글루타메이트에 의한 소포체 스트레스 유도성 성상세포 자멸사

원광대학교 의과대학 응급의학교실

김성호 · 한용재 · 박재황 · 유수진

Glutamate Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in Primary Rat Astrocytes

Sung Ho Kim, MD, Yong Jae Han, MD, Jae Hwang Park, MD, Su Jin Yoo, MD

Department of Emergency Medicine, Wonkwang University College of Medicine, Iksan, Korea

Background: Glutamate is a well-known central nervous system (CNS) excitatory neurotransmitter that plays a role in memory and learning. However, in excess, it leads to a process called excitotoxicity resulting in cell death. To investigate the mechanism of glutamate cytotoxicity, the apoptosis signaling pathway of primary rat astrocytes was explored in vitro. With this study, we hope to improve the prevention and treatment of ischaemic strokes and various central nervous system disorders.

Methods: To produce a model of cell injury, primary rat astrocytes were treated with glutamate.

Results: Treatment with glutamate induced death by apoptosis in primary rat astrocytes. This was evidenced by an increase in sub-G0/G1 fraction of the cell cycle with a loss of cell viability. Glutamate also increased the intracellular accumulation of Ca^{2+} ions, the expression levels of glucose-regulated protein 78 (Grp78) and C/EBP homologous protein (CHOP) protein, and the phosphorylation of protein kinase r-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). However, the expression pattern of activating transcription factor (ATF)4 protein did not change and the 90 kDa ATF6 was cleaved to 50 kDa along with a reduced amount of Bcl-2 protein in a time-dependent manner. Interestingly, pre-treatment with glutathione markedly suppressed the reactive oxygen species (ROS) generation and the sub-G0/G1 fraction. However, the intracellular concentration of Ca^{2+} did not change.

Conclusion: Our findings suggest that glutamate injures primary rat astrocytes through the endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated apoptotic signaling pathway, as well as, ROS generation. More specifically, through Grp78, PERK, and CHOP, glutamate activates the ER stress-mediated signaling pathway in astrocytes and activates ATF6 to reduce the expression of the Bcl-2 proteins contributing to apoptosis. In addition, the ER stress-mediated signaling pathway is closely related to the transformation of intracellular ROS. This information should be applied to research for the prevention and treatment of strokes and other CNS conditions.

Key Words: Glutamate, Astrocyte, Endoplasmic reticulum, Apoptosis, Reactive oxygen species

서론

의학의 지속적인 발전과 보건의료, 위생의 개선으로 인구

구성이 점차 고령화됨에 따라 치매와 같은 노인성 질환과 더불어 뇌졸중과 같은 뇌혈관계 질환의 발생이 증가하게 되었다. 뇌졸중(stroke 또는 cerebrovascular accident)은 악성 종양 및 심장질환과 더불어 우리나라 3대 사망 원인 중의

▶Received: Jun 3, 2010 ▶Revised: Sep 4, 2010 ▶Accepted: Oct 6, 2010

Address for correspondence: Su Jin Yoo, MD

Department of Emergency Medicine, Wonkwang University College of Medicine, 344-2 Sinyong-dong, Iksan 570-749, Korea

Tel: +82-63-859-1172, Fax: +82-63-859-2129, E-mail: ysoojin@wmc.wonkwang.ac.kr

본 연구는 2008년도 원광대학교 교비 지원에 의하여 수행되었습.

하나로서 뇌혈관 장애로 인한 질환 및 사고의 충칭으로 임상적으로는 크게 허혈성 및 출혈성으로 양분된다. 실제 뇌졸중이 발생하였을 경우 사망이나 장애를 일으키는 경우가 많고 재발 가능성 높으며, 혈관성치매의 중요한 원인이 되기 때문에 이에 대한 예방과 재발 방지에 대한 노력은 국가 보건 차원의 주요한 과제로 생각되고 있다.

동맥혈류 차단 등에 의한 뇌손상은 허혈 및 저산소증에 의해 뇌세포에 산소와 에너지 공급을 차단함으로써 세포막 전위를 상실시킨다. 세포막 이온펌프의 기능 정지는 세포 내 이온들의 농도 변화에 따른 심한 세포 부종을 초래한다. 더불어 세포막 전위 상실에 따른 신경세포 및 신경교세포에서 탈분극이 발생하면서 과량의 글루타메이트를 분비하는 신경세포를 강하게 흥분시키며, 또한 세포 내 칼슘 농도의 급격한 상승을 초래한다. 세포 내에 증가된 칼슘은 단백질분해 효소, 지방분해 효소들을 활성화시키고 미토콘드리아 기능 장애를 초래한다. 따라서 허혈성 손상에 의하여 매우 빠른 시간 내에 세포괴사(necrosis)가 발생하고, 시간이 경과하면서 지연성 세포사인 세포자멸사(apoptosis)가 동반되어 신경세포의 사멸이 일어난다¹⁾.

