

베타아밀로이드가 신경세포에 미치는 염증 작용 연구

장선아¹, 구현정¹, 강세찬¹, 손은화², 남궁승^{3*}

Effects Amyloid Beta Peptide on the Inflammatory Response in Neuronal Cells

Seon-A Jang¹, Hyun Jung Koo¹, Se Chan Kang¹, Eun-Hwa Sohn², and Seung Namkoong^{3*}

접수: 2013년 8월 6일 / 게재승인: 2013년 8월 23일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Amyloid β peptide ($A\beta$) still best known as a molecule to cause Alzheimer's disease (AD). AD is characterized by the accumulation and deposition of $A\beta$ within the brain, leading to neuronal cell loss and perturbation of synaptic function by causing free radical formation, inflammation and apoptosis. We investigated the inflammatory action of $A\beta$ on two types of brain cells, neuronal cells (SH-SY5Y) and neuroglia cells (C6), and its mechanism. We measured the production of NO-iNOS, TNF- α , and ICAM-1 using RT-PCR and Western blot analysis less than the concentration of cytotoxic effects (> 70% survivability). $A\beta$ had no effect on the production of NO and TNF- α , but significantly increases of iNOS and ICAM-1. Based on this, we suggest that the inflammatory effect of $A\beta$ results from the action of ICAM-1 in neuronal cells, rather than the release of inflammatory mediators such as NO and TNF- α in neuroglia cells. In addition, we confirmed whether p53 was related to the action of $A\beta$ by using SH-SY5Y (p53^{-/-}) dominant cells. Neither the expres-

sion of p53 nor the cytotoxicity of SH-SY5Y (p53^{-/-}) cells were directly affected by $A\beta$. However, ICAM-1 was not expressed in SH-SY5Y (p53^{-/-}) cells. This means that p53-independent pathway exists in the expression of ICAM-1 by $A\beta$ while p53 plays a role as an on-and-off switch.

Keywords: Amyloid β peptide, SH-SY5Y, C6, ICAM-1, p53

1. 서론

알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD)은 기억과 인지에 손실을 주는 퇴행성 뇌질환 (degenerative disease) 중의 하나이다. 알츠하이머병의 주요한 원인은 베타아밀로이드 (amyloid β ; $A\beta$) 펩타이드 (peptide)의 응집으로 인한 뇌세포의 사멸로 알려져 있다 [1,2].

$A\beta$ 는 38개에서 43개 정도의 아미노산으로 이루어져 있는데 특히 신경세포에 독성을 일으키는 것은 42개의 펩티드로 알려져 있다. 즉, 신경세포에서 $A\beta$ ($A\beta$ 1-42)가 과잉 생성되고 이들이 응집을 일으켜 계속 불용성 아밀로이드 덩어리를 형성하면서 병변을 유발한다는 증거가 발견되었다 [3,4].

$A\beta$ 는 생체 조건 내와 실험실 조건 모두에서 신경독성을 가지고 있음이 밝혀졌으며, 합성된 아밀로이드 베타 ($A\beta$ 1-40, $A\beta$ 25-35)에서도 그들의 응집체 또한 쥐의 해마부위 신경세포와 배양한 신경세포 모두에서 독성을 나타내었다 [5-10]. 또한 합성된 $A\beta$ 1-40와 알츠하이머질환을 가진 환자의 뇌에서 얻은 아밀로이드판 중심부위를 쥐의 대뇌에 주입하였을 때 알츠하이머에 특이적으로 나타나는 신경세포의 사멸을 유발하였다 [11,12]. 많은 연구가 $A\beta$ 에 의해 유도되는 신경

¹가천대학교 생명과학과

¹Department of Life Science, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea

²강원대학교 생약자원개발학과

²Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-710, Korea

³강원대학교 물리치료학과

³Department of Physical Therapy, Kangwon National University, Samcheok 245-710, Korea

Tel: +82-33-540-3372, Fax: +82-33-540-3379

e-mail: seungnk@kangwon.ac.kr

세포 사멸 (apoptosis) 과정에 관한 연구로 집중되어져 왔으며, 그 결과 A β 에 의한 신경세포의 사멸 과정에는 자유라디칼의 발생과 신경세포의 사립체의 산화적 손상, 염증반응을 통한 점막적인 시냅스의 손상과 인지기능 소실, 그리고 세포 사멸로의 유도 등을 일으키는 것으로 밝혀졌다 [13-17].

뇌는 신경계의 주요 기능을 담당하는 10%의 신경 (실질)세포와 신경세포의 기능유지 및 영양을 담당하는 90%의 신경교세포로 이루어져 있다. 최근 뇌의 AD, 파킨슨병 (Parkinson's disease; PD) 등에서 발견되는 염증반응에 있어서 신경교세포가 관련되어 있음이 보고되었다. 뇌의 신경교세포의 활성화로 인하여 생성되는 염증반응 cytokine에 의해 신경세포의 사멸이 촉진된다는 것이다. 정상상태의 뇌에서 astrocyte 및 미세아교세포 등의 신경교세포는 신경세포의 분화에 필요한 영양인자로서 cytokine들을 미량 분비함으로써 뇌의 생체 항상성을 유지하는데 기여하지만, 뇌손상에서 제일 먼저 병변부위에 나타나는 신경계 세포는 미세아교세포로 astrocyte의 주요자극인자인 IL-1, TNF를 생산하여 astrocyte를 활성화시키고 [18,19], 자극된 astrocyte는 IL-6, IL-8, TNF, GM-CSF (colony-stimulating factor), IL-5 등의 cytokine을 생성시키고 ROS (reactive oxygen species) 활성화요소의 일종인 peroxynitrite 등을 유도함으로써 신경세포의 사망을 유도한다.

