

자기면역성 뇌척수염에서 interleukin-1 β converting enzyme의 발현

문창종 · 김승준 · 이용덕 · 신태균

제주대학교 농과대학 수의학과
(1998년 12월 2일)

The expression of interleukin-1 β converting enzyme in experimental autoimmune encephalomyelitis

Chang-jong Moon, Seung-joon Kim, Yong-duk Lee, Tae-kyun Shin

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju 690-756, Republic of Korea
(Received Dec 2, 1998)

Abstract : To elucidate the involvement of interleukin-1 β converting enzyme (ICE) in the course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), we induced EAE by immunizing rats with an emulsion of rat spinal cord homogenate with complete Freund's adjuvant supplemented with *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, 5mg/ml) and then examined the expression of ICE in the spinal cord of rats with EAE.

In normal rat spinal cords, ICE is constitutively, but weakly, expressed in ependymal cells, neurons, and some neuroglial cells. In EAE, many inflammatory cells are positive for ICE, and the majority of ICE+ cells were identified as ED1+ macrophages. During this stage of EAE, the number of ICE+ cells in brain cells, including neurons and astrocytes, increased and these cells also had increased ICE immunoreactivity.

These findings suggest that the upregulation of ICE in both brain cells and invading hematogenous cells is stimulated by a secretory product from inflammatory cells, and that this enzyme is involved in the pathogenesis of EAE via the production of IL-1 beta.

Key words : interleukin-1 β converting enzyme, experimental autoimmune encephalomyelitis.

서 론

Interleukin-1 β converting enzyme(ICE, caspase-1)은 cysteine

protease로서 불활성형의 pro-ICE(45kD)에서 granzymes, Fas-Fas ligand, growth factor deprivation, viruses, DNA damage 등으로 인해 활성화 된다¹. 지금까지 알려진 ICE의 기능에는 두 가지가 있는데 첫째, ICE는 불활성

Address reprint requests to Dr. Tae-kyun Shin, Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju 690-756, Republic of Korea.

형인 pro-IL-1 β (31kD)를 활성형 IL-1 β (17kD)로 전환하여 fever를 유발하거나 pro-inflammatory cytokine으로 작용하게 하고²⁻³ 둘째로는 *Caenorhabditis elegans*의 ced-3와 homologue를 가지며 동시에 apoptosis에 관여하는 것으로 알려지고 있다⁴⁻⁵. 이와같은 기능을 가진 ICE는 생식기, 소화기, 흥선, 비장, 신경계세포와 염증세포 등에서 광범위하게 발현되며 면역자극시 발현이 증가되는 것으로 알려지고 있다⁶⁻⁹.

자기면역성 뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)은 T세포 매개성 질병(Th1-type)으로 중추신경계에서 T세포 침윤과 수초탈락이 특징이며 사람의 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS)의 동물모델로 활용된다¹⁰. EAE는 T세포 매개성 질병의 연구에 중요한 모델일 뿐만 아니라 염증세포의 침윤에 의한 척수손상 모델로도 활용이 가능하다. EAE의 발병은 뇌내 침윤된 염증세포로부터 분비된 pro-inflammatory cytokine(IL-1 β , TNF- α)에 의해 야기되며¹¹ 심한 마비기를 지니게 되면 anti-inflammatory cytokine(IL-4, IL-10, TGF- β 등)의 작용¹¹ 및 침윤된 염증세포의 apoptosis에 의해 회복하는 것으로 알려지고 있다¹². 이런 뇌조직내 염증의 유도에 중요한 역할을 할 수 있는 IL-1 β 는 주로 뇌내 침윤된 macrophage¹³ 또는 신경세포¹⁴ 및 신경아교세포¹⁵에서 발현되지만 IL-1 β 를 유도할 수 있는 ICE에 대한 연구는 거의 없다.

이 연구에서는 면역학적으로 격리된 뇌조직의 손상시 염증세포 및 이에 반응하는 신경계세포에서 ICE가 어떤 형태로 발현되는지를 확인하기 위하여 자기면역성 척수손상 모델인 EAE에서 ICE를 면역조직화학적으로 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 암·수 구별없이 7~12주령의 Lewis 랫트를 한국과학기술원 생명공학연구소로부터 분양받아 사용하였다.