뇌허혈에 의한 뇌손상의 기전으로 신경흥분독성(excitotoxicity)이 주요한 기전 중 하나로 알려져 있는데, 이는 과다 분비된 글루타메이트 등 흥분성 아미노산에 의한 수용체의 과도한 자극으로 인한 신경세포 사멸을 의미한다. 글루타메이트는 척추동물의 중추신경계에서 중요한 흥분성 신경전달물질로 뇌 신경조직에 존재하는 수용체에 작용하며, 다양한 생리작용에 관여하는 것으로 알려졌다. 그러나 뇌허혈 같은 손상이나 자극에 의하여 글루탐산(glutamic acid)의 유리가 증가되면 신경아교세포에 의한 재흡수가 감소하여 글루타메이트가 신경연접부위에 축적하여 독성을 유발하고, cytokine 증가, 활성산소종의 생성 및 산화적 스트레스 등을 유도하여 신경세포의 손상을 초래한다^{2,3)}.

활성산소종(reactive oxygen species)은 활성화된 호중구, xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡 및 아라키돈산 대사 과정을 통해서 생성된다. 세포 내에서 생성된 활성산소종을 제거하기 위한 생리적 방어기전이 작용하지만, 과도한 활성산소종은 이들 방어체계를 초과하여 세포손상을 초래한다⁴⁾.

정상세포는 뇌세포의 하나로서 중추신경계의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 주로 신경세포에 대한 영양 공급 및 지지기능을 주로 하는 것으로 알려져

Fig. 1. Two major pathways of apoptosis- death receptor pathway triggered by members of death receptor superfamily such as Fas (Type I) and mitochondrial pathway seen extensively in response to extracellular cues and internal insults such as DNA damage (Type II).

있는 정상세포는 중추신경계의 신경세포 중 수적으로 가장 많이 분포하고 있는 세포로 교통기능에 주요한 역할을 하며, 근접한 혈관벽에 부착하여 신경세포의 신진대사에 관여하고 있다.

세포자멸사의 과정은 크게 2가지로 대별되어 왔는데, 즉 사멸수용체(death receptor, Fas/FasL, TNF- α 등)를 통한 수용체 매개성(외인성) 세포사멸 경로와 항암화학제, 활성산소종 등 다양한 인자들에 의해 유발되는 미토콘드리아 매개성(내인성) 세포사멸 경로가 있다(Fig. 1). 최근 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스에 의하여 유도되는 제 3경로(ER stress-mediated apoptotic signaling pathway)가 제안되었다⁵⁾.

소포체는 분비물, 세포막, 골지체와 리소좀이 유기적으로 연관된 단백질의 합성과 folding에 중요한 세포 소기관이며, 신생단백질의 당화, disulfide bonds, folding과 조립을 포함한 중요한 역할을 한다. 또한 소포체는 세포 내 칼슘이온 저장소로서 sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase를 통하여 칼슘이온을 펌핑하거나, inositol 1,4,5-triphosphate에 의해 소포체로부터 칼슘이온을 배출함으로써 칼슘이온 농도를 유지하는데 중요한 역할을 한다⁶⁾.

소포체 스트레스 반응 과정은 소포체 기능을 회복하고 유지하기 위하여 4가지 활성화 단계로 구분한다. 첫 번째 단계는 활성화된 protein kinase r-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)가 eIF-2 α (α -subunit of eukaryotic initiation

factor 2)의 인산화를 통하여 단백질 합성의 전이과정을 감소시켜서 새로운 단백질 합성을 억제하는 과정이다⁷⁾. 두 번째 단계는 소포체 내에 단백질 folding 활동을 증강시키기 위하여 BiP과 같은 소포체 샤페론을 유도하는 것이다. 세 번째 단계는 세포질 내 ubiquitin-proteasome 시스템을 통한 소포체 내 folding 되지 않거나, 잘못 folding된 단백질을 분해하는 과정이다. 이는 소포체 스트레스 관련분해(ER stress associated degradation)라고 불린다. 마지막으로 소포체 스트레스 유도성 스트레스가 너무 심하여 소포체 기능을 회복할 수 없을 경우에는, 세포사멸 경로가 활성화되어 손상된 세포를 제거한다. 소포체 스트레스 상태에서는 이들 4가지 반응단계가 시간 의존적으로 이행된다⁸⁾. 그러나 허혈성 뇌질환에 의한 칼슘이온 증가에 의한 소포체 스트레스 경로에 대한 정확한 신호전달 분자는 알려져 있지 않다. 따라서 이 연구에서는 글루타메이트에 의한 정상세포 사멸기전에서 세포 내 칼슘이온의 증가에 의한 소포체 스트레스 경로를 밝히기 위하여 신호전달 분자의 기능 등을 밝히고, 이를 이용하여 허혈성 뇌졸중 등을 포함한 다양한 뇌신경계 질환의 예방 및 치료에 도움을 주고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1) 실험동물

체중 250 g의 임신한 흰쥐(Sprague-Dawley rat; Samtako, Inc., Osan, Korea)를 구입하였다. 물과 사료를 충분히 주면서 온도 25°C, 습도 50% 전후의 항온습습 장치(Mini Clean Rack; Three Shine Inc., Seoul, Korea) 내에서 명암을 12시간 주기로 조정하여 사육하였고, 이로부터 출생한 생후 3일째 쥐들을 성별에 관계없이 실험동물로 사용하였다. 동물실험은 원광대학교 실험동물 윤리위원회 가이드라인을 준수하여 수행하였다.