AD의 주요 원인으로 알려진 노화과정에서도 뇌는 pro-inflammatory state (전-염증 상태)로의 전환이 보고되고 있으며, 노화 환경에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 염증성 cytokine의 분비와, 신경교세포의 활성화로 인한 매우 독성이 강한 ROS/RNS (reactive nitrogen species) 생성과 단백질분해효소, 보체기전 등의 활성이 증가됨으로써 근접해 있는 신경의 손상이나 신경세포 사멸을 일으키게 된다고 설명하고 있다 [20,21]. 실제로 Ibuprofen (BRUFEN) 등의 NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs)의 염증 치료제가 AD의 발병률이나 진행을 감소시킨다고 보고되었으며, 이미 AD 환자에게 장기처방이 이루어지고 있어 임상적으로도 인정되고 있다 [22].

그 밖에도 A β 의 전구단백질 APP (β -amyloid precursor protein)를 과도하게 발현하는 AD 질환 동물모델 (Tg2567 transgenic mice)에서는 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , chemoattractant protein-1, COX-2, complement 1q 등의 염증관련 인자들의 발현이 크게 증가하였다고 보고되고 있으며, 이는 A β 의 생성과정 및 침착과 AD 질환의 진행이 염증 반응과 관련되어 있다는 것을 의미한다 [20,21]. AD와 관련된 gene array 연구에 의하면 APP, PS-1 (presenilin-1), PS-2, apoE, Tau 등 이미 AD 원인 물질로 알려진 단백질의 발현 및 대사에 관련된 유전자 그룹과, TGF- β 1, IL-1 α/β , IL-6, TNF- α/β 등 염증 반응과 관련된 cytokine 그룹 및 신경세포부착인자 ICAM-1, NCAM-180 등이 보고되고 있다 [23].

이와 같이 많은 AD의 발병과 A β 의 침착에 대한 염증 반응에 관한 충분한 실험적 증거에도 불구하고, A β 에 대한 연구는 주로 신경세포의 사멸과 사멸기전에 대한 연구로 집중되어져 왔으며, 염증 반응을 유발하는 작용과 그 기전에 대한

연구는 제대로 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 뇌를 이루는 두 가지 종류의 세포, 즉 신경실질세포주 (neuronal cell) SH-SY5Y와 신경교세포주 (neuroglia cell) C6를 이용하여 A β 의 침착이 세포사멸을 일으키지 않는 범위에서 신경계 세포에 미치는 영향을 염증반응과 관련된 마커와 작용 기전을 중심으로 이루어졌으며, 향후 A β 의 침착에 의한 뇌질환 치료에 대하여 선택적인 염증반응 억제제 개발과 기전 규명에 기여하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포주

사람신경모세포종 (human neuroblastoma)인 SH-SY5Y와 쥐 신경교세포 (rat glioma cells)인 C6 세포주는 한국세포은행 (Korean cell bank, Seoul, Korea)에서 구입하였고, 10% fetal bovine serum, penicillin (50 U/mL), streptomycin (100 ug/mL) 이 포함된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)을 사용하였으며, 5% CO₂와 37°C의 배양조건에서 배양하였다.

2.2. 베타아밀로이드 (A β) 침착물의 제조

본 방법은 Hu 등 [24]이 제안한 방법을 참고하여 제조하였고, A β (1-42) peptide는 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO)에서 구입하였다. 더욱 노화된 형태인 acidic 상태의 A β aggregated 형태를 만들기 위해서 1 mM peptide를 10 mM HCl로 제조하고 이를 다시 phosphate buffered saline (PBS)로 10배 희석하였다. 0.1 mM의 peptide 용액은 2일 동안 상온에서 보관하여 aggregation이 일어나게 하고, DMEM로 희석하여 원하는 A β 농도를 맞추어 사용하였다.

2.3. MTT를 이용한 세포독성의 측정

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [25]는 세포 내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 formazan 측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법이다. 96 well plate에 24시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 시료와 함께 배양액을 각각 100 μ L씩 첨가하여 24시간 더 배양시킨 후 25 μ L의 MTT (5 mg/mL) 용액을 첨가하였다. 3시간 동안 배양한 후 DMSO 200 μ L를 첨가하여 생성된 formazan이 녹을 때까지 혼합한 뒤 microplate reader (Menlo, CA)을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. Griess Reagents법을 이용한 NO (nitric oxide)의 생성도 측정

세포를 24시간 배양한 후 상층액 중의 NO 생성농도를 Ding 등 [26]의 방법에 따라 측정하였다. 100 μ L 상층액을 취하여 96 well plate에 옮긴 후 각각의 well에 100 μ L의 Griess 시약을 가하여 5분간 반응 후 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 농도는 NaNO₂를 사용하여 작성한 표준 곡선

으로부터 계산하였다. Griess 시약은 증류수에 녹인 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride와 5% H₃PO₄ 용액에 녹인 1% sulfanilamid를 동량씩 혼합한 것으로 사용하였다.

