주입한 칼리스타틴 knockdown 신경세포군, control siRNA 형질 주입 신경세포군에 OGD/Reoxygenation 과정을 처리한 군, 칼리스타틴 knockdown 인간 신경세포를 OGD/Reoxygenation 시킨 군으로 총 4군으로 나누었다. 군당 세포수는 전체적으로 적었지만 SERPINA4(Human) ELISA Kit (KA3892; Abnova, Walnut, CA)를 사용하여 칼리스타틴 농도의 정량적 측정을 하였다.

2.6 산화 스트레스 및 세포자멸사 측정

4개의 세포군에서 세포 내 산화 스트레스를 측정하기 위해 먼저 NADPH 산화효소

(NADPH oxidase, Nox-1)의 발현을 확인하고자 하였고 anti-NOX1 antibody(Abcam, Catalog number: ab55831)를 이용한 western blot을 사용하여 측정하였다. Culture media내의 H₂O₂농도는 hydrogen peroxide colorimetric detection kit (ADI-907-015, Enzo Life Science, Farmingdale, NY)를 이용하여 측정하였으며, cleaved caspase 3 발현을 확인하기 위해 anticaspase 3 (1:1,000; 9664; Cell Signaling, Danvers, MA) western blot을 이용하여 세포 자멸사를 측정하였다.

2.7 통계분석

실험 결과의 통계적 분석은 ANOVA with Tukey post-hoc test 방법을 사용하였다. 모든 통계 분석은 SPSS 21.0 for Windows(SPSS, Chicago, IL)를 이용하여 시행되었으며 유의검정수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

III. 결과

3.1 칼리스트타틴 knockdown 인간 신경세포의 SERPINA4 유전자 발현

SERPINA4 siRNA를 이용한 형질주입과정으로 처리된 칼리스트타틴 knockdown 실험군은 control siRNA를 처리한 대조군 세포군과 형질주입을 하지 않은 신경 세포군과 비교하여 SERPINA4의 mRNA 발현이 현저히 적게 측정되었으며 이것으로 칼리스트타틴 knockdown 인간신경세포를 제작하였다. (Figure 1)

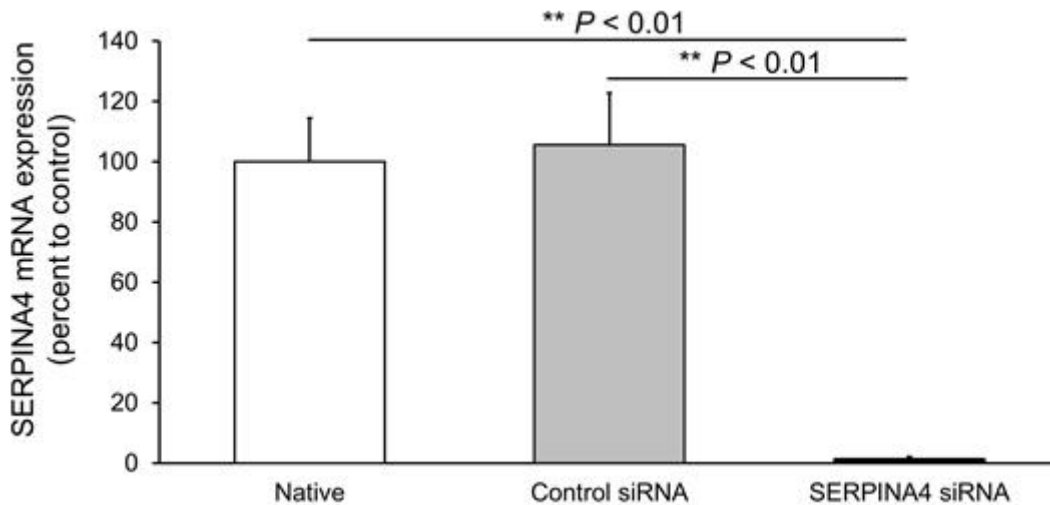


Figure 1. SERPINA4 mRNA expression after SERPINA4 small interfering RNA (siRNA) transfection

mRNA, messenger ribonucleic acid; siRNA, small interfering ribonucleic acid

3.2 산소-포도당 결핍 시간에 따른 세포 생존도 측정

우선, 인간 신경세포 HCN-2의 적절한 OGD/Reoxy시간을 결정하기 위해 인간 신경세포 HCN-2를 포도당 결핍 배지에 넣은 후, 95% 질소와 5% 이산화탄소로 구성된 hypoxic chamber에 각각 30분, 60분, 90분간 노출 시키고 이후 완전배지로 교체하고 95% 공기와 5% 이산화탄소로 구성된 chamber에서 23.5시간, 23시간, 22.5시간 동안 재산소화를 시킨 후 MTT assay를 이용하여 세포 생존도를 분석하였다. 세포 생존도는 아무런 처리를 거치지 않은 대조군에 비하여 OGD/Reoxy 30

분($p < 0.05$)와 60분($p < 0.01$), 90분($p < 0.001$)으로 산소포도당 결핍 시간이 늘어날수록 점차 감소하는 것을 확인하였다. (Figure 2)

