J. Fd Hyg. Safety 9(4), S9-S13(1994)

랫드 뇌신경세포의 Glutamate에 의한 흥분독성과 Phospholipase A_2 효소의 활성증가

김 대 경
중앙대학교 약학대학
서울시 동작구 흑석동 221, 756-156

I. 서 론

뇌졸중 및 노망과 같은 허혈성뇌질환에 대한 예방과 치료제의 개발이 절실히 요구되는 현실에 비추어 뇌세포의 손상메카니즘을 규명하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 일반적으로 심장혈관계의 기능이상에 의한 shock와 저혈압, 혈소판 응집에 의한 혈전형성, Mitochondria의 기능상실에 의한 에너지 대사의 이상 등으로 인해 세포와 조직은 허혈상태(Ischemia), 저산소(Hypoxia) 또는 무산소 상태(Apoxia)에 빠지게 된다.[1,2] 이러한 상태에서 Phospholipase A_2 (PLA_2)효소가 활성화되어 세포막 구성성분인 인지질(Phospholipids)을 가수분해하여 Arachidonic acid와 Lysophospholipids를 생성시킨다. 이렇게 생성된 유리 Arachidonic acid로부터 강력한 생리활성물질인 Prostaglandins과 Leukotrienes등 소위 Arachidonic acid 대사물질들(Eicosanoids)이 합성되고, 계면활성제와 같은 구조와 역할을 가지는 Lysophospholipids는 그 자체에 의해 세포막을 파괴하기도 하고, 또한 강력한 생리활성을 가지는 Platelet Activating Factor (PAF)의 생합성을 위한 전구물질로 쓰여지기도 한다.[3] PLA_2의 활성화는 이렇게 세포막을 분해, 파괴시킬 뿐만 아니라 그 생성물의 생리활성으로 세포와 조직의 생리적 기능을 상실케 하므로써 손상을 일으키고 생체를 각종 염증을 비롯하여, 뇌졸중, 노망과 심장마비 등의 허혈성 질병 상태에 빠지게 한다.

현재까지 알려진 PLA_2 효소는 크게 Group I, Group II 그리고 세포질 PLA_2 ($cPLA_2$)의 세가지의 Isozymes이 있으며 일차구조 뿐 아니라 기질특이성, 세포내의 국재성 및 생화학적 특성 등에 있어서 각각 다르며 세포내에 있어서의 그 역할 또한 다르리라 예상된다. Group I과 Group II PLA_2는 분자량 14 kDa이며 mM의 Ca^{2+} 농도에서 최적활성을 나타내고, 많은 Disulfide 결합을 가지는, 화학적으로 안정한 단백질로 몇 개의 아미노산을 제외하고 거의 같은 일차구조를 가지지만 3차구조의 상이성으로 인하여 그들은 각각 기질특이성과 계면활성제에 의한 영향 등에 있어서 현저히 다르다. Group I PLA_2는 췌장에 주로 존재하며, 외분비되어 지방의 소화에 관여하리라 생각되며, Group II PLA_2는 혈소판이 활성화될 때 과립(α-granule)으로부터 분비되며 또한 몇몇 염증국소에서도 발견되므로 염증과의 관련성이 예상된다. 한편, 최근에 발견된 세포질 PLA_2는 세포질에 국재하며 분자량 약 100 kDa의 비교적 고분자량이며, Arachidonic acid를 함유하는 인지질에 선택성을 가지는 효소이며 세포가 활성화될 때에 증가하는 μM의 Ca^{2+} 농도에서 최적활성을 나타내는 효소로 세포의 신호전달과정에서 활성화된다.[4,5]

Glutamate는 생체내의 뇌신경전달물질로서 잘 알려진 아미노산의 일종이지만 과량의 유리와 재흡수의 이상 등으로 고농도로 뇌신경세포에 노출되면 소위 흥분독성(excitotoxicity)을 일으키며, 일반적으로 이러한 Glutamate에 의한 아미노산성 뇌세포의 흥분독성과 위에서 언급한 허혈성 뇌손상과는 매우 흡사한 생화학적 메카니즘에 의한다고 인식되어 뇌손상 메카니즘의 연구에 널리 이용되어 왔다. Glutamate의 뇌조직 흥분독성 발현은 Postsynapse에 국재하는 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)수용체를 통하여 그 신호가 전달되어 뇌신경세포의 막투과성, 탈분극, 세포내의 Ca^{2+} 이온의 증가 등을 유도하고 최종적으로 세포막의 파괴와 과량의 수분유입에 의해 세포가 파괴되리라 생각되고 있다.

본 연구자는 일차배양 뇌신경세포를 이용하여 이러한 과정에서 어떠한 PLA_2효소가 어떻게 활성화되는가를 검토하고, PLA_2의 세포손상에 있어서의 역할과 기능을 규명하기 위해 본 연구를 수행하였다.

실험방법

뇌신경세포의 배양 및 세포의 활성화

생후 하루 내지 이틀된 Long Evans 랫드로부터 신경세포와 Glial 세포를 분리하고 poly-L-lysine coated dishes에서 5% rat serum, 0.5 mM Glutamine과 21 mM Glucose를 첨가하여 세포를 배양시킨다. 이때 신경세포가 아닌 세포는 10 μM의 uridine-deoxyuridine을 첨가하여 증식을 억제하고 14일과 16일만에 실험에 이용하였다. 여러 농도의 Glutamate를 20분간 처리하여 신경세포를 활성화시켰다.