2.5. RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 측정

Trizol reagent (Invitrogen, Grand Island, NY)를 이용하여 kit에서 제공하는 방법에 따라 total RNA를 추출하였다. 이때 추출된 total RNA는 UV spectrophotometer를 이용하여 1 µg/µL의 농도로 정량하고 추출된 total RNA는 Superscript one-step RT-PCR with platinum Taq kit (Invitrogen, Grand Island, NY)을 이용하여 mRNA 발현량을 측정하였다. 1X reaction buffer, 2 mM MgSO₄, 0.04 µg/µL template RNA, 0.2 µM primer, 0.5 µL/25 µL RT/platinum Taq mix의 조성으로 25 µL의 volume으로 최적조건을 나타내는 cycle로 반응하였다. PCR 반응이 종결된 후 product 중 5 µL를 2% agarose gel에서 전기영동하고 band를 확인하였다. 이때 이용된 primer의 염기 배열은 다음과 같다. iNOS-F: 5'-CAT TCA GAT CCC GAA ACG TAC-3', iNOS-R: 5'-AGC CTC ATG GTG AAC ACG TTC T-3', TNF-α-F: 5'-GCT CCC TCT CAT CAG TTC CA-3', TNF-α-R: 5'-TGT GGG TGA GGA GCA CAT AG-3', β-actin-F: 5'-TGA GAG GGA AAT CGT GCG T-3', β-actin-R: 5'-TCA TGG ATG CCA CAG GAT TCC-3'

2.6. Western blot을 이용한 단백질 발현량의 측정

Aβ를 처리한 세포를 떼어낸 후 원심분리를 하여 세포를 수확하고, 세포 pellet에 homogenization buffer (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 5 ng/mL leupepsin, 0.25 mM PMSF in ethanol, 0.1 TIU/mL aprotinin, 1 mM DTT)를 넣고 80°C에서 10분간 끓인 후 원심분리 (4°C, 13,000 rpm, 30분)하여 상등액을 취해서 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 정량하였다. 총 25 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE gel에 전기영동한 다음 nitrocellulose membrane으로 옮긴 후, membrane을 1시간 동안 상온에서 5% skim milk로 block 처리한 후 pri-

mary antibody를 1시간 동안 상온에서 처리하였다. 세척 후 HRP-conjugated secondary antibody를 1시간 동안 상온에서 처리하고 ECL 용액을 가한 후 필름에 노출시켜 확인하였다.

2.7. Transfected 세포주 [SK-SH-5Y (p53^{-/-})]의 확립

SK-SH5Y 세포를 60 mm 배양접시에 2 × 10⁶ cells/mL의 밀도로 배양하고, DMEM 배양액을 사용하여 control siRNA 또는 siRNA-p53을 각각 FuGENE HD transfection reagent (Promega, Madison, WI)와 1:3 비율로 섞고 상온에서 15분간 두었다가 세포에 24시간 동안 처리하였다.

2.8. 통계처리

모든 자료는 mean±S.E.M으로 표시하였고, 각 실험군 간 유의성은 Student's *t*-test로 검증하여 *p*-value가 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Aβ의 신경세포와 신경교세포의 세포독성효과

Aβ는 신경세포에 독성을 나타내며 세포사멸을 유도한다는 것이 알려져 있다 [1,2]. 신경계의 염증반응은 어떤 자극에 의해서 Aβ의 이상 침착이 일어나고 외부자극과 Aβ의 침착은 신경교세포와 신경세포의 활성화와 그 상호작용에 영향을 미침으로써 염증을 일으킨다 [20,21]. 본 실험에서는 합성 Aβ를 염증반응 유발물질로 사용하기 위하여 2가지 타입의 신경계 세포에 적용하기 위한 Aβ의 농도를 설정하였다. Fig. 1에서 보여주듯이 Aβ (1-42)는 1, 10 µg/mL 농도에서 본 연구에 사용된 신경세포 SH-SY5Y와 신경교세포 C6에서 70% 이상의 세포생존률을 보여주었다. 본 연구는 세포독성이 크게 나타나지 않는 범위에서의 염증반응을 연구하고자 하였으므로, 향후 염증성 마커의 분비와 발현 및 관련 작용기전의 연구를 Aβ 농도 1, 10 µg/mL에서 진행하였다.