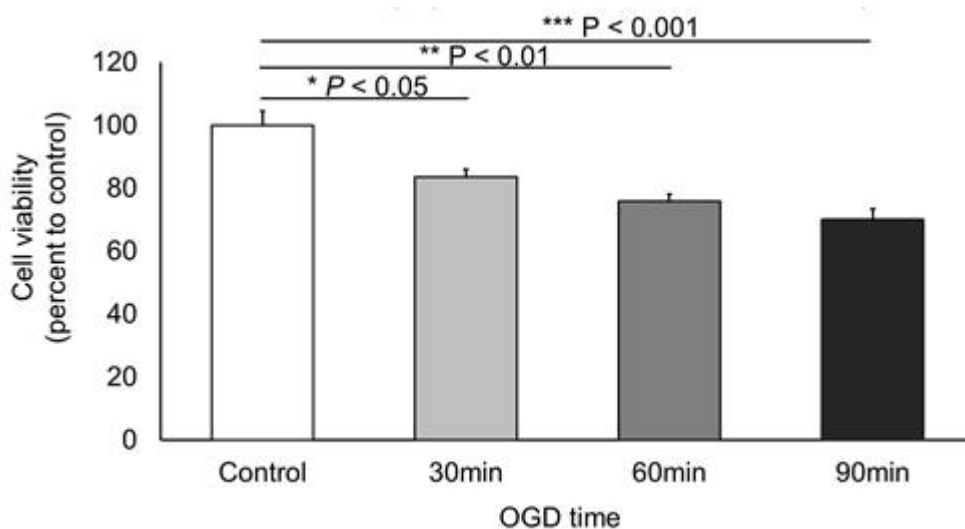


Figure 2. Oxygen–glucose deprivation/reoxygenation(OGD/Reoxy) time dependent effect on human neuronal cells

상기 결과를 근거로 대조군과 명확한 차이를 보이며 추후 칼리스타틴 knockdown 세포를 OGD/Reoxy 실험을 진행하였을 때의 세포 생존도 측정치를 고려하여 인간 신경세포를 이용한 적절한 산소–포도당 결핍 시간을 60분으로 결정하였고 control siRNA 형질주입 신경세포와 칼리스타틴 knockdown 인간 신경세포에서 각각 OGD/Reoxy과정 유/무에 따른 세포 생존도를 측정하였다.

Control siRNA와 SERPINA4 siRNA를 처리한 세포군 모두에서 OGD/Reoxy과정은 세포 생존도를 감소시켰다. (Control siRNA: $p < 0.01$, SERPINA4 siRNA: $p < 0.001$) (Figure 3). 그 중 OGD/Reoxy과정 이후의 세포 생존도 감소는 control siRNA를 처리한 신경세포군과 비교하여 SERPINA4 siRNA 형질주입을 통해 칼리스타틴 발현이 억제된 신경세포에 OGD/Reoxy과정을 거쳤을 때 더욱 두드러졌다. ($p < 0.05$)

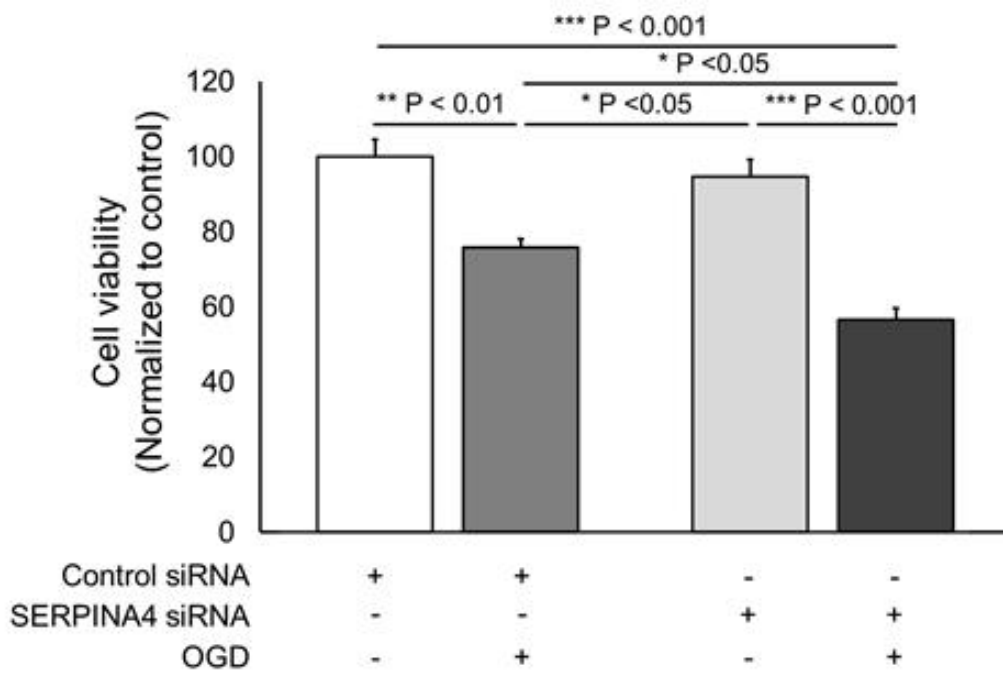


Figure 3. The cell viability of oxygen–glucose deprivation/reoxygenation effect on control and kallistatin knockdown human neuronal cells

3.3 칼리스타틴 농도 측정

SERPINA4 (Human) ELISA Kit를 이용하여 각각의 세포군의 칼리스타틴 농도를 측정하였으며, 아무런 처리를 거치지 않은 control siRNA군과 비교하여 OGD/Reoxy과정을 거친 control siRNA 형질주입 세포군에서 칼리스타틴의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. ($p < 0.001$) 또한 control siRNA군과 비교하여 SERPINA4 siRNA 형질주입한 세포군에서 칼리스타틴 발현이 억제된 것을 확인하였으며 ($p < 0.001$) 이는 control siRNA그룹에 OGD/Reoxy시켰을 때 나오는 칼리스타틴 양보다 더 적음을 확인하였다. ($p < 0.05$) 그러나, SERPINA4 siRNA 형질주입을 통해 칼리스타틴 발현이 억제된 세포군은 산소–포도당 결핍과 재산소화에 따라 칼리스타틴 농도가 유의미한 차이를 보이지 않았다. (Figure 4)

