

Peroxynitrite에 의한 사람 신경세포종 SH-SY5Y의 glutathione 감소와 apoptosis

김명선^{1,2} · 이강민² · 박래길^{1*}

¹원광대학교 의과대학 미생물학 교실

²전북대학교 자연과학대학 생물과학부

Reduction of Glutathione and Apoptosis of Human Dopaminergic Neuroblastoma SH-SY5Y Cells by Peroxynitrite

Myung-Sunny Kim^{1,2}, Kang-Min Lee² and Rae-Kil Park^{1*}

¹Department of Microbiology, Wonkwang University School of Medicine,
Iksan, Chonbuk 570-749, Korea

²Department of Molecular Biology, Chonbuk National University,
Chonju Chonbuk 561-756, Korea

(Received April 4, 2000)

(Accepted June 27, 2000)

ABSTRACT : This study was designed to evaluate the mechanism by which reactive nitrogen intermediates (RNI) induced the cytotoxicity of human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. 3-Morpholinopyridone (SIN-1), a donor of peroxynitrite (ONOO⁻) and sodium nitroprusside (SNP), a donor of nitric oxide (NO) induced cell detachment and apoptotic death, as characterized by chromatin condensation, the ladder pattern fragmentation of genomic DNA and morphological nuclear changes. SIN-1 also induced the activation of caspase 3-like protease in a time-dependent manner. Exogenous antioxidants, such as reduced glutathione (GSH), N-acetylcysteine (NAC), and selenium protected the cells from apoptotic death and reduced the activation of caspase 3-like protease by SIN-1. Furthermore, SIN-1 directly reduced the intracellular levels of glutathione. Taken together, these data suggested that RNI including NO and peroxynitrite decrease the concentration of intracellular antioxidant such as GSH, which lead to the apoptotic death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Key Words : Peroxynitrite, Nitric oxide, Apoptosis, Glutathione, Neurotoxicity

I. 서 론

신경계에서 저농도의 nitric oxide(NO)는 신경전도(neurotransmission) 및 혈관이완(vasodilation) 기능을 수행하나, 고농도의 유도성 NO는 허혈, 뇌조직 손상 및 탈수질(demyelination)의 원인이 되어 퇴행성 뇌질환(degenerative disease)과 뇌졸중(stroke)을 초래한다고 보고되어져 있다(Dawson 등, 1991; Jaffrey와 Snyder, 1995). 뇌허혈시 뇌내로 글루타메이트(glutamate)의 과도한 방출이 이루어지고(Wahl 등, 1994), 글루타메이트 수용체의 과도한 흥분독

성(excitotoxicity)이 세포내로 전달되어지게 되면 비교적 짧은 시간에 신경세포의 비가역적 손상이 초래된다. 흥분독성은 이온통로를 통한 칼슘의 세포내 유입을 증가시키고(Gunasekar 등, 1995), 세포내 칼슘의 증가는 neuronal nitric oxide synthase(nNOS)를 활성화시켜 기질인 L-arginine으로 부터 NO생성을 촉진시킨다(Samdani 등, 1997). NO와 O₂의 반응생성물인 peroxynitrite(ONOO⁻) 같은 질소자유기(reactive nitrogen intermediates)는 NO 보다 더욱 짧은 반감기의 라디칼로서 산화적 스트레스(oxidative stress)의 강한 유도체이다. 이들은 지질의 산화(lipid peroxidation), DNA 손상 그리고 미토콘드리아의 기능손상을 초래하여 세포의 기능을 상실시키는 것으로 보고된 바 있다(Radi 등, 1991). 특히, peroxynitrite는 타이로신(tyrosine)과 반응해서 3-nitrotyrosine을 형성하고 이 반응산물은 알츠하이머병(Alzheimer's disease)(Smith, 1997)과 파킨슨씨

*To whom correspondence should be addressed
Abbreviations: GSH, reduced glutathione; NO, nitric oxide; RNI, reactive nitrogen intermediates; SIN-1, 3-morpholinopyridone; SNP, Sodium nitroprusside; MTT, Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide; DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole

질환(Parkinson's disease)(Good *et al.*, 1998)으로 사망한 환자의 뇌에서 증가되어 있음이 보고된 바 있다. 이러한 증거들은 자유라디칼에 의한 산화성 손상(free radical injury)이 여러 신경계 질환에서 신경세포사의 주요 기전의 하나로 작용하는 것을 시사한다. 이러한 자유라디칼은 단독 또는 다른 분자와 상호작용으로 신경세포사를 초래하여 신경계 질환들이 유발되리라 여겨지는데, 최근에는 세포고사(apoptosis)가 신경계 질환의 신경세포사의 중요기전이라는 증거들이 빠른 속도로 축적되고 있다(Savitz, 1998).