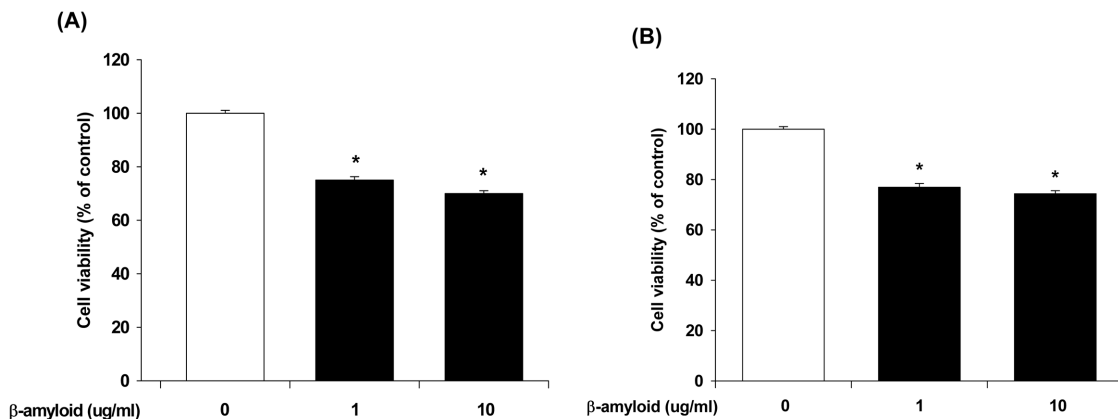


Fig. 1. Effects of Aβ on cell viability in (A) neuronal cells (SH-SY5Y) and (B) neuroglia cells (C6). Cells were treated with various concentrations of Aβ for 24 h and their viability were determined by MTT assay. Data represent the mean of three experiments±SEM. Significant values are represented by an asterisk (**p*<0.05).

3.2. Aβ가 NO-iNOS 생성에 미치는 영향

중추신경계에서 신경세포의 보호 및 영양 기능을 담당하는 신경교세포는 신경독성물질 또는 뇌허혈 등의 노출 시에 활성화되어 NO와 그 분해산물 (ONOO⁻, NO₂, NO₂⁻)의 RNS를 생성하여 신경세포의 염증과 사멸을 매개한다 [27,28]. NO의 생성효소인 NOS (nitric oxide synthase)는 정상적으로 신경세포에서 발현되는 nNOS (neuronal NOS)와 혈관내피세포에서 발현되는 eNOS (endothelial NOS)가 있으며, 각종의 유해인자에 의한 조직손상이 발생할 경우에 활성화된 대식세포, 신경교세포, 간세포 등에서 발현되는 iNOS (inducible NOS) 등의 3가지 동종효소가 있다 [29]. 이 중 iNOS가 병리적 환경에서 과량의 NO를 생성하여 신경세포의 손상을 유도한다고 알려져 있다 [30]. 따라서 본 실험에서는 Aβ가 신경교세포의 활성화와 NO와 iNOS의 생성에 영향을 미치는지 알아보았다. 실험 결과, Aβ는 NO의 분비를 증가시키지 않았지만, iNOS의 mRNA 및 단백질 발현량을 유의적으로 증가시켰다 (Fig. 2). 신경교세포의 활성화에 의한 NO 분비는 iNOS 발현에 의존적으로 나타나는 것으로 알려지고 있으므로 [28], 본 실험

에서 사용한 Griess reagent를 이용한 NO 측정법의 민감도 때문에 측정되지 않은 것으로 여겨지며 그 유의성이 크게 나타나진 않지만, Aβ는 iNOS의 증가와 관련되어 신경교세포의 활성화에 관여하는 것으로 생각된다.

3.3. Aβ가 신경교세포에서의 염증유발인자 TNF-α 발현에 미치는 영향

뇌의 염증상태에서 발견되는 대표적인 pro-inflammatory cytokine으로 TNF-α가 알려져 있다 [20,21]. Aβ의 침착이 신경교세포를 직접 활성화하여 TNF-α를 분비하는지 알아보기 위하여 RT-PCR법을 이용하여 TNF-α mRNA 발현량을 측정하였다. Aβ는 신경교세포의 TNF-α 생성에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 3).