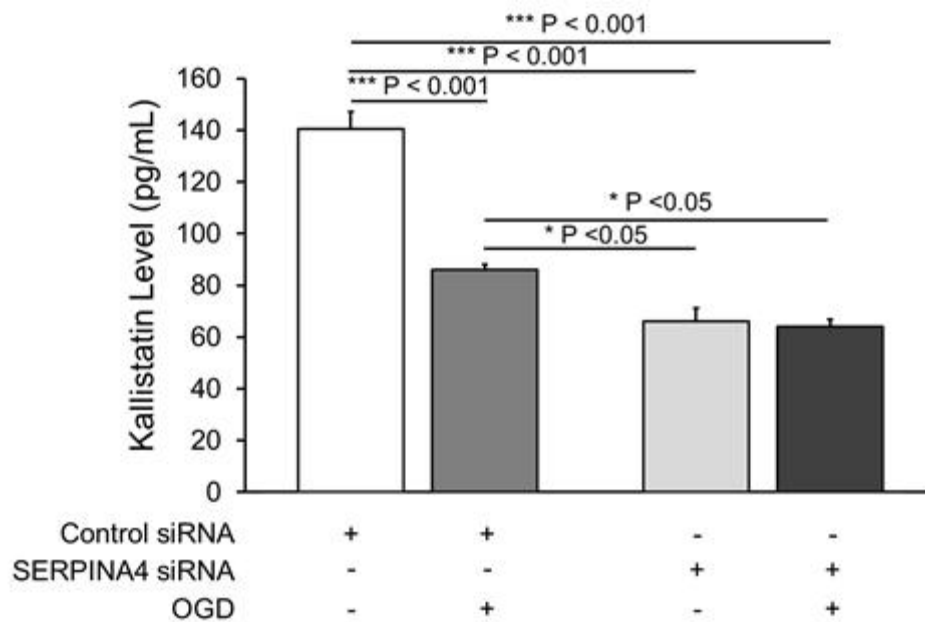


Figure 4. The kallistatin Level of control and kallistatin knockdown human neuronal cells on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation

3.4 산화 스트레스 및 세포자멸사 측정

Control siRNA를 형질 주입한 신경세포군, SERPINA4 siRNA를 형질 주입한 칼리스타틴 knockdown 신경세포군, control siRNA 형질 주입 신경세포군과 칼리스타틴 knockdown 인간 신경세포에 각각 OGD/Reoxy 시킨 군, 4개의 세포군에서 세포 내 산화스트레스를 측정하기 위해 NADPH 산화효소(Nox-1)의 발현 및 hydrogen peroxide 농도를 측정하였다. SERPINA4 siRNA 형질주입을 통해 칼리스타틴 발현이 억제된 세포군에 비해 이 세포군에 OGD/Reoxy 과정을 거친 그룹에서 NADPH 산화효소 발현이 증가하는 것을 확인하였고($p < 0.001$) control siRNA 형질주입 신경세포에 OGD/Reoxy 과정을 거친 세포군과 비교 시에도 칼리스타틴 knockdown 세포군에 OGD/Reoxy 과정을 거치게 되면 NADPH 산화효소 발현이 더욱 증가하는 것을 확인하였다. ($p < 0.001$) (Figure 5)

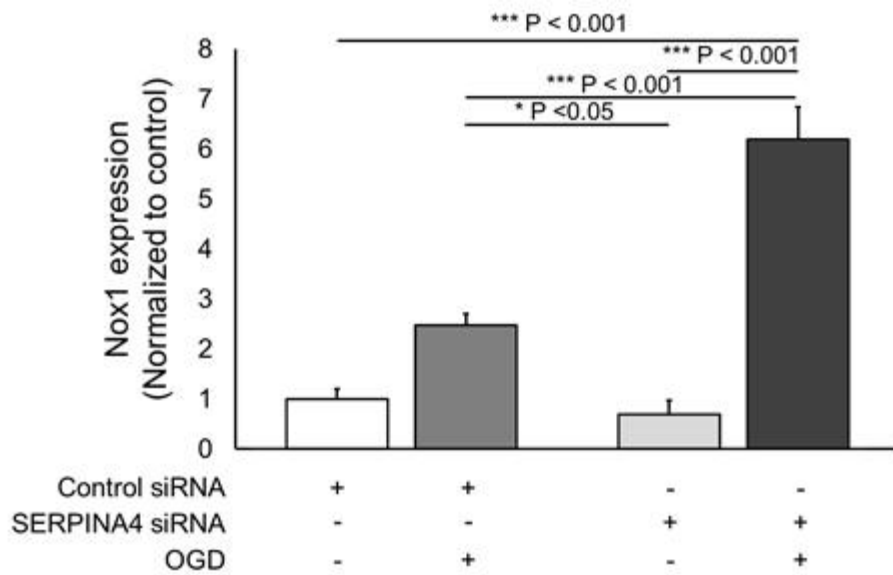


Figure 5. The NADPH oxidase(Nox-1) expression of control and kallistatin knockdown human neuronal cells on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation

다음으로 culture media내의 hydrogen peroxide농도를 측정하였으며 control siRNA 형질 주입 세포군에 비해 control siRNA 형질주입 세포군에 OGD/Reoxy 과정을 거친 세포군에서 hydrogen peroxide 농도가 더 높았으며($p < 0.01$) SERPINA4 siRNA 형질주입을 통해 칼리스타틴 발현이 억제된 세포군과 이 세포군에 OGD/Reoxy과정을 거친 그룹 간 비교 시에도 hydrogen peroxide 농도가 더 증가하는 것을 확인하였다.($p < 0.001$)(Figure 6)

