

C6 세포에서 phospholipase A₂ 활성화에 대한 ATP의 작용

심상수* · 김명준 · 윤신희 · 김창종* · 조양혁#

*중앙대학교 약학대학 병태생리학교실, 가톨릭대학교 의과대학 생리학교실
(Received May 14, 2001; Revised May 25, 2001)

The Action of ATP on Phospholipase A₂ Activation in C6 Cells

Sang Soo Sim*, Myung June Kim, Shin Hee Yoon,
Chang Jong Kim* and Yang Hyeok Jo#

*Division of Pathophysiology, College of Pharmacy, Chung Ang University and
Department of Physiology, College of Medicine, The Catholic University of Korea

Abstract — To investigate action of ATP on ischemia-induced brain injury, we measured phospholipase A₂ activity and nitric oxide (NO) production in C6 cells. ATP alone did not have any influence on phospholipase A₂ activity but increased NO production. Glutamate (1 mM) significantly increased phospholipase A₂ activity, whereas did not increased NO production. ATP significantly inhibited phospholipase A₂ activation induced by 0.1 μM A23187, 1 mM glutamate and 1 mM H₂O₂, but did not inhibited 1 μM PMA-induced phospholipase A₂ activation. From the above results, it is suggested that the action of ATP in C6 cells has dual actions, such as the inhibition of agonist-induced phospholipase A₂ activation and the increase of NO production.

Keywords □ C6 cells, ATP, phospholipase A₂, nitric oxide

뇌허혈은 세포막에 존재하는 인지질의 이화작용을 일으키는 phospholipase A₂의 활성을 증가시키며,¹⁾ phospholipase A₂ 활성화에 의해 생성되는 arachidonic acid는 여러 가지 eicosanoids를 만들어 염증 반응을 가속화시킨다.²⁾ 또한 세포막에 필수불가결한 glycerophospholipid의 손실로 세포막 투과도의 변화를 일으켜 이온항상성의 파괴를 가져오며 lipid peroxide의 축적을 야기시키기도 한다.³⁾ 한편 뇌조직의 손상은 ATP나 glutamate등 생리활성 물질을 유리시키므로써 염증 반응을 더욱 더 악화시키게 된다. 조직손상시 세포내에 저장된 ATP는 이웃된 여러 가지 세포에 자극제로 작용한다는 설이 제기되고 있다. ATP의 작용은 세포에 따라 매우 다양한데 P_{2x}-purinergic receptor를 통

해 ATP-gated ionic channels을 활성화시키며⁴⁾ P_{2y}-purinoceptor를 통해서는 phospholipase C를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.⁵⁾

비만세포에서 ATP는 농도 의존적으로 histamine과 prostaglandin D₂를 유리시킨다는 보고가 있다.⁶⁾ 이러한 결과는 ATP가 phospholipase A₂를 활성화시킨다는 것을 제시하여 준다. 그러나 P388D1 macrophage 세포에서 lipopolysaccharide에 의한 arachidonic acid 유리가 ATP에 의해 억제된다는 보고도 있다.⁷⁾ 지금까지 ATP의 생리작용은 세포에 따라 다르게 나타나고 있어 단정적으로 ATP의 작용을 설명할 수는 없는 상태이다. 뇌허혈로 인한 뇌조직의 손상이 필연적으로 유리되는 ATP가 phospholipase A₂에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해서 아직 알려진 바가 없는 실정이다. 그러므로 이 실험에서는 glioma 세포의 일종인 C6 세포에서 ATP가 phospholipase A₂ 활성화에 미치는 영향

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-590-1170 (팩스) 02-532-9575

을 관찰하였다.

실험방법

재료 - DMEM, ATP, lipopolysaccharide, calcium ionophore A23187, glutamate, phorbol ester 12-myristate 13-acetate(PMA)는 Sigma Chemical 회사로부터 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco에서, [³H]-arachidonic acid는 NEN에서 nitrite assay kit는 Promega로부터 구입하였으며, 다른 모든 시약은 analytical grade를 사용하였다.