자기면역성 뇌척수염(EAE)의 유도와 임상증상의 평가: 정상 Lewis 랫트의 척수를 추출하여 0.05M phosphate buffer에서 균질화시킨 후(1g/ml), complete Freund's adjuvant (CFA; *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, 5mg/ml; Difco)를 동량 혼합한 후 면역원으로 사용하였다¹⁵⁻¹⁶. 면역은 랫트의 좌우 뒷발바닥에 100 μ l씩 접종하였고 면역한 랫트는 자기면역성 뇌척수염의 특징적인 임상증상을 단계

별로 구분하였다. 즉, 증상 없으면 grade 0, 꼬리가 힘없이 늘어지면 grade 1, 한쪽 뒷다리가 마비되면 grade 2, 양쪽 뒷다리가 마비되면 grade 3, 사지가 마비되면 grade 4로 구분하였다¹⁵⁻¹⁶.

조직표본 준비와 투과전자현미경적 관찰 : 실험동물은 ether로 마취하여 방혈하였고 조직채취는 정상랫트, 12~14일령 뒷다리와 꼬리의 완전 마비되는 grade 3과 면역후 21일 이후 회복기로 나누어 각 실험군당 3마리씩 희생시켜 척수를 채취하였다. 그리고 면역조직화학염색용 조직은 10% 포르말린 고정하고 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 5 μ m의 두께로 조직절편을 만들어 H-E 염색을 실시하였다.

투과전자현미경(JEOL 1200EX II)으로 관찰할 조직은 2.5% glutaraldehyde와 1% osmic acid로 고정한 후 에탄올과 propylene oxide로 탈수와 치환하여 epon 레진에 포매하였다. 그후 1마이크론 두께로 절편을 만들어 1% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. Apoptosis가 관찰되는 부위는 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 전자염색한 후 투과전자현미경(JEOL 1200 EX II)으로 세포침윤부위를 관찰하였다.

면역조직화학 : 슬라이드 준비된 조직의 파라핀을 제거하고 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H₂O₂가 포함된 메탄올에 20분간 반응시켰다. 비특이적 반응을 방지하기 위해 10% normal goat serum으로 1시간 반응시켰다. 1차 항체로 ICE p10(Research Diagnostics, Inc., Flender, NJ) (1 : 400), mouse anti-ED1(Serotec, UK) (1 ; 200) 그리고 rabbit anti-GFAP(Dako, Denmark) (1 : 400)를 실온에서 1시간 반응시킨 후 biotinylated goat anti-rabbit IgG(1 : 1000) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 또는 biotinylated goat anti-mouse IgG(1 : 1000) (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 45분간 반응시켰다. 이어 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 실온에서 45분간 반응시켰다. 각 단계가 끝나고 PBS(pH 7.4)로 5분간 3회 충분히 세척했으며 면역반응이 끝난 조직절편은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB) (Sigma, USA) 용액으로 발색했다. 그리고 hematoxylin용액으로 대조염색을 한 후 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경으로 관찰했다.

면역반응세포의 평가 : ICE 염색결과를 2가지 방식으로 평가하였다¹⁷. 염색의 강도에 따라 염색이 안된 경우 (0), 약함(1+), 보통(2+), 강함(3+), 매우 강함(4+)으로 평

가하였고 염색의 분포에 따라 핵만 염색된 경우(N), 세포질만 염색된 경우(C), 핵과 세포질 모두 염색될 경우(NC)로 각각 평가하였다.

결 과

EAE의 경과 : 면역후 9~11일경에 꼬리의 마비기(G1)가 나타나 뇌척수염의 발병을 알 수 있었고 12~15일경에는 꼬리 및 양쪽 후지의 마비(G3)가 일어나며 이 질병이 악화되었다. 16~17일경에 마비가 사라지면서 자연 회복되었다. 면역 후에 나타나는 임상증상의 변화는 Fig 1과 같이 나타났다.

