한국전자현미경학회지 제 34 권 제 4 호 2004
Korean J. Electron Microscopy 34(4), 231~239(2004)

치밀이음부 구조단백질인 Occludin에 대한 활성산소종의 영향

이희상, 김대진, 손동섭[1], 정봉수, 최형택, 심규민, 이금정, 조혜진,
김석중, 이종찬, 정윤희, 김성수, 이원복, 김경용*
중앙대학교 의과대학 해부학교실, [1]흉부외과학교실

The Changes of Occludin in Tight Junction of Blood-Brain Barrier by ROS

Heesang Lee, Daejin Kim, Dongsuep Sohn[1], Bongsu Jeong, Hyungtaek Choi,
Kyumin Sim, Keumjeong Lee, Hyejin Cho, Sukjoong Kim, Jongchan Lee,
Yoonhee Jeong, Sungsu Kim, Wonbok Lee and Kyungyong Kim*
Department of Anatomy, Thoracic & [1]Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University,
Seoul 156-756, Korea
(Received October 7, 2004; Accepted November 18, 2004)

ABSTRACT

Cerebral microvessel endothelial cells that form blood brain barrier (BBB) have tight junction for maintaining brain homeostasis. Occludin, one of tight junction protein, is crucial for BBB function. H_2O_2 induced occludin changes and effects in bovine brain BBB endothelial cells were examined in this study. The decrease of transendothelial electrical resistance (TEER) by H_2O_2 was due to disruption of occludin localization. Cytotoxicity test revealed that H_2O_2 did not cause cell death below 1 mM H_2O_2 within 4 hr. H_2O_2 caused intermittent disruption and loss of occludin at tight junctions and occludin disappeared with dose dependent manner from tight junction in confocal laser microscopy. But Western blot revealed that the total amounts of occludin increased by H_2O_2 administration. Transmission electron microscopy revealed that the ultrastructure of tight junction was not changed by H_2O_2. These data suggest that functional disruption of BBB by H_2O_2 was due to the localized loss of occludin in tight junction, but the expression of occludin increased in order to compensate the disrupted function in BBB.

Key words : BBB, Occludin, ROS, Tight junction

서 론

순환계의 어느 부위이던 간에 내피세포는 복잡한 항상성을 변화시키려는 수많은 자극에 노출되어 있다. 즉 내피세포는 ROIs (reactive oxygen intermediates), bacterial toxin, cholesterol, nicotinine 등의 화학물질에 의해 혈관의 생리적 기능에 중요한 변화를 일으킨다 (Pohlman & Harlan, 2000). 신체의 순환계로부터 중추신경계를 분리시키는 혈액뇌장벽(blood-brain barrier,

이 논문은 2004학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.
* Correspondance should be addressed to Dr. Kyungyong Kim, Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea. Ph. 02-820-5643, FAX: 02-815-4814, E-mail: skull@cau.ac.kr

BBB)은 이온농도와 물의 투과성, 아미노산과 당의 이동을 조절하고, 순환하는 항체와 면역세포에 대한 노출을 억제해, 뇌의 독특한 미세환경을 유지한다(Anyonetti et al., 1999). 장벽의 기능은 세포를 통하는 특이한 수송체계, 음세포작용의 희소, 그리고 내피세포의 사이를 봉합하는 치밀이음부(tight junction, TJ)에 의해 이루어진다(Bradbury, 1993).

혈액에서 뇌실질로 들어가는 물질이 이동하는 경로는 크게 transcellular route와 paracellular route로 나뉜다(Huber et al., 2001). 세포배양 등을 통한 뇌혈관장벽에 대한 연구는 이 두 통로를 통한 물질이동을 조절하는 기전을 밝히는데 중점을 두고 있다(Gumbleton & Audus, 2001). 이와 동시에 내피세포의 발달에 필수적인 아교세포의 영향(Gaillard et al., 2001; Prat et al., 2001)과 Multidrug resistence (Ghersi-Egea & Strazielle, 2001; Loscher & Potschka, 2002)에 대해서도 연구가 활발하다. 더욱이 현재에는 사람의 뇌에서 모세혈관 내피세포를 대상으로 연구가 진행되고 있다(Kallmann et al., 2002).

BBB의 가장 중요한 기능 중의 하나는 뇌에 산소를 공급하는 것으로, 내피세포 속에는 산소와 반응하여 독성산소대사물을 계속적으로 생산하는 요소들이 있다. 다행히도 내피세포는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 등의 항산화효소를 가지고 있어(Tayarani et al., 1987), 정상적인 환경에서 BBB는 견고하게 보호를 받으며, 이는 뇌의 정상적인 기능에 매우 중요하다.

뇌의 항상성과 낮은 물질투과도를 유지하는 치밀이음부는 여러 단백질과 복합체를 형성하여 세포골격인 actin에 연결된다(Mark & Davis, 2002). 표피의 것과는 달리 내피세포의 치밀이음부는 다양한 요인에 매우 민감하다(Kniesel & Wolburg, 2000). 치밀이음부의 기능은 G-protein, serine, threonine, 그리고 tyrosine kinase, calcium level, cAMP level, protease 그리고 TNF alpha 등이 관여하는 신호전달체계가 BBB를 특징짓는 세포골격을 조절한다(Kniesel & Wolburg, 2000).