세포고사는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 세포의 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로(Cohen, 1993), 괴사현상(necrosis)과는 다른 형태적 및 생화학적 특성을 동반하는 유전자 활성화에 의한 생리과정이다. 일반적으로 세포가 심각한 상해를 입었을 경우에 나타나는 괴사는 세포막의 파괴, 팽창(swelling), 용해(lysis)를 동반하는 것과는 달리, 세포고사 현상은 빠른 탈수에 의한 수축, 세포막의 기포화 현상(blebbing), 세포질내의 칼슘 농도의 증가, chromatin의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절(ladder pattern DNA fragmentation) 형성, transglutaminase의 활성화, 세포의 분절소체(apoptotic body)의 형성을 동반한다(Cohen, 1993; Robaye, 1991). 이러한 세포고사 현상은 허혈성 뇌졸중(brain ischemia), 간질(seizure), 알츠하이머병 등에서 일어남이 보고되는 등(Shigeno 등, 1990; Dichter, 1988; Goedert 등, 1991) 신경세포 사멸의 주요기전으로 여겨지고 있다. 따라서 본 연구에서는 사람 신경세포종인 SH-SY5Y에 질소자유기인 NO와 peroxynitrite가 미치는 세포독성과 그 기전을 연구하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

배양 RPMI1640, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), penicillin G, streptomycin 등의 항생제 및 trypsin등의 세포배양에 필요한 재료는 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며 배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포핵 염색에 이용한 slide chamber는 Nunc사(Germany)로부터 구입하여 사용하였다. MTT (methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide), 환원형 글루타치온(GSH), N-acetylcysteine(NAC) 등은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하고 4', 6'-diamidino-2-phenylindole(DAPI) dihydrochloride는 Sigma Biosciences (St. Louis, Missouri, USA)에서, 3-morpholinosydnonimine

(SIN-1)은 Biomol(Hambrug, Germany)사에서 구입하였다. DEVD-AMC는 Calbiochem사(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 세포의 배양

사람 신경세포종인 SH-SY5Y는 American Type Culture Collection(ATCC)으로 구입하여 약 48시간 주기로 10% FBS/RPMI1640 배양액을 교체하여 주며 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 세포는 20시간 배양기 바닥에 부착시킨 후 실험에 필요한 자극을 가하여 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

3. 세포 활성도 측정

세포의 사멸정도는 MTT assay 방법을 이용하여 측정하였다. 먼저, 여러 실험조건에서 활성도가 저하되어 세포배양용기로부터 부착력이 떨어진 부유 세포를 흡입기에 의해 제거한 후 배양액에 용해한 MTT(0.5 mg/ml)를 각 well에 넣고 다시 3시간 배양기에서 반응시킨다. 생존 세포에 의해 형성된 formazan 결정은 200 μ l의 dimethylsulfoxide(DMSO)로 용해시킨 후 분광광도계(spectrophotometer, model ETY-96, Toyo Instruments, Inc., Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 값은 정상 세포의 활성도와 비교하여 백분율(%)로 표시하였다. 황산화제 실험의 경우 황산화제자체가 MTT와의 직접적인 반응으로 세포생존을 측정에 오차가 유발되어 crystal violet 염색법으로 생존율을 결정하였다. 실험시간 종료 후 배양액을 버리고 30% ethanol, 3% formaldehyde에 녹여진 0.2% crystal violet 용액으로 고정, 염색을 5분 시행한 후 건조시켜 1% SDS 용액으로 세포에 염색된 crystal violet을 녹여내어 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 얻은 값은 평균을 내어 대조군에 비교한 백분율(%)로 나타내었다.

4. 세포의 핵 염색 및 관찰

SIN-1으로 자극한 세포는 3.7% formaldehyde 용액으로 고정시키고 phosphate buffered saline(PBS)로 세척, 10 μ M DAPI로 10분 염색하고, 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(fluorescence microscope, Leica, Germany)하에서 100배의 배율로 촬영하였다.

5. Caspase 3-like protease 활성도 측정

신경세포(2×10^6 cells)를 파쇄완충용액(1% TritonX-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl

fluoride(PMSF), 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol(DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)으로 4°C, 15분 파쇄하고 14,000 rpm으로 15분 원심분리시켰다. 상청액은 bicinchoninic acid(BCA)법으로 정량하여 분석용 완충용액(100 mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM DTT)에 희석한 형광기질 50 µM DEVD-AMC와 37°C에서 30분간 반응시켜 이들의 proteolytic cleavage를 형광분광계(fluorometer; Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하여 caspase 3-like protease 활성을 조사하였다.

