

2009년 2월

박사학위논문

신경계 손상에서의 Star D6의 반응

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 중 권

신경계 손상에서의 Star D6의 반응
Immunohistochemical reaction of Star D6 after the
damage of nervous system

2009년 2 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 중 권

신경계 손상에서의 Star D6의 반응

지 도 교 수 이 승 명

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2008년 10 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 중 권

김 중 권의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 장 인엽 인

위원 조선대학교 교수 노 준 인

위원 조선대학교 교수 유 호진 인

위원 서남대학교 조교수 윤 상필 인

위원 조선대학교 교수 이 승 명 인

2008년 12 월 일

조선대학교대학원

목 차

도 목 차	1
표 목 차	2
영 문 초 록	3
서 론	5
재 료 및 방 법	9
결 과	14
고 찰	17
결 론	25
참 고 문 헌	27
사 진 부 도 설 명	32
사 진 부 도	34

도 목 차

Fig. 1	—————	34
Fig. 2	—————	35
Fig. 3	—————	36
Fig. 4	—————	37

표 목 차

Table 1 —————13

Table 2 —————18

-Abstract-

Immunohistochemical reaction of Star D6 after the damage of nervous system

Jung-Goan Kim

Advisor: Seung-Myung Lee, MD. Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Neurosteroids are known to have neuroprotective properties and the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-mediated delivery of cholesterol is rate limiting in steroidogenesis. StAR belongs to a family of 15 StAR-related lipid transfer (START) domain containing proteins termed StAR/StarD1 ~ StarD15. StarD6, particularly, is known to be confined in male germ cells and thus exhibits a role in spermatogenesis. The presence of StarD6 in the rat brain was recently demonstrated by immunohistochemistry, although StAR distributed ubiquitously.

Here I present a new additional evidence of StarD6 as a regulatory protein in neurosteroid synthesis following neurodegenerative stimuli. The temporal lobe epilepsy was induced by pilocarpine (350 mg/kg, intraperitoneally), and convulsive reactions were observed. On scheduled time the hippocampus was removed and examined by immunohistochemistry and Western blot analysis.

In control group, StAR appeared in the cytoplasm of the strata

oriens and radiatum and in the granular layer, while StarD6 was seen in the cytoplasm as well as in the nuclei of the stratum pyramidale and in the granular layer. StAR and StarD6 immunolocalization was increased following the epilepsy. StAR immunolocalization was seen not only in the strata oriens and radiatum but also in the stratum pyramidale from 3 h until 24h after epilepsy. StarD6 immunolocalization was seen in the stratum lacunosum-moleculare as well as in the stratum pyramidale from 3 h until 12 h after epilepsy. Moreover, the level of StarD6 protein was acutely and transiently elevated at 3 h following pilocarpine-treated rat hippocampus comparing with normal rats.

These results on StAR is generally consistent with the previous report, but the target area after epilepsy was the stratum pyramidale of hippocampus in this study. Nuclear localization and transiently elevated level of StarD6 raises the possibility as a regulatory protein in neurosteroidogenesis and suggests that subsequent formations of neuroprotective steroids may be part of the mechanism used by the brain to cope with neurodegenerative diseases.

Keywords: Neurosteroid; StAR; Epilepsy; Hippocampus

I. 서 론 (Introduction)

신경계통은 스테로이드 호르몬의 잘 알려진 목표 부위이면서 동시에 스테로이드 호르몬을 합성할 수 있는 조직임이 알려졌다. 일반적으로 신경계통에 작용하는 스테로이드 호르몬을 신경 활성 스테로이드 (neuroactive steroids)라고 분류하였으나, 최근에 신경계통 자체에서 생산되어 신경계통에 작용하는 스테로이드를 'neurosteroid'라고 구분하고 있다. Neurosteroid에는 pregnenolone, dehydroepiandrosterone (DHEA), progesterone, estradiol 등이 포함되고, 이들은 신경의 발생 (neurogenesis), 분화 (differentiation), 생존 (survival), 말이집 형성 (myelination), 수복 (repair/plasticity) 등 다양한 과정에 관여할 수 있기 때문에 신경계통의 스테로이드 생합성 능력은 의미를 갖는다. Neurosteroid는 스테로이드 합성에 관여하는 효소 (steroidogenic enzyme)가 활성화되어야 생성될 수 있는데, 이를 위해서는 이입소체 (endosome) /용해소체 (lysosome)에 존재하는 콜레스테롤을 사립체 (mitochondria)의 내막 (inner membrane)으로 전달하는 과정이 필요하다. 이러한 콜레스테롤의 전달을 담당하는 단백질의 존재는 steroidogenic enzyme의 존재 여부 및 neurosteroid의 생합성과 밀접한 연관성을 가질 것으로 생각된다 (Sierra, 2004; Lavaque 등, 2006; Wojtal 등, 2006).

이러한 전달 단백질 (transport protein) 중 비교적 잘 밝혀진 것은 Niemann-Pick C (NPC) 단백질이다 (Adibhatla와 Hatcher, 2008). NPC 단백질에 의해 사립체 내로 전달된 콜레스테롤은 steroidogenic enzyme에 의해 neurosteroid로 전환되는데, 특히 DHEA와 allopregnanolone이

Alzheimer 치매, Parkinson씨 병, 정신분열병 (schizophrenia), 양극성 장애 (조울증, bipolar disorder), 뇌졸중 (stroke), 외상 (brain/spinal cord injuries) 등과 같은 다양한 증례에서 신경 보호 효과를 갖는 것으로 보고되었다. 심지어 뇌졸중 (Marx 등, 2006)이나 치매 (Wang 등, 2007)의 경우 DHEA와 allopregnanolone이 신경세포의 재생을 자극하였다는 보고도 있었다.

