

흰쥐 성상세포에서 산소농도의존성 유전자의 분리

박정애 · 송현석 · 이혜신 · 김규원[#]

서울대학교 약학대학

(Received February 24, 2006; Revised March 29, 2006)

Isolation of a Hypoxia/Reoxygenation Regulatory Factor in Rat Astrocytes

Jeong Ae Park, Hyun Seok Song, Hye Shin Lee and Kyu Won Kim[#]

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract – Astrocyte has emerged as an active regulator of brain function, which connects between blood vessels and neurons as well as is a structural component of the blood-brain barrier. From its structural characteristics, astrocyte seems to sensitively respond to oxygen tension, and, in turn, generate diverse cellular cascades. Therefore, to reveal astrocytic events by oxygen change, we screened genes whose expressions are upregulated under reoxygenation after hypoxic stress using cDNA representational difference analysis (RDA) technique. Meteorin that regulates glial differentiation was isolated from primary cultured rat astrocytes as a hypoxia/reoxygenation regulatory factor. We cloned rat version of Meteorin (rMeteorin) and determined full-size sequences of rMeteorin. In addition, RT-PCR analysis revealed that Meteorin was increased under reoxygenation in astrocytes and highly expressed in the developing brain. Collectively, these results suggest that Meteorin may regulate astrocyte-mediated effects in response to the change of oxygen tension in the pathophysiological states.

Keywords □ astrocyte, normoxia, hypoxia, reoxygenation, development, Meteorin

성상세포는 뇌를 구성하는 세포 중 가장 높은 비율을 차지하는 세포로서, 일반적으로 신경세포의 네트워크를 구조적으로 지지하고 신경세포에서 나오는 대사 부산물을 제거하는 등 수동적인 역할을 한다는 이론이 지배적이었다. 그러나 최근 다양한 성상세포의 능동적인 기능들이 밝혀지면서 그 중요성이 다시 부각되고 있다.¹⁾

성상세포가 가지고 있는 고유의 기능 중 하나는 혈관과 신경세포를 구조적, 기능적으로 연결하는 다리 역할을 한다는 점이다. 뇌혈관은 뇌혈액관문(blood brain barrier, BBB)이라는 특수한 구조를 가지고 있는데, 뇌혈액관문은 혈관내피세포 사이의 tight junction과 뇌혈관을 감싸고 있는 성상세포로 구성되어 있다.^{2,4)} 이렇듯 성상세포는 혈관과 직접적으로 연결되어 혈관에서 오는 신호를 받아들여 신경세포로 전달하고 반대로 신경세포의 신호를 혈관에 매개하는 역할을 한다.

혈관이 만들어내는 중요한 신호 중 하나는 산소 농도의 변화이다. 병리적 상황에서, 뇌의 hypoxia는 뇌혈관의 투과성을 증가

시키고 뇌혈액관문 구조를 느슨하게 하여 부종등을 일으키기도 한다.^{5,6)} hypoxia 이후에 다시 산소가 공급되는 과정을 reperfusion 또는 reoxygenation이라고 하는데 reoxygenation과 연관된 세포 내 반응은 병적 상황을 회복하는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 뇌의 산소 농도가 급격히 변화하는 hypoxia/reoxygenation현상은 정상적인 뇌 발생 과정에서도 일어난다. 성상세포의 증식에 의한 hypoxia 스트레스는 혈관신생신호로 작용하게 되고 혈관 신생 이후에 공급되는 산소로 인한 reoxygenation 상황은 뇌혈관의 성숙과 뇌혈액관문구조로 분화되는 신호로서 작용한다.^{3,7)} 이 과정에서 성상세포는 뇌의 산소센서로서, hypoxia 상황에서는 VEGF라는 혈관신생 인자를 분비하여 혈관신생을 유도하고⁸⁾ reoxygenation이 일어나면 SSeCKs와 angiopoietin 등의 단백질을 매개로 뇌혈액관문 분화를 일으킨다는 보고가 있다.⁹⁾

뇌혈관 분화와 더불어 발생 과정에서 산소 농도의 변화는 신경 줄기세포의 증식과 분화에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 신경 줄기세포의 증식 및 분화와 관련하여서는 hypoxia에 대한 연구가 많이 수행되었는데, 일반적으로 hypoxia에 노출된 신경 줄기세포는 증식이 증가하고 multipotency가 높아지는 경향이 있다.^{10,11)} 또한 hypoxia신호는 신경아세포로의 분화를 촉진