6. 글루타치온의 측정

세포내의 글루타치온 양의 측정은 Tietze(1969)의 방법에 따랐다. 먼저 사람 신경세포에 SIN-1을 가한 20시간 후 세포를 차가운 PBS로 세척하고 10% trichloroacetic acid(TCA)를 400 µl 분주하여 10분 진탕하여 산에 의해 용출된 분획만을 모아서 21,000×g, 4°C에서 10분 원심분리하여 모아진 상청액을 다시 중성의 pH로 맞추고 이중 50 µl용액에 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 5 mM EDTA에 녹여진 250 µl의 5,5'-dithionitrobenzoic acid(0.96 mg/ml), 250 µl의 NADPH (0.59 mg/ml)과 450 µl의 glutathione reductase(5 U/ml)를 혼합하여 실온에서 20분 반응시키고 412 nm에서 분광광도계(Toyo Instruments, Inc., Japan)로 흡광도를 측정하였다.

7. 결과산출방법

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하여 표시하였다. 세포독성을 보이는 값의 비교에 있어서는 Student's t-test를 사용하였으며 P<0.01, 혹은 P<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. NO 및 Peroxynitrite가 사람 신경세포주 SH-SY5Y에 미치는 독성효과와 세포고사현상

본 실험에서는 먼저 신경계 손상의 주요인자인 산화적 자유기에 의한 손상이 세포의 생존율에 미치는 정도를 알고자 배양액에 첨가되는 우태아혈청을 제거한 상태에서 NO와 superoxide를 동시에 방출하여 peroxynitrite를 생성시키는 SIN-1과 NO의 공여제인 SNP를 농도별로 처리하여 세포의 생존율을 MTT assay 방법으로 측정하였다. 배양액에 1 mM의 SIN-1을 처리한 6시간 이후부터 SH-SY5Y 세포는 극심한 손상을 입어 세포고사 현상의 특징

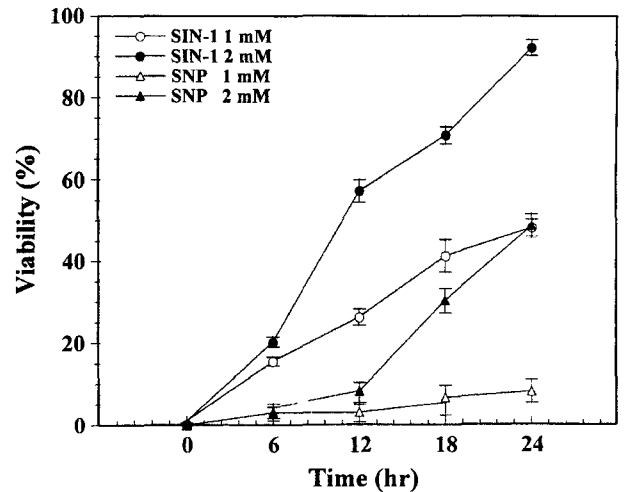


Fig. 1. Peroxynitrite and nitric oxide showed cytotoxic effects in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Cells seeded in culture plates with 10% FBS/RPMI for 20 hr and washed out with serum-free RPMI, treated with SIN-1 (1, 2 mM) and SNP (1, 2 mM) in serum-free RPMI for various periods. Cultured supernatants was discarded and MTT was added to the cells with fresh medium, and incubated for 3 hr at 37°C. The purple formazan formed in cells was resolved by DMSO and the absorbance was measured at 540 nm by spectrophotometer. Results were expressed as means (%) ±S.D. of three different experiments. *, p<0.05 compared to control values.

인 세포수축을 동반하면서 시간과 농도 의존적으로 바닥으로부터 떨어져 나가는 현상을 보였으며 세포손상을 또한 SIN-1은 6시간, SNP는 12시간 이후부터 감소하기 시작하였다. 신경세포주 SH-SY5Y는 1 mM SIN-1 처리 24시간 이후에 47%의 세포손상을 보였으며 2 mM을 처리 시 91.1%의 손상을 보였다(Fig. 1). SNP는 고농도인 2 mM에서 47.4%의 세포고사율을 나타냈다. 그러나 SNP는 NO 생성뿐만 아니라 cyanide의 생성을 수반하기 때문에 독성을 보일 수 있으므로 구조유사체인 potassium ferricyanide(PFN)를 같은 농도로 처리하여 대조 실험을 하였을 때 SNP의 독성과는 다르게 PFN에 의해서는 독성을 보이지 않았다. 이러한 결과로부터 질소자유기에 의한 신경세포의 독성효과를 확인할 수 있었으며 peroxynitrite가 더욱 심한 세포독성이 있음을 알 수 있었다. 세포활성도의 변화와 함께 peroxynitrite에 의한 세포의 죽음 기전이 세포고사(apoptosis) 혹은 괴사(necrosis) 과정에 의하여 이루어졌는지를 확인하고자 형광염색물질인 DAPI로 세포핵을 염색시 정상세포의 핵은 타원형이고 균질한 크기로 염색되었으나(Fig. 2A) SIN-1에 의하여 손상을 입은 세포는 핵의 응축현상과 분절현상을 보였다(Fig. 2B). 세포고사 현상은 1 mM SIN-1과 2 mM SNP를 20시간 처리 후 SH-SY5Y 세포의 genomic DNA를 분리하여 1.5% agarose gel에서 전기영동시 마찬가지로 Fig. 2C에서 보이는 것처럼 genomic DNA는 세포고사의 전형적인 특징인 사다리 모양 분절현