이와 같은 전달 단백질의 다른 예가 START 단백질이다. 즉, 콜레스테롤을 사립체의 내막으로 전달하는 과정에 관여하는 steroidogenic acute regulatory (StAR) 단백질이 그 원형이다 (Stocco, 2001; Socciodh Breslow, 2003; Manna와 Stocco, 2005). START 단백질은 모두 200-210 아미노산으로 구성된 StAR-related lipid transfer (START) domain을 공유하고 있으며 (Ponting과 Aravind, 1999), 사람에서는 그 구성에 따라 6개의 아형 (subfamily)으로 나눌 수 있다 (Alpy와 Tomasetto, 2005). StAR/StarD1 군은 전신에 분포하는 START 단백질의 원형에 해당하는 반면 StarD4 군에 속하는 것이 StarD4, StarD5, StarD6이다. StarD4와 StarD5는 StAR와 마찬가지로 대부분의 조직에서 발현되지만, StarD6는 일반적으로 스테로이드 생합성에 관여하는 생식샘 (gonad)이나 콩팥결샘 (adrenal gland)의 세포에서는 관찰되지 않았고 고환 (testis) 내 정자 발생 세포 (spermatogenic cell)의 성숙과정에서만 발현되는 것으로 보고되었다 (Soccio 등, 2002; Gomes 등, 2005). 특히 면역조직화학적 염색 결과 다른 START 단백질이 세포질에서 관찰되는 것과 달리 StarD6는 핵에서만 염색되는 것으로 보고되었다.

이와 같이 StarD6는 통상적인 START 단백질과 같은 스테로이드 호르몬의 생합성과 관련된 기능이 없이 정자 발생 (spermatogenesis) 및 정자 형

성 (spermiogenesis)에만 관여할 것으로 생각되었다. 그러나 최근 만성 갑상선기능저하증 (perinatal hypothyroidism)을 유발한 흰쥐의 고환 내 사이질세포 (interstitial cell of Leydig)에서 StarD6 양성반응이 보고되었다 (Chang 등, 2007a). 이는 정상적인 경우 StarD6가 스테로이드 호르몬 생합성에 관여하지 않는다 하더라도 특정 상황에서는 다른 STAR 단백질처럼 스테로이드 호르몬 생합성에 관여할 수 있음을 시사하는 것이다. 이 결과는 StarD6의 구조적 특성이 StAR와 거의 유사하고 그 작용도 StAR처럼 사립체의 내막과 상호작용을 한다는 보고에 의해 더 강력한 근거를 갖는다 (Bose 등, 2008). 이 보고의 연장선에서 StarD6가 신경계통에서도 발현되는지에 대한 연구 결과도 보고되었다. 즉, StarD6는 StAR와 유사하게 많은 뇌 구역에서 면역양성반응을 보였으나, 그 세부 구역 및 세포는 약간의 차이점을 보였다. 특히 해마 (hippocampus)의 경우, StAR는 주 세포층 (principal layer)을 제외한 나머지 구역에서 강한 양성반응을 보이는 반면, StarD6는 cornu ammonis (CA)의 피라미트세포층 (pyramidal layer)와 치아 이랑 (dentate gyrus)의 과립세포층 (granular layer) 등 주 세포층에서 강한 양성반응을 보였다 (Sierra, 2004; Chang 등, 2007b).

그러나 기존의 연구 결과 사이에 존재하는 차이점을 분명히 할 필요가 있다. 즉 StAR와 StarD6의 분포구역의 차이점에 대한 보고가 있으나, 최근 보고처럼 StarD6가 StAR와 같은 특성을 가진다면 이러한 차이점에 대한 설명이 필요하다고 생각된다. 더욱이 신경계통에서 StarD6의 존재 및 그 기능적 의의에 대해서는 잘 알려지지 않았다. Neurosteroid 생합성은 다양한 신경계통의 질환이나 외상에 의해 영향을 받을 수 있고, 어떤 neurosteroid가 예후 (prognosis)에 긍정적인 영향을 준다는 사실은 앞서 기술한 바 있다 (Adibhatla와 Hatcher, 2008). 따라서 본 실험에서는 신경계통에서 스테로

이드 호르몬 생합성의 변화를 조절할 수 있는 인자로서 StarD6와 StAR, 또 신경보호 효과와의 연관성을 가지는 StarD6와 StAR의 가능성을 확인하고자 하였다. 이를 위해 관자엽 간질 (temporal lobe epilepsy) 모델을 유발한 후, StarD6와 StAR 양성반응세포가 분포하는 구역의 변화 및 간질 발작 시간에 따른 StarD6 단백질 총 양의 변화를 측정하였다. 이상의 결과를 통해 신경퇴행성 자극 (neurodegenerative stimuli)에 대해 neurosteroid 생합성을 조절하는 StarD6와 StAR의 기능을 유추할 수 있을 것이다.

II. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

II-1. 실험동물 및 처치 (Animals and Treatment)

출생 후 8주 이상 된 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 각 실험동물은 증류수를 투여한 대조군 ($n = 5$) 또는 pilocarpine (350 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 복강 내로 투여한 실험군 ($n = 5$ /군)으로 나누었다. pilocarpine 투여 후 무작위로 실험군을 나누었고, 각 군은 투명한 장 (chamber)에 넣고 행동 변화를 관찰하였다. 행동 변화는 기존의 보고와 같이 비교하였고, 그 근거는 <표 1>과 같다 (Hesp 등, 2007). 즉, 정상적인 행동을 기준으로 머리와 목의 변화에서부터 전신 간대성 발작 (tonic-clonic convulsions)까지를 평가하였다. 전신 간대성 발작이 1시간 이상 지속된 동물의 경우 diazepam (2 mg/kg)을 복강 내로 투여하여 발작을 억제하였고, 이를 통해 사망률을 감소시킬 수 있었다.

II-2. 세포구조학적 변화 (Cytoarchitecture)

이상의 관찰을 마친 후 각 군은 pilocarpine 주사 후 3시간, 6시간, 12시간, 24시간이 지난 후 희생시켰다. 세포구조학적 변화 및 면역조직화학적 염색을 위해 ketamine (케타라™, 유한양행, 3 ml/kg)을 복강 내로 주사하여 마취를 유도하였다. 이후 좌심실을 통해 heparin (250 unit/ml, 중외제약)을 함유한 생리식염수로 관류 세척한 다음, 4 % paraformaldehyde

(0.1M phosphate buffer, pH 7.4)를 사용하여 관류 고정하였다. 해마를 적출하고 동일한 고정액에 4 °C에서 24시간 정도 고정하였다. 고정된 조직은 통상의 수세, 탈수, 투명 등을 거쳐 파라핀 조직 처리 (Tissue-Tek, Sakura, Japan)를 시행한 후, 5 µm 두께로 연속 절편을 제작하였다 (Leica RM 2155 rotary microtome, Nussloch, German). 절편은 매 100 매 마다 선택하여 통상적인 Hematoxylin/Eosin (H/E) 염색과 Nissl 염색을 시행하여 조직학적 특성을 확인하였다.