2) 세포주

랫트 C6 glial 세포주(CCL-107; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 ATCC로부터 구입, 계대 배양하면서 실험을 실시하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Gibco BRL사(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. 배양용기(24-well plate와 10 cm dish)는 BD사(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 제품을 구입하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 4',6-diamidino-2-phenylindole, bicinehonic acid, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma사(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Grp78 (sc-13539), phospho-PERK (sc-32577), PERK (sc-13073), ATF4 (sc-200), CHOP (sc-575), ATF6 (sc-166659), Bcl-2 (sc-578) 및 β -actin (sc-47778) 등의 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 방 법

1) 성상세포(rat primary astrocytes)의 분리

실험동물의 대뇌 피질로부터 성상세포를 분리하여 사용하였다. 무균상태에서 생후 3일 된 쥐의 뇌를 적출하여 분리된 피질 세포는 25 mM glucose, 4 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate 및 10% FBS가 포함된 배양배지에 현탁하고 6×10^5 cells/mL로 배양용기에 분주한 후 12일 동안 배양하였다. Microglia 및 neuron과 같은 nonastrocytes는 shaking하고 배지를 교환하여 배양용기로 부터 제거하였다. 분리한 astrocytes는 trypsin으로 탈착시켜 실험 목적에 맞게 적절한 배양용기에 분주하여 실험에 사용하였다.

2) 세포배양

세포는 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 가열로 비활성화된 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 배양하여 실험 목적에 따라 사용하였다.

3) 세포생존율 측정

세포생존율은 MTT 분석 방법을 이용하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 분석기로 흡광도 570 nm에서 측정하였다. 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10^5 cells/mL)를 1 mL씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정한 후 시료를 각각의 조건에 따라 처리하였다. 각각의

배양세포에 배양액의 1/10로 MTT용액(5 mg/mL in phosphate buffered saline [PBS])을 첨가하였다. 반응 4시간 후, 배양액을 제거하고, 1 mL DMSO를 첨가하여 세포를 용해시킨 다음, 분광광도계(Thermo Scientific EQuan MAX System; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) 유식세포분석기(Flow cytometry)를 이용한 세포주기 분석

세포사멸에 미치는 영향을 알아보기 위해 propidium iodide (PI)로 DNA를 염색한 후에 유식세포분석기(BD FACSCalibur; Becton, Dickinson and Company)를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. 세포는 시약을 처리한 시간별로 포집하여 PBS (pH 7.4)로 두 번 세척하였다. 세척한 세포(1×10^6)의 DNA는 PI 용액(0.1% Triton X-100, 20 µg/mL PI, 200 µg/mL RNase) 600 µL로 20분 반응하였다. 유식세포분석기에서 얻은 정보는 BD CellQuest software (Becton, Dickinson and Company)를 이용하여 분석하였다.

5) 세포 내 활성산소종 생성의 측정

세포 내 활성산소종의 생성을 측정하기 위하여 형광 probe 인 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma-Aldrich Co.)를 이용하였다. 비형광물질인 DCF-DA는 세포 내 hydrogen peroxide와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. 세포를 수확하기 전에 5 µM DCF-DA를 처리하여 37°C에서 30분 배양하였다. 배양한 세포는 PBS로 세척하여 1% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 용액을 처리한 후 세포를 수확하고, 다시 PBS로 세척하여 유식세포분석기로 형광을 측정하고, BD CellQuest software를 이용하여 분석하였다.

6) 세포 내 칼슘이온 생성의 측정

세포 내 칼슘이온의 축적을 측정하기 위하여 형광 probe Fluo-3AM (Sigma-Aldrich Co.)을 이용하였다. 세포를 수확하기 전에 5 µM Fluo-3AM을 처리하여 37°C에서 30분 배양하였다. 배양한 세포는 PBS (pH 7.4)로 세척하여 1% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고, 다시 PBS로 세척하

여 유식세포분석기로 형광을 측정하고, BD CellQuest software를 이용하여 분석하였다.

7) Western blot analysis

세포는 포집하여 냉 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM 4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, 1 µg/mL aprotinin)과 4°C에서 30분 반응하였다. 동량의 세포파쇄액(200 µg)과 2×sample buffer를 혼합하여 100°C에서 3분 가열하여 단백질의 변성을 유도한 후에 12.5% 및 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 electrotransfer system (Horizontal Semi-Dry Electro-Blotter, HEB 2020; Ellard Instrumentation Ltd., Monore, WA, USA)을 이용(0.8 mA/cm)하여 nitrocellulose membrane으로 이동하고, blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 2시간 반응하였다. 일차 항체는 0.05% (v/v)의 tween-20이 함유된 Tris-buffered saline (TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응하였으며, 각 항체에 대한 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase (HRP)와 anti-mouse IgG conjugated HRP는 TBS-T로 희석(1:3,000)하여 상온에서 1시간 반응한 후, enhanced chemiluminescence kit (RPN2232; GE healthcare, General Electronic Company, Fairfield, CT, USA)를 이용하여 현상하였다.