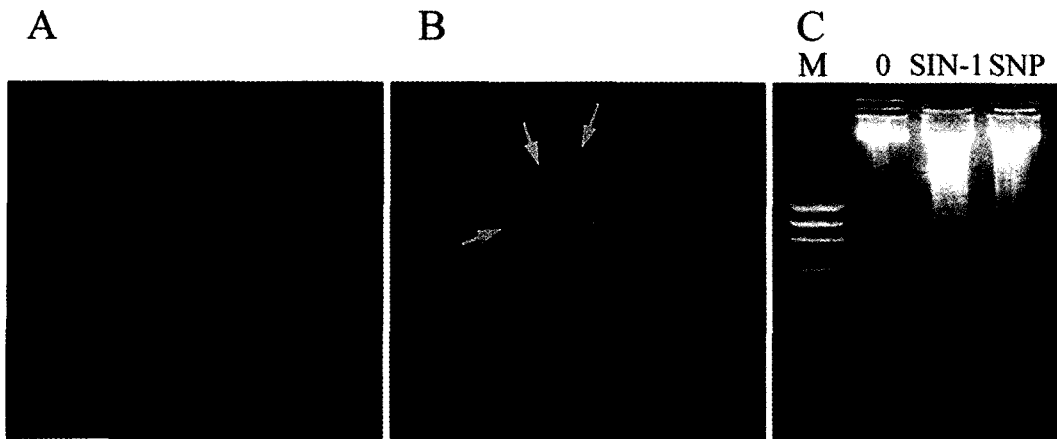


Fig. 2. SIN-1 and SNP induced nuclear condensation and DNA fragmentation of SH-SY5Y cells. Control cells (A) were treated with 1 mM of SIN-1 for 20 hr (B), washed, fixed with 3.7% paraformaldehyde for 10 min and washed, stained with DAPI. Morphological features of the nucleus were observed by inverted phase-contrast fluorescence microscopy (×100). Arrows indicate fragmented cells. (C) Cells were treated with SIN-1 (1 mM) and SNP (2 mM) for 20 hr. Genomic DNA was extracted by Wizard kit.

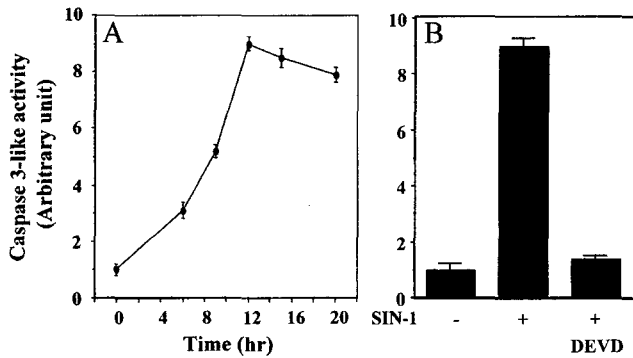


Fig. 3. Caspase 3-like protease was involved in the apoptosis by SIN-1. Cells were treated with 1 mM SIN-1 for indicated periods (A). Whole cell lysates were used to measure the activity of caspase 3-like protease by using 50 μM fluorogenic peptide DEVD-AMC. (B) Specific activation of caspase 3-like protease was confirmed by pre-incubation with 100 μM Ac-DEVD-CHO. Results were represented as means (%) ±S.D. of three different experiments.

상이 현저하게 나타났다(Fig. 2C). Peroxynitrite에 의한 신경세포의 세포고사 현상은 세포고사에서 중추적인 역할을 하며 aspartic acid를 인식하여 절단하는 효소 cysteine proteases 중에서 대표적인 caspase 3-like cysteine protease의 활성도에서도 나타나는데 효소적 활성은 1 mM SIN-1에 의하여 산화적 손상이 가해진 9시간 이후에 최고치인 9배의 활성도를 보였다(Fig. 3). 이 때 caspase 3-like cysteine protease의 생리활성 억제제인 DEVD-CHO에 의하여 1.4 배 수준으로 활성이 줄어들었으므로 caspase 3-like protease의 활성정도가 특정적임을 확인하였다(Fig. 3B).