II-3. 면역조직화학적 염색 (Immunohistochemistry)

절편을 0.05M phosphate buffered saline (PBS)에 옮겨 세척한 후 과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂; 0.03 % in methanol)를 첨가하여 내인성 과산화효소의 활성을 억제시킨 다음, 0.5 % bovine serum albumin (BSA)과 1.5 % normal goat serum (NGS; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., UK)이 포함된 PBS 용액에 1시간 처리한 후 제 1 항체를 반응시켰다. 제 1 항체로 1) rabbit anti-StarD6 항체는 전남대학교 소재 목 교수님께서 제공한 것을, 2) rabbit anti-StAR 항체는 Santa Cruz 사에서 구입하여 사용하였다 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). 제 1 항체를 BSA와 NGS가 포함된 PBS 용액에 각각 1:1000으로 희석하여 4 °C에서 48시간 동안 반응시켰다. 제 2 항체는 biotin이 부착된 goat anti-rabbit IgG (Vectastatin ABC; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 BSA와 NGS가 포함된 PBS 용액에 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 제 3 항체는 avidin-biotin

complex (Vectastatin ABC; Vector)를 PBS 용액에 1:100으로 희석하여 50 분 동안 반응시켰다. 발색은 0.05 % 3'3-diaminobenzidine (Sigma)을 사용하였으며, 에탄올에 탈수한 후 xylene에 투명, polymount (Shandon, Cheshire, UK)에 봉입하였다. 제 1 항체 또는 제 2 항체를 생략하고 동일한 과정을 시행함으로써 위양성 반응 (false positive reaction)을 확인하였다.

StarD6 항체 및 StAR 항체에 대한 면역양성 반응을 보인 결과는 광학현미경 (Olympus BX-50, Olympus Corp., Tokyo, Japan)으로 관찰한 후, 현미경에 직접 연결된 디지털 카메라 (Olympus C-4040Z, Olympus)를 이용해 상을 얻었다. 이렇게 얻어진 상을 저장하고, Adobe Photoshop (Adobe system, San Jose, CA, USA)을 이용해 상의 밝기 (brightness)와 대조 (contrast)를 분명히 하기 위한 작업을 시행하였다.

II-4. Western blot 분석 (Western blot analysis)

Western blot을 위해서 예정된 시간에 실험동물을 목 분리 (decapitation) 방법으로 희생시킨 후, 신선한 해마를 드라이아이스와 isopentane이 혼합된 용액에서 급속히 냉각시킨 냉동 상태로 보관시켜 다음 실험에 사용하였다. 조직 0.5 mg을 300 μ l 용해 완충액 (lysis buffer; 20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EGTA, 50 mM-glycerol phosphate, 1 % triton X-100, 10 % glycerol, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM Na_3VO_4 , and 5 mM NaF)으로 30분 동안 0 $^{\circ}$ C에서 용해

시킨 후 균질화 (homogenization) 시켰다. Ultrasonicator를 이용해서 세포를 파괴시켜 원심분리하고 (18,000 rpm, 4 °C, 15 분), 상층액을 재차 원심분리하였다 (18,000 rpm, 4 °C, 10 분). 5 분 동안 열판에서 가열한 후, 전기영동을 위해 단백질 농도를 Bio-Rad dye-binding microassay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 결정하였는데, 20 µg의 단백질을 10 % SDS polyacrylamide gels로 전기영동 시킨 후 단백질을 Hybon ECL membranes (Amersham-Pharmacia, Biotech., Seoul, Korea)로 옮겨서 염색을 하였다. 제 1 항체로는 anti-StarD6 (1:15000, 4 °C, 24 h)와 anti-β-actin (1:10000, 4 °C, 24 h)을 이용하였다. 염색된 단백질을 enhanced chemiluminescence detect system (iNtRON, Biotech., Seoul, Korea)을 이용하여 특정 단백질의 발현 여부를 확인하였다.

Table 1. Scores allocated to observed rat behaviors[#]

Level 0	Resting	Sleeping
	Snuffling/Floor licking	Air sniffing
	Wall climbing	Walking
	Face washing	Genital licking
	Grooming	
Level 1	Blinking	Squinting
	Frozen posture/Staring	Bracing
	Resting in an unnatural state	Body scrunching
	Mastication	Vocalization
	Panting	Piloerection
	Hiccups	Heaving
Level 2	Tooth grinding	Mouth twitches
	Head tics	Head tremors
	Head bobbing	Head weaving
	Head shakes	
Level 3	Wet dog shakes	Hind foot biting
	Forelimb twitches	Hindlimb twitches
	Forelimb tremors	Hindlimb tremors
	Forelimb clonus	Hindlimb clonus
	Forelimb tonic-clonic	Hindlimb extension
	Scratching	Running or circling
Level 4	Whole body twitches	Whole body tremors
	Loss of balance	Rearing/Praying
	Salivation	Foaming at the mouth
	Straub tail	Tail whipping
	Myoclonic jerks	Bilateral clonic jerks
	Rigidity	
Level 5	Tonic-Clonic convulsions	

[#]This table was quoted from the previous report of Hesp et al. (2007).

III. 결과 (Results)

III-1. 간질 모델의 유도 (Induction of temporal lobe epilepsy)

증류수를 투여한 대조군과 비교했을 때, 모든 pilocarpine 투여군에서 씹기 반응 (mastication), 앞다리 발작 (forelimb clonus), wet-dog shakes 반응을 보였다. 예비 실험에서 전신 간대성 발작이 1시간 이상 지속되면 사망에 이르는 경우가 있었으나, 본 실험에서 중첩 발작 (status epilepticus)을 억제한 결과 실험 도중 사망한 동물은 없었다.

정상 대조군과 실험군의 해마에서 H/E 또는 Nissl 염색에서 세포구조학적 차이점은 발견할 수 없었다 (그림 없음).

III-2. 정상 흰쥐의 해마에서 StarD6와 StAR (StarD6 and StAR in the normal hippocampus)

StarD6 양성반응세포는 CA 모든 영역의 피라미트세포층 (stratum pyramidale)에 존재하는 피라미트세포 (pyramidal cell)와 치아이랑의 과립세포층 (granular layer)의 과립세포 (granule cell)에서 비교적 강하게 염색되었다. 양성반응은 핵 보다 세포질에서 더 강하게 나타났다 (그림 1A, 그림 2A와 2E).