8) 통계처리

모든 실험은 3회 이상 독립적으로 시행하였으며, 통계처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였고, p-value가 최대치 0.05 미만($p < 0.05$)의 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 글루타메이트가 정상세포의 생존율에 미치는 영향

글루타메이트에 의한 정상세포의 세포독성을 조사하기 위하여 다양한 농도의 글루타메이트를 24시간 처리하여

Fig. 2. Glutamate reduced the viability of C6 glial cells and primary astrocytes. Cells were treated with various concentrations of glutamate for 24 hours after which viability was measured by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Values are represented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. * p <0.05.

세포생존율을 MTT 방법으로 조사하였다. 뇌세포 실험모델로 많이 사용되고 있는 C6 glial 세포에서 글루타메이트 처리 시, 3.75 mM 농도에서 세포생존율은 98%, 7.5 mM의 농도에서 84%, 15 mM 농도에서 46%, 30 mM 농도에서 24% 그리고 60 mM 농도에서 8%로 농도 의존적인 세포생존율의 감소를 나타냈다. 또한 실험동물의 성상세포에 글루타메이트 처리 시, 3.75 mM 농도에서 세포생존율은 96%, 7.5 mM의 농도에서 81%, 15 mM 농도에서 32%, 30 mM 농도에서 21% 그리고 60 mM 농도에서 11%로 농도 의존적인 세포생존율의 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

2. 글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 Grp78 단백질의 발현변화

글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 소포체 스트레스 사멸경로를 조사하기 위하여 15 mM의 글루타메이트를 다양한 시간 처리하여 배양한 후 Grp78 단백질의 발현변화를 Western blot 분석법을 통해 조사하였다. 성상세포에 글루타메이트를 1, 3, 6, 9, 12, 18 및 24시간 처리하여 각각의 세포를 포집, 파쇄한 후 세포 부유액으로부터 Grp78과 β -actin 단백질의 발현 변화를 조사한 결과, Grp78 단백질은 β -actin 단백질 대비 글루타메이트 처리시간 의존적으로 발

현이 증가하였다(Fig. 3).

3. 글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 PERK 단백질의 인산화 및 발현양의 변화

글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 소포체 스트레스 사멸경로를 조사하기 위하여 15 mM의 글루타메이트를 다양한 시간 처리하여 배양한 후 PERK 단백질의 인산화 및 발현변화를 Western blot 분석법을 통하여 조사하였다. 성상세포에 글루타메이트를 1, 3, 6, 9, 12, 18, 및 24시간 처리하여 각각의 세포를 포집, 파쇄한 후 세포 부유액으로부터 PERK 단백질의 인산화와 발현양의 변화를 조사한 결과, PERK 단백질의 인산화는 글루타메이트 처리 1시간 후부터 시간 의존적으로 증가하였으며, 글루타메이트 처리 18시간 후에 최대의 인산화 경향을 보이다가 감소하였다. 반면, PERK 단백질의 발현은 시간 의존적으로 감소하는 경향이 있었다. 이때 단백질양은 β -actin을 통하여 확인하였다(Fig. 3).

4. 글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 ATF4 단백질의 발현변화

글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 소포체 스트레스 사멸경로를 조사하기 위하여 15 mM의 글루타메이트를 다양한 시간 처리하여 배양한 후 ATF4 단백질의 발현 변화를 Western blot 분석법을 통하여 조사하였다. 성상세포에 글루타메이트를 1, 3, 6, 9, 12, 18 및 24시간 처리하여 각각의 세포를 포집, 파쇄한 후 세포 부유액으로부터 ATF4 단백질의 발현을 조사한 결과, ATF4 단백질의 발현은 글루타메이트 처리시간에 따라 감소하는 것처럼 보였지만, β -actin의 발현 정도 또한 감소하여 유의한 발현감소는 아니었다(Fig. 3).

5. 글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 CHOP 단백질의 발현변화

글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 소포체 스트레스 사멸경로를 조사하기 위하여 15 mM의 글루타메이트를 다양한 시간 처리하여 배양한 후 CHOP 단백질의 발현변화를 Western blot 분석법을 통해 조사하였다. 성상세포에 글루타메이트를 1, 3, 6, 9, 12, 18 및 24시간 처리하여 각각의 세포를 포집, 파쇄한 후 세포 부유액으로부터 CHOP 단백질

Fig. 3. Expression of glucose-regulated protein 78 (Grp78), phospho protein kinase r-like endoplasmic reticulum kianse (p-PERK), activating transcription factor (ATF)4, C/EBP homologous protein (CHOP), ATF6, and Bcl-2 protein in glutamate-treated rat primary astrocytes. The expression of proteins was measured by Western blotting. Cell lysates were quantified in protein concentration and subjected on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The transferred membrane was immunoblotted with anti-Grp78, anti-phospho PERK, anti-PERK, anti-ATF4, anti-CHOP, anti-ATF6, anti-Bcl-2, and anti- β actin antibodies. The immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence kit.

의 발현 변화를 조사한 결과, CHOP 단백질은 글루타메이트 처리에 의해 시간 의존적으로 발현이 증가하였으며, 특히 글루타메이트 처리 18시간 이후부터 뚜렷한 증가양상을 보였다. 이때 단백질량은 β -actin을 통하여 확인하였다(Fig. 3).