위에서 제시된 여러 연구결과를 바탕으로 볼 때, BBB에서 내피세포의 역할은 매우 중요하며, 특히 치밀이음부가 중추적인 역할을 하는 것이 분명하다. 이 실험에서는 소의 뇌에서 배양된 BBB 내피세포에서 ROS의 일종인 H_2O_2에 의해 일어나는 기능 및 occludin 단백질의 변화를 관찰하였다

재료 및 방법

1. 시 약

배양액은 DMEM/F-12에 10% horse serum과 penicillin, streptomycin, heparin을 첨가하여 만들었다. Dispase와 collagenase/dispase 등의 시약들은 Sigma와 Loche 에서 구입하였다. 이중구조배양관(0.4 μm 구멍, 12-well Transwell®)은 Corning costar corporation (USA)의 것을 사용하였다.

2. 소의 뇌 미세혈관 내피세포의 분리와 배양

도살장에서 갓 도살한 신선한 소의 뇌를 구입하여 ice-cold MEM (pH 7.4)에 넣어 실험실로 운반하여 뇌수막과 뇌표면의 미세한 혈관들을 제거한 후, 대뇌겉질만을 실험재료로 삼았다. 무균장치내에서 뇌겉질을 1~2 mm^3의 크기로 세절한 후, 뇌 겉질에 dispase 와 collagenase/dispase 로 5시간 배양하고, 50% percoll을 이용하여 최종적으로 BBB를 구성하는 미세혈관 내피세포(bovine brain microvessel endothelial cells, BBMECs)를 분리하였다. 실험목적에 따라 cover glass, 12 well plate 또는 Transwell (Corning)에 내피세포를 배양하였다. 배양액은 3일째 바꾸어 주고, 이후로는 이틀마다 바꿔주었다. 실험일에 H_2O_2 10 μM, 100 μM, 1 mM, 5 mM을 투여하였다. 실험은 4회를 실시하였다.

3. TEER (transendothelial electrical resistance)의 관찰

H_2O_2 투여 후 30분 간격으로 두 시간 동안 EVOM (Precisoin)으로 transendothelial electrical resistance (TEER)를 측정하였다.

4. Cytotoxicity test

H_2O_2를 처리한 후의 BBMECs의 생존률은 AlamarBlue assay (Serotec)를 이용하여 확인하였다. H_2O_2

로 30분간 처리하고 10% AlamarBlue를 포함한 changing media로 바꿔준 후 4시간 동안 배양하면서 cell viability를 측정하였다. Spectra MAX 340 (Molecular Devices)를 이용하여 570 nm에서 측정한 absorbance에서 Background absorbance (600 nm에서 측정) 빼었으며 생존률은 대조군 대비 %로 표현하였다(n=3).

5. Western blot

배양된 세포는 0.01 M PBS (0.2 mM phenylmethylsulfonyl floride, 4°C)로 세척한 후, Complete mini protease inhibitor (Boehringer Mannheim)를 넣은 lysis buffer (Triton/deoxycholate/SDS buffer, 0.2% SDS, 100 mM NaCl, 1% Triton-X 100, 0.5% deoxycholic acid, 2 mM EDTA, 10 mM HEPES pH 7.5, 10 mM NaFl, 1 mM $NaVO_4$, 1 mM benzamidine, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl floride) 를 넣어 15분간 4°C에서 처리하였다. 이후 cell scraper로 모아 shaking 한 후(1시간, 4°C), 원심분리하여(10,000 g) 상층액과 pellet을 분리하여 -70 °C에서 보관하였다.

MicroBCA kit (Pierce)를 이용하여 단백질의 농도를 정량하고 10% SDS polyacryamide gel로 전기영동(4 g protein/lane)을 하였다. 젤은 PVDF membrane에 전기이적한 후, blocking solution (5% milk, TBST)에서 한 시간 처리하였다. Mouse anti-occludin antibody (1 : 5000)로 1시간 반응시킨 후 TBST로 5분간 3번 세척하였다. HRP conjugated goat anti-mouse IgG antibody로 1시간 반응시킨 후, 다시 TBST로 5분 간 3번 세척한 후, ECL plus kit (Amersham)를 이용하여 반응시킨 후, gel documentation system 을 이용해 반응을 관찰하였다.