StAR 양성반응세포는 StarD6 양성반응세포가 존재하는 주 세포층을 제외한 다른 구역, 즉 stratum oriens와 stratum radiatum의 사이신경

(interneuron)에서 강하게 염색되었고, 과립세포층은 상대적으로 약하게 염색되었다. 양성반응은 세포질에서만 관찰되었다 (그림1E, 그림3A와 3E).

III-3. 간질이 유도된 해마에서 StarD6와 StAR (StarD6 and StAR in the hippocampus of pilocarpine-induced epilepsy)

StarD6 양성반응은 발작이 유도된 후 3 시간이 지나면서 증가하였다 (그림1B, 그림2B와 2F). 대조군에서 세포질에서 주로 양성반응을 보였던 면역반응은 핵으로 변화되었고, 양성반응세포의 분포도 stratum pyramidale 중심에서 해마의 모든 층으로 확산된 상태로 관찰되었다. 또 치아이랑의 과립세포층의 양성반응도 증가하였다. 이렇게 증가된 양성반응은 12 시간까지 지속되었는데, 특히 stratum lacunosum-moleculare를 중심으로 한 양성반응세포의 분포가 특징적인 것이었다 (그림1C, 그림2C와 2G). 발작 후 24 시간이 지나면서 StarD6 양성반응은 대조군과 같이 감소하였다 (그림1D, 그림2D와 2H). 그 결과 CA의 stratum pyramidale 중심의 양성반응은 유지되고 있었으나, 치아이랑의 과립세포층의 양성반응을 포함하여 stratum lacunosum -moleculare의 양성반응은 감소하였다.

StAR 양성반응 역시 발작이 유도된 후 3 시간이 지나면서 증가하였다 (그림1F, 그림3B와 3F). 특히 치아이랑의 과립세포층에서 강한 양성반응을 보였고, CA 영역의 경우 stratum oriens와 stratum radiatum의 사이신경과 stratum pyramidale의 피라밋세포까지 양성반응을 보였다. 발작 후 12 시간까지 증가된 양성반응이 지속되었는데, 다른 부위에 비해 CA의 피라밋세포의 양성반응이 증가되어 있는 것이 특징이었다 (그림1G, 그림3C와 3G). 피

라밋세포에서 StAR 양성반응은 발작 후 24 시간이 지나도 비교적 잘 관찰되었고 다른 양성반응은 감소하였다 (그림1H, 그림3D와 3H).

III-4. 간질이 유도된 해마에서 StarD6 총량의 변화 (Change of StarD6 in the hippocampus of pilocarpine-induced epilepsy)

대조군의 해마와 간질 발작이 유도된 해마에서 StarD6 단백질의 함량을 비교하기 위해 Western blot 분석을 시행하였다. 그 결과 정상 흰쥐의 해마에서 StarD6가 존재함을 확인할 수 있었다. StarD6 함량은 간질 발작이 유도된 후 3 시간이 되었을 때 일시적으로 증가하였다가 이후 감소하는 양상을 보였다 (그림4).

IV. 고찰 (Discussion)

IV-1. 간질 모델의 유도 (Induction of temporal lobe epilepsy)

간질 모델에서 그 목표 부위는 해마를 중심으로 한 관자엽 구역이 된다. 다른 대뇌 구역과 비교할 때 해마는 그 구조가 비교적 단순하여 간질 발작 후 기능적, 형태학적 연구에 유용한 부위로 이용되었고, kainic acid, domoic acid, pilocarpine, NMDA 등과 같은 다양한 간질 유발 물질이 동물 실험에 이용되고 있다 (Persinger와 Dupont, 2004). 본 실험에서는 pilocarpine을 이용하여 간질 모델을 유발하였는데, <표 1>에 비추어 보면 pilocarpine 주사 후 5분 이내에 씹기반응 (mastication)을 비롯한 머리와 얼굴을 중심으로 한 반응을 보이기 시작하여 이후 수 분이 경과하면 앞다리 발작 (forelimb clonus)과 'wet-dog shakes' 반응을 보였고, 일부는 전신 간대성 발작 (tonic-clonic convulsion)을 보이다가 적절한 처치가 없으면 사망하는 예도 관찰할 수 있었다 (예비실험 결과로 본 논문의 결과에는 포함되지 않았슴). 이상의 반응은 기존의 보고와도 유사한 것이었다.

반면 조직학적/세포구축학적 염색 결과 특이한 변화를 발견할 수 없었다. 기존의 보고에 의하면 세포자멸사 (apoptosis; programmed cell death)와 같은 세포의 조직학적 변화는 주로 발작이 유발된 후 5일이 경과하면 최대에 이르고, 이후 세포의 재생 (regeneration)이 뒤따른다는 보고가 있다 (Ananth 등, 2001). 따라서 발작 유도 후 24시간 이내에는 세포자멸사와 같은 변화를 일반적인 조직학적 염색으로는 발견할 수 없었던 것으로 보인다.

Table 2. Distribution of various START proteins in the hippocampus.

	StAR ¹	StarD6 ²	StarD6 ³
CA			
stratum oriens	+	-	-
stratum pyramidale	-	+	+
stratum radiatum	+	-	±
stratum lacunosum-moleculare	±	-	-
DG (including the hilus)			
molecular layer	±	-	-
granular layer	±	+	+
polymorphic layer	+	+	+

¹Sierra (2004): StAR was widely distributed in the cerebral cortex and cerebellum as well as the hippocampus. StAR immunolocalization was seen in the cytoplasm only.

²Chang et al. (2007b): StarD6 was detected in the nervous system for the first time by immunohistochemistry. StarD6 immunolocalization was observed in the nucleus as well as in the cytoplasm. The cytoplasmic immunoreactivity was not considered as immunopositive in this study.

³This study: StarD6 was detected as reported by Chang et al. (2007b), although the immunolocalization was mainly seen in the cytoplasm in this study and this finding was considered as immunopositive.