6. 글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 ATF6 단백질의 발현 변화

글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 소포체 스트레스 사멸경로를 조사하기 위하여 15 mM의 글루타메이트를 다양한 시간 처리하여 배양한 후 ATF6 단백질의 발현 변화를 Western blot 분석법을 통해 조사하였다. ATF6 단백질은 소포체에 90 kDa의 크기로 존재하다가 소포체 스트레스 경로 활성화시 골지체로 이동 50 kDa와 40 kDa로 절단된다. 성상세포에 글루타메이트를 1, 3, 6, 9, 12, 18 및 24시간 처리하여 각각의 세포를 포집, 파쇄한 후 세포부유액으로

부터 ATF6 단백질의 발현 변화를 조사한 결과, 글루타메이트 처리에 의해 90 kDa의 ATF6 단백질은 3시간 이후부터 시간 의존적으로 발현이 현저히 감소하였으나, 이와는 상반되게 50 kDa의 ATF6 단백질은 발현이 증가하였다. 특히 글루타메이트 처리 3시간부터 ATF6의 분절이 시작되었음을 알 수 있었다. 이때 단백질량은 β -actin을 통하여 확인하였다(Fig. 3).

7. 글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 Bcl-2 단백질의 발현 변화

글루타메이트에 의한 성상세포 사멸에서 세포사멸 신호 전달계의 중요 신호전달 분자인 Bcl-2 family 단백질군 즉, Bcl-2의 발현을 단백질 수준에서 조사하였다. 먼저, 15 mM 농도의 글루타메이트를 성상세포에 1, 3, 6, 9, 12, 18 및 24시간 처리하여 각각의 세포를 포집, 파쇄한 후 세포 부유액

으로부터 Bcl-2 단백질의 발현을 Western blot 분석법으로 조사하였다. 그 결과 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-2의 발현이 글루타메이트 처리 1시간 후부터 시간 의존적인 발현 감소를 보였다. 이때 단백질양은 β -actin을 통하여 확인하였다(Fig. 3).

8. 글루타메이트에 의한 정상세포 사멸에서 glutathione의 효과

글루타메이트에 의한 정상세포 사멸에서 세포 사멸 신호 전달 기전 중 활성산소종의 영향을 조사하기 위하여 대표적 항산화제인 glutathione (GSH)를 정상세포에 30분 동안 전처리하여 글루타메이트에 의한 sub-G0/G1 분획변화, 세포 내 활성산소종, H_2O_2 의 생성 및 세포 내 칼슘이온의 변화를 유식세포분석기로 조사하였다. 세포자멸사의 전형적인 특

징인 세포 내 DNA의 분절을 나타내는 sub-G0/G1 분획의 분석은 PI 염색을 시행하였다. 정상세포에 15 mM 농도의 글루타메이트를 24시간 처리 시 sub-G0/G1 분획은 대조군 0.2%에 비해 15%로 증가하였으나, 10 mM 농도의 GSH를 전처리하였을 경우 2.7%의 sub-G0/G1 분획으로 감소하여 글루타메이트에 의한 정상세포의 자멸사를 보호하는 효과를 나타내었다(Fig. 4A). 이때 GSH 단독처리군에서는 0.1%의 sub-G0/G1 분획을 보여 정상세포에 대한 GSH 자체 독성 효과는 없었다.

또한, 세포 내 활성산소종인 H_2O_2 의 생성은 DCF-DA로 염색하여 유식세포분석기를 통하여 조사하고, M1 값으로 표시하였다. DCF-DA는 활성산소종 중 세포 내 H_2O_2 와 반응하여 녹색형광이 증가 한다. 정상세포에서 15 mM 농도의

Fig. 4. Effects of glutathione (GSH) on intracellular Ca^{2+} accumulation in glutamate-treated primary rat astrocytes. Cells were treated with indicated concentrations of GSH for 30 minutes then further maintained with 15 mM glutamate. Cells were separately incubated with propidium iodide staining (A), 5 μ M 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (B), and Fluo-3AM (C). Then, the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry. Glu, glutamate; Cont, control.

글루타메이트를 18시간 처리 시 녹색형광의 M1 값은 대조군 67%에 비하여 89%로 증가하였으나, 10 mM 농도의 GSH를 전처리한 실험군의 M1 값은 63%로 감소하였다. GSH 단독 처리군의 M1 값은 정상대조군과 유사한 수준인 65%를 나타내었다(Fig. 4B).

세포 내 칼슘이온의 축적은 Fluo-3AM 염색 후 유식세포분석을 시행하였다. 15 mM 농도의 글루타메이트를 성상세포에 24시간 처리 시 칼슘이온의 축적은 대조군 49%에 비교하여 94%로 증가하였으나, GSH 전처리 시 92%의 칼슘이온 축적을 보여 유의한 변화가 없었다. 이때 GSH를 단독처리한 실험군은 대조군과 비슷한 52%를 보였다(Fig. 4C).