세포배양 - glioma 세포의 일종인 C6 세포를 10% FBS를 함유한 DMEM 배양액(2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, penicillin 100 U/ml 및 streptomycin 10 µg/ml 포함)에서 계대 배양하면서 phospholipase A₂ activity와 nitric oxide 정량에 사용하였다.

phospholipase A₂ 정량 - C6 세포를 10% FBS이 함유한 DMEM에서 충분히 배양한 후에 24 well plate 이용하여 10⁵ cells/well로 분주하였다. FBS이 없는 DMEM에 [³H]arachidonic acid(0.2 µCi/ml/well)를 가하여 24 시간 동안 labeling하였다. labeling이 끝난 후 serum-free DMEM으로 1 ml 씩 2회 washing하여 labeling 되지 않은 [³H]arachidonic acid를 제거하였다.⁸⁾ 다시 serum-free DMEM을 1 ml 가하고 ischemia와 관련된 여러 가지 agonist를 처치한 후 1 시간 배양하였다. 배양이 끝난후 상층액을 취하여 원심분리하고 세포가 없는 상층액 500 µl를 취하여 액체 섬광계수기를 이용하여 radioactivity를 측정하였다.

Nitrite 정량 - C6 세포에서 생성되는 NO의 양을 측정하기 위해서 NO의 최종 산물인 nitrite를 비색 정량하였다. 24 well plate 이용하여 10⁵ cells/well로 분주한후 ischemia와 관련된 여러 가지 agonist를 처치한후 48시간 배양하였다. 배양이 끝난후 배양액 50 µl를 96 well plate에 가하고 동량의 Griess reagent(equal volume mixture of 0.1% naphthylethylenediamine (NEDD) and 1% sulfanilamide in 2% phosphoric acid)를 가한후 상온에서 10분간 반응시키고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 알고 있는 농도의 sodium nitrite를 이용하여 산출하였다.

자료분석 및 통계처리 - 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 표기하였으며 실험 군간의 통계적 유의성은 two-tailed Student's t-test로 하였으며 P 값이 0.05

미만일 때 유의하다고 판단하였다.

실험결과 및 고찰

ATP가 phospholipase A₂ activity에 미치는 영향 - 조직손상시 세포의 파괴는 세포질내에 3~5 mM 농도로 존재하는 ATP가 세포외액으로 방출되며 유리된 ATP는 paracrine으로서 이웃된 세포를 자극하게 된다.⁹⁻¹²⁾ 이러한 관점에서 ATP는 뇌허혈로 인한 조직손상에서 중요한 인자로 작용할 가능성이 있다. ATP를 C6 세포에 여러 농도로 투여한 결과 약간 phospholipase A₂ activity를 증가시키는 경향을 보였으며 1 mM에서 대조군에 비해 phospholipase A₂ activity를 10% 증가시켰다(Fig. 1). 생쥐의 성상세포(astrocytes)에서 ATP는 arachidonic acid의 유리를 일으킨다는 보고와는 일치하지 않지만,¹³⁾ 이 결과로 미루어 볼 때 ATP 자체는 glioma 세포에서 직접적으로 phospholipase A₂ 활성을 증가시키지 않는 것으로 사료된다.

glutamate와 H₂O₂ 및 pH의 영향 - calcium ionophore인 A23187(0.1 µM)은 대조군에 비해 phospholipase A₂ activity를 2.5배 증가시킨 반면 뇌허혈로 인한 조직손상에 관여하는 인자로 예상되는 glutamate (1 mM)와 H₂O₂(1 mM)는 phospholipase A₂ activity를 각각 12.6%, 36.2% 증가시켰다(Fig. 2). 혈관 평활근 세포에서 H₂O₂가 phospholipase A₂를 활성화 시