2. 신경세포에 가해진 산화적 손상과 항산화제의 역할

신경세포의 산화적 손상이나 뇌허혈시 입을 수 있는 손

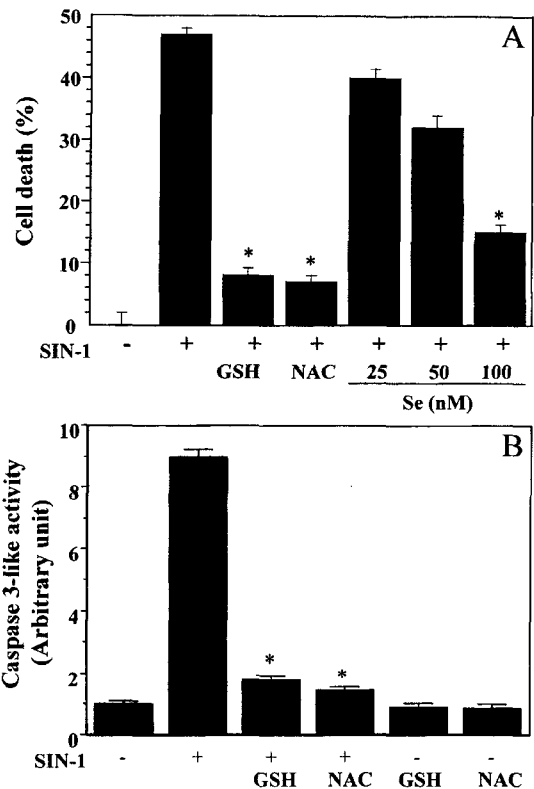


Fig. 4. Antioxidants protected the cells from SIN-1-induced death and reduced the activation of caspase 3-like protease. Cells were preincubated with 5 mM GSH, 5 mM NAC, and 25, 50, 100 nM Se followed by the addition of 1 mM SIN-1. (A) The cytotoxicity of cells was measured by crystal violet staining. (B) The activation of caspase 3-like protease was measured by methods as described in Fig. 3. Results were represented as means (%) ±S.D. of three different experiments. *, p<0.05 compared to SIN-1 alone.

상을 줄이기 위한 신경세포 내부에서의 항산화제의 역할은 대단히 중요하다. 따라서 신경세포에 가해진 산화적 손

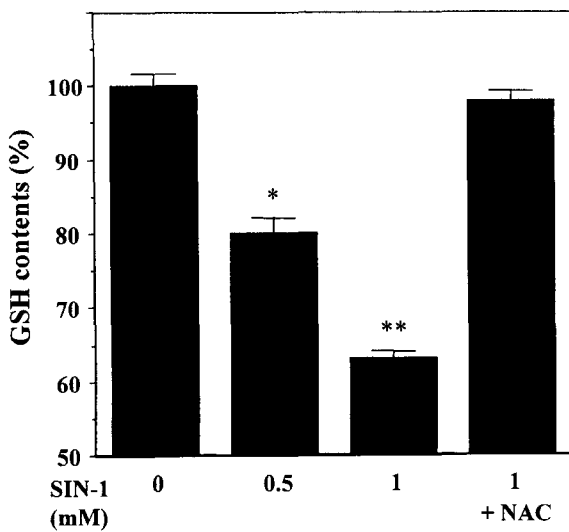


Fig. 5. SIN-1 reduced the intracellular contents of glutathione. Cells were treated with 1, 2 mM SIN-1 for 20 hr in the absence or presence of 5 mM NAC. The amount of intracellular glutathione was measured as described in Materials and Methods. Results were represented as means (%) \pm S.D. of three different experiments. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ compared to control values.

상에서의 역할을 알기 위하여 외부에서 GSH와 글루타치온의 생합성의 전구체인 NAC를 전처리한 후 SIN-1을 처리하여 세포독성 정도를 조사하였다(Fig. 4). 5 mM의 GSH를 전처리시 SIN-1에 의한 세포독성이 방지되어 8% 수준으로 세포손상이 줄었으며 5 mM의 NAC도 GSH와 동일하게 SIN-1으로부터 SH-SY5Y를 보호하여 세포고사를 7% 수준으로 감소시켰다(Fig. 4A). GSH와 NAC는 고농도로 존재하다가 흡수되거나 일부 세포 외에 존재하여 peroxynitrite와의 반응할 가능성이 있으므로 glutathione peroxidase(GPx)의 selenocysteine기와 반응하여 효소의 활성을 촉매시켜 GSH 생성을 증가시키며 세포내 항산화 기능을 증강시키는 것으로 알려진 다른 항산화제인 셀레늄(Se)을 처리하여 활성도를 조사하였던 바 Se의 농도의존적으로 세포고사를 감소시켰으며 100 nM에서 15% 수준을 보였다(Fig. 4A). 이때 GSH, NAC 그리고 여러 농도의 Se는 자체로서 독성을 가지지 않았다. 항산화제에 의한 peroxynitrite의 세포고사 보호 효과는 caspase 3-like protease의 활성도 또한 억제하였다(Fig. 4B). 또한 세포 내부에서 만들어지는 항산화제인 글루타치온의 양을 직접 측정시 1 mM SIN-1은 대조군의 글루타치온 생성을 63% 수준으로 감소시켰다(Fig. 5). 이러한 결과는 뇌에서 발생하는 산소 및 질소자유라디칼들이 세포내부의 항산화 기능을 저하시켜서 신경세포 손상을 촉진시킬수 있는 가능성을 제시하고 있다.