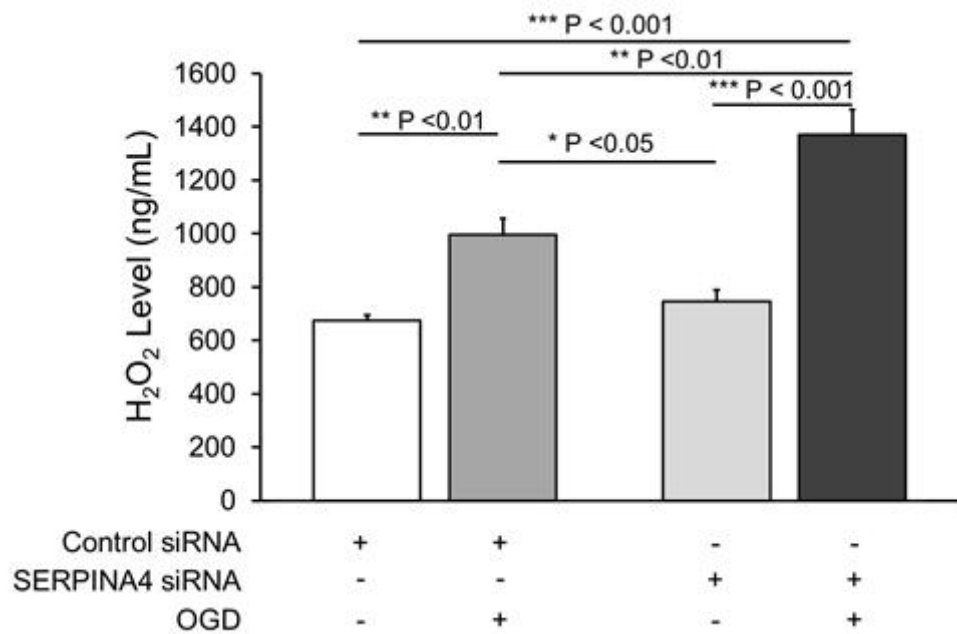


Figure 6. The hydrogen peroxide level of control and kallistatin knockdown human neuronal cells on oxygen–glucose deprivation/reoxygenation

다음으로 세포자멸사를 확인하기 위해 western blot방법을 이용해 cleaved caspase 3 발현정도를 확인하였으며 control siRNA 세포군과 SERPINA4 siRNA 형질주입을 통해 칼리스타틴 발현이 억제된 세포군에 각각 OGD/Reoxy과정을 거쳤을 때, OGD/Reoxy 과정을 거치지 않은 세포군과 비교 시 caspase-3 발현이 증가하는 것을 확인하였다. (Control siRNA: $p < 0.05$, SERPINA4 siRNA: $p < 0.01$) (Figure 7).

결론적으로 칼리스타틴 발현이 억제된 knockdown 신경세포군에 OGD/Reoxy과정을 거치게 되면 NADPH 산화효소와 caspase-3가 가장 많이 발현되었고(Figure 8) 이로 인해 산화적 손상 및 세포자멸사가 더욱 진행함을 확인할 수 있었다.

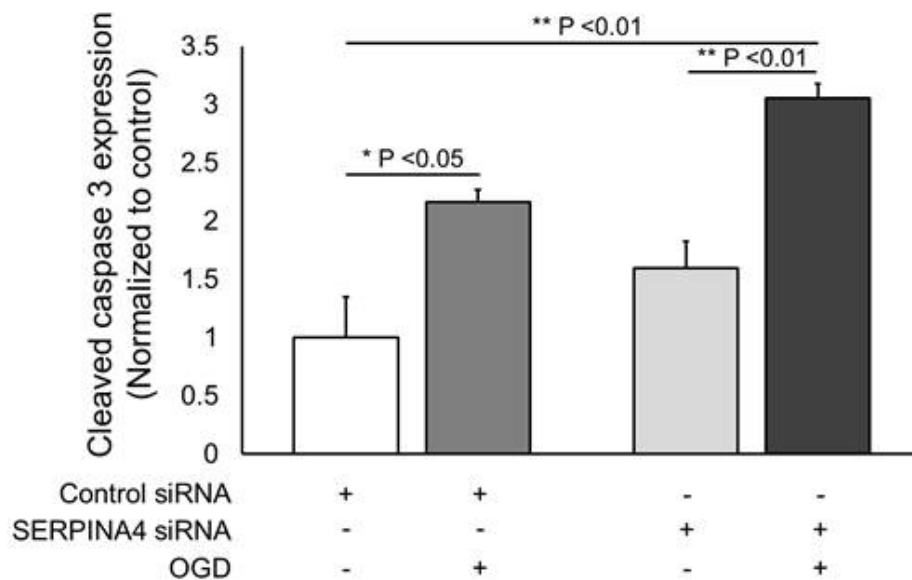


Figure 7. The caspase-3 expression of control and kallistatin knockdown human neuronal cells on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation

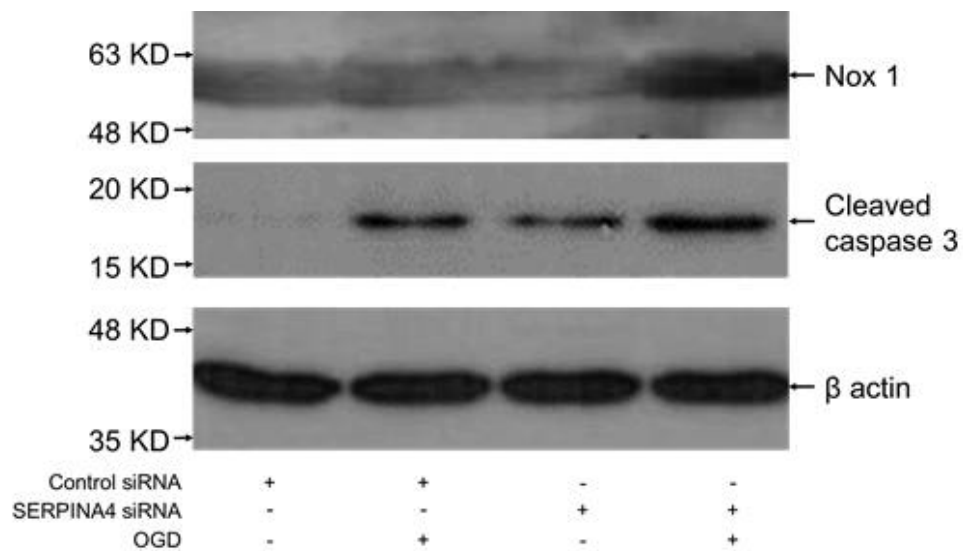


Figure 8. NADPH oxidase, cleaved caspase 3 western blot protein band result of control and kallistatin knockdown human neuronal cells on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation

IV. 고찰

본 연구는 허혈-재관류 손상 발생 시 인간 신경세포에서의 칼리스타틴 역할에 대해서 알아보기 위한 목적으로 시행하였으며 특히 칼리스타틴의 항산화기능에 초점을 맞추었다. 본 연구에서는 인간 신경세포 HCN-2에 SERPINA4 siRNA 형질주입 과정을 거쳐 칼리스타틴 발현이 억제된 knockdown 세포군을 제작하였으며 control siRNA를 형질주입한 신경세포군과 칼리스타틴 knockdown 신경 세포군에 허혈-재관류 손상을 만들기 위해 OGD/Reoxy 과정을 수행하였다. control siRNA를 형질주입한 신경세포군과 칼리스타틴 knockdown 세포군 모두 OGD/Reoxy 과정을 거쳤을 때 세포 생존도가 모두 감소하였으며, 특히 칼리스타틴이 억제된 knockdown 세포군의 경우 세포생존도의 감소효과가 더 두드러졌다. 또한 아무런 처리를 거치지 않은 control siRNA 형질주입 세포군과 비교하여 OGD/Reoxy 과정을 거친 control siRNA 형질주입 세포군에서 칼리스타틴의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 control siRNA를 형질주입한 신경세포군에 비해 칼리스타틴 knockdown 세포군의 칼리스타틴 농도도 감소함을 확인할 수 있었다.

이전 연구들을 통해 칼리스타틴의 heparin-binding site는 TNF- α 에 의해 유도된 NADPH 산화효소 활성 및 발현을 차단하는데 필요하며, active site는 내피 세포 및 혈관내피 전구세포에서 endothelial nitric oxide synthase(eNOS), sirtuin 1(SIRT1) 및 카탈라제의 발현 수준을 자극하는 데 중요한 역할을 한다는 것이 보고되었다.^{33,35,39,40} 또한 관절염, 고혈압, 심근 허혈 및 폐혈증의 동물모델에서 칼리스타틴 투여는 산화 스트레스와 염증을 감소시키고 고혈압 및 기관 손상을 약화시키며 혈청 칼리스타틴 수치는 고혈압, 대동맥 수축, 당뇨병, 신장 손상, 심근 허혈-재관류 동물 모델에서 현저하게 감소되어 있음을 알게 되었다.⁴¹⁻⁴⁴ 칼리스타틴은 또한 쥐 각막 상피와 인간 간 정상세포에서 H₂O₂ 중재 산화 스트레스와 하향 조절 NADPH 산화 효소 발현을 감소시켰다.^{45,46} 그러나, 현재까지 뇌 허혈-재관류 손상 모델에서의 칼리스타틴 작용을 입증하는 연구는 없었으며 칼리스타틴의 항산화 기능이 인간 신경세포에 어떤 역할을 할 수 있는지 알아보기 위한 연구는 시행되지 않았다.

따라서 본 연구는 칼리스타틴 발현이 억제된 인간 신경세포가 허혈-재관류 손상에 취약하며 NADPH 산화효소의 발현이 증가함에 따라 산화스트레스 및 세포자멸사가 활성화될 것이라 가정하였다. 이를 확인하기 위해 control siRNA를 형질주입한

신경세포군과 칼리스타틴 knockdown 세포군에 각각 허혈-재관류 손상 과정을 진행하였을 때 NADPH 산화효소 발현, hydrogen peroxide 농도, caspase-3 발현을 측정하였다. 칼리스타틴 knockdown 인간 신경세포군에 OGD/Reoxy 손상을 가한 경우에서 NADPH 산화효소가 가장 많이 발현되었고, hydrogen peroxide 농도가 가장 높았다. 이는 NADPH 산화효소 발현을 통해 NADPH가 산화되어 활성산소 생성이 증가한 것으로 생각할 수 있으며 caspase-3 발현도 가장 높게 측정되어 세포자멸사도 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구는 칼리스타틴이 결핍된 인간 신경세포에서 허혈-재관류 손상을 겪게 되면 칼리스타틴의 NADPH 산화효소 억제를 통한 항산화 기능이 억제되어 산화적 손상을 더욱 악화시킬 수 있다는 연관성을 확인하였다는 점에서 의미가 있다.