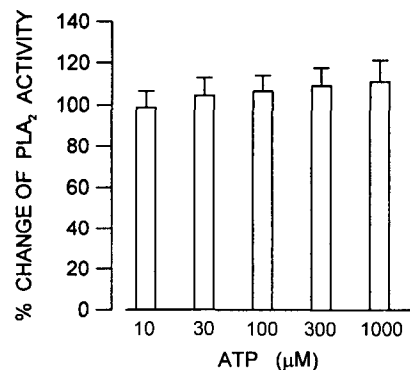


Fig. 1 - Effect of ATP on phospholipase A₂ activity in C6 cells. C6 cells labeled with [³H]arachidonic acid were stimulated with ATP for 1 hr. Radioactivity of [³H]arachidonic acid released into medium was measured by liquid scintillation counter. Results indicate mean ± SD of 4 experiments.

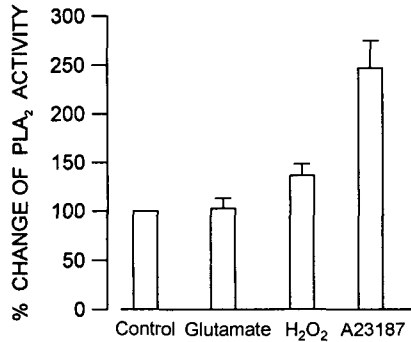


Fig. 2 – Effects of glutamate, H₂O₂ and A23187 on phospholipase A₂ activity in C6 cells. C6 cells labeled with [³H]arachidonic acid were stimulated with glutamate (1 mM), H₂O₂ (1 mM) and A23187 (1 μM) for 1 hr. Results indicate mean ± SD of 4 experiments.

킨다는 것이 보고된바 있다.¹⁴⁾ A23187에 의해 phospholipase A₂ 활성이 증가하는 것은 C6 세포에서 Ca²⁺ 의존성 phospholipase A₂가 활성화 되는 것으로 생각된다. 한편 뇌허혈시 조직내 CO₂의 축적은 조직내 pH를 산성으로 전환시킬 가능성이 있으며 pH의 변화에 따른 phospholipase A₂의 활성에 변화가 있는지를 확인하기 위하여 배양액의 pH를 7.4에서 6.6까지 변화시켰다. 그러나 배양액의 pH를 변화시켜도 phospholipase A₂ activity에 별다른 영향을 주지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과로 미루어 볼 때 ATP와 pH의 변화는 phospholipase A₂ activity 변화와는 연관성이 없는 것으로 사료된다. protein kinase C(PKC) activator인 PMA는 농도 의존적으로 phospholipase

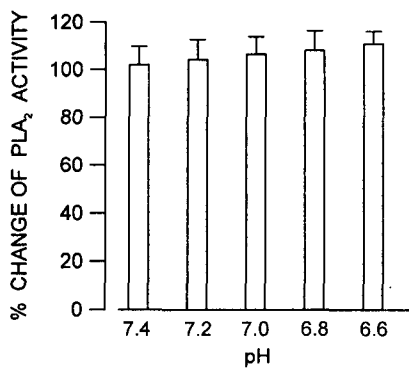


Fig. 3 – Effect of pH on phospholipase A₂ activity in C6 cells. C6 cells labeled with [³H]arachidonic acid were incubated in pH-adjusted medium for 1 hr. Results indicate mean ± SD of 4 experiments.

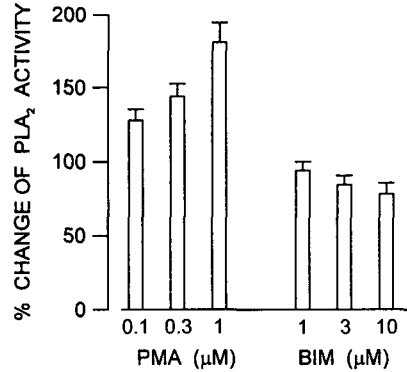


Fig. 4 – Effect of protein kinase C on phospholipase A₂ activity in C6 cells. C6 cells labeled with [³H]arachidonic acid were stimulated with PMA (protein kinase C activator) and bisindolmaleimide (BIM, protein kinase C inhibitor) for 1 hr. Results indicate mean ± SD of 4 experiments.