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-880-6988 (팩스) 02-872-1795
(E-mail) qwonkim@plaza.snu.ac.kr

하고,¹²⁾ 도파민 신경세포의 비율을 높이는 것으로 보고되어 있다.¹¹⁾ Hypoxia 이후의 reoxygenation 신호가 신경 줄기세포 분화에 미치는 영향에 대한 구체적인 보고는 아직 없지만, 발생 과정에서 자연스럽게 경험하게 되는 reoxygenation 상황은 분화의 또 다른 인자로서 작용 할 것으로 예상된다.

Reoxygenation 신호가 병리학적, 발생학적으로 뇌의 기능에 다양한 반응을 일으키는 반면 이에 대한 구체적인 메커니즘이나 매개 단백질에 대한 연구는 많이 이루어지지 않은 상태이다. 따라서 본 연구실에서는 성상세포를 대상으로, hypoxia 이후 reoxygenation 상황에서 발현이 증가하는 유전자를 cDNA RDA 방법을 이용해 스크리닝하였고 그 중 아직까지 보고가 되어있지 않은 새로운 유전자를 클로닝하고 염기배열을 밝히는 작업을 수행하였다.

실험방법 및 재료

실험동물

SPF(specific pathogen-free) Sprague-Dawley(SD) rat과 ICR mouse는 대한 바이오텍(주)에서 구입하였다.

세포 배양 - 성상세포 (primary rat astrocyte) 배양은 생후 2 일째의 Sprague-Dawley rat 또는 ICR mouse를 사용하였다. 흰 쥐의 대뇌반구를 분리하여 meninges를 제거한 뒤 DMEM 배지에 넣고 0.25% trypsin/EDTA를 처리하여 파쇄 하였다. 300×g 에서 10분간 원심분리 한 후에 상등액은 제거하고 세포침전물은 10% FBS를 포함한 DMEM 배지에 풀어서 175 cm² 세포배양용 플라스크에 배양하였다. 7~9일간 배양 후 밤새 shaker에서 흔들어서 microglia, oligodendrocyte등을 제거하고 10⁻⁵ M의 cytosine arabinoside를 48시간 동안 처리하여 남아있는 progenitor세포와 fibroblast를 제거 하였다.

분리한 성상세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM 배지에서 배양하였다. Hypoxia(1% 산소)에 노출 시키기 위해 세포는 정해진 시간동안 hypoxia chamber(Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio, USA)에서 배양하였다. Hypoxia chamber는 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂의 저 산소 대기와 37°C의 온도로 유지되었다. Hypoxia에 노출 후 정상산소상태(reoxygenation) 조건을 위해서는 48시간 hypoxia로 배양한 세포를 배양기에서 꺼내어 신선한 배지로 교체한 후 5% CO₂의 일반 인큐베이터(21% 산소공급)에서 정해진 시간 동안 배양하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR - 발생 단계에 따른 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 발생중인 ICR mouse의 대뇌를 꺼내어 Trizol Reagent(Invitrogen)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 산소농도 변화에 따른 유전자 발현 관찰 실험을 위해서는 normoxia와 hypoxia 그리고 reoxygenation에 노출시킨 SD rat 성상세포로부터 같은 방식으로 RNA를 분리하였다. cDNA 합성에는 5 μg의

RNA에 200 unit의 M-MLV reverse transcriptase(Promega)와 500 ng의 oligo-dT를 이용하였다. PCR에 사용된 프라이머 염기 배열은 다음과 같다. mouse cDNA인 경우, 5'-TCCGCTCACGC-TGGCTACTCG, 5'-GCAGCTCTGTGTCATGGGCGAC; rat cDNA인 경우, 5'-TTGACCCAGGAACCTGGCAG, 5'-GCATG-CAGTCAGAAGGAGCTC.