6. Confocal laser microscopy

Slide chamber (Nunk)에서 배양한 내피세포는 3% paraformaldeyde (0.01 M PBS, 4°C)로 고정하고 면역형광현미경 관찰을 위해 일차항체는 mouse monoclonal anti-occludin antibody를 사용하였다. 대조군에서는 일차항체 대신 PBS를 사용하였다. 이차항체는 FITC conjugated anti-mouse antibody (Zymed)를 사용하였다. Slide chamber에서 배양한 내피세포는 3% paraformaldehyde (0.01 M PBS)나 70% ethanol에 10분간 고정하였고 PBS로 세척하고 0.1% Triton X-100 (PBS)으로 세포막의 이동성을 증대시켰다. Bovine serum albumin (BSA, 0.5 g/mL) 으로 10분간 blocking 한 후 일차항체 (10 μg/mL)로 4°C에서 12시간 반응시켰다. 그 후 다시 PBS로 세척하고 FITC가 붙은 이차항체로 1시간 반응시키고 PBS로 세척한 후 50% glycerol을 세포 위에 몇 방울 떨어뜨리고 confocal laser microscope (Zeiss, LSM-510 meta)으로 관찰하였다

7. 투과전자현미경 관찰

Transwell 의 막을 분리하여 2.5% glutaraldehyde (pH 7.4, 0.01 M phosphate buffer, 4°C)에 2~4시간 선고정한 후 1% osmium tetroxide (pH 7.4, 0.01 M phosphate buffer 4°C)에 1시간 후고정하였다. 다시 같은 완충용액으로 세척한 후 50, 70, 80, 90, 100%의 4°C에 탄올용액에서 각각 10분간 점진적으로 탈수시켰다. propylene oxide는 막을 변형시켜 사용하지 않았다. 그 후 epon에 24시간 침투시킨 후 epon 812에 포매하였다.

Sorvall Mt 5000으로 0.1~0.5 μm 두께의 준초박절편을 제작하고 Richardson염색을 하여 광학현미경으로 관찰한 후 다시 50 nm 두께의 초박절편을 제작하고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색을 실시하여 JEOL 200 CX 투과전자현미경으로 100 KeV 하에서 관찰하였다.

8. 통계처리

자료는 평균±표준편차로 나타내었으며, 통계처리는 Student's t test로 유의성을 검정하였으며 유의수준은 5%로 하였다.

결 과

1. H_2O_2에 의한 TEER의 변화

10 μM부터 5 mM에 이르는 H_2O_2의 투여에 따른 BBMEC의 TEER의 변화를 EVOM으로 관찰하였다 (Fig. 1). 5 mM의 H_2O_2로 의해 TEER는 한 시간 후에

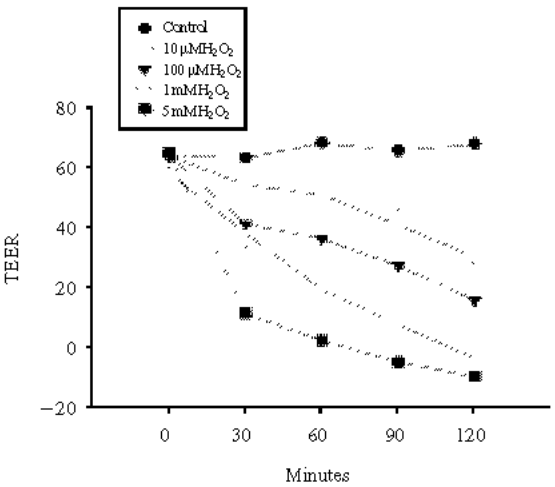

Fig. 1. H_2O_2 mediated transendothelial electrical resistance (TEER, Ωcm^2). TEER of bovine brain microvessel endothelial cells (BBMECs) was measured with EVOM. Treatment of 5 mM H_2O_2 showed abrupt and significant decrease in TEER at 15 minutes. Compared with control level, lower doses of H_2O_2, 10 μM, 100 μM and 1 mM showed gradual decrease with dose and time dependent pattern. Data are shown as mean ± SD with $p < 0.05$ (n = 3).

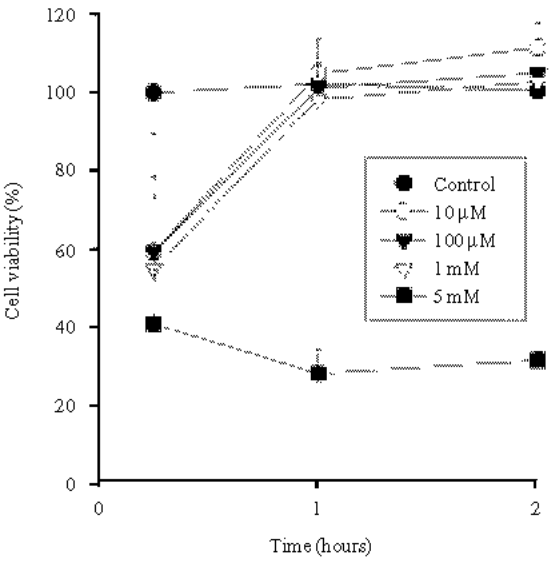

Fig. 2. Percentage of viability of BBMECs after H_2O_2 treatment. The cell viability was assessed using AlamarBlue assay. Treatment of 5 mM H_2O_2 showed significant decrease in viability. Compared with control level, lower doses of H_2O_2, 10 μM, 100 μM and 1 mM did not affect the cell viability. Data are shown as mean ± SD (n = 5).