고 찰

신경세포의 손상기전은 외부 자극에 의한 물리적 혹은 생리적 손상으로 세포가 손상되어 괴사가 유도된다. 알츠하이머병, 파킨슨병 및 뇌졸중 등과 같은 다양한 뇌신경계 질환들은 조직 및 세포수준의 다양한 생화학적 기전들을 통하여 여러 유관세포들의 자멸사를 통하여 진행되는 것으로 알려졌다^{9,10}. 세포자멸사는 세포나 장기의 항상성(homeostasis) 유지를 위한 중요한 기전으로서 1980년대 후반기부터 세포생물학 영역에서 발전되어 왔으며, 특히, 신경계와 면역계에서 세포의 생성, 분화 및 기능 등에 그 중요성이 밝혀졌다¹¹. 세포자멸사 기전의 이상은 암 발생, 암 치료에 대한 내성발현, 자가 면역질환의 발생, 퇴행성 질환 및 HIV에 의한 병리 현상에 중요하다^{12,13}. 세포자멸사는 다세포 생물의 정상적인 기관 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리 현상의 하나인 계획된 세포의 사멸로 빠른 세포탈수 현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질 내의 칼슘농도의 증가, 염색체의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 아포토틱 소체(apoptotic body)의 형성이 특징적이다¹⁴. 이 연구에서 글루타메이트는 성상세포 및 C6 glial 세포에서 농도 의존적인 세포생존율의 감소를 보였으며, 글루타메이트 처리 24시간에 sub-G0/G1 분획의 증가를 보이는 전형적인 세포자멸사 기전이었다.

다양한 신경계질환에서 중추신경 세포손상에 기여하는 물질은 여러 가지가 있으나, 그 중 대표적인 것은 아미노산계

의 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트이다. 글루타메이트는 척추동물의 중추신경계에서 중요한 신경전달물질로서 뇌에 분포되어 있는 여러 수용체에 작용하여 다양한 생리작용에 관여하며, 뇌의 원활한 기능 유지에 필수적이지만, 손상이 진행될 경우 다량의 글루타메이트가 유리되어 여러 병리적 작용의 원인이 된다²⁴. 뇌허혈 시에는 흥분성 아미노산들의 다량 분비와 허혈에 의한 성상세포의 글루타메이트 수송체(transporter) 작용의 억제 혹은 역작용에 의하여 허혈 수분 내에 글루타메이트의 농도가 급격히 증가하고, 증가된 글루타메이트는 세포 내 흥분성 아미노산 수용체를 활성화하여 세포 내로의 칼슘의 유입을 증가하여 뇌 세포 손상을 유도한다¹⁵. 이 연구에서 글루타메이트 수송체의 작용 및 발현을 조사하지 않았으나, 세포 내 칼슘이온의 농도가 증가하는 결과는 Hwang 등¹⁶의 결과와 일치하였다.

칼슘이온은 세포 내 신호전달을 담당하는 중심 역할을 하는 요소의 하나이다¹⁷. 신경세포나 그 외 흥분성 세포에서는 탈분극 될 때 세포막의 칼슘이온 통로가 열리며, 이를 통하여 세포의 칼슘이온이 세포 내로 유입되어 세포 내 칼슘이온 농도가 증가하거나, 여러 수용체 자극에 의하여 유리된 inositol 1,4,5-triphosphate에 의해 세포 내에 저장된 칼슘이 유리되어 세포 내 칼슘이온 농도가 증가한다¹⁸. 비흥분성 세포에서도 호르몬 등에 의한 자극은 세포 내 칼슘이온 농도 증가를 유도한다¹⁹. 이러한 칼슘이온 농도변화가 세포 내에서 어떤 기능을 하는지는 다양한 분야에서 수 년간 연구하여 많은 부분이 알려졌다²⁰. 많은 종류의 세포에서 세포 내 칼슘이온 농도는 평상시에 매우 낮은 농도로 유지되는데, 이는 주로 세포 내 칼슘 저장소의 하나인 소포체에 칼슘이온이 능동적으로 저장되기 때문이다²¹. 소포체 내의 높은 칼슘이온의 농도는 신생 단백질의 folding과 disulfide bonds 형성과 같은 소포체 기능에 필수적이며, 소포체에서 칼슘이온 항상성이 파괴되면 소포체의 기능이 저하된다. 이 연구에서도 글루타메이트에 의해 성상세포 내 칼슘이온 농도가 높아짐을 칼슘이온 indicator인 Fluo-3 AM 염색과 유식세포분석기를 통하여 확인하였으며, 이러한 연구결과는 소포체 스트레스 경로가 활성화하였다고 판단되었다.

소포체 스트레스 반응 과정은 소포체 기능을 회복하고 유지하기 위하여 4가지 활성화 단계로 구분하고, 소포체 스트레스 상태에서는 이들 4가지 반응 단계가 시간 의존적으

로 이행된다. 이 연구에서는 글루타메이트 처리 시 정상세포에서 Grp78 단백질의 발현이 시간 의존적으로 증가하였으며, PERK 단백질의 인산화 및 CHOP 단백질의 발현이 증가하였다. Rodrigues 등²²⁾은 Bcl-2 family 단백질의 발현이 소포체 스트레스 경로에 의한 CHOP 단백질에 의하여 조절됨을 보고하였다. 이 연구에서 글루타메이트에 의하여 발현이 감소한 Bcl-2 단백질은 소포체에서 칼슘의 방출을 초래하는 Rodrigues 등의 결과와도 일치하였다. 그러나 ATF4 단백질의 발현 변화는 없었으며, ATF6의 분절은 증가하였으나 eIF-2 α 의 활성화와 발현 양 변화는 관찰할 수 없었다. 따라서 글루타메이트에 의한 정상세포의 자멸사는 Grp78-PERK-CHOP 신호전달경로가 주된 소포체 스트레스 경로로 판단되며, ATF6의 상하방 신호전달 경로에 대한 정확한 신호전달 기전 연구가 추가적으로 필요하다고 판단된다.