3.4. Aβ가 신경세포에서 염증유발인자 ICAM-1의 발현에 미치는 영향

신경계를 이루는 신경교세포와 신경세포에서 발현되는 세포 부착분자들 (cell adhesion molecules; CAMs)간의 작용은 신

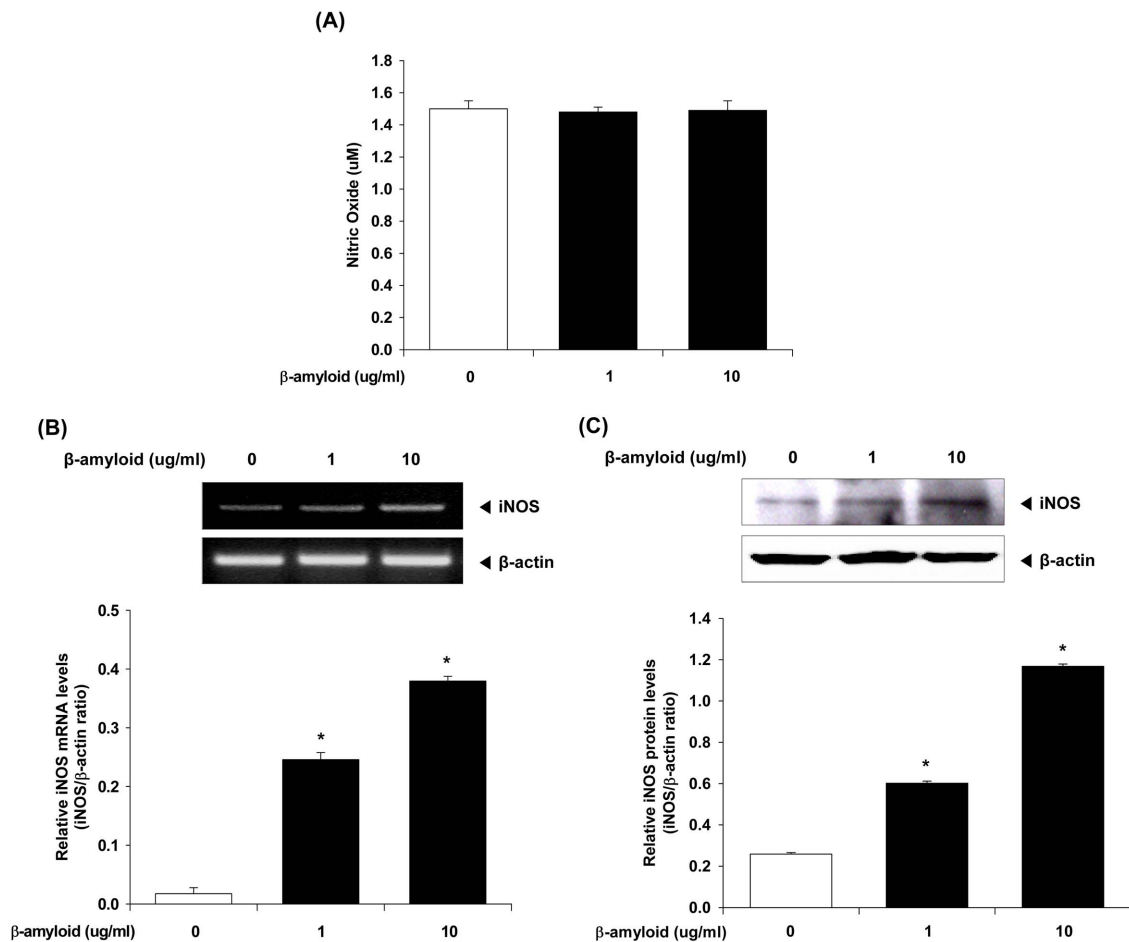


Fig. 2. Effects of Aβ on (A) nitric oxide production and (B), (C) iNOS expression in C6 cells. Cells were treated with various concentrations of Aβ for 24 h. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium. The mRNA and protein expression of iNOS was determined by (B) RT-PCR or (C) Western blot analysis. Densitometric analysis of Western blots is represented as the mean band density normalized to β-actin. Results are expressed as mean±SEM (n=3). Significant values are represented by an asterisk (*p<0.05).

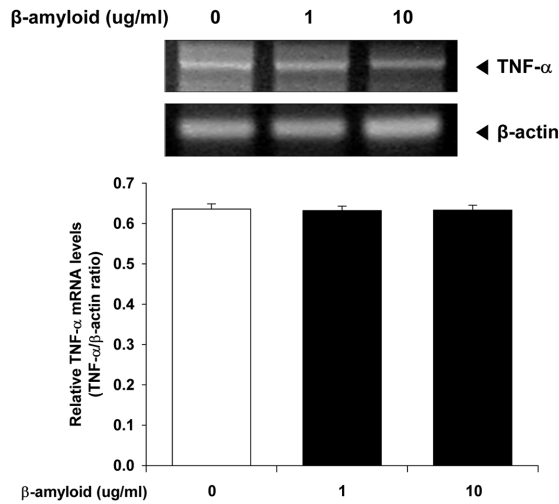


Fig. 3. Effects of Aβ on TNF-α production in C6 cells. Cells were treated with various concentrations of Aβ for 16 h. Total RNA was extracted and subjected to reverse transcription polymerase chain reaction analysis. β-actin served as a housekeeping gene. Results are expressed as mean±SEM (n=3).

경계의 발생과 유지에 있어 중요한 기능을 담당한다. 또한 세포부착분자들의 발현은 신경계 손상으로 나타나는 신경퇴행성 질환과 연관되어 매우 중요한 의미를 지니는데, 그 중 ICAM-1 단백질의 발현 증가는 신경계에서 유발된 염증반응 부위에 lymphocyte와 신경교세포들을 이동시키고 면역세포를 활성화시킴으로써 염증반응을 유발시킨다 [31,32]. 따라서 본 연구에 사용된 Aβ가 신경세포의 ICAM-1 단백질의 발현에 영향을 미치는지 확인하였으며, Aβ에 의해 ICAM-1 단백질의 발현이 농도 의존적으로 증가하였으며 유의적인 차이를 보였다 (Fig. 4).

3.5. Aβ의 p53 유전자 발현조절과 신경세포의 ICAM-1 단백질 발현에 p53의 역할

알츠하이머병에서 나타나는 신경세포의 손상에 있어서 p53 전사인자의 역할은 매우 필수적이다. Buizza 등 [33]은 신경계에서 외부의 산화적 손상에 의한 p53의 구조적 변화가 신경세포를 사멸과정으로 유도하는지 축삭돌기의 성장 등의 생리학적 변화를 일으키는지 등에 대한 결정을 하게 된다고 발표하였다. 본 연구에서는 Aβ가 신경세포의 손상과 염증을 일으키는 과정에서 나타나는 ICAM-1 단백질의 발현에 p53 유전자의 관련성을 확인하고자 하였다.