급속하게 감소하여 두 시간 경에는 기저 수준에 도달하였고 이후에는 오히려 기저수준보다 더 낮은 값을 보였다. 1 mM에서는 점진적으로 TEER가 감소하는 양상으로 보였으며 한 시간 후에 기저수준에 도달하였고 이후에는 역시 기저수준보다 더 낮은 값을 보였다. 10 μM, 100 μM에서는 TEER가 점진적으로 감소하는 양상을 보이고 있었다. 이 결과로 볼 때 대체로 H_2O_2 1 mM의 농도까지는 용량에 의존하여 TEER가 감소하는 양상을 보였다.

2. Cytotoxicity test

TEER 는 H_2O_2의 농도가 증가하면서 감소하는 양상을 보였다. 그러나 H_2O_2는 cell toxicity를 일으켜 cell death에 이르게 하므로 cytotoxicity test를 시행하였다. 실험시간인 4시간 동안은 H_2O_2의 농도가 10 μM, 100 μM, 1 mM에서의 세포생존율은 대조군과 유사하였다 (Fig. 2). 그러나 세포의 생존률은 5 mM의 H_2O_2로 처치한 결과는 세포의 생존률이 대조군의 약 30% 정도

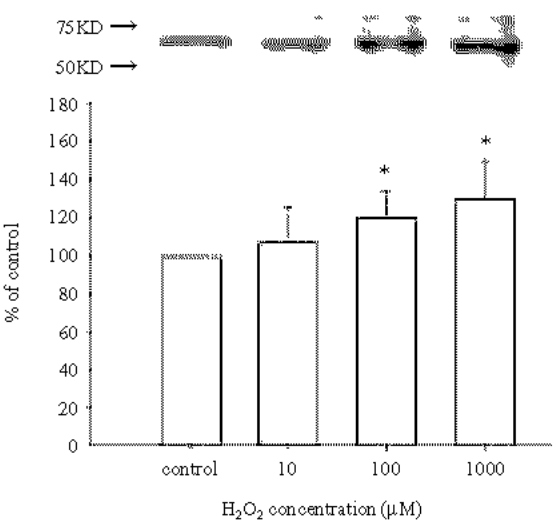

Fig. 3. Effect of H_2O_2 on actin protein levels. BBMECs were treated with H_2O_2 of 10 μM, 100 μM, and 1 mM. Western blot analysis showed the increased level of actin (100 μM, 1 mM). Densitometry analysis of blots showed significant increase in actin (100 μM, 1 mM). Data are shown as the mean ± SD with *$p < 0.05$ (n = 3).

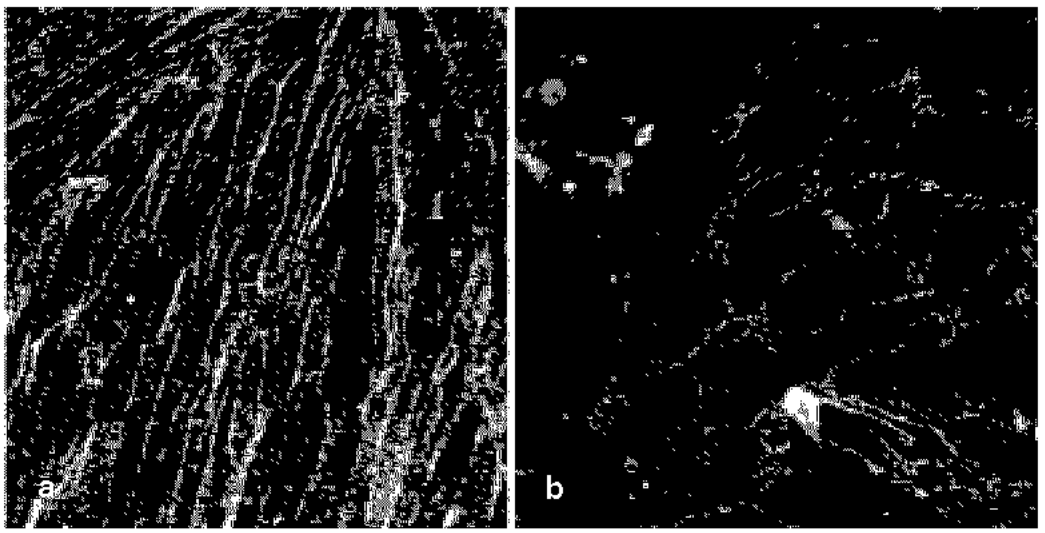

Fig. 4. Immunostaining of BBMEC monolayers for occludin. Immunofluorescence showing occludin localization in bovine brain microvessel endothelial cells. 4a shows control staining for occludin. 4b exhibits intermittent loss of occludin at tight junctions after 30-min exposure of 1mM H_2O_2.

로 크게 감소하였다. 이것으로 보아 H_2O_2의 농도가 1 mM 이하에서 나타나는 TEER의 감소는 cell death를 유발하지 않은, 단순한 기능의 변화라고 생각되었다. 그러나 5 mM의 H_2O_2를 투여한 경우 cell death가 크게 증가되어 나타나 이후 계속되는 실험에서는 1 mM 이하의 농도에서 실험을 진행하였다.