cDNA Representational difference analysis (RDA) - cDNA RDA 스크리닝은 Hubank *et al.*의 1999년 논문에 따라 수행되었다.¹⁰⁾ normoxia와 hypoxia와 reoxygenation조건하의 성상 세포로부터 poly(A)+RNA를 분리하여 cDNA를 합성하였다. DpnII제한효소로 절단한 후, R-12/24-mer linker를 ligation하고 Klenow로 fill-in하였다. representative amplicon은 R-24-mer를 프라이머로 PCR하여 합성하였다. Driver는 normoxia와 hypoxia 조건하에서 성상세포의 amplicon을 1:1 mix하여 만들었고 tester는 저산소조건 후 정상산소공급되는 reoxygenation 조건의 성상 세포의 amplicon에 두 번째 linker(J-linker)를 ligation하여 합성 하였다. Hybridization 반응은 driver:tester 비율을 100:1로 하여 20시간 동안 진행하였다.

cDNA RDA 산물은 DpnII 제한효소로 절단하여 linker를 제거 하고 pT7Blue-2 벡터에 옮겼다. 유전자 동정을 위한 염기배열 결정 반응은 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit(Perkin-Elmer)를 이용하여 T7프라이머로 수행되었고 ABI 373 sequencing machine(Applied Biosystems)을 이용하여 분석 하였다.

RACE와 rat Meteorin 유전자 클로닝 - Rat Meteorin유전자의 염기배열을 결정하고 유전자를 얻기 위하여 5' RACE 방법(Invitrogen)을 사용하였다. 생후 2일 rat에서 성상세포를 분리배양하여 cDNA를 제조하였다. cDNA에 dCTP와 TdT로 반응시켜 polymeric tail을 형성시킨 후 AAP primer(5'-GGCCACGCGTC-GACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3')와 rat meteorin의 EST 중의 하나인 AW144009의 염기배열을 기반으로 제조한 rMeteorin 프라이머 #1(5'-CCATCCGTTTCAGCGAAGACC-3')로 primary PCR반응을 수행하였다. PCR산물을 증폭시키기 위하여 nested PCR을 다시 수행하였다. 프라이머로서는 AUAP(5'-GGCCACG-CGTCGACTAGTAC-3')와 rMeteorin 프라이머 #2(5'-GCGCA-GACAGACGATGCTGG)를 사용하였다. 얻어진 PCR product를 pT7Blue 벡터에 클로닝하여 rMeteorin의 전사시작 코돈 ATG를 포함한 전체염기배열을 결정하여 rMeteorin의 전체클로닝을 수행하였다.

결 과

뇌혈액관 분화유도인자로서 산소의존적 Meteorin 유전자분리
발생과정 중에 세포는 hypoxia에 노출되나 왕성한 혈관형성과

함께 산소가 공급되는 reoxygenation 상태에서 세포내외의 다양한 변화가 예상된다. 특히 hypoxia를 경험한 뇌세포에 정상산소가 공급되면서 일어나는 세포내 변화, 즉 다양한 신호전달이나 성장분화인자의 변화를 cDNA RDA(representational difference analysis) 방법을 이용하여 분리하고자 하였다.

이를 위하여 태어난 후 3일째 되는 rat의 대뇌에서 세포를 분리한 다음 정상세포로 분화 유도된 세포만을 사용하였다. 분리된 정상세포를 normoxia와 hypoxia와 reoxygenation 조건에서 각각 배양하여 RNA를 분리하였다. 분리한 cDNA를 primer와 linker를 사용하여 hypoxia에 노출한 다음 normoxia 즉 reoxygenation 조건에서 배양한 세포로부터 발현이 증가한 단편을 분리하여 blast search한 결과 access No. AW144009와 일치하였다. 이를 정상세포에서 발현되는 hypoxia/reoxygenation regulatory factor로 명명하였다. 하지만 최근에 human과 mouse에서 Meteorin(Access No. NM_024042; NM_133719)과 동일한 유전자인 것으로 확인되었으므로 분리한 유전자를 이후부터는 rMeteorin(rat Meteorin)이라는 이름으로 언급하기로 한다. Meteorin은 정상세포의 분화에 관여하는 기능을 갖는 유전자로 보고되었다.¹⁴⁾

분리된 rMeteorin 유전자의 EST로 보고된 AW144009를 기준으로 프라이머를 합성하여 rMeteorin 발현의 산소의존성여부를 조사하였다. Fig. 1에서 보이는 바와 같이 RT-PCR로 확인한 결과 normoxia에서 발현되는 rMeteorin이 hypoxia에서는 감소한 반면 reoxygenation 조건하에서는 그 발현이 증가하는 것을 관찰하였다. 따라서 rMeteorin은 특히 reoxygenation상태에서 증가하는 유전자임을 확인하였으므로 전체 염기서열을 결정하고 유전자를 분리하기로 하였다.