Fig. 5A에서 보여주는 결과와 같이 Aβ는 p53 유전자 발현에 의한 단백질의 변화에 영향을 미치지 않았다. 이는 신경세포에서 나타난 Aβ에 의한 ICAM-1 단백질의 발현 과정에는 p53-independent 경로가 존재함을 의미한다. p53 유전자 관련성을 확실히 규명하고자 SH-SY5Y (p53^{-/-}) 돌연변이 세포주를 확립하여 베타아밀로이드에 대한 세포독성을 확인하였으며, ICAM-1 단백질의 발현도를 측정하였다. SH-SY5Y (p53^{-/-})는 wild type의 대조군에 비하여 Aβ 처리에 의한 세포독성 변화에 영향을 미치지 않았으나 (Fig. 5B), SH-SY5Y (p53^{-/-})에서는 ICAM-1 단백질의 발현이 현저하게 나타나지 않았다 (Fig. 6).

ICAM-1의 발현조절에 있어서 NF-κB 신호경로가 관련되어 있다는 것은 잘 알려져 있다 [31,32]. 그러나 ICAM-1 발현에 있어서 NF-κB 비의존성 경로가 존재하며, p53 의존성 경로의 존재에 대한 보고가 있었다 [33,34]. Gorgoulis 등은 DNA 손상에 대한 NF-κB의 억제가 p53경로를 통한 ICAM-1의 발현에 영향을 미치지 않았으며, p53 inhibitor pifithrin-α를 처리하거나 p53 결핍세포주에 대하여 ICAM-1의 발현이 일어나지 않았다고 보고하였다. 또한, 동맥경화증에 있어서 인간 섬유아세포와 혈관평활근세포에서도 p53을 경유한 ICAM-1의 발현이 나타남을 보고하였다. 본 연구 결과에서도 p53 결

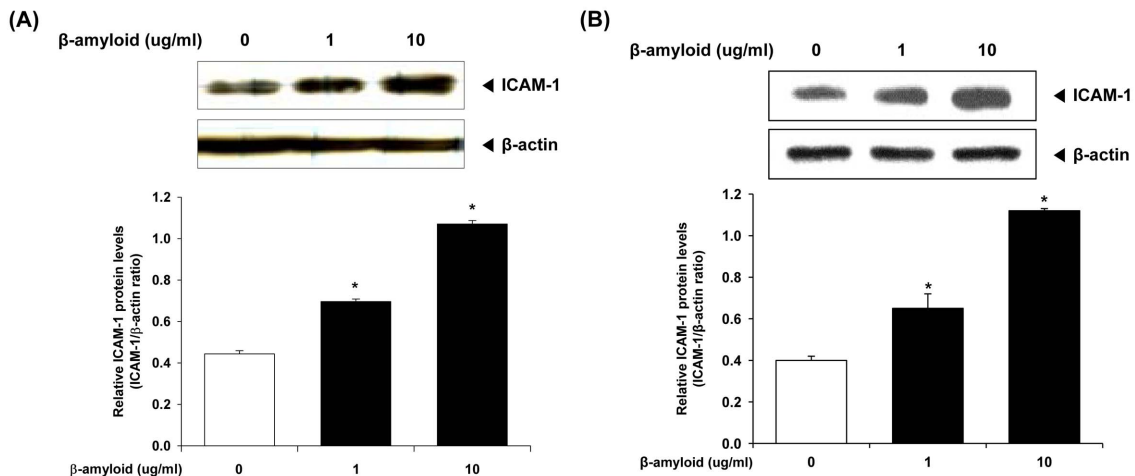


Fig. 4. Effects of Aβ on ICAM-1 expression in (A) C6 and (B) SH-SY5Y cells. Cells were treated with various concentrations of Aβ for 24 h. The level of ICAM-1 expression was determined by Western blot analysis. Densitometric analysis of Western blots is represented as the mean band density normalized to β-actin. Results are expressed as mean±SEM (n=3). Significant values are represented by an asterisk (*p<0.05).