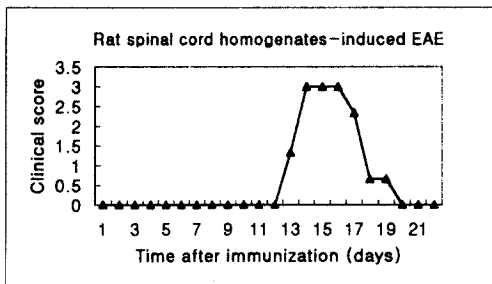


Fig 1. Clinical EAE scores in Lewis rats. Injecting 200mg of homogenated rat spinal cord on day 0 induced EAE. The symbol(▲) indicates the mean clinical score for a group(n=3) on the day indicated.

EAE의 조직소견 : 척수에 나타나는 조직학적 병변은 면역후 9~11일경의 발병초기에는 자기면역반응한 염증세포들이 수막 주위에 나타났으며 수막근처 실질 내로 염증세포가 침윤되었다. 12~15일경의 EAE 척수조직에서는 염증세포들이 주로 수막과 혈관주위에 침윤되었고 조직내 edema를 보였다(Fig 2). 이렇게 침윤된 염증세포들은 주로 T 림프구와 ED1 양성인 macrophage로 구성되어 있었다. 16~17일경, 회복기의 척수조직에서는 G3기의 척수조직에서 보다 적은 수의 염증세포들이 나타났다.

투과전자현미경적 관찰 : 광학현미경적 소견으로 EAE 척수조직에서 dorsal root entry zone 주위 및 혈관 주위에서 세포침윤이 확인되었으며 백색질에서의 수초변성은 거의 관찰되지 않았다. 수막하 및 실질내 침윤된 염증세포의 apoptosis는 Kerr *et al*¹⁸와 Nguyen *et al*¹⁹의 형태학적 판정방법에 따라 확인되었다(Fig 3A). 한편 고배율 소견에서는 혈관주위 염증세포침윤 부위에서 수초의 변성

Fig 2. Histological findings in the rat spinal cord. There were no histological changes in the normal rat spinal cord(A), while the Grade 3 EAE rat spinal cord(B) showed intercellular edema, perivascular cuffing, and infiltrating inflammatory cells. (H-E stain, ×132).

Fig 3. Light(A, ×130) and electron(B, ×4,000) micrographs of the sacral spinal cord of rats with Grade 3 EAE. Inflammatory cells are present in the meninges and parenchyma(A, B). (A) The sacral spinal cord of EAE rat showing apoptotic cell (arrow). In B infiltrated macrophage(arrow) is seen in the parenchyma of the sacral spinal cord of EAE rat. Epoxy resin section(1µm) (A) stained with Toluidine blue.

이 경미하게 관찰되었다(Fig 3A, B).

ICE의 면역반응 : 정상랫트 척수조직에서 ICE의 염색은 매우 약하게 나타났으나 뇌실막세포(Fig 4B)와 실질내 일부 신경아교세포(특히 astrocytes)(Fig 4C, D)에서 ICE 양성반응이 확인되었다. 그러나 신경세포는 약한 양성반응을 보였으나 그 수는 많지 않았다(Fig 4A).

Fig 4. Immunohistochemical staining of ICE(A, B and C) GFAP (D) positive cells in a normal rat spinal cord. a little ICE-positive neurons are found in the normal rat spinal cord(A). B shows ICE-positive ependymal cells. Some weakly-positive GFAP cells are found in the normal rat spinal cord(D, arrows) and some of these cells are also ICE-positive(C, arrows). ($\times 132$).

Fig 5. Immunohistochemical staining of ICE(A and B) and ED 1(C) positive cells in a Grade 3 EAE rat spinal cord. Many ICE-positive neurons are found in the EAE rat spinal cord(A). The ICE-positive cells are located mainly in the perivascular region(B). ED1-positive cells are also found in the perivascular region of the EAE rat spinal cord(C). ($\times 132$).