Rat Meteorin 유전자의 클로닝

rat의 정상세포에서 산소의존적인 유전자로 분리된 단편의 완전한 염기배열을 분리하기 위하여 cDNA RACE 방법을 이용

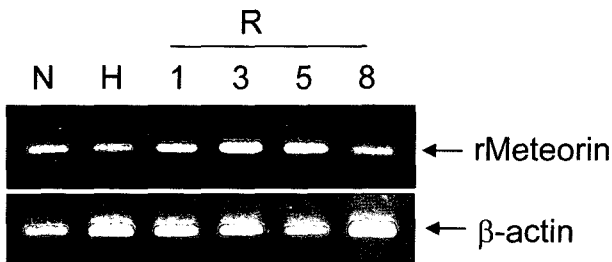


Fig. 1 – rMeteorin is regulated in an oxygen-dependent manner in astrocytes. RT-PCR analysis showing the expression of rMeteorin, 48 h exposure of astrocyte cultures to 21% (normoxia, N) or 1% oxygen (hypoxia, H), or exposure for indicated time periods to 21% oxygen, following 1% oxygen (reoxygenation, R). β -actin shows as an internal control.

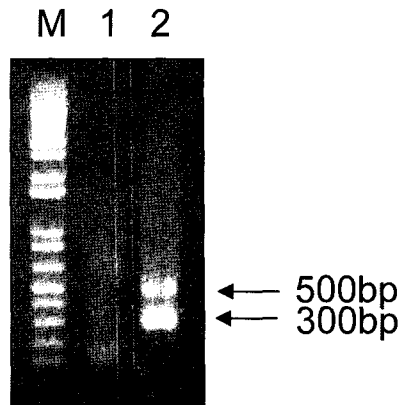


Fig. 2 – N-terminal clones of rMeteorin using cDNA 5' RACE. Primary PCR product was obtained by amplifying dC-tailed cDNA (1), and then which was reamplified by nested PCR (2). M, marker. Primers used for 5' RACE were indicated the following Fig. 3.

하였다. 생후 2일째의 rat의 뇌에서 분리배양한 정상세포를 normoxia와 hypoxia 그리고 reoxygenation에 노출한 정상세포에서 각각 cDNA를 분리하였다. 이미 보고된 access No. AW144009는 N 말단기의 염기배열부분을 완성하기 위하여 cDNA 5' RACE를 수행하였다. PCR과 nested PCR을 수행하여 얻은 PCR 생성물, 300 bp와 500 bp를 pTBlue vector에 클로닝하여

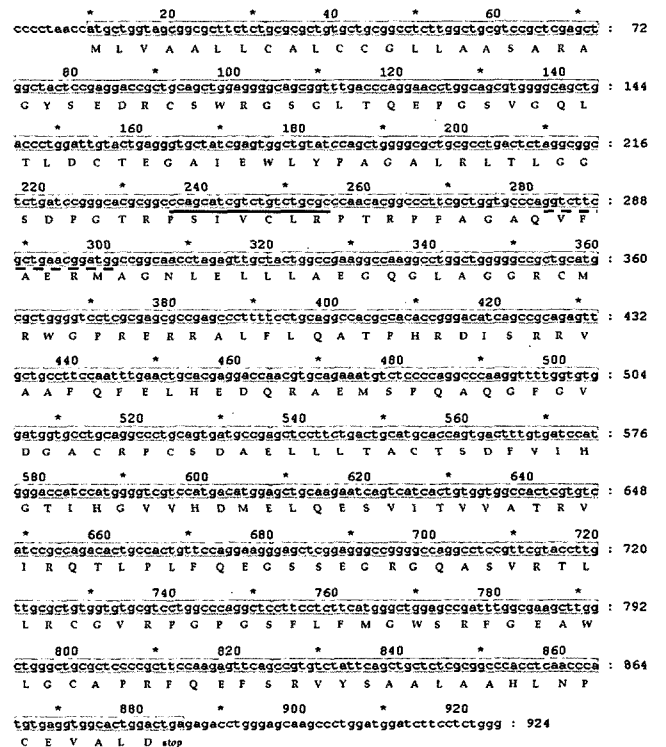


Fig. 3 – Completion of rMeteorin sequences (access No. AY800384). Primers used for identifying rMeteorin full sequences present as a bold (rMeteorin primer #1) and dotted (rMeteorin primer #2) lines.