3. Occludin 총양의 변화

10 μM, 100 μM, 1 mM의 H_2O_2에 30분 노출시키고 한 시간 반 후에 나타나는 occludin 양을 western blot으로 확인하였다. occludin은 H_2O_2 10 μM에서는 유의한 변화가 없었지만 100 μM, 1 mM에서는 대조군에 비해 단백질의 양이 증가되어 있는 것을 Densitometric analysis에서 관찰하였다(Fig. 3).

4. 면역형광염색을 이용한 occludin의 localization의 변화

30분간 1 mM H_2O_2에 노출시키고 한시간 반 후에 세포사이의 치밀이음부를 구성하는 occludin의 변화를 관찰하였다. BBMEC가 밀접하게 접촉을 이루고 있는 대조군(Fig. 5a)에서 치밀이음부의 occludin은 세포들의 접촉 경계부를 따라 치밀하게 분포되어 있었다. 간혹 끊김이 있지만 occludin이 세포사이를 채우며 연속적인 그물의 형태를 나타내고 있는 것이 매우 특징적이었다. H_2O_2 처치에 의해 나타나는 occludin 면역반응의 분포는 대조군에 비교할 때 그물의 형태가 파괴되어 있었다. 세포사이에서 관찰되는 occludin은 연속적으로 이어져 있지 못하고 중간중간이 끊어져 세포사이에 틈이 형성되었다. 높은 농도인 1 mM H_2O_2에 의해 occludin의 분포의 변화는 더욱 뚜렷하게 나타났다(Fig. 5b). 많은 부위의 세포사이에서 면역반응이 사라져 occludin의 소실이 매우 광범위하였다.

5. 투과전자현미경 관찰

1 mM의 H_2O_2에 30분 노출시키고 한 시간 반 후에 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 치밀이음부의 형태학적 변화는 관찰되지 않았다. 대조군에서 세포사이에 나타나는 세포사이결합은 세포의 긴 면에 대해 거의 수직이나(Fig. 5a) 비스듬하게(Fig. 5b) 형성되어 있었다. H_2O_2 1 mM을 투여한 경우 나타나는 세포사이의 결합은 대조군에 비해 뚜렷한 차이는 없었다. 세포사이결합에 나타난 큰 공간(Fig. 5c)이나 틈새(Fig. 5d)