A₂ activity를 증가시켰으며, protein kinase C 억제제인 bisindolmaleimide는 농도 의존적으로 phospholipase A₂ activity를 억제하였다(Fig. 4). 이러한 결과로 미루어 볼 때 C6 세포에 존재하는 phospholipase A₂는 Ca²⁺과 PKC 의존성 phospholipase A₂인 것으로 사료된다.

여러 작동제에 의한 phospholipase A₂ activity 증가에 대한 ATP의 억제효과 –ATP 자체가 phospholipase A₂ activity를 약간 증가시키는 경향은 보이지만 현저한 증가를 일으키지는 못했다. 그러나 P388D1

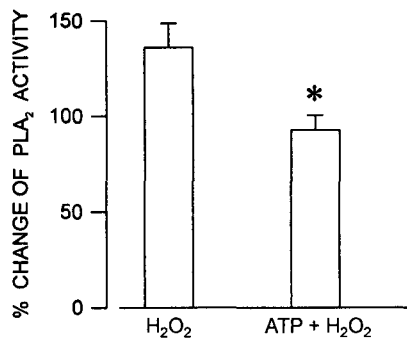


Fig. 5 – Inhibitory effect of ATP on H₂O₂-stimulated phospholipase A₂ activity in C6 cells. C6 cells labeled with [³H]arachidonic acid were stimulated with H₂O₂ (1 mM) in the presence of 100 μM ATP for 1 hr. Results indicate mean ± SD of 4 experiments.

*P<0.05 significantly different from control.

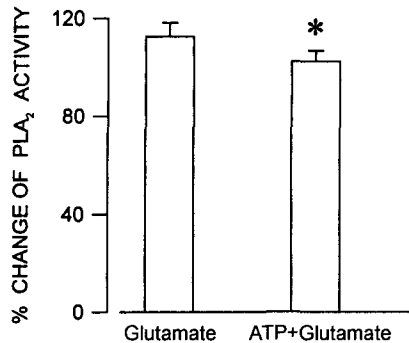


Fig. 6 – Inhibitory effect of ATP on glutamate-stimulated phospholipase A₂ activity in C6 cells. C6 cells labeled with [³H]arachidonic acid were stimulated with glutamate (1 mM) in the presence of 100 μM ATP for 1 hr. Results indicate mean ± SD of 4 experiments.

*P<0.05 significantly different from control.

macrophage 세포에서 ATP는 lipopolysaccharide에 의한 arachidonic acid 유리를 억제한다는 결과로 미루어 볼 때⁷⁾ 다른 작동제에 의한 phospholipase A₂ activity 증가에 있어서 어떠한 modulator로서 작용할 가능성이 있다. 이러한 가능성을 확인하기 위하여 phospholipase A₂ activity를 증가시키는 H₂O₂ 반응에 있어서 ATP를 10분간 전처리한후 H₂O₂를 처리하여 phospholipase A₂ activity의 변화를 관찰하였다. ATP (100 μM)는 1 mM H₂O₂에 의한 phospholipase A₂ activity의 증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 5). 또한

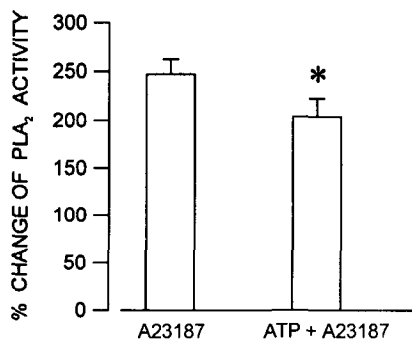


Fig. 7 – Inhibitory effect of ATP on A23187-stimulated phospholipase A₂ activity in C6 cells. C6 cells labeled with [³H]arachidonic acid were stimulated with A23187 (0.1 μM) in the presence of 100 μM ATP for 1 hr. Results indicate mean ± SD of 4 experiments.

*P<0.05 significantly different from control.