다량의 글루타메이트가 유리되거나, 혹은 글루타메이트 수용체의 반응 감도가 상승하면 신경세포에 손상을 초래하게 되는데, 이것은 산화적 스트레스의 증가, 세포 내 여러 이온들의 농도 증가 등이 매개한다. 산화적 스트레스는 퇴행성 신경질환의 병리학에서 중요한 역할을 하며, 핵산, 단백질 및 지질에 손상을 주고 미토콘드리아에도 영향을 주어 세포 내 활성산소종의 농도 증가를 유도한다²³⁾. 고농도의 활성산소종은 항산화 메커니즘을 억제하여 신경세포의 사멸을 유도한다²⁴⁾. 활성산소종은 자유 라디칼로서 산소 대사의 정상적 생성물이고, 여러 기전을 통해 허혈성 재관류 등의 과정 동안 과량이 생성된다. 세포 내 활성산소종이 과다하게 생성될 경우 c-Jun N-terminal kinase 경로의 활성화 혹은 NF- κ B 전사인자의 활성화를 통하여 손상을 유도하며, 심한 경우에는 미토콘드리아가 활성화되어 cytochrome c가 방출되어 세포사멸을 일으키게 된다²⁵⁻²⁷⁾. 따라서 과량의 산화성 스트레스에 의해 산화/항산화 균형이 깨졌을 때 신경세포 손상이 일어날 수 있기 때문에 활성산소종의 조절이 퇴행성 신경질환에서 매우 중요하다. 산소가 불안정하게 산화되어 생성되는 활성산소종은 사립체 호흡 사슬의 효소반응이나 해독반응, 유리 방사선, 가시광선 및 자외선 조사 등에 의한 세포 병리상태에 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 생체에는 유리에 의한 세포손상을 방지하는 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase 등과 같은 항산화 효소계와 요산, GSH, sulphhydryl groups 및 melanine 등과 같은 항산화 물질

이 있다²⁸⁾. 특히 노화와 암, 치매 등의 원인으로 알려진 유해물질 활성산소종을 제거하는 역할을 하는 항산화물질 GSH가 우리 몸이 질병 등에 노출되면 다량으로 생성되어 몸을 보호하는 기능을 수행하게 된다. 또한 이러한 GSH는 모든 생명체에 존재하며, 외부 스트레스에 의한 세포 내 활성산소종의 농도를 인지하여 다양한 스트레스를 제거하는 생체방어 조절기능을 가진다²⁹⁾. 또한, 최근 보고에 의하면 활성산소종 scavenger가 과산화수소에 의해 유도된 세포사멸에서 효과적으로 사람 신경교종을 보호하였다³⁰⁾. 이 연구에서도 글루타메이트 처리 시 정상세포에서 활성산소종의 생성이 증가하였고, GSH 처리 시 sub-G0/G1 분획의 감소와 함께 세포 내 활성산소종의 생성량이 감소하였다. 그러나 글루타메이트에 의한 정상세포 내 칼슘이온의 증가는 GSH 전처리에 의해 억제되지 못하였다. 따라서 글루타메이트에 의한 칼슘이온 유입에 따른 소포체 스트레스가 세포 내 활성산소종의 생성의 상방 신호전달계일 것으로 판단되며, 소포체 스트레스 억제를 통한 활성산소 생성 조절들에 대한 심도 깊은 연구가 요구되어 진다.

이상의 결과를 종합하면 글루타메이트는 정상세포에서 농도 의존적인 세포독성을 유발하였으며, 세포 내 칼슘이온 축적을 초래하고 소포체 스트레스를 유발하여 Grp78 발현 증가, PERK 단백질의 인산화를 통한 활성화와 CHOP 발현 증가, ATF6 분절 및 Bcl-2의 발현감소에 따른 세포자멸사 기전을 활성화하였다. 또한, GSH 전처리는 글루타메이트에 의한 세포자멸사와 세포 내 활성산소종의 생성을 억제하였으나 세포 내 칼슘이온의 축적은 억제하지 못하였다. 따라서 세포 내 활성산소종의 생성 및 소포체 스트레스 경로에 대한 추가 연구는 글루타메이트에 의한 뇌세포 손상을 보호하거나 치료할 수 있는 약물 개발에 필요한 과학적 기반을 제공할 수 있을 것으로 생각한다.

요 약

연구배경: 글루타메이트에 의한 정상세포 사멸기전에서 세포 내 칼슘이온의 증가에 의한 소포체 스트레스 경로를 밝히기 위하여 신호전달 분자의 기능 등을 밝히고, 이를 이용하여 인구의 고령화에 따라 증가하고 있는 허혈성 뇌졸중 등을 포함한 다양한 뇌신경계 질환의 예방 및 치료에

도움을 주고자 하였다.