IV-2. 정상 흰쥐의 해마에서 StarD6와 StAR (StarD6 and StAR in the normal hippocampus)

START 단백질은 'START domain'을 공유하는 군으로, 사람의 경우 6개의 아군 (subfamilies)으로 나눌 수 있다. 그 원형 단백질은 StAR/StarD1으로 전통적인 스테로이드 합성을 담당하는 조직 (Stocco, 2001) 뿐만 아니라 신경조직 (Furukawa 등, 1998; King 등, 2002; Sierra 등, 2003)에서도 존재함이 보고되었다. 이들은 세포질 내에서 사립체로의 콜레스테롤 전달에 관여하는 전형적인 전달 단백질로 작용한다고 알려져 있으며, 따라서 면역조직화학적 염색에서는 세포질에만 국한되는 것으로 보고되었다. StAR는 대뇌 겉질 (cerebral cortex), 소뇌 (cerebellum), 해마 등 다양한 신경조직에서 양성반응을 보였는데 (Sierra, 2004), 특히 해마에서는 주로 stratum oriens/radiatum에 존재하는 세포에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 보고되었다. 반면에 주 세포층에 해당하는 피라미트세포나 과립세포에서는 양성반응을 관찰할 수 없거나 미약한 양성반응을 보인다고 보고하였다. 본 실험의 결과에서도 이와 유사한 양상을 보이고 있다.

반면 StarD6가 포함되는 StarD4군은 StAR와는 다른 양상을 보인다. StarD4와 StarD5는 StAR와 마찬가지로 전통적인 스테로이드 합성 조직과 신경조직에 존재함이 보고되었는데, 특징적으로 이들은 세포질과 핵 모두에 분포하는 것으로 알려져 있다 (Soccio 등, 2005; Alpy와 Tomasetto, 2005). StarD6는 최근의 보고가 있기 전까지는 고환의 정자발생 세포의 핵에만 존재하는 것으로 보고되었다 (Soccio 등, 2002; Gomes 등, 2005). 이 결과를 바탕으로 StarD6는 다른 START 단백질이 스테로이드 생합성에 필요한 콜레스테롤의 전달에 관여하는 물질이 아니고, 정자발생 (spermatogenesis)과 정자형성 (spermiogenesis)에 필요한 지질의 대사에

더 중요한 역할을 할 것으로 기대되었다.

그러나 StarD6에 관한 최근의 보고는 이와 다른 기능에 대한 가능성을 제시한다. 첫째, Chang 등 (2007a)은 만성 갑상선기능저하증 모델에서 StarD6의 발현이 정자발생 세포 뿐만 아니라 고환의 사이질세포 에서도 관찰됨을 보고하였다. 고환의 사이질세포는 전형적인 스테로이드 생합성을 담당하는 세포로, 이 세포에서 StarD6가 발현된다는 것은 기존의 보고와 달리 StarD6가 콜레스테롤의 생합성에도 관여할 수 있다는 근거로 보인다. 둘째, Chang 등 (2007b)은 신경조직 자체가 대표적인 스테로이드 생합성 장소로 대두되었음에도 불구하고 신경조직에 대한 StarD6 면역조직화학적 연구가 없었다는 점에서 그 결과를 보고하였다. 그 결과 신경조직 내에서도 StarD6 양성반응세포가 존재함을 알 수 있었는데, 그 분포 구역은 StAR와 달리 주 세포층이라는 점이 대표적인 차이점이었다. 이 결과는 본 실험의 결과와 일치하는 것이었는데, 기존의 보고와 달리 본 실험에서는 핵 보다는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것이 다른 점이라고 하겠다 (표 2 참고).

이러한 변화는 Bose 등 (2008)이 보고한 결과에 의해 더욱 가능성을 높이게 된다. 즉, StarD6의 구조적 특성이 StAR와 거의 유사하고, 그 작용도 StAR와 같이 사립체의 내막과 상호작용을 하는 것으로 보인다는 것이다. 이 결과에 의하면 StarD6는 다른 START 단백질과 마찬가지로 세포질에서 콜레스테롤의 전달에 관여하고, 이를 통해 스테로이드 생합성에 관여하는 물질일 가능성이 높다. 따라서 기존의 보고와 같이 핵에서만 관찰되고 핵에서 지질의 대사와 관련된 어떤 기능에 관여할 것이라는 보고와 달리, 세포질 내에도 존재할 수 있으며 그 곳에서 스테로이드 생합성과 관련된 기능을 가질 수 있다는 점을 간과할 수 없다. 따라서 본 실험에서 나타난 세포질 내의 양성반응을 기존의 보고 (Chang 등, 2007b)와 같이 의미 없는 것으로

간주할 수 없을 것으로 생각된다. 그러나 본 실험의 결과만으로 이상의 내용을 입증할 수는 없을 것으로 생각된다. 본 실험에 이용된 제 1 항체는 잘 정제된 단클론 항체 (monoclonal antibody)가 아니라는 점이 가장 큰 제한점이 될 것으로 생각된다. 비록 위양성 반응에 의한 오류를 검증하기 위해 다양한 방법이 시행되기는 하였으나 추가적인 실험에 의해 그 의의를 입증하여야 할 것으로 생각된다.

IV-3. 간질이 유도된 해마에서 StarD6와 StAR (StarD6 and StAR in the hippocampus of pilocarpine-induced epilepsy)

신경조직에서 합성되고 그 효과를 내는 neurosteroid는 노화, 노인성 치매, 간질 등과 같은 다양한 신경퇴행성 질환에서 신경 보호 효과를 가질 것으로 생각되고 있다 (Wojtal 등, 2006). 지금까지 알려진 내용에 한계가 있기는 하지만, 노화된 흰쥐 (Sierra 등, 2003)나 Alzheimer 질환에 걸린 환자 (Webber 등, 2006)에서 젊은 쥐 또는 같은 연령의 정상 대조군과 비교하였을 때 StAR의 총 양이 증가하였다는 보고가 있다. 또, kainic acid를 이용한 간질 유도 동물 실험에서 StAR의 변화가 보고되었다 (Sierra 등, 2003). StAR의 정상 분포 영역은 간질 유도에 의해 변화하였는데, 특히 치아이랑을 중심으로 증가하였고, 발작 후 12시간에 StAR의 총 양이 증가하였다가 24시간에 다시 감소하는 양상을 보였다. 그러나 StarD6에 대한 실험 결과는 아직까지 보고된 바 없다.