앞서 언급했듯이 심정지 이후 자발순환이 회복되어도 신경학적 예후는 불량하며 아직까지 신경학적 예후를 개선시키는 효과가 있다고 밝혀진 약물은 없다.¹⁸ 신경학적 예후를 개선시키기 위한 치료 표적물질이 되기 위해서는 우선 그 물질의 결핍이 불량한 신경학적 예후와 연관 있어야 하며 해당 물질을 추가 공급함으로써 신경학적 결과를 개선시킬 수 확인되어야 한다.^{22,23} 최근 단백질학 연구를 통해 병원 밖 심정지 환자들의 혈중 낮은 칼리스타틴 농도가 심정지의 불량한 신경학적 결과와 관련이 있다는 사실을 밝혀냈으며²⁴ 상기 연관성을 통해 칼리스타틴이 부족한 환자는 심정지 후 발생하는 허혈-재관류 손상에서 활성산소와 관련된 산화 스트레스로부터 뇌 신경세포를 보호하지 못해 불량한 신경학적 결과가 유래했을 것이라고 가정할 수 있었다. 본 연구에서는 심정지 이후 신경학적 결손 발생의 주요 기전인 허혈-재관류 손상에서 칼리스타틴이 결핍된 경우, 인간 신경세포에서 NADPH 산화효소를 통한 산화스트레스 증가를 밝혀냈으며 세포사멸을 증가시킴을 확인하였으므로 추후 추가 연구를 통해 칼리스타틴이 환자의 신경학적 예후를 예측하기 위한 새로운 바이오 마커와 치료 물질로 활용 가능할 수 있는 실마리를 제공하였다고 생각한다.

그러나 본 연구는 몇 가지 제한점을 가지고 있다. 첫째, SERPINA4 siRNA를 형질주입하여 칼리스타틴 발현을 억제시킨 세포군과 이에 산소-포도당 결핍과 재산소화 과정을 거친 세포군 사이에 칼리스타틴의 농도 변화가 미미하였으며 통계적 유의성을 얻지 못했다. 인간 신경세포를 배양하는데 있어 시간이 매우 오래 걸리고 배양한 세포의 양 또한 많지 않아 실험에 어려움이 있었으며 전체적으로 칼리스타틴 knockdown 세포수도 적었다. 칼리스타틴 knockdown 신경세포에서 측정된 칼리스타틴의 농도는 65.9 $\mu\text{g/ml}$ 이었고, 이 세포군에 OGD/Reoxy 과정을 거친 세포

군이 64.0 μ g/ml로 칼리스타틴 농도가 매우 낮아 둘의 차이를 유의미하게 확인하기 어려운 수준이 되었기 때문이라고 생각된다. 둘째, 허혈-재관류에 의한 조직 손상에서는 산화 스트레스와 그로 인한 세포사멸이 가장 중요한 역할을 하지만 국소 염증반응과 응고반응에 의한 조직관류 저하도 조직손상에 기여를 할 수 있다. 앞서 언급한 것처럼 칼리스타틴 자체도 항염증, 항산화 기능을 가지고 있는데 칼리스타틴의 많은 항산화 효과는 nitric oxide(NO)가 NADPH 산화효소를 억제함으로써 발생하지만,⁴⁷ 그 외에도 다양한 신호 전달 체계에 여러 물질이 작용하기 때문에 본 연구에서 보인 NADPH 산화 효소의 작용이 TNF- α 에 의해 유도되는 것인지, NO에 의해 억제되지 못해 발생하는 것인지는 구체적인 중간 신호전달 과정을 확인할 수 없어 항산화 작용에 국한되어 기인한 결과라고 설명하기에는 다소 무리가 있을 수 있다. 추후 media proteomics와 같은 실험을 추가하여 신호전달 과정에 관여하는 물질을 확인할 수 있을 것이라고 생각된다. 셋째, 본 실험은 in-vitro로 진행한 실험으로 in-vivo 인간 신경세포 혹은 인간 뇌 조직에서 칼리스타틴 발현을 억제시켰을 때 허혈-재관류 손상에 대한 취약성을 확인하지 못했고 나아가 신경학적 예후와의 연관성을 설명하는데 한계가 있다. 넷째, 칼리스타틴 knockdown 실험군에 다시 칼리스타틴을 투여하는 양성 피드백 실험을 진행하지 못해 칼리스타틴을 치료제로 투약하였을 때 산화스트레스가 감소할 수 있는지를 규명하지는 못했다. 향후 인간 신경세포나 실제 허혈-재관류 손상이 발생하는 심정지 동물모델에 칼리스타틴을 투여하였을 때 산화 스트레스와 세포사멸을 감소시키고 허혈-재관류 손상에서 대한 예방효과를 지니는지를 확인하는 연구가 진행된다면 칼리스타틴을 치료물질로 사용하기 위한 근간을 마련할 수 있을 것이라 기대된다.

V. 결론

본 연구에서 SERPINA4 siRNA 형질주입은 인간 신경세포 HCN-2의 칼리스타틴의 발현을 억제시키고 산소-포도당 결핍과 재산소화 과정은 HCN-2의 세포생존도를 감소시켰다. 특히 칼리스타틴 knockdown 인간신경 세포군에서 산소-포도당 결핍과 재산소화 과정은 NADPH 산화효소 발현을 더욱 증가시켜 산화 스트레스를 증가시켰으며 또한 hydrogen peroxide가 더 많이 생성됨을 확인하였고 caspase-3가 더 많이 생성되어 세포자멸사를 촉진시켰다. 이러한 결과는 추후 칼리스타틴이 항산화 및 항세포사멸 작용에 영향을 미쳐 인간 신경 세포의 허혈-재관류 손상에 대한 신경 보호 작용을 할 수 있는 실마리를 제공할 수 있음을 시사한다.