IV. 고 찰

신경계에서 발생하는 여러 활성자유기는 세포에 강한 세포독성을 보이게 되는데 이중 신경세포에 대한 산화적 손상은 세포사멸을 유도함으로써 신경계 손상에 대표적인 원인으로 밝혀지고 있다. 본 연구에서는 NO와 superoxide가 반응하여 일시적으로 생성되는 peroxynitrite의 독성효과를 연구하고자 하였다. 사람 신경세포종인 SH-SY5Y에 peroxynitrite를 발생시키는 화학 공여제인 SIN-1을 처리시 신경세포에서 전형적인 고사현상이 관찰되었다. 3-Morpholinodisnominine(SIN-1)은 NO와 O_2 를 동시에 방출함으로써 ONOO를 발생시키고(Hogg 등, 1992) 많은 연구 논문에서 일반적인 ONOO 공여제(Amin과 Pearce, 1997; Oh-hashi 등, 1999; Ju 등, 2000)로 사용되고 있다. 이전의 연구결과에 의하면(Jang 등, 2000) 별아교세포에서의 SIN-1에 의한 세포독성은 superoxide dismutase(SOD)와 catalase를 처리시 55%에서 85%로 회복되는 것을 알 수 있었다. 이는 O_2 가 제거된 상태에서는 ONOO를 형성할 수 없음을 나타낸다. 따라서 SIN-1에 의한 세포독성은 peroxynitrite에 의한 것으로 간주할 수 있으므로 peroxynitrite 공여제로서 SIN-1을 선택하였다. SIN-1에 의한 신경세포의 산화적 손상은 핵막의 수축과 기포화 현상을 수반하면서 DNA 분절현상을 초래하였다(Fig. 2). 신경세포는 다양한 자극에 의하여 세포고사를 일으키는데, 특히 산화적 손상은 가장 주요한 원인의 하나이다. NO와 그 대사산물은 백서의 부신피질 암세포(pheochromocytoma)인 PC12(Spear 등, 1997)와 신경세포주 SH-SY5Y(Maruyama, 1998)를 세포고사에 빠지게 한다고 보고되어졌다. 본 연구에서 peroxynitrite에 의한 산화적 손상시 세포고사에 빠지면서 caspase 3-like protease 효소활성이 증가함을 관찰할 수 있었다. 이 세포고사는 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에 밀접하게 작용함이 밝혀지고 있다(Raff 등, 1993; Cohen, 1993). 한편, caspase family는 염증반응이나 포유동물의 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로 세포내에 불활성화 형태로 존재하다가 세포고사 유도 자극시 활성화되어, 세포고사의 특징적인 현상을 초래하게 된다(Schulze-Osthoff, 1998). 이러한 caspase는 aspartic acid를 인식하여 표적 단백질을 절단시키는 cysteine protease으로써 일단 caspase 3-like protease가 활성화되면 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), lamin, MEKK, 및 다른 caspases 등 여러 표적 단백질에 작용해서 기능적 활성화나 불활성화를 유도하여 세포내의 여러 신호전달활성을 조절하게 된다(Widmann 등, 1998). 최근 보고에 의하면 death suppressor 단백질 중의 하나인 Bcl-2 단백질 역시 caspase-3에 의해 cleavage 됨이 보고되고 있다(Cheng 등, 1997). Bcl-2의 절단은 세포내 방어 시스템을 무너뜨림으로써 세포죽음을 가속화시킬 가능성을 보여준다.