본 실험에서 StAR의 총 양의 변화를 확인하지는 못 하였지만 StAR 양성 반응은 증가하는 것이 확인되었다. 그러나 기존의 결과와 달리 StAR 양성 반응은 발작 유도 초기부터 증가하였고, 특히 주 세포층의 변화가 특징적으

로 관찰되었다. 주 세포층의 변화는 치아이랑보다는 CA에서 두드러지게 나타났다, 간질 발작 후 24시간이 지나도 양성반응이 남아 있는 것을 확인할 수 있었다. StarD6의 경우 기존의 보고가 없어 StAR의 변화를 기준으로 본 실험의 의의를 찾고자 하였다. 즉, 본 실험 결과 StarD6 양성반응세포의 분포는 정상 해마에서 관찰되었던 부위 외에도 stratum lacunosum-moleculare에서도 관찰된다는 점이 특징이었다. 이 부위의 양성반응은 간질 발작 유도 후 3시간부터 12시간까지 관찰되었고, 24시간이 지나면 정상 대조군과 유사한 상태로 감소하였다. 뿐만 아니라 StarD6의 총량은 간질 발작 유도 후 3시간에 일시적으로 증가하였다가 감소하는 양상을 보였다.

본 실험의 결과는 간질 발작 유도에 따른 조직학적 손상 과정 (Fujikawa, 1996; Motte 등, 1998)과 일치하는 것이었고, StAR의 조기 유도 (Sierra 등, 2003)라는 측면에서 유사한 것이었다. 특히 stratum lacunosum-moleculare 층에서의 변화는 cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme과 같이 스테로이드 생합성을 관장하는 다양한 효소 (Furukawa 등, 1998; Garcia-Segura 등, 1999; Garcia-Ovejero 등, 2002; Patte-Mensah 등, 2003; Biagini 등, 2006; Wojtal 등, 2006)나 에스트로겐 수용체 (estrogen receptor)의 분포 부위 (Rune과 Frotscher, 2005)와 START 단백질의 분포 부위가 같다는 점에서 의의를 갖는다. 즉, neurosteroid의 생합성과 관련된 전달 단백질인 START 단백질 (StAR, StarD6), 효소 (cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme), neurosteroid 수용체가 동일한 부위에 존재한다는 점을 보여준다. 따라서 간질 발작과 같은 손상에 의해 neurosteroid 생합성과 관련된 각 단계에 작용하는 물질이 일시적으로 활성화 될 수 있고, 이를 통해 neurosteroid의

생합성이 증가하고, 결과적으로 생성된 neurosteroid가 작용함으로써 신경 보호 효과를 가질 수 있음을 시사한다. 따라서 본 실험에서 나타난 StarD6의 조기 유도 역시 의미 있는 소견으로 생각된다.

또 간질 발작 후 12시간이 지나야 StAR 총 양이 증가되었던 기존의 보고 (Sierra 등, 2003)와 달리 StarD6는 발작 후 3시간에 증가하였다가 감소하는 양상을 볼 수 있다. 뿐만 아니라 StarD6 면역양성반응이 세포질 중심에서 핵 중심으로 급격히 변화하는 것도 관찰되었다. 이러한 StarD6의 반응은 StAR의 반응보다 빠른 것으로, 이는 각 단백질의 분포 구역의 차이에 의한 것으로 생각된다. 즉, StAR는 전형적인 콜레스테롤 전달 단백질로 세포질 내에서 사립체로의 전달이 주 기능이지만, StarD6는 핵에서 어떤 기능을 가지고 있을 가능성을 제시하는 것이다. 기존의 보고 (Mellon 등, 2001; Plassart-Schiess와 Baulieu, 2001; Alpy 등, 2005; Soccio 등, 2005)에 의하면 StarD6를 비롯한 핵에서 관찰되는 START 단백질이 핵 내의 수용체와 반응하여 유전자의 발현 (gene expression)을 조절할 것으로 기대된다고 하였다. 즉, 체내의 지질 변화를 감지하여 핵에서 neurosteroid 합성에 관여하는 유전자의 기능을 활성화 시키는 기능을 일부 핵에 존재하는 START 단백질이 할 수 있을 것이라는 것이다. 간질 발작에 의해 StarD6 염색성의 변화 및 단백질 총 양의 변화는 이러한 주장과 일치하는 것이라고 생각된다.

neurosteroid 생합성은 외상에 의해 영향을 받을 수 있고 (di Mechele 등, 2000), 낮은 neurosteroid 총 양이 많은 뇌 질환 (brain pathologies)에서 좋지 않은 예후와 연관성이 있을 수 있다 (Adibhtla와 Hatcher, 2008). 이런 측면에서 본 실험의 결과는 StAR와 StarD6가 유용한 콜레스테롤 전달 단백질 또는 핵에서 어떤 기능을 가질 수 있는 물질임을 증명하는 것이다.

특히 신경계통에서 StarD6는 세포질과 핵에서 모두 중요한 역할을 할 가능성을 제시하고 있다. 그러나 StarD6의 발현을 조절하는 기전 (mechanism)은 명확하지 않다. 특히 neurosteroid 생합성을 조절하는 효소가 신경세포 뿐만 아니라 신경아교세포 (neuroglia)에 더 많이 존재하는 것으로 알려져 있다 (Biagini 등, 2006). 그러나 StarD6 양성반응의 변화가 신경세포에 국한된 것인지 신경아교세포까지 영향을 받는 것인지는 분명하지 않다. STAR가 신경세포에서 더 많이 반응을 보였던 것으로 보아 StarD6도 신경아교세포 보다는 신경세포에서 더 많은 역할을 할 것으로 기대된다. 따라서 앞으로 StarD6의 조절과 관련된 추가 연구를 통해 외상 또는 신경퇴행성 질환에서 이들 START 단백질의 역할을 밝히도록 하여야 할 것이다.

V. 결론 (Conclusions)

neurosteroid 생합성을 조절하는 콜레스테롤의 전달에 관여하는 START 단백질의 역할을 밝히고자 pilocarpine (350 mg/kg, 복강 내 주사)을 이용하여 간질 모델을 유도하였다. 간질 발작이 유발 된 후 3시간, 6시간, 12시간, 24시간까지 해마에서 StAR와 StarD6의 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. pilocarpine 투여로 모든 실험동물에서 발작이 유도되었다.
2. 정상 대조군의 해마: StAR는 주로 CA의 strata oriens/radiatum 또는 치아이랑 내 과립세포층 세포질에서 관찰되었고, StarD6는 주 세포층의 세포질에서 관찰되었다.
3. 간질 유도 후 StAR의 변화: StAR 양성반응세포는 정상 대조군에 비해 stratum pyramidale와 과립세포층에서 많이 관찰되었다. 이러한 변화는 간질 발작 유도 후 3시간부터 24시간까지 관찰되었다.
4. 간질 유도 후 StarD6의 변화: StarD6 양성반응은 정상 대조군에 비해 간질 발작 유도 후 3시간부터 급격히 증가하였다. 양성반응세포는 CA의 거의 모든 층에서 관찰되었는데, 특히 stratum lacunosum-moleculare 층에서의 증가가 특징적이었다. 이러한 변화는 간질 발작 유도 후 12시간까지 유지되었으나, 발작 후 24시간에는 다시 거의 소실되었다. StarD6 총 양은 간질 발작 유도 후 3시간에 일시적으로 증가하였다가 이후 감소하였다.