자기면역성 뇌척수염(grade 3, 면역후 13일째)의 척수에는 ICE 양성세포들이 대조군에 비하여 다수 출현하였다. ICE 양성세포의 cell phenotype을 조사한 결과 침윤된 일부 염증세포는 ICE 양성으로 나타났으며 이런 염증세포들은 주로 ED1 양성 macrophage였다(Fig 5B, C). 한편 신경계 세포의 경우 신경아교세포(주로 astrocytes)에서는 염증부위에 근접한 경우 ICE 면역반응이 증가하였고 신경원세포에서도 EAE 이환후 증가하였다(Fig 5A). 뇌실막세포에서의 ICE 면역반응은 대조군에 비해 큰 차이가 없었다.

ICE는 핵과 세포질 내에 존재하는 것으로 알려져 있고²⁰⁻²¹ 자기면역성 뇌척수염의 경우에도 신경계 세포와 염증세포의 핵내 및 세포질 내에 ICE 양성반응이 나타나 이를 구분하여 조사하였다(Table 1).

1. Inflammatory cells : ICE 양성반응의 염증세포중에 침윤된 ED1 양성의 macrophage는 핵내 염색되었으며 염색의 강도는 0에서 4+ 정도로 다양하게 염색되었으나 2+에서 4+ 정도가 가장 많았다. 염증세포중에 세포가 작고 ICE 음성반응으로 나타난 대부분의 세포는 림프구이다.

2. Reactive brain cells : 신경원세포는 대조군 척수조직에서는 극소수의 신경세포에서 ICE 면역반응(0-2+)이 확인되었으나 그 수는 척수절편당 20개 이내로 거의 관찰되지 않았다. 그러나 G3(면역후 13일째)단계에서의 신경원세포는 ICE 면역반응(0-3+)이 증가되었고 특히 perivascular cuffing 인접부의 신경원세포에서 ICE 염색성이 증가되었다. 회복기(면역후 22일째) 단계에서는 ICE 양성반응한 신경원세포가 G3 단계에서 보다 높은 염색성

(0-4+)을 나타냈다. 각 단계에 따른 이런 변화는 Fig 4에서 ICE 양성 운동신경원세포의 숫자의 변화와 비슷한 양상이었다. 뇌실막세포는 대조군과 비슷한 염색강도(대조군, 0-3+; EAE, 0-4+)를 보였으나 대조군에서는 핵만 염색되었으나 EAE에서는 세포질까지 염색이 되었다. 별아교세포는 대조군과 EAE의 경우 모두 ICE의 면역반응이 핵내 및 세포질까지 확인되었다. 염색강도는 대조군인 경우 0-3+정도였고 EAE의 경우 0-4+였으나 EAE의 경우 대부분이 2+~4+ 정도의 세포가 나타났다.

고 찰

ICE는 다양한 조직에서 상존하고 있는 cystein protease의 일종으로 여러 기능을 가진 것으로 알려지고 있으나⁴⁻⁵ 뇌조직 내에서 ICE의 역할에 대하여는 알려진 바 거의 없다. 본 연구에서는 ICE의 역할을 규명하기 위한 방편으로 정상 뇌조직 및 자기면역성 뇌염 조직에서 ICE의 발현을 관찰하였다.

중추신경계에서 여러가지 세포들은 IL-1 β 를 생성할 수 있으며²² 특히 EAE에 이환된 랫트의 중추신경계에 침윤된 염증세포들은 주로 ED1 양성의 macrophage와 CD4 양성의 T-cell이며¹⁶ 이들은 IL-1 β 를 생산할 수 있는 세포군¹³으로서 ICE가 관여될 수 있을 것으로 생각된다.