참고문헌

1. Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, Maksan SM, Schmiedt W, Neufang A, et al. Ischemia–Reperfusion Injury: Pathophysiology and Clinical Implications. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2007;33:600–12.
2. Theodore Kalogeris, Christopher P. Baines, Maik Krenz, Ronald J. Korthuis. *Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury.* International Review of Cell and Molecular Biology. 2012;29:229–317.
3. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007;87:99–163.
4. Pamela W, K. Wingler, J. J. R. Hermans et al. NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular Medicine.* 2012;90:1391–1406
5. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001;53:135–59.
6. Siesjo BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjo P, Katsura K, Folbergrova J. Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *Ann Thorac Surg.* 1995;59:1316–20.
7. Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative stress and lung ischemia–reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:590987.
8. Bartos JA, Debaty G, Matsuura T, et al. Post–conditioning to improve cardiopulmonary resuscitation. *Curr Opin Crit Care.* 2014;20(3):242–249.
9. Espinosa–Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sanchez–Perez P, Cadenas S, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015;6:183–97.
10. Mourao Mde M, Dingirard N, Franco GR, Yoshino TP. Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress. *PLoS Negl Trop Dis.*

2009;3:e550.

11. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012;24:981–90.
12. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24:R453–62.
13. Kristian, T., Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell Calcium*. 2004;36:221–233.
14. Adibhatha, R.M., Hatcher, J.F., Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal*. 2010;12:125–169.
15. Amy C. Walker, Nicholas J. Johnson. Critical Care of the Post-Cardiac Arrest Patient. *Cardiol Clin*. 2018;36:419–428.
16. Lim C, Alexander MP, LaFleche G, Schnyer DM. The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest. *Neurology*. 2004;63:1774–8.
17. Wachelder EM, Moolaert VR, van Heugten C, Verbunt JA, Bekkers SC, Wade DT. Life after survival: long-term daily functioning and quality of life after an out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*. 2009;80:517–22.
18. Callaway CW, Donnino MW, Fink EL, Geocadin RG, Golan E, Kern KB, et al. Part 8: Post-Cardiac Arrest Care: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation*. 2015;132:S465–82.
19. Vondrakova D, Kruger A, Janotka M, Malek F, Dudkova V, Neuzil P, et al. Association of neuron-specific enolase values with outcomes in cardiac arrest survivors is dependent on the time of sample collection. *Crit Care*. 2017;21:172.
20. Stammet P, Collignon O, Hassager C, Wise MP, Hovdenes J, Oneman A, et al. Neuron-specific enolase as a predictor of death or poor neurological outcome after out-of-hospital cardiac arrest and targeted temperature management at 33 degrees C and 36 degrees C. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:2104–14.

21. Shinozaki K, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, Abe R, et al. S-100B and neuron-specific enolase as predictors of neurological outcome in patients after cardiac arrest and return of spontaneous circulation: a systematic review. *Crit Care*. 2009;13:R121.
22. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*. 2011;162:1239-49.
23. Schenone M, Dančik V, Wagner BK, Clemons PA. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat Chem Biol*. 2013;9:232-40.
24. Jung YS, Kwon WY, Suh GJ, Moon S, Han MH, Youn JI, et al. Low serum Kallistatin level was associated with poor neurological outcome of out-of-hospital cardiac arrest survivors: Proteomics study. *Resuscitation*. 2018;128:6-10.
25. Chao J, Tillman DM, Wang MY, Margolius HS, Chao L. Identification of a new tissue-kallikrein-binding protein. *Biochem J*. 1986;239:325-31.
26. Zhou GX, Chao L, Chao J. Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence. *J Biol Chem*. 1992;267:25873-80.
27. Chao J, Chao L. Biochemistry, regulation and potential function of kallistatin. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995;376:705-713.
28. Chen LM, Song Q, Chao L, Chao J. Cellular localization of tissue kallikrein and kallistatin mRNAs in human kidney. *Kidney Int*. 1995;48:690-697.
29. Wolf WC, Harley RA, Sluce D, Chao L, Chao J. Localization and expression of tissue kallikrein and kallistatin in human blood vessels. *J Histochem Cytochem*. 1999;47:221-228.
30. Chao J, Bledsoe G, Chao L. Protective Role of Kallistatin in Vascular and Organ Injury. *Hypertension*. 2016;68:533-41.
31. Li P, Bledsoe G, Yang ZR, Fan H, Chao L, Chao J: Human kallistatin administration reduces organ injury and improves survival in a mouse model of polymicrobial sepsis. *Immunology*. 2014;142(2):216-226.

32. Yin H, Gao L, Shen B, Chao L, Chao J: Kallistatin inhibits vascular inflammation by antagonizing tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor kappaB activation. *Hypertension*. 2010;56(2):260-267
33. Guo Y, Li P, Bledsoe G, Yang ZR, Chao L, Chao J. Kallistatin inhibits TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition by differential regulation of microRNA-21 and eNOS expression. *Exp Cell Res*. 2015;337:103-10
34. Shen B, Smith RS, Jr., Hsu YT, Chao L, Chao J. Kruppel-like factor 4 is a novel mediator of Kallistatin in inhibiting endothelial inflammation via increased endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem*. 2009;284:35471-8.
35. Shen B, Gao L, Hsu YT, Bledsoe G, Hagiwara M, Chao L, et al. Kallistatin attenuates endothelial apoptosis through inhibition of oxidative stress and activation of Akt-eNOS signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H1419-27.
36. Taegyun Kim, Gil Joon Suh, Woon Yong Kwon, et al. Lower serum Kallistatin level is associated with 28-day mortality in patients with septic Shock. *J Crit Care*. 2018 Dec;48:328-333.
37. Li P, Guo Y, Bledsoe G, Yang ZR, Fan H, Chao L, Chao J: Kallistatin treatment attenuates lethality and organ injury in mouse models of established sepsis. *Crit Care*. 2015;19:200.
38. Goldberg MP, Choi DW: Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci*. 1993;13:3510-3524.
39. Shen, B., Chao, L., and Chao, J. Pivotal role of JNK-dependent FOXO1 activation in downregulation of kallistatin expression by oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2010;298:H1048-H1054.
40. Gao, L., Li, P., Zhang, J., Hagiwara, M., Shen, B., Bledsoe, G., Chang, E., Chao, L., and Chao, J. Novel role of kallistatin in vascular repair by promoting mobility, viability, and function of endothelial progenitor cells. *J. Am. Heart Assoc*. 2014;3:e001194.