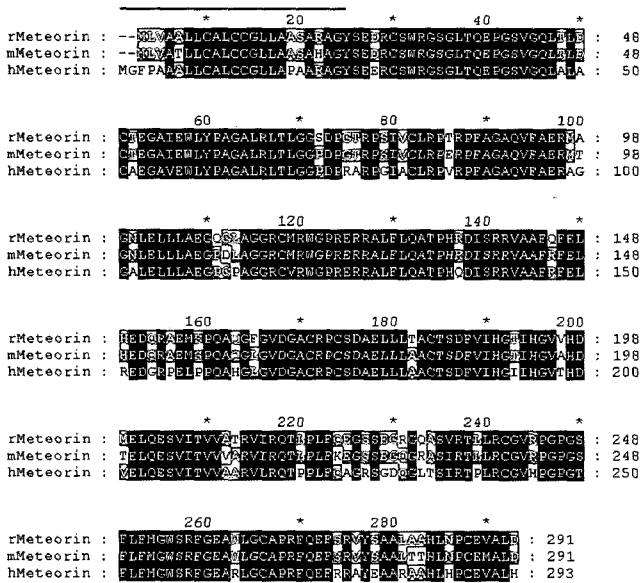


Fig. 4 – Alignment of amino acid sequences of rat, mouse, and human of Meteorin. Identical residues are shaded in black box. Gray-shaded residues are common to two species. The bold line presents a secretion signal.

염기배열을 결정하였다(Fig. 2). 그 결과, 전사시작 코돈 ATG 를 포함하는 N 말단기 염기배열을 완성하였으며 Fig. 3에서와 같은 염기배열과 아미노산 배열을 결정하였다. 염기서열을 결정 한 924 bp의 염기배열을 유전자뱅크인 NCBI에 Access No. AY800384로 등록하였으며 Gene Tool 프로그램을 이용하여 291개의 아미노산을 지닌 단백질로 전사되는 것을 추정하였다 (Fig. 3).

Meteorin은 rat, mouse, human의 중간에 아미노산이 잘 보존 되어 있으며, 각각 291, 291, 293 아미노산으로 구성되어 있고 N-말단기에 분비되는 단백질의 유전자서열을 보유하고 있다(Fig. 4). 그러나 다른 특별한 모티브는 발견되지 않았다.

Meteorin 유전자의 산소의존성

mouse 뇌에서 정상세포를 분리하여 mMeteorin(mouse Meteorin) 유전자의 산소의존도를 RT-PCR을 이용하여 조사한 결과에서도 hypoxia에 노출한 다음 normoxia조건에 다시 노출 시킨(R) 정상세포에서 mMeteorin유전자의 발현이 증가함을 확인하였다(Fig. 5, upper).

Meteorin이 출생한 후의 뇌의 정상세포에서 분리되었지만 뇌 에서 Meteorin 유전자의 기능을 탐색하기 위하여 태어나기 전의 뇌에서 Meteorin 유전자의 발현의 변화를 조사하였다. Meteorin 유전자는 생쥐의 초기발생 10.5일째에서도 발현이 증가되었다 (Fig. 5, lower). 뇌의 초기 10.5일째는 신경세포전구체가 신경세포로 분화되기 전의 시기로서 이때 이미 증가되어 있는 Meteorin의 발현이 신경세포의 분화에도 영향을 미치리라 예측된다.