Peroxynitrite에 의한 caspase 3-like protease의 활성은

항산화제인 GSH와 NAC에 의하여 완전히 억제되었으며 이 결과로 인하여 세포독성도 완전히 차단되었다. 위 결과와 유관하게 peroxynitrite는 직접 세포내부에서 만들어지는 항산화제 GSH의 양을 63%까지 감소시켰다. Glutathione peroxidase(GPx)를 활성화시키는 다른 항산화제인 셀레늄(Se)을 처리하여 활성도를 조사하였던 바 Se 또한 농도의존적으로 세포고사를 감소시켰다. Selenium(Se)은 oxidative damage로부터 막지질과 거대분자들을 보호하고 다양한 peroxides를 제거하는 효소인 glutathione peroxidase(GPx)의 active center에 존재하게 된다(Rotruck 등, 1973). GPx와 일부 Se 함유성분들은 ONOO에 의해 매개되는 산화(oxidation)와 질화(nitration)에 대해 보호 효과를 보인다(Sies 등, 1998). Se은 다양한 oxidative damage와 연관된 신경퇴행성 질병(neurological degenerative disease)에 있어서 효과적인 임상적 치료 결과를 보인다고 발표된 바 있다(Watanabe와 Suzuki, 1986). Ebselen, selenomethione 그리고 selenocysteine같은 다양한 selenoprotein들은 ONOO에 의해 매개되는 산화(oxidation)와 질화(nitrations) 모델에서 peroxynitrite reductases로서 명명되어지기도 했다(Sies 등, 1998).

활성산소에 의한 신경세포에서의 글루타치온의 감소는 파킨슨씨병과 치매 같은 질병의 원인이 될 수 있으며 노화를 촉진시키는 원인이 된다고 알려져 있다(Bains and Shaw, 1997). Peroxynitrite에 의한 SH-SY5Y의 세포고사에서 글루타치온의 역할은 아마도 간접적일 수도 있다. 글루타치온은 세포내의 redox 상태를 조절하는 주요인자 중의 하나이고 thioredoxin을 비롯한 몇몇 단백질이 유전자 발현의 조절을 통하여 부분적으로 활동하게 된다(Chae 등, 1994; Holmgren, 1989). 글루타치온은 아미노산 고갈이나 글루타치온 고갈시 Jun/Fos heterodimeric complex(AP-1)과 nuclear factor kB(NFkB)(Anderson, 1994; Mihm, 1995; Schenk, 1994) 같은 전사인자의 발현을 조절하는 것으로 설명되어지고 있다. 따라서, peroxynitrite에 의한 글루타치온의 감소는 이러한 세포내 전사인자를 발현을 감소시킴으로서 세포고사를 조절할 가능성 또한 제시되어질 수 있다. 또한, Oh-hashii 등 (1999)은 peroxynitrite는 도파민성 신경세포 SH-SY5Y의 caspase 3-like protease의 활성화는 mitogen activated protein kinase (MAPK)으로 연결되어짐을 보고하였다. Peroxynitrite에 의하여 활성화된 caspase 3-like protease는 p38 MAPK를 활성화시키고 이와 연계되어 extracellular signal-regulated kinase(ERK)의 활성화시키면서 세포죽음을 유발할 가능성을 제시하였다.

중추신경계 세포들은 대사성 손상을 비롯한 여러 종류의 물리·화학적 손상에 아주 민감하다는 것이 잘 알려져 있다. 많은 신경계 질환의 증상 발현에는 중추신경세포의 사멸이 그 궁극적 원인을 제공하고 있다. 예를 들어 뇌졸중의 경우 주요 증상인 운동, 감각, 인지 기능의 소실 등

이 신경세포의 사멸에 기인한다. 또한 노인성 치매의 경우에도 기억, 인지 등에 관여하는 대뇌피질, 해마 등에서 신경세포들이 소실됨으로써 기억상실 증상들이 나타나는 것으로 여겨지고 있다. 파킨슨씨병의 경우도 운동기능 장애가 중뇌 흑질(substantia nigra)의 도파민성 신경세포들이 선택적으로 퇴행, 사멸함으로써 운동기능조절에 관여하는 기저핵의 기능이상이 초래되어 유발된다고 알려져 있다. 불행히도 이러한 중추신경세포들은 현재까지는 한 번 사멸이 되면 재생이 불가능하기 때문에, 신경세포사의 분자적 기전을 이해하는 것은 퇴행성 신경계 질환을 이해하고 치료를 하는 기본적인 바탕이 되리라 본다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부에서 지원하는 암정복 추진 연구과제에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Amin, N. and Pearce, B. (1997): Peroxynitrite-induced toxicity in cultured astrocytes, *Brain Res.*, **773**, 227-30.
- Anderson, M.E., Levy, E.J. and Meister, A. (1994): Preparation and use of glutathione monoesters, *Methods Enzymol.*, **234**, 492-499.
- Bains, J.S and Shaw, C.A. (1997): Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death, *Brain Res. Rev.*, **25**, 335-358.
- Chae, H.Z., Chung, S.J. and Rhee, S.G. (1994): Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast, *J. Biol. Chem.*, **269**, 27670-27678.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K. and Hardwick, J.M. (1997): Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases, *Science*, **278**, 1966-1968.
- Cohen, J.J. (1993): Apoptosis, *Immunol. Today*, **14**, 126-130.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1991): Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6368-6371.
- Goedert, M., Sisodia, S.S. and Price, D.L. (1991): Neurofibrillary tangles and beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **1**, 441-447.
- Good, P.F., Hsu, A., Werner, P., Perl, D.P. and Olanow, C.W. (1998): Protein nitration in Parkinson's disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **57**, 338-342.
- Gunasekar, P.G., Kanthasamy, A.G., Borowitz, J.L. and Isom, G.E. (1995): NMDA receptor activation pro-