Intact neuronal cell에서의 Glutamate에 의한 Arachidonic acid의 유리

Glutamate를 일차배양 뇌신경세포에 처리하였을 때 PLA_2의 생성물인 Arachidonic acid가 유리되는가를 검토하기 위하여 Tritium([^{3}H])으로 표식된 Arachidonic acid를 배양액에 함유시켜 생체막 인지질에 결합시킨 후 Glutamate를 처리했을 때 배지로 유리된 Arachidonic acid의 양을 측정하였다.

Cell-free system에서의 외인성 기질(liposome PC 또는 PE)을 사용한 PLA_2활성의 측정

이때 Glutamate를 처리한 신경세포를 수집하여 세척하고 Homogenation buffer (50 mM Hepes, 250 mM Sucrose, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, Protease inhibitors)로 Homogenization과 원심분리에 의해 가용성분획을 얻은 후 Sonication Method에 의해 세포를 파괴한 후 세포질 분획에 대해 PLA_2효소 활성을 측정하였다. 이 세포질 분획을 Superose 12의 Gel filtration 크로마토그라피와 Heparin-Sepharose Affinity 크로마토그라피에 의해 각 Type의 PLA_2 isoenzymes으로 분리한 후 어느 Type의 PLA_2가 Glutamate에 의해 활성이 증가되었는가를 검토하였다.

PLA_2효소 활성의 측정

기질로서 1-Stearoyl-2-[1-^{14}C]arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (2-[1-^{14}C]AA-GPC) 또는 1-acyl-2-[1-^{14}C]arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (2-[1-^{14}C]AA-GPE)을 사용하였으며 75 mM Tris/HCl, pH 9.0, 5 mM $CaCl_2$의 조건에서 효소시료와 함께 incubation하고, 유리된 [1-^{14}C]AA를 β-scintillation counting으로 효소활성을 측정하였다.[5]

실험결과 및 고찰

Intact cell 또는 cell-free system에서의 PLA_2활성을 측정한 결과 Glutamate의 처리에 의해 현저한 활성 증가를 보여주었다(Fig. 1, 2). 특히 Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 cell-free system에서 활성의 증가는 이러한 안정된 화학적 수식에 의한 활성증가로 판단되며 그 메카니즘을 알기위해 PKC를 활성화하는 Phorbol ester인 PMA를 처리했을 때 현저한 활성증가를 보였으며(Fig. 3A), 또한 전처리에 의해 PKC를 Down-Regulation시킨 신경세포에서는 Glutamate에 의해 PLA_2효소의 활성증가는 나타나지 않았다(Fig. 3B). 이러한 실험결과로부터 PKC에 의한 인산화에 의해 활성이 증가되었으리라 생각된다.

이 신경세포의 가용성 분획의 PLA_2효소활성은 Gel Filtration 크로마토그라피 또는 Heparin-Sepharose 크로마토그라피에 의해 두 활성으로 분리되었으며 두 활성 모두 Glutamate에 의해 현저히 증가하였다 (Fig. 4). 이 중에서 Heparin에 결합하지 않는 활성을 Mono Q 음이온 또는 Gel filtration 크로마토그라피

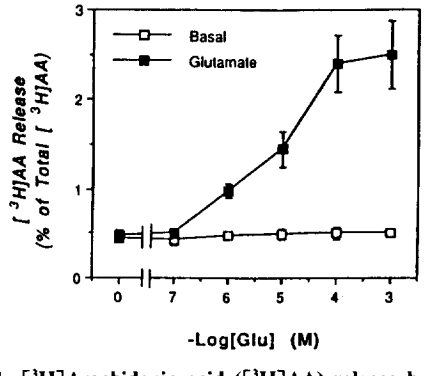

Fig. 1. [^{3}H]Arachidonic acid ([^{3}H]AA) release by glutamate in cortical cultures.
Cortical cultures were prelabeled with [^{3}H]AA (0.2 μCi/ml) overnight. The cells were washed three times with fresh culture medium. After further incubation for 30 min, the various concentrations of glutamate were added to the culture media and an aliquot of each medium was collected for quantitation of released [^{3}H]AA after 20 min. The data represent mean± standard errors of mean (SEM) from three independent experiments.

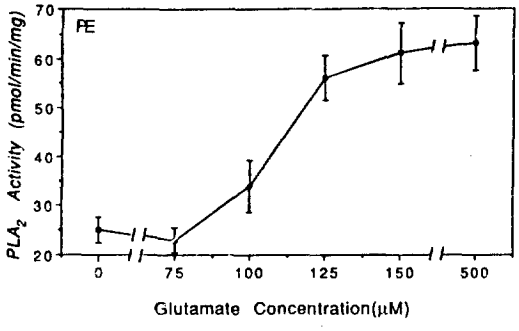

Fig. 2. Effect of glutamate on PLA_2 activity in cortical cultures.

PLA2 activity was measured in control extracts and extracts of neurons exposed to 500 μM of glutamate for 20 minutes. PLA_2 activity was significantly increased after exposure to glutamate as compared with control cell activity. The enzyme activity, determined using PE as substrate, was enhanced for doses of glutamate equal or greater than 125 μM. The experiment was perfomed on sister cultures from a single plating and repeated in three separate cell platings. A representative curve is shown.