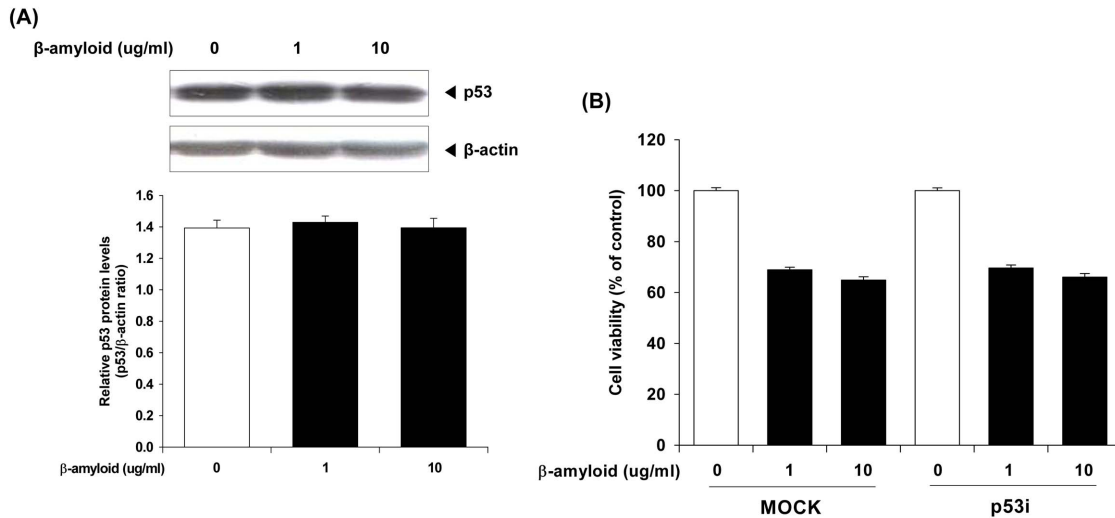


Fig. 5. Effects of Aβ on (A) p53 expression in SH-SY5Y cells and (B) cell viability in SH-SY5Y cells transfected with p53 siRNA. (A) Cells were treated with various concentrations of Aβ for 24 h. The level of p53 expression was determined by western blot analysis. Densitometric analysis of Western blots is represented as the mean band density normalized to β-actin. Results are expressed as mean±SEM (n=3). (B) p53 siRNA transfected cells were treated with various concentrations of Aβ for 24 h. The cytotoxicity were assessed by MTT assay. Cell density was measured at a wavelength of 540 nm. Data represent the mean of three experiments±SEM.

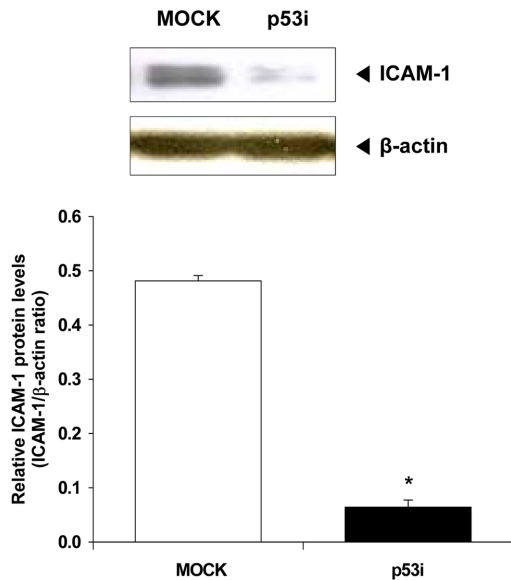


Fig. 6. Steady state levels of ICAM-1 expression in SH-SY5Y cells transfected with p53 siRNA. Cells were transfected with control siRNA or siRNA-p53 for 24 h and treated with Aβ (10 μg/mL) for 24 h. The level of ICAM-1 expression was determined by western blot analysis. Densitometric analysis of Western blots is represented as the mean band density normalized to β-actin. Results are expressed as mean±SEM (n=3). Significant values are represented by an asterisk (*p<0.05).

핀 SH-SY5Y 신경모세포에 있어서 ICAM-1의 발현이 나타나지 않았으며, 이는 p53 유전자가 ICAM-1의 발현에 필수적인 역할을 보여준 것이다. 그러나 신경세포의 ICAM-1의 발현에 있어서 p53의 유전자는 on-and-off switch 역할을 하는 필수요소로 생각되지만, Aβ 자극에 의한 ICAM-1 단백질 발현

조절에는 또 다른 p53 비의존적인 경로가 존재한다. 즉, Aβ 자극에 의한 신경세포의 ICAM-1의 발현에는 p53의 역할이 핵심적이면서 동시에 p53 비의존성 경로에 의해 조절됨을 시사한다.

4. 결론

뇌에서의 베타아밀로이드의 침착은 신경세포와 신경교세포에 염증을 일으킴으로써 신경세포의 독성을 일으킨다. 본 연구결과에 의하면 베타아미로이드 펩타이드 (Aβ1-42)는 신경세포와 신경교세포에 영향을 미침으로써 뇌염증을 일으킨다. Aβ가 신경세포 및 신경교세포에 독성을 일으키지 않는 범위 (생존률 > 70%)에서 각 두 가지 타입의 세포에 처리하여 염증 유발 요소들을 측정 한 결과 Aβ는 신경교세포를 활성화하여 NO 및 TNF-α를 증가시키기보다는 신경세포를 자극하여 염증관련세포를 염증부위에 모이게 함으로써 염증반응을 확대하는 주요 요인이 되는 세포부착분자 ICAM-1 단백질의 합성을 증가시키는 것으로 생각된다. 신경세포와 신경교세포간의 상호반응에서 ICAM-1 단백질의 생성의 증가는 염증 유발 인자로 알려져 있으며, ICAM-1 단백질 발현의 역할이 항염증 치료제 개발의 타겟으로도 인식되고 있다. Aβ에 대한 신경세포의 손상에서 주요 전사인자로 알려진 p53의 관련성을 알아보기 위하여, Aβ가 p53 발현에 미치는 영향과 신경세포 SH-SY5Y (p53^{-/-})에서의 ICAM-1 단백질의 발현도를 측정 한 결과 Aβ는 p53의 발현에 영향을 미치지 않는었으나, SH-SY5Y (p53^{-/-})에서는 ICAM-1 단백질의 발현이 나타나지 않았다. 이는 Aβ에 의한 ICAM-1 단백질의 발현에는 p53-independent pathway가 존재하는 것을 의미하지만 p53은 ICAM-1

단백질의 발현에 있어서 on-off switch 역할을 하는 결정적인 역할을 하는 것으로 보인다. 본 연구결과는 A β 침착에 의한 알츠하이머병의 염증 치료에 있어서 ICAM-1 단백질의 억제적 조절기전을 가진 치료제 개발에 기초자료로 제공될 수 있다.