정상 뇌조직에서 ICE는 뇌실막세포, 별아교세포에서는 많은 수가 발현하였으나 다른 신경계세포에서는 적은 수의 발현이 나타났다. 그러나 EAE를 유도한 결과 침윤된 염증세포 뿐만 아니라 정상상태에서 발현이 약했던 신경계세포에서도 ICE가 강하게 발현되었다. 따라서

Table 1. ICE immunoreactivity in the spinal cord of rats with normal and EAE

Cell type	Normal	G3 stage(D13PI)*	Recovery(D22PI)*
Inflammatory cell	0*/- **	0-4+/N	0-4+/N, NC
Astrocyte	0-3+/N, C, NC	0-4+/N, C, NC	0-4+/N, C, NC
Vessel	0-1+/C	0-3+/N, NC	0-4+/N, NC
Ependymal cell	0-3+/N	0-4+/N, NC	0-4+/N, NC
Neuronal cell	0-2+/N, C, NC	0-3+/N, C, NC	0-4+/N, C, NC
Meningeal cell	0-3+/N	0-4+/N, NC	0-4+/N, NC

*Intensity of the immunoreactive cells: 0, negative; 1+, weak; 2+, moderate; 3+, strong; 4+, very intense.

**Distribution of expression in the cell: N, nucleus; C, cytoplasm; NC, both nucleus and cytoplasm # D13PI, on day 13 post-immunization; D22PI, on day 22 post-immunization.

EAE의 발병에 적어도 ICE가 관여될 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험의 결과에서 혈관주위의 큰포식세포(macrophage) 뿐만 아니라 뇌조직에서 광범위하게 ICE를 발현한 점은 신경계세포들이 pro-inflammatory cytokine의 자극에 의해 IL-1 β 를 생산할 수 있는 세포군들임을 알 수 있었다.

Apoptosis에 관여하는 여러 인자들은 caspase family를 포함하여 Fas-Fas Ligand, TNF- α , p53, p21, Bax, Bak 등이 증명되고 있으며²³⁻²⁶ 현재까지 규명된 caspase family는 10종이 넘으며 그중에 caspase-3(CPP-32)가 apoptosis를 일으키는 마지막 단계에 관여되어 중요한 역할을 한다고 한다²⁷. 또한 caspase-1(ICE)은 생식기, 소화기, 흉선, 비장, 신경계세포와 염증세포 등에서 apoptosis에 관여가 확인됨에 따라⁶⁻⁹ EAE에서도 caspase-1이 apoptosis에 관여될 개연성은 높다고 하겠으나 이 과정중에는 추가적으로 caspase family 뿐만 아니라 위에서 언급한 다른 분자들의 상호작용이 중요한 매개인자일 것으로 추정된다. 따라서 caspase-1에 의한 apoptosis는 다른 caspase family 또는 death related molecules의 영향이 있을 경우 apoptosis를 유발할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

ICE는 cystein protease로서 apoptosis에 관여하는 것으로 알려지고 있으며 정상 뇌조직내 별아교세포와 신경세포가 발현한다. ICE는 apoptosis 뿐만 아니라 염증반응에도 관여하는 것으로 알려지고 있으나 자기역성 뇌염 모델에서는 규명된 바 없다. 뇌조직 손상시 ICE의 역할을 규명하기 위하여 EAE를 유도한 후 척수조직내 ICE의 발현을 경시적으로 규명하였다.

정상랫트 척수조직에서 ICE의 염색은 매우 약하게 나타났으나 뇌실막세포와 실질내 일부 신경아교세포에서 ICE 양성반응이 확인되었다. 그러나 신경세포는 약한 양성반응을 보였으나 그 수는 많지 않았다. EAE의 척수조직내에는 ICE 양성세포들이 증가하였고 대부분의 염증세포들은 ICE 면역반응이 강하게 나타났다. 동시에 신경세포 및 신경아교세포들도 정상대조군에 비해 ICE 면역반응이 증가되었다.

이 실험결과를 종합해볼 때 뇌내 신경계세포에서 ICE의 발현증가는 침윤된 염증세포로부터 분비된 pro-

inflammatory cytokine에 의한 것으로 추정될 수 있으며 동시에 ICE는 다른 death related molecules와 함께 인접한 침윤세포의 apoptosis에 관여함으로써 뇌염에 의한 마비의 회복에 관련된 것으로 생각된다.