방법: 글루타메이트에 의한 신경독성 유발 모델을 위해 생후 3일째 쥐에서 각각 성상세포(rat primary astrocyte)를 분리배양하여 글루타메이트에 의한 세포 손상 모델을 만들고, 신경교세포주인 C6 glial 세포에 대한 글루타메이트의 독성과 비교하였다. 또한 글루타메이트 처리 시 세포 내 칼슘이온의 증가와 소포체 관련 단백질의 활성화와 발현 변화를 조사하였다.

결과: 글루타메이트는 C6 glial 세포와 성상세포에서 농도의존적인 세포생존율의 감소를 유도하였다. 글루타메이트는 성상세포에서 세포 내 칼슘이온 축적을 초래하고 소포체 스트레스를 유발하여 Grp78 발현 증가, PERK 단백질의 인산화를 통한 활성화와 CHOP 발현 증가, ATF6 분절 및 Bcl-2의 발현감소에 따른 세포자멸사 기전을 활성화하였다. 또한, GSH 전처리는 글루타메이트에 의한 세포자멸사와 세포 내 활성산소종의 생성을 억제하였으나, 세포 내 칼슘이온의 축적은 억제하지 못하였다.

결론: 글루타메이트는 성상세포에서 Grp78, PERK 및 CHOP의 전달 경로를 통해 소포체 스트레스 경로를 활성화하였고, ATF6의 활성화에 따른 Bcl-2의 단백질 발현 감소를 유도하여 세포자멸사를 초래하였다. 또한 세포 내 활성산소종의 생성 변화에 소포체 스트레스 경로가 밀접한 연관이 있을 것으로 판단된다. 따라서 세포 내 활성산소종 생성 및 소포체 스트레스 경로 조절에 대한 보다 정확한 연구는 뇌졸중 등을 포함한 다양한 뇌신경계 질환의 예방 및 치료에 활용될 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

- Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:99-109.
- Landucci E, Boscia F, Gerace E, Scartabelli T, Cozzi A, Moroni F, et al. Involvement of endocannabinoid signaling in the neuroprotective effects of subtype 1 metabotropic glutamate receptor antagonists in models of cerebral ischemia. *Int Rev Neurobiol* 2009;85:337-50.
- Milanese M, Bonifacino T, Zappettini S, Usai C, Tacchetti C, Nobile M, et al. Glutamate release from astrocytic gliosomes under physiological and pathological conditions. *Int Rev Neurobiol* 2009;85:295-318.
- Halliwell B, Gutteridge JM, editors. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989. p. 86-9.
- Mehmet H. Caspases find a new place to hide. *Nature* 2000;403:29-30.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000;403:98-103.
- Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 2002;3:99-111.
- Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell* 2003;4:265-71.
- Fischer U, Schulze-Osthoff K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev* 2005;57:187-215.
- Uversky VN. Intrinsic disorder in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Front Biosci* 2009;14:5188-238.
- Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982;17 Pt 2:229-59.
- Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993;262:695-700.
- Williams GT. Apoptosis in the immune system. *J Pathol* 1994;173:1-4.
- Cohen JJ. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract (Off Ed)* 1993;28:35-43.
- Berliocchi L, Bano D, Nicotera P. Ca^{2+} signals and death programmes in neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;360:2255-8.
- Hwang IY, Shin IC, Song YS, Seoung MJ, Park HJ, Park CB, et al. Intracellular calcium concentration in the glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cell. *Toxicolo Res* 2002;18:355-62.
- Kaneko Y, Tsukamoto A. Thapsigargin-induced persistent intracellular calcium pool depletion and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Lett* 1994;79:147-55.
- Putney JW Jr. Stimulus-permeability coupling: role of calcium in the receptor regulation of membrane permeability. *Pharmacol Rev* 1978;30:209-45.
- Putney JW Jr, Bird GS. The inositol phosphate-calcium

- signaling system in nonexcitable cells. *Endocr Rev* 1993; 14:610-31.
20. Putney JW Jr. Calcium signaling: up, down, up, down... what's the point? *Science* 1998;279:191-2.
 21. Bellomo G, Perotti M, Taddei F, Mirabelli F, Finardi G, Nicotera P, et al. Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free Ca^{2+} concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res* 1992;52:1342-6.
 22. Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ* 1999;6:842-54.
 23. Nicholls DG. Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr Mol Med* 2004;4:149-77.
 24. Farooqui T, Farooqui AA. Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev* 2009;130:203-15.
 25. Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 2000;28:170-7.
 26. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000;288:870-4.
 27. Luo Y, Hattori A, Munoz J, Qin ZH, Roth GS. Intrastriatal dopamine injection induces apoptosis through oxidation-involved activation of transcription factors AP-1 and NF-kappaB in rats. *Mol Pharmacol* 1999;56:254-64.
 28. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
 29. Wang X, Phelan SA, Forsman-Semb K, Taylor EF, Petros C, Brown A, et al. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J Biol Chem* 2003;278:25179-90.
 30. Morgan MJ, Kim YS, Liu Z. Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1471-83.