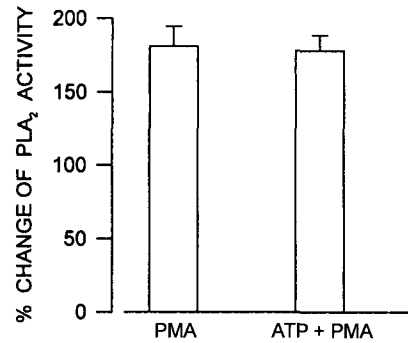


Fig. 8 – Inhibitory effect of ATP on PMA-stimulated phospholipase A₂ activity in C6 cells. C6 cells labeled with [³H]arachidonic acid were stimulated with PMA (1 μM) in the presence of 100 μM ATP for 1 hr. Results indicate mean ± SD of 4 experiments.

1 mM glutamate와 0.1 μM A23187에 의한 phospholipase A₂ activity의 증가도 유의하게 억제하였다 (Figs. 6 & 7). 그러나 1 μM PMA에 의한 phospholipase A₂ activity의 증가에는 이렇다할 영향을 주지 않았다(Fig. 8). 이 결과로 미루어 볼 때 ATP는 phospholipase A₂ activity에 있어서 뇌허혈로 인한 뇌 조직 손상에 있어서 다른 인자에 의한 뇌조직 손상으로 부터 뇌조직을 보호하며, 염증의 진행을 감소시키는 protector로 작용할 가능성이 있음을 제시할 수 있다.

Nitric oxide 생성에 대한 ATP의 영향 – phospholipase A₂ 활성 및 NO 생성을 일으켜 염증을 일으키는

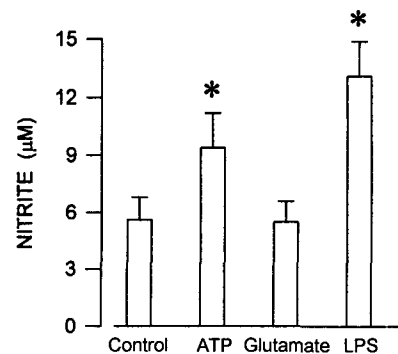


Fig. 9 – Effect of ATP on nitric oxide production in C6 cells. C6 cells were stimulated with ATP (100 μM), glutamate (1 mM) and lipopolysaccharide (0.5 μg/ml) for 48 hr. Nitric oxide released into medium was measured using Griess reagent. Results indicate mean ± SD of 4 experiments. *P<0.05 significantly different from control.

lipopolysaccharide(0.5 µg/ml)는 C6 세포에서 NO 생성을 2.7배 증가시켰다.^{15,16} ATP(100 µM)는 대조군에 비하여 nitric oxide의 생성을 1.7배 유의하게 증가시켰으나, 1 mM glutamate는 NO 생성에 별다른 영향을 주지 않았다(Fig. 9). 뇌허혈로 인한 뇌조직의 손상과 관련된 phospholipase A₂ 활성화와 NO 생성에 있어서 ATP는 phospholipase A₂에는 별다른 영향을 주지 않았지만 NO 생성을 유의하게 증가시켰으며, glutamate는 phospholipase A₂ activity를 증가시켰지만 NO 생성에 있어서 별다른 영향을 미치지 못했다. 뇌허혈로 인한 뇌조직의 손상에서 중요한 인자로 알려진 ATP와 glutamate는 NO 생성과 phospholipase A₂ activity에 작용하는 기전이 다른 것으로 사료되며 앞으로 이들의 작용기전을 명확히 규명하는 것이 필요한 것으로 사료된다.