감사의 글 : 이 연구의 일부는 제주대학교 공동실험실습관 투과전자현미경실에서 이루어졌으며 공동실험실습관 관계자에게 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Ramage P, Cheneval D, Chvei M, et al. Expression, folding, and autocatalytic proteolytic processing of the interleukin-1 β converting enzyme precursor. *J Biol Chem*, 270:9378-9383, 1995.
2. Kostura MJ, Tocci MJ, Limjoco G, et al. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:5227-5231, 1989.
3. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356:768-774, 1992.
4. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, et al. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75:641-652, 1993.
5. Kumar S. ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biol Sci*, 20:198-202, 1995.
6. Fearnhead HO, Dinsdale D, Cohen GM. An interleukin-1 beta-converting enzyme-like protease is a common mediator of apoptosis in thymocytes. *FEBS Lett*, 375:283-288, 1995.
7. Hsueh AJ, Eisenhauer K, Chun SY, et al. Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm Res*, 51:433-55, 1996.
8. McAlindon ME, Hawkey CJ, Mahida YR. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut*, 42:214-9, 1998.
9. Keane KM, Giegel DA, Lipinski WJ, et al. Cloning, tissue expression and regulation of rat interleukin 1 beta converting enzyme. *Cytokine*, 7:105-110, 1995.

10. Raine CS, Traugott U. Experimental autoimmune demyelination. Chronic relapsing models and their therapeutic implications for multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 436:33-51, 1984.
11. Tanuma N, Kojima T, Shin T, *et al*. Competitive PCR quantification of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 73:197-206, 1997.
12. Schmied M, Breitschopf H, Gold R, *et al*. Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am J Pathol*, 143:446-452, 1993.
13. Bauer J, Berkenbosch F, Van Dam AM, *et al*. Demonstration of interleukin-1 beta in Lewis rat brain during experimental allergic encephalomyelitis by immunocytochemistry at the light and ultrastructural level. *J Neuroimmunol*, 48:13-21, 1993.
14. Di Loreto S, Balestrino M, Pellegrini P, *et al*. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptor prevents hypoxic neuronal death and cytokine release. *Neuroimmunomodulation*, 4:195-199, 1997.
15. Ohmori K, Hong Y, Fujiwara M, *et al*. *In situ* demonstration of proliferating cells in the rat central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence suggesting that most infiltrating T cells do not proliferate in the target organ. *Lab Invest*, 66:54-62, 1992.
16. Shin T, Kojima T, Tanuma N, *et al*. The subarachnoid space as a site for precursor T cell proliferation and effector T cell selection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 56:171-178, 1995.
17. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, *et al*. Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32(Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res*, 57:1605-1613, 1997.
18. Kerr JFR, Harmon BV. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In: Tomei D, and Cope F, eds. *Apoptosis: The molecular basis of cell death*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 5-29, 1991.
19. Nguyen KB, McCombe PA, Pender MP. Increased apoptosis of T lymphocyte and macrophages in the central and peripheral nervous systems of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with dexamethasone. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56:58-69, 1997.
20. Nakagawara A, Nakamura Y, Ikeda H, *et al*. High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1 beta converting enzyme and CPP32 in favorable human neuroblastomas. *Cancer Res*, 57:4578-4584, 1997.
21. Hayashi T, Sakurai M, Abe K, *et al*. Apoptosis of motor neurons with induction of caspases in the spinal cord after ischemia. *Stroke*, 29:1007-1012, 1998.
22. Lechan RM, Toni R, Clark BD, *et al*. Immunoreactive interleukin-1 localization in the rat forebrain. *Brain Res*, 514:135-140, 1990.
23. Vanhaesebroeck B, Reed JC, De Valck D, *et al*. Effect of bcl-2 proto-oncogene expression on cellular sensitivity to tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Oncogene*, 8:1075-1081, 1993.
24. Nagata S. Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas ligand and Fas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 345:281-287, 1994.
25. Moss SF, Agarwal B, Arber N, *et al*. Increased intestinal Bak expression results in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 223:199-203, 1996.
26. Tang DG, Li L, Chopra DP, *et al*. Extended survivability of prostate cancer cells in the absence of trophic factors: increased proliferation, evasion of apoptosis, and the role of apoptosis proteins. *Cancer Res*, 58:3466-3479, 1998.
27. Endres M, Wang ZQ, Namura S, *et al*. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17: 1143-1151, 1997.