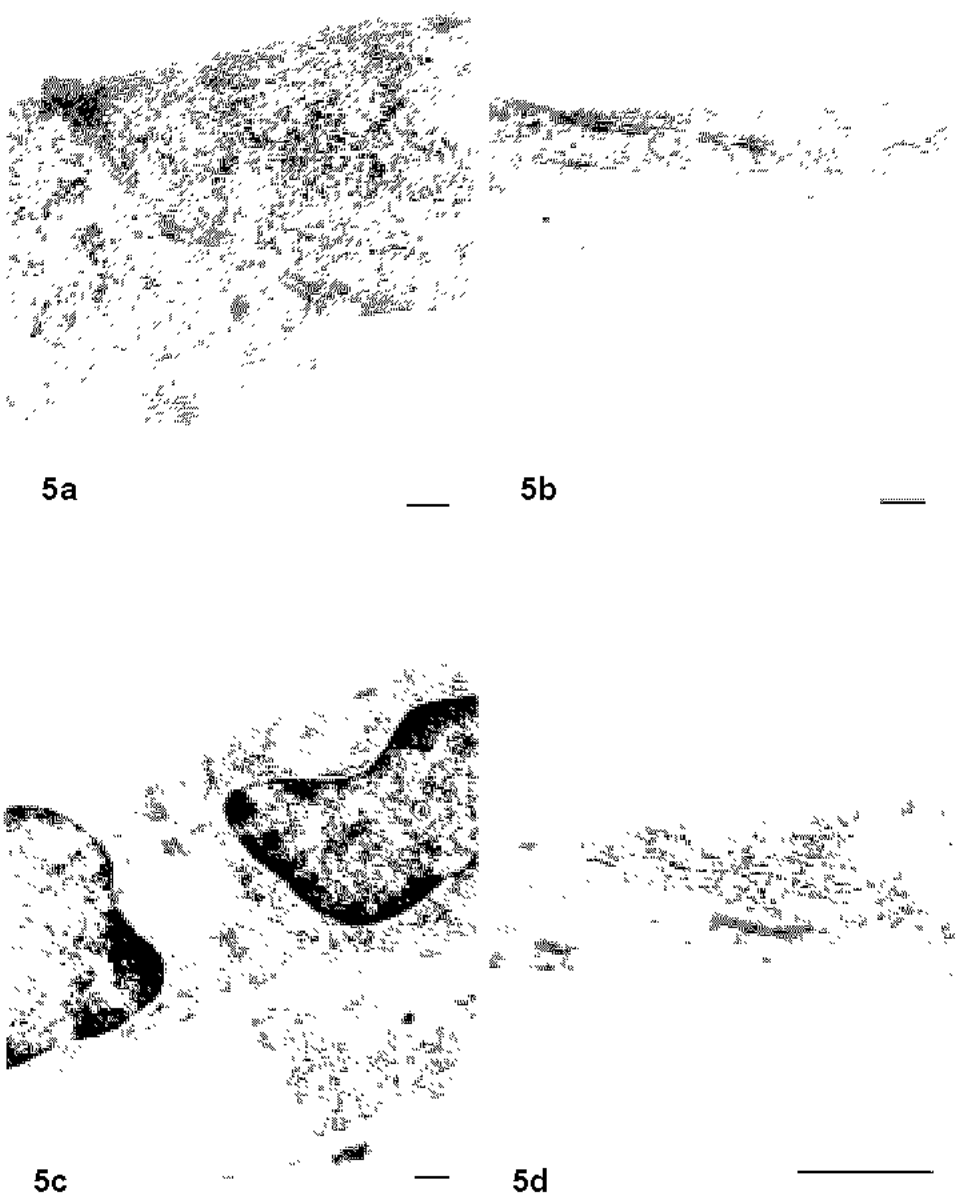

Fig. 5. Transmission electron micrograph of bovine brain microvessel endothelial cells cultured on 0.4 μm pore transwell. The intercellular junction between endothelial cells are oblique (a) or nearly flat (b) with high electron density showing tight junction and adherens junction. When treated with 1 mM H_2O_2 for 30 min, the intercellular junction showed no alteration in ultrastructure (c, d). The vacuole (c) and widening (d) in intercellular junction were considered as artifact. Bars equal 2 μm.

는 조직처리과정에서 나타난 인조물로 생각되었으며 H_2O_2에 의한 구조적 변형으로 판단하기 힘들었다.

고 찰

중추신경계에서 내피세포는 유해한 환경으로부터 신경원과 아교세포를 보호하는 1차적인 보호장치로서 역할을 하고 있다(Bottaro et al., 1986). 이 보호장치 중에 TJ가 paracellular transport를 조절하는 중요한 기능을 담당하고 있다(Huber et al., 2001). Occludin과 claudin으로 구성된 TJ는 세포막 단백질의 복합체로서 membrane associated accessory protein {zonular occludens (ZO)-1, -2, -3과 cingulin}을 통해 세포골격과 연결되어 있다(Mitic & Anderson, 1998). 이 단백질들은 integral transmembrane protein으로 인접한 다른 세포의 세포막의 같은 단백질에 작용하여 TJ를 형성한다(Tsukamoto & Nigam, 1999). 이중에서 occludin 이 내피세포의 장벽으로서의 기능 중 solute barrier로서 중추적인 역할을 한다(Trocha et al., 1999).

허혈 및 재관류 그리고 백혈구를 매개로 한 염증은 H_2O_2형성과 미세혈관의 투과성의 변화를 수반한다 (Parks et al., 1984). 많은 실험들이 혈액뇌장벽의 내피세포가 아닌 것을 이용하여 H_2O_2에 의한 변화를 관찰하여 왔다(Kevil et al., 1998, 2000).

본 실험의 결과 H_2O_2에 의해 TEER가 용량의존적으로 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. 세포를 H_2O_2 (250~1000 μM)에 노출시켜 산화스트레스를 유발하면 내피세포에 손상이 초래되지만(Shimizu et al., 1994), 적은 농도(121 μM)에서는 섬유아세포의 증식(Burdon & Gill, 1990)과 내피세포의 혈관형성(Yasuda et al., 1999) 이 촉진된다. 이와 같은 자료를 배경으로 실험에서는 낮은 농도(10 μM, 100 μM) 및 높은 농도(1 mM, 5 mM)에서 모두 TEER가 감소하는 것으로 나타났으며, 다른 부위의 내피세포에서 나타나는 변화와 유사하였다(Lum et al., 1992; Siflinger-Birnboim et al., 1996). H_2O_2에 의한 TEER의 감소는 투과성의 증가와 밀접하게 관계되어 있어서 in vivo나 in vitro에서 용질 투과성이 증가하는 것이 보고되고 있다(Lum et al., 1992; Siflinger-Birnboim et al., 1996; Kevil et al., 2001, 2002). 이러한 보고들 중에서 oxidant를 매개로 하여 투과성이 증가하는 몇몇 신호전달체계가 밝혀져 있으나 molecular target은 대부분 밝혀져 있지 않다.

H_2O_2에 의해 내피세포에서 투과성이 증가하는 예에는 내피세포 사이에 간격이 형성되고 actin이나 cadherin과 같은 단백질이 소실되기 때문인 것으로 알려져 있다(Carbajal & Schaeffer, 1998; Kevil et al., 1998). 그러나 이미 밝혀진 바와 같이 혈관 내피세포에서 투과성을 유지하는 데 있어서, TJ를 구성하는 단백질 중 occludin이 가장 중요한 역할을 한다(Hirase et al., 1997). 예를 들면 HUVEC에서 H_2O_2를 투여하면 내피세포의 투과성이 증가하는데 이는 H_2O_2에 의해 occludin의 분포가 변하기 때문이다(Kevil et al., 2000). 또한 현재까지 H_2O_2가 직접적 occludin에 영향을 끼치는 지는 알려져 있지 않다.