StAR 결과는 신경퇴행성 자극에 대한 StAR의 변화가 neurosteroid 생합성과 관련될 수 있다는 기존의 보고와 거의 유사한 것이었으나, 기존의 보고에서 치아이랑이 주 목표 부위였다면 본 실험에서는 CA의 피라밋세포가 가장 많은 변화를 보였다. 또, StarD6는 신경계통에 존재하고, 신경퇴행성

자극에 대해 StarD6가 StAR와 유사한 반응을 보이고 있다는 점에서 StarD6가 neurosteroid 생합성과 관련된 물질이 될 수 있음을 시사한다. 특히 StarD6가 StAR 보다 빨리 반응하고, 면역양성반응도 핵에서 주로 관찰된다는 점에서 StarD6는 StAR와 같이 세포질 내에서의 기능 뿐만 아니라 핵에서도 기능을 할 것으로 생각된다.

참고문헌 (References)

Adibhatla RM, Hatcher JF. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem* 2008; 49:241–268.

Alpy F, Latchumanan VK, Kedinger V, Janoshazi A, Thiele C, Wendling C, Rio MC, Tomasetto C. Functional characterization of the MENTAL domain. *J Biol Chem* 2005; 280:17945–17952.

Alpy F, Tomasetto C. Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J Cell Sci* 2005; 118:2791–2801.

Ananth C, Dheen ST, Gopalakrishnakone P, Kaur C. Domoic acid-induced neuronal damage in the rat hippocampus: changes in apoptosis related genes (bcl-2, bax, caspase-3) and microglial response. *J Neurosci Res* 2001; 66:177–190.

Biagini G, Baldelli E, Longo D, Pradelli L, Zini I, Rogawski MA, Avoli M. Endogenous neurosteroids modulate epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 2006; 201:519–524.

Bose HS, Whittal RM, Ran Y, Bose M, Baker BY, Miller WL. StAR-like activity and molten globule behavior of StARD6, a male germ-lin protein. *Biochemistry* 2008; 47:2277–2288.

Chang IY, Shin SY, Kim JW, Yu JM, Kim JS, Song PI, Yoon SP. The changed immunolocalization of START-domain-containing6 (StarD6) during the

development of testes in rat perinatal hypothyroidism. *Acta Histochem* 2007a; 109:315–21.

Chang IY, Kim JH, Hwang G, Song PI, Song RJ, Kim JW, Yoon SP. Immunohistochemical detection of StarD6 in the rat nervous system. *Neuroreport* 2007b; 18:1615–1619.

Fujikawa DG. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 1996; 725:11–22.

Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450_{scc} (CYP 11A1), and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 1998; 71:2231–2238.

Garcia-Ovejero D, Veiga S, Garcia-Segura LM, DonCarlos LL. Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J Comp Neurol* 2002; 450:256–271.

Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchinson RE, Hutchinson JB. Aromatase expression by astrocytes after brain injury; implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 1999; 89:567–578.

Gomes C, Oh SD, Kim JW, Chun SY, Lee KS, Kwon HB, Soh J. Expression of the putative sterol binding protein Stard6 gene is male germ cell specific. *Biol Reprod* 2005; 72:651–658.

Hesp BR, Clarkson AN, Sawant PM, Kerr DS. Domoic acid preconditioning and seizure induction in young and aged rats. *Epilepsy Res* 2007; 76:103–112.

King SR, Manna PR, Ishii T, Syapin PJ, Ginsberg SD, Wilson K, Walsh LP, Parker KL, Stocco DM, Smith RG, Lamb D. An essential component in steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein, is expressed in discrete regions of the brain. *J Neurosci* 2002; 22:10613–10620.

Lavaque E, Mayen A, Azcoitia I, Tena-Sempere M, Garcia-Segura LM. Sex differences, developmental changes, response to injury and camp regulation of the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome P450_{scc}, and aromatase in the olivocerebellar system. *J Neurobiol* 2006; 66:308–318.

Manna PR, Stocco DM. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein expression: functional and physiological consequences. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5:93–108.

Marx CE, Trost WT, Shampine LJ, Stevens RD, Hulette CM, Steffens DC, Ervin JF, Butterfield MI, Blazer DG, Massing MW, Lieberman JA. The neurosteroid allopregnanolone is reduced in prefrontal cortex in Alzheimer's disease. *Biol Psych* 2006; 60:1287–1294.

Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA. Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Rev* 2001; 37:3–12.

di Michele F, Lekieffre D, Pasini A, Bernardi G, Benavides J, Romeo E. Increased neurosteroids synthesis after brain and spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 2000; 284:65–68.

Motter J, da Silva Fernandes MJ, Baram TZ, Nhelig A. Spatial and temporal evolution of neuronal activation, stress, and injury in lithium–pilocarpine seizures in adult rats. *Brain Res* 1998; 793:61–72.

Patte–Mensah C, Kappes V, Freund–Mereier MJ, Tsutsu K, Mensah–Nyagan AG. Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450 side chain cleavage, in sensory neural pathways. *J Neurochem* 2003; 86:1233–1246.

Persinger MA, Dupont MJ. Emergence of spontaneous seizures during the year following lithium/pilocarpine–induced epilepsy and neuronal loss within the right temporal cortices. *Epilepsy Behav* 2004; 5:440–445.

Plassart–Schiess E, Baulieu EE. Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Rev* 2001; 37:133–140.

Ponting CP, Aravind L. START: a lipid–binding domain in StAR, HD–SIP and signaling proteins. *Trends Biochem Sci* 1999; 24:130–132.

Rune GM, Frotscher M. Neurosteroid synthesis in the hippocampus: role in synaptic plasticity. *Neuroscience* 2005; 136:833–842.

Sierra A. Neurosteroids: The StAR protein in the brain. *J Neuroendocrin* 2004; 16:787–793.