REFERENCES

- Pietrzik, C. and C. Behl (2005) Concepts for the treatment of Alzheimer's disease: Molecular mechanisms and clinical application. *Int. J. Exp. Pathol.* 86: 173-185.
- Silverberg, G. D., M. Mayo, T. Saul, J. Carvalho, and D. McGuire (2004) Novel ventriculo-peritoneal shunt in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers. *Expert Rev. Neurother.* 4: 97-107.
- Barril, X., M. Orozco, and F. J. Luque (2001) Towards improved acetylcholinesterase inhibitors: A structural and computational approach. *Mini Rev. Med. Chem.* 1: 255-266.
- Gong, Y., L. Chang, K. L. Viola, P. N. Lacor, M. P. Lambert, C. E. Finch, G. A. Krafft, and W. L. Klein (2003) Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A-beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 10417-10422.
- Yankner, B. A., L. K. Duffy, and D. A. Kirschner (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250: 279-282.
- Mattson, M. P., B. Cheng, D. Davis, K. Bryant, I. Lieberburg, and R. E. Rydel (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12: 376-389.
- Pike, C. J., D. Burdick, A. J. Walencewicz, C. G. Glabe, and D. W. Cotman (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: The role of peptide assembly state. *J. Neurosci.* 13: 1676-1687.
- Takashima, A., K. Noguchi, K. Sato, T. Hoshino, and K. Imahori (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7789-7793.
- Behl, C., J. B. Davis, R. Lesley, and D. Schubert (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77: 817-827.
- Shearman, M. S., C. I. Ragan, and L. L. Iversen (1994) Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 1470-1474.
- Frautschy, S. A., A. Baird, and G. M. Cole (1991) Effects of injected Alzheimer beta-amyloids in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 8362-8366.
- Kowall, N. W., M. F. Beal, J. Busciglio, L. K. Duffy, and B. A. Yankner (1991) An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta-amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7247-7251.
- Selkoe, D. J. (2001) Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81: 741-766.
- Mattson, M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631-639.
- Reddy, P. H. and M. F. Beal (2005) Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* 49: 618-632.
- Reddy, P. H. and S. Weeney (2006) Mapping cellular transcriptomes in autopsied Alzheimer's disease subjects and relevant animal models. *Neurobiol. Aging* 27: 1060-1077.
- Tanzi, R. E. and L. Bertram (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell* 120: 545-555.
- Skaper, S. D. (2012) Alzheimer's disease and amyloid: Culprit or coincidence? *Int. Rev. Neurobiol.* 102: 277-316.
- Rubio-Perez, J. M. and J. M. Morillas-Ruiz (2012) A review: Inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Scientific World J.* 2012: 756357.
- Selkoe, D. J. (2005) Defining molecular targets to prevent Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 62: 192-195.
- Selkoe, D. J. (2003) Folding proteins in fatal ways. *Nature* 426: 900-904.
- Rich, J. B., D. X. Rasmussen, M. F. Folstein, K. A. Carson, C. Kawas, and J. Brandt (1995) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Neurology* 45: 51-55.
- Wei, X., Y. Zhang, and J. Zhou (1999) Alzheimer's disease-related gene expression in the brain of senescence accelerated mouse. *Neurosci. Lett.* 268: 139-142.
- Hu, J., K. T. Akama, G. A. Krafft, B. A. Chromy, and L. J. Van Eldik (1998) Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: Morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain. Res.* 785: 195-206.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63.
- Ding, A. H., C. F. Nathan, and D. J. Stuehr (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407-2414.
- Barron, K. D. (1995) The microglial cell. A historical review. *J. Neurol. Sci.* 134: 57-68.
- Boje, K. M. and P. K. Arora (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxide mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 587: 250-256.
- Dawson, T. M., J. Zhang, V. L. Dawson, and S. H. Snyder (1994) Nitric oxide: Cellular regulation and neuronal injury. *Prog. Brain Res.* 103: 365-369.
- Kleinert, H., P. M. Schwarz, and U. Frstermann (2003) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol. Chem.* 384: 1343-1364.
- Satoh, J., L. F. Kastrukoff, and S. U. Kim (1991) Cytokine-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cultured human oligodendrocytes and astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 50: 215-216.
- Ballestas, M. E. and E. N. Benveniste. (1995) Interleukin 1-beta and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of ICAM-1 gene expression in astrocytes requires protein kinase C activity. *Glia* 14: 267-278.

33. Buizza, L., C. Prandelli, S. A. Bonini, A. Delbarba, G. Cenini, C. Lanni, E. Buoso, M. Racchi, S. Govoni, M. Memo, and D. Uberti (2013) Conformational altered p53 affects neuronal function: Relevance for the response to toxic insult and growth-associated protein 43 expression. *Cell Death Dis.* 4: e484.
34. Gorgoulis, V. G., P. Zacharatos, A. Kotsinas, D. Kletsas, G. Mariatos, V. Zoumpourlis, K. M. Ryan, C. Kittas, and A. G. Papavassiliou (2003) p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NFκB-independent manner. *EMBO J.* 22:1567-1578.
35. Gorgoulis, V. G., H. Pratsinis, P. Zacharatos, C. Demoliou, F. Sigala, P. J. Asimacopoulos, A. G. Papavassiliou, and D. Kletsas (2005) p53-dependent ICAM-1 overexpression in senescent human cells identified in atherosclerotic lesions. *Lab. Invest.* 85:502-511.