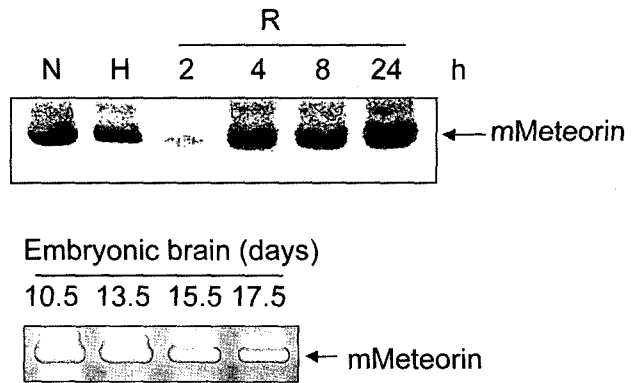


Fig. 5 – mMeteorin is increased under oxygen and regulated in the embryonic brain. RT-PCR analysis showing the increase of mMeteorin expression under reoxygenation (R) in primary cultured mouse astrocytes (upper). The experimental condition was performed as described in Fig. 1. In the developing mouse brain, mMeteorin was increased (lower).

고 찰

정상세포는 뇌내의 환경변화를 인지하는 센서로서 작용한다고 보고되어 있으며 특히 뇌내의 산소의 변화를 인지함으로써 정상 세포, 신경세포, 그리고 혈관세포의 성장, 증식이나 분화에 관여 하리라 예상된다. 특히 발생과정과 병적상황에서 뇌의 산소농도 변화가 일어나게 되므로, 이를 매개하는 단백질류와 그 기능을 규명하는 일은 흥미로운 것이다. 본 연구에서는 이러한 아이디어를 바탕으로 정상세포에서 산소농도에 따라 발현이 증가하는 유전자로서 Meteorin을 분리하여 rat Meteorin의 전체 염기서열 을 결정하여 유전자뱅크에 Access No. AY800384로 보고하였다. 특히 인접하게 존재하는 정상세포와 신경세포와 혈관세포는 긴 밀한 상호작용의 가능성을 고려해 볼 때 Meteorin은 뇌 초기 발생 중에서도 발현이 증가되므로 뇌세포의 발생단계에서 정상세포뿐만 아니라 신경세포와 혈관세포의 성장분화에 관여하리라 생각된다. 또한 병리학적측면에서도 microglia 세포의 증가와 정상세포의 활성화과정에서 Meteorin의 역할을 앞으로 규명하여야 할 것이다.

참고문헌

- 1) Volterra, A. and Meldolesi, J. : Astrocytes, from brain glue to communication elements : the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 626 (2005).
- 2) Janzer, R. C. and Raff, M. C. : Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325**, 253 (1987).
- 3) Risau, W. and Wolburg, H. : Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* **13**, 174 (1990).
- 4) Risau, W. : Differentiation of endothelium. *FASEB J.* **9**, 926

- (1995).
- 5) Hackett, P. H. : High altitude cerebral edema and acute mountain sickness. A pathophysiology update. *Adv. Exp. Med. Biol.* **474**, 23 (1999).
 - 6) Krasney J. A. : A neurogenic basis for acute altitude illness. *Med. Sci. Sports Exerc.* **26**, 195 (1994).
 - 7) Plate, K. H. : Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 313 (1999).
 - 8) Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T. and Keshet, E. : Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J. Neurosci.* **15**, 4738 (1995).
 - 9) Lee, S. W., Kim, W. J., Choi, Y. K., Song, H. S., Son, M. J., Gelman I. H., Kim, Y. J. and Kim, K. W. : SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat. Med.* **9**, 900 (2003).
 - 10) Morrison, S. J., Csete, M., Groves, A. K., Melega, W., Wold, B. and Anderson, D. J. : Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J. Neurosci.* **20**, 7370 (2000).
 - 11) Studer, L., Csete, M., Lee, S. H., Kabbani, N., Walikonis, J., Wold, B. and McDay, R. : Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J. Neurosci.* **20**, 7377 (2000).
 - 12) Tanaka, Y., Kanno, H., Dezawa, M., Mimura, T., Kubo, A. and Yamamoto, I. : The role of von Hippel-Lindau protein in the differentiation of neural progenitor cells under normoxic and anoxic conditions. *Neurosci. Lett.* **383**, 28 (2005).
 - 13) Hubank, M. and Schata, D. G. : cDNA representational difference analysis: a sensitive and flexible method for identification of differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* **303**, 325 (1999).
 - 14) Nishino, J., Yamashita, K., Kashiguchi, H., Fujii, H., Shimazaki, T. and Hamada, H. : Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *EMBO J.* **23**, 1998 (2004).