Sierra A, Lavaque E, Perez–Martin M, Azcoitia I, Hales DB, Garcia–Segura LM. Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *Eur J Neurosci* 2003;

18:1458–1467.

Soccio RE, Adams RM, Romanowski MJ, Sehayek E, Burley SK, Breslow JL. The cholesterol-regulated StarD4 gene encodes a StAR-related lipid transfer protein with two closely related homologues, StarD5 and StarD6. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:6943–6948.

Soccio RE, Adams RM, Maxwell KN, Breslow JL. Differential gene regulation of StarD4 and StarD5 cholesterol transfer proteins: activation of StarD4 by SREBP-2 and StarD5 by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2005; 280:19410–19418.

Soccio RE, Breslow JL. StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism. *J Biol Chem* 2003; 278:22183–22186.

Stocco DM. SAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:193–213.

Wang JM, Liu L, Irwin RW, Chen S, Brinton RD. Regenerative potential of allopregnanolone. *Brain Res Rev* 2008; 57:398–409.

Webber KM, Stocco DM, Casadesus G, Bowen RL, Atwood CS, Preville LA, Harris PLR, Zhu X, Perry G, Smith MA. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR): evidence of gonadotropin-induced steroidogenesis in Alzheimer disease. *Mol Neurodegener* 2006; 1:14.

Wojtal K, Trojnar MK, Czuczwar SJ. Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacol Rep* 2006; 58:335–340.

Figure Legend

Fig. 1. Low power images of the hippocampus stained by StarD6 and StAR. Compensatory distribution of StarD6 and StAR was seen in control hippocampus. Increased immunolocalization was observed in the stratum lacunosum-moleculare (black arrows in B and C) and in stratum pyramidale (white arrows in G and H) following pilocarpine-induced epilepsy. CA, cornu ammonis; DG, dentate gyrus. Scale bar in H = 500 μ m

Fig. 2. High power images of the hippocampus stained by StarD6. Immunolocalization was shifted to the nuclei and induced in all subfields, especially in the stratum lacunosum-moleculare, of the CA following pilocarpine-induced epilepsy. so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum-moleculare; gcl, granule cell layer. Scale bar in H = 100 μ m

Fig. 3. High power images of the hippocampus stained by StAR. Immunolocalization was induced in the stratum pyramidale following pilocarpine-induced epilepsy. Changed immunolocalization in the dentate gyrus was not remarkable as reported earlier. so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; slm, stratum lacunosum-moleculare; gcl, granule cell layer. Scale bar in H = 100 μ m

Fig. 4. Western blot analysis for StarD6 in animals killed at 3, 6, 12, 24 h following pilocarpine-induced epilepsy. This analysis revealed significant changes in the level of StarD6 in response to epilepsy, an increase being observed 3 h after the injury, compared with the normal hippocampus. The data was normalized with β -actin expression.

그림 1

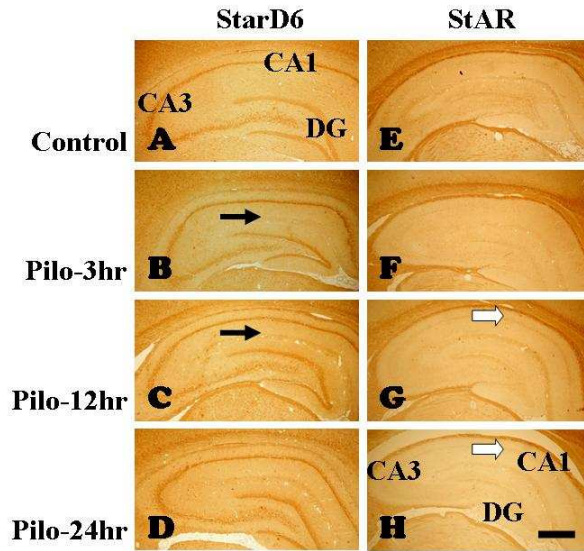


그림2

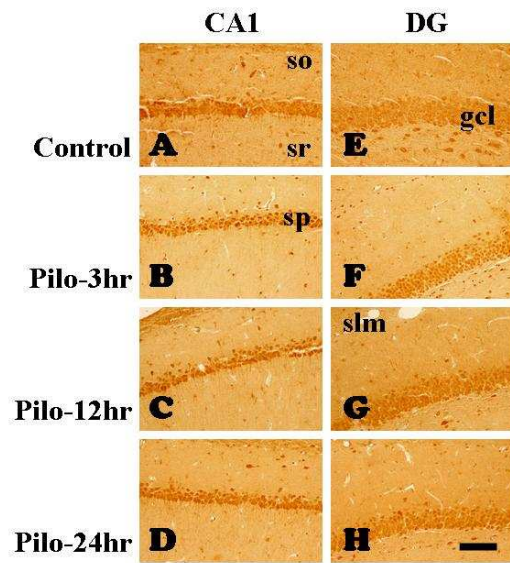


그림 3

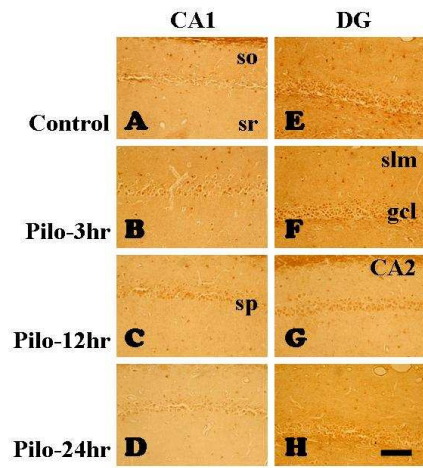
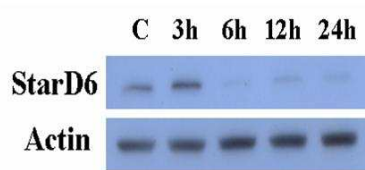


그림 4



저작물 이용 허락서

학 과	의	학 번	20077451	과 정	박사
성 명	한글: 김종권		영문 : Jung-Goan Kim		
주 소	광주 동구 서석동 조선대 병원 신경외과				
연락처	E-MAIL : gokim134@hanmail.net				
논문제목	한글 :신경계 손상에서의 Star D6의 반응				
	영어 : Immunohistochemical reaction of Star D6 after the damage of nervous system				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제,
기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가
없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는
1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한
권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의
전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의() 반대()

2008년 12 월 29 일

저작자: 김 중권 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하