- duces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death, *J. Neurochem.*, **65**, 2016-2021.
- Hogg, N., Darley-Usmar, V.M., Wilson, M.T. and Moncada, S. (1992): Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide, *Biochem. J.*, **281**, 419-24.
- Holmgren, A. (1989): Thioredoxin and glutaredoxin systems, *J. Biol. Chem.*, **264**, 13963-13966.
- Jaffrey, S.R. and Snyder, S.H. (1995): Nitric oxide: a neural messenger, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **11**, 417-440.
- Jang, H., Kim, M.S., Park, H.Y., Kim, Y.S., Cho, K.H., Chung, H.T. and Park, R.K. (2000): Cytotoxic Effects of Free Radical on Rat Primary Astrocytes, *J. Toxicol. Pub. Health.*, **16**, 1-8
- Ju, C., Yoon, K.N., Oh, Y.K., Kim, H.C., Shin, C.Y., Ryu, J.R., Ko, K.H. and Kim, W.K. (2000): Synergistic depletion of astrocytic glutathione by glucose deprivation and peroxynitrite: correlation with mitochondrial dysfunction and subsequent cell death, *J. Neurochem.*, **74**, 1989-1998.
- Maruyama, W., Takahashi, T. and Naoi, M. (1998): (-)-Deprenyl protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells from apoptosis induced by peroxynitrite and nitric oxide, *J. Neurochem.*, **70**, 2510-2515.
- Mihm, S., Galter, D. and Droge, W. (1995): Modulation of transcription factor NF kappa B activity by intracellular glutathione levels and by variations of the extracellular cysteine supply, *FASEB J.*, **9**, 246-252.
- Oh-hashii, K., Maruyama, W., Yi, H., Takahashi, T., Naoi, M. and Isobe, K. (1999): Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 504-509.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. and Freeman, B.A. (1991): Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 481-487.
- Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M.D. (1993): Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system, *Science*, **262**, 695-700.
- Robaye, B., Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J.E. and Galand, P. (1991): Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells *in vitro*, *Am. J. Pathol.*, **138**, 447-453.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G. (1973): Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, **179**, 588-90.
- Samdani, A.F., Dawson, T.M. and Dawson, V.L. (1997): Nitric oxide synthase in models of focal ischemia, *Stroke*, **28**, 1283-1288.
- Savitz, S.I. and Rosenbaum, D.M. (1998): Apoptosis in neurological disease, *Neurosurgery*, **42**, 555-572; discussion 573-554.
- Schenk, H., Klein, M., Erdbrugger, W., Droge, W. and Schulze-Osthoff, K. (1994): Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1672-1676.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M.E. (1998): Apoptosis signaling by death receptors, *Eur. J. Biochem.*, **254**, 439-459.
- Shigeno, T., Yamasaki, Y., Kato, G., Kusaka, K., Mima, T., Takakura, K., Graham, D.I. and Furukawa, S. (1990): Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis, *Neurosci. Lett.*, **120**, 117-119.
- Sies, H., Klotz, L.O., Sharov, V.S., Assmann, A. and Briviba, K. (1998): Protection against peroxynitrite by selenoproteins, *Z. Naturforsch. [C]*, **53**, 228-32.
- Smith, M.A., Richey Harris, P.L., Sayre, L.M., Beckman, J.S. and Perry, G. (1997): Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease, *J. Neurosci.*, **17**, 2653-2657.
- Spear, N., Estevez, A.G., Barbeito, L., Beckman, J.S. and Johnson, G.V. (1997): Nerve growth factor protects PC12 cells against peroxynitrite-induced apoptosis via a mechanism dependent on phosphatidylinositol 3-kinase, *J. Neurochem.*, **69**, 53-59.
- Tietze, F. (1969): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues, *Anal. Biochem.*, **27**, 502-522.
- Wahl, F., Obrenovitch, T.P., Hardy, A.M., Plotkine, M., Boulu, R. and Symon, L. (1994): Extracellular glutamate during focal cerebral ischaemia in rats: time course and calcium dependency, *J. Neurochem.*, **63**, 1003-1011.
- Watanabe, C. and Suzuki, T. (1986): Sodium selenite-induced hypothermia in mice: indirect evidence for a neural effect, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **86**, 372-9.
- Widmann, C., Gibson, S. and Johnson, G.L. (1998): Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals, *J. Biol. Chem.*, **273**, 7141-7147.