이러한 배경을 근거로 본 실험에서는 H_2O_2를 투여하여 나타나는 TJ의 단백질인 occludin의 분포의 변화를 면역형광염색을 통해 관찰하였다. BBMEC에서 TJ를 구성하는 occludin은 H_2O_2에 의해 용량의존적으로 TJ에서 감소되어 있었다. 감소되는 양상을 보면, 정상적으로 세포사이에 나타나는 면역반응이 H_2O_2에 의해 그 연속성이 파괴되어 있었다. 그러나 occludin은 세포사이에서 전체적으로 소실되지 않고 남아 있었다. HUVEC에서도 이와 유사한 양상으로 occludin의 분포의 변화가 나타난다(Kevil et al., 2000).

본 면역형광염색의 결과를 근거로 보면, occludin은 H_2O_2에 의해 TJ에서 부분적으로 사라졌으며, 이 단백질이 사라진 세포사이는 바로 TJ의 기능이 소실된 부위에 해당한다고 볼 수 있었다. 바로 이 부위의 세포사이에 통로가 형성되고, 이 곳으로 용질의 자유로운 이동이 일어나 TEER가 감소하고 또한 투과성이 증가하는 것으로 생각할 수 있다.

면역형광염색에서 H_2O_2에 의해 TJ를 형성하는 occludin이 세포사이에서 많이 사라졌지만 western blot을 한 결과 occludin의 총양은 오히려 증가하였다. Occludin은 ZO-1의 NH_2 terminal region에 직접 이어져 있으며 이를 통해 actin에 연결된다(Fanning et al., 1998). H_2O_2에 의해 occludin과 ZO-1의 결합이 감소되기 때문에(Kevil et al., 2000), occludin이 세포속으로 유입되어 세포 전반에 퍼지거나, occludin이 H_2O_2

에 의해 일부 파괴되어 사라질 수도 있다. 또한 H_2O_2에 의해 cadherin이나 ZO-1도 세포질내로 유입되거나 세포질 전체로 퍼지는 것(Kevil et al., 1998, 2000)으로 알려져 있다.

Western blot 결과 H_2O_2에 의해 occludin의 양이 증가하는 것은, 손상된 BBB 고유기능을 복구하기 위한 방편으로 이 단백질의 생산을 더욱 증가시키는 것으로 생각된다. 또한 세포질 내에서 occludin의 면역반응이 증가되지 않는 것으로 보아 occludin의 세포질 속으로의 유입은 없는 것으로 추측할 수 있다. 또한 투과전자현미경관찰을 통해도 치밀이음부의 기본적인 구조가 H_2O_2에 의해 변형된다거나 파괴되는 양산을 관찰하기 힘들었다.

이와같은 결과들을 종합해 볼 때 H_2O_2에 의해 occludin에 변화가 일어나 투과성이 증가한다고 생각된다. 그러나 이는 occludin의 파괴나 세포에서의 소실에 의한 것이 아니고 TJ에서 occludin이 다른 부위로 이동하는 재분포에 의한 것으로 생각된다.

H_2O_2를 포함한 ROS는 혈관세포에서 MAP kinase 통해 각종 kinase와 transcription factor를 조절하여 protein systhesis 와 redox-sensitive gene에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 ROS에 의한 MAPK activity 조절은 MAPK family member나 cell type에 따라 다르다. 그러므로 앞으로 BBB 내피세포에서 MAPK signal transductoin 기전, ROS에 반응하는 signaling cascade, 그리고 ROS의 직접적인 target molecule을 밝혀내야 할 것이다.

참 고 문 헌

Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW: Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. J Biol Chem 13(274) : 23463 23467, 1999.

Bottaro D, Shepro D, Hechtman HH: Heterogeneity of intimal and microvessel endothelial cell barriers in vitro. Microvasc Res 32 : 389 398, 1986.

Bradbury MWB: The blood brain barrier. Exp Physiol 78 : 453 472, 1993.

Burdon RH, Gill V, Rice Evans C : Oxidative stress and tumor cell proliferation. Free Radic Res Comm 11 : 65 76, 1990.

Carbajal JM, Schaeffer RC: H_2O_2 and genistein differentially modulate protein tyrosine phosphorylation, endothelial morphology, and monolayer barrier function. Biochem Biophy Res Commun 249 : 461 466, 1998.

Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM: The tight junction protein ZO 1 establishes a link between the transmembrane protein occluding and the actin cytoskeleton. J Boil Chem 273 : 29745 29753, 1998.

Gaillard PJ, Voorwinden LH, Nielson JL, Ivanov A,Atsumi R, Engman H, Ringbom C, Boer AG, Breimer DD: Establishment and functional characterization of an in vivo model 0f the blood brain barrier, compromising a co culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. Euro J Pharmacol Sci 12 : 215 222, 2001.

Ghersi Egea JF, Strazielle N: Brain drug delivery, drug metabolism, and multidrug resistence at the choroid plexus. Drug Metabol 52 : 83 88, 2001.

Gumbleton M, Audus KL: Progress and limitation in the use of in vitro cell culture to serve as a permeability screen for the blood brain barrier. J pharmacol Sci 90(11) : 1681 1698, 2001.

Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL: Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cell. J Cell Sci 110 : 1603 1613, 1997.

Huber JD, Egleton RD, Davis TP: Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood brain barrier. TREND Neurosci 24(12) : 719 725, 2001.

Kniesel U, Wolburg H: Tight junctions of the blood brain barrier. Cell Mol Neurobiol 20(1) : 57 76, 2000.

Kallmann BA, Wagner S, Hummel V, Buttmann M, Bayas A, Tonn JC, Rieckmann P: Characteristic gene expression profile of primary human endothelial cell. FASEB Express Article 10.1096/fj.01 0594fje, 2002.

Kevil CG, Ohno N, Gute DC, Okayama N, Robinson SA, Cheney E, Alexander JS: Role of cadherin internalization in H_2O_2 mediated endothelial permeability. Free Radical Boil Med 24 : 1015 1022, 1998.

Kevil CG, Okayama N, Alexander JS: H_2O_2 mediated

permeability: Importance of tyrosine phosphatase and kinase activity. Am J Physiol Cell Physiol 281 : C1940 C1947, 2001.

Kevil CG, Oshima T, Alexander B, Coe LL, Alexander JS: H_2O_2 mediated permeability: role of MAPK and occludin. Am J Physiol Cell Physiol 279(1) : C21 C30, 2000.

Kniesel U, Wolburg H: Tight junctions of the blood brain barrier. Cell Mol Neurobiol 20(1) : 57 76, 2000.

Loscher W, Potschka H: Role of multidrug transporters in pharmacoresistence to antiepileptic drug. Perspect Pharmacol 301(1) : 7 14, 2001.

Lum H, Barr DA, ShafferJR, Gordon RJ, Ezrin AM, Malik AB: Reoxygenation of endothelial cells increases permeability by oxidation dependent mechanism. Circ res 70 : 991 998, 1992.

Mark KS, Davis TP: Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia reoxygenation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 282(4) : H1485 H1494, 2002.

Mitic LL, Anderson JM: Molecular architecture of tight junctions. Annu Rev Physiol 60 : 121 142, 1998.

Parks DA, Shah AK, Granger DN: Oxygen radicals: effect on intestinal vascular permeability. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 247 : G167 G170, 1984.

Pohlman TH, Harlan JM: Adaptive responses of the endothelium to stress. J Surgical Res 89 : 85 119, 2000.

Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP: Glial cell influence on the human blood brain barrier. Glia 36 : 145 155, 2001.

Shimizu S, Nomoto M, Yamamoto T, Momose K: Reduction by NG nitro L arginine of H_2O_2 induced endothelial cell injury. Br J Pharmacol 113 : 564 568, 1994.

Siflinger Birnboim A, Goligorsky MS, Vecchino PJD, Malik AB: Involvement of Ca^{2+} in the H_2O_2 induced increase in endothelial permeability, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 270 : L973 L978, 1996.

Tayarani I, Chaudiere J, Lefauconnier JM Bourre JM: Enzymatic protection against peroxidative damage in isolated brain capillaries. J Neurochem 48 : 1399 1402, 1987.

Trocha SD, Kevil CG, Mancini M, Alexander JS: Organ preservation solutions increase endothelial permeability and promote loss of junctional proteins. Ann Surg 230 : 105 113, 1999.

Tsukamoto T, Nigam SK: Tight junction proteins form large complexesand associate with the cytoskeleton in an ATP depletion model for reversible junction assembly. J Biol Chem 272 : 16133 16139, 1999.

Yasuda M, Ohzeki Y, Shimizu S, Natio S, Ohtsuru A: Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS 1 in endothelial cells. Life Sci 64 : 249 258, 1999.

<국문초록>

뇌에서 혈액뇌장벽을 형성하는 내피세포는 치밀이음부를 통해 뇌의 항상성을 유지하고 있다. 치밀이음부의 단백질 중의 하나인 occludin은 뇌혈관장벽(BBB)의 기능을 유지하는 중요한 단백질로 인식되고 있다. 본 실험에서는 소의 뇌에서 배양된 BBB 내피세포에서 활성산소종의 하나인 H_2O_2에 의해 일어나는 occludin 단백질의 변화를 관찰하였다. H_2O_2에 의해 TEER가 감소하는 것은 occludin의 재분포에 의한 것이었다. 세포독성은 4시간내에서는 1 mM H_2O_2 이하에서는 나타나지 않았다. Confocal laser microscope으로 관찰한 결과, H_2O_2에 의해 occludin은 치밀이음부에서 중간중간이 사라져 감소해 있었고, 이러한 양상은 H_2O_2의 용량과 노출시간에 비례하였다. 그러나 Western blot 결과, occludin의 총량은 증가하였다. 투과전자현미경 관찰을 통해 H_2O_2가 세포사이의 결합의 구조에 뚜렷한 변화를 미치지 않는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 H_2O_2에 의한 BBB 기능소실은 occludin이 치밀이음부에서 부분적으로 사라지는 것에 의하지만, 세포는 기능손상을 복구하기위한 방편으로 이 단백질의 생산을 더욱 증가시키는 것으로 생각된다.