결 론

뇌허혈로 인한 뇌조직의 손상에서 ATP의 작용을 알아보기 위하여 C6세포를 이용하여 phospholipase A₂ activity와 nitric oxide(NO) 생성을 측정하였다. ATP는 phospholipase A₂ activity를 약간 증가하는 경향은 보였으나 유의한 증가를 일으키지 않았으며, NO 생성은 유의하게 증가시켰다. Glutamate(1 mM)는 phospholipase A₂ activity는 유의하게 증가시켰으나 NO 생성에는 별다른 영향을 주지 않았다. 한편 ATP는 0.1 µM A23187와 1 mM glutamate 및 1 mM H₂O₂에 의한 phospholipase A₂ activation은 유의하게 억제하였다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 ATP는 C6 세포에서 작동제에 의한 phospholipase A₂ activation은 억제하며 NO는 증가시키는 이중 작용(dual action)을 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 1998년도 보건복지부 보건의료기술연구 개발사업(HMP-98-N-2-0022) 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Katsura, K., Rodriguez, E. B., Folbergrova, J.,

- Bazan, N. G. and Siesjo, B. K. : Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis and phospholipase A₂ and C activation during ischemia. *J. neurochem.* **61**, 1677 (1993).
- 2) Walton, M., Sirimanne, E., Williams, C., Gluckman, P. D., Keelan, J., Mitchell, M. D., and Dragunow, M. : Prostaglandin H synthase-2 and cytosolic phospholipase A₂ in the hypoxic-ischemic brain: role in neuronal death or survival? *Brain Res. Mol. Brain Res.* **50**, 165 (1997).
- 3) Farooqui, A. A., Yang, H. C., Rosenberger, T. A., Horrocks, L. A. : Phospholipase A₂ and its role in brain tissue. *J. Neurochem.* **69**, 889 (1997).
- 4) Conigrave, A. D. and Jiang, L. : Ca²⁺-mobilizing receptors for ATP and UTP. *Cell Calcium* **17**(2), 111 (1995).
- 5) North, R. A. and Barnard, E. A. : Nucleotide receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **7**, 346 (1997).
- 6) Jaffar, Z. H. and Pearce, F. L. : Histamine secretion from mast cells stimulated with ATP. *Agents Actions* **30**, 64 (1990).
- 7) Balboa, M. A., Balsinde, J., Johnson, C. A., and Dennis, E. A. : Regulation of arachidonic acid mobilization in lipopolysaccharide-activated P388D(1) macrophages by adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* **274**, 36764 (1999).
- 8) Cane, A., Breton, M., Bereziat, G., and Colard, O. : Phospholipase A₂-dependent and -independent pathways of arachidonate release from vascular smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 327 (1997).
- 9) Rubio, R., Berne, R. M., and Katori, M. : Release of adenosine in reactive hyperemia of the dog heart. *Am. J. Physiol.* **216**, 56 (1969).
- 10) Forrester, T., and Williams, C. A. : Release of adenosine triphosphate from isolated adult heart cells in response to hypoxia. *J. Physiol.* **268**, 371 (1977).
- 11) Williams, C. A., and Forrester, T. : Possible source of adenosine triphosphate released from rat myocytes in response to hypoxia and acidosis. *Cardiovasc. Res.* **17**, 301 (1983).
- 12) Richardson, P. J., and Brown, S. J. : ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J. Neurochem.* **48**, 622 (1987).

- 13) Stella, N., Estelles, A., Siciliano, J., Tence, M., Desagher, S., Piomelli, D., Glowinski, J., and Premont, J.: Interleukin-1 enhances the ATP-evoked release of arachidonic acid from mouse astrocytes. *J. Neurosci.* **17**, 2939 (1997).
- 14) Rao, G. N, Runge, M. S., and Alexander, R. W. : Hydrogen peroxide activation of cytosolic phospholipase A₂ in vascular smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1265**, 67 (1995).
- 15) Patel, R., Attur, M. G., Dave, M. N., Kumar, S., Lee, J. C., Abramson, S. B., and Amin, A. R. : Regulation of nitric oxide and prostaglandin E₂ production by CSAIDS (SB203580) in murine macrophages and bovine chondrocytes stimulated with LPS. *Inflamm. Res.* **48**, 337 (1999).
- 16) Patel, R., Attur, M. G., Dave, M., Abramson, S. B., and Amin, A. R. : Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E₂ production by nitric oxide in activated murine macrophages. *J. Immunol.* **162**, 4191 (1999).