41. Shen B, Hagiwara M, Yao YY, Chao L, Chao J. Salutary effect of kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation, and fibrosis via antioxidative stress. *Hypertension*. 2008;51:1358-1365.
42. Chao J, Yin H, Yao YY, Shen B, Smith RS Jr, Chao L. Novel role of kallistatin in protection against myocardial ischemia-reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation. *Hum Gene Ther*. 2006;17:1201-1213.
43. Gao L, Yin H, S Smith R Jr, Chao L, Chao J. Role of kallistatin in prevention of cardiac remodeling after chronic myocardial infarction. *Lab Invest*. 2008;88:1157-1166.
44. P. Li, Y. Guo, G. Bledsoe et al., Kallistatin treatment attenuates lethality and organ injury in mouse models of established sepsis. *Critical Care*. 2015;19:200.
45. Huang X, Wang X, Lv Y, Xu L, Lin J, Diao Y. Protection effect of kallistatin on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats via antioxidative stress. *PLoS One*. 2014;9:e88498.
46. Zhou T, Zong R, Zhang Z, Zhu C, Pan F, Xiao X, Liu Z, He H, Ma JX, Liu Z, Zhou Y. SERPINA3K protects against oxidative stress via modulating ROS generation/degradation and KEAP1-NRF2 pathway in the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:5033-5043.
47. Fujii H, Ichimori K, Hoshiai K, Nakazawa H. Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process. *J Biol Chem*. 1997;272:32773-32778.

Abstract

Role of Kallistatin on ischemia–reperfusion neuronal injury

Ha Young Kim

Department of Clinical Medical Sciences

The Graduate School

Seoul National University

Introduction: Ischemia–reperfusion injury is a series of processes that occur when oxygen supply to tissues is lowered and reperfusion occurs after ischemia, and is known as a major mechanism of post cardiac arrest syndrome, reperfusion after myocardial infarction and stroke, and sepsis. In the previous studies, NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase is involved in the early stages of ischemia–reperfusion injury, and it generates oxidative stress. The main mechanism of brain injury after post cardiac arrest syndrome is the generation of reactive oxygen species by ischemia–reperfusion injury and apoptosis proceeds. The neurological outcome after cardiac arrest is still poor. According to recent proteomic study, low serum level of kallistatin was associated with poor neurological outcomes of out–of–hospital cardiac arrest survivors. Kallistatin is a protein that is encoded by the SERPINA4 gene and is found in human plasma and has anti–inflammatory and antioxidant properties. Kallistatin is known to contribute to antioxidant activity by inhibiting the activity of NADPH oxidase. Therefore, the purpose of this study was attempted to clarify that when human neuronal cells deficient in kallistatin undergo ischemia–reperfusion injury, the expression of NADPH oxidase increases, resulting in excessive production of reactive oxygen species and deterioration of oxidative damage.

Methods: SERPINA4 small interfering RNA(siRNA) was transfected into human neuronal cells to produce kallistatin knockdown neuronal cells. After producing the SERPINA4 knockdown cells, the expression level of kallistatin was measured. To induce ischemia–reperfusion injury, SERPINA4 knockdown cells and control siRNA transfected cells were exposed to 60 minutes of oxygen–glucose deprivation(OGD) followed by 23 hours of reoxygenation(Reoxy) and cell viability assay was performed. In addition, the levels of oxidative stress and apoptosis were compared by measuring the concentration of kallistatin, NADPH oxidase, hydrogen peroxide, and caspase–3 in kallistatin knockdown cells and control siRNA transfected cells and each treated with OGD/Reoxy.

Results: SERPINA4 siRNA transfection suppressed kallistatin expression. 60 minutes oxygen–glucose deprivation and 23 hours reoxygenation reduced cell viability in both SERPINA4 knockdown cells and control siRNA transfected human neuronal cells. The expression of kallistatin was reduced in the control siRNA transfected cell group after OGD/Reoxy process. ($p < 0.001$) Also, it was confirmed that the expression of kallistatin was inhibited in the cell group transfected with SERPINA4 siRNA compared to the control siRNA group. ($p < 0.001$) To measure the oxidative stress, NADPH oxidase expression, hydrogen peroxide level were compared. NADPH oxidase expression and hydrogen peroxide level was increased in the cells that had undergone OGD/Reoxy processing on kallistatin knockdown group compared to the kallistatin knockdown cell group without OGD/Reoxy. ($p < 0.001$) When the control siRNA transfected human neuronal cell group and the kallistatin knockdown cell group were processed to OGD/Reoxy, it was confirmed that caspase–3 expression was elevated and apoptosis was promoted. (Control siRNA: $p < 0.05$, SERPINA4 siRNA: $p < 0.01$)

Conclusions: The kallistatin knockdown cell group were processed to OGD/Reoxy reduced cell viability, NADPH oxidase expression was increased. As a result, more free radicals were generated, more hydrogen peroxide was produced, and more caspase–3 was produced, thereby promoting apoptosis. These results suggest that kallistatin may provide a clue that it can act as a neuroprotective action against ischemia–reperfusion injury in human neuronal cells through anti–oxidant and anti–apoptotic effects.

Keywords: neuronal cell, kallistatin, reactive oxygen species, oxidative stress, apoptosis, ischemia–reperfusion injury, NADPH oxidase

Student number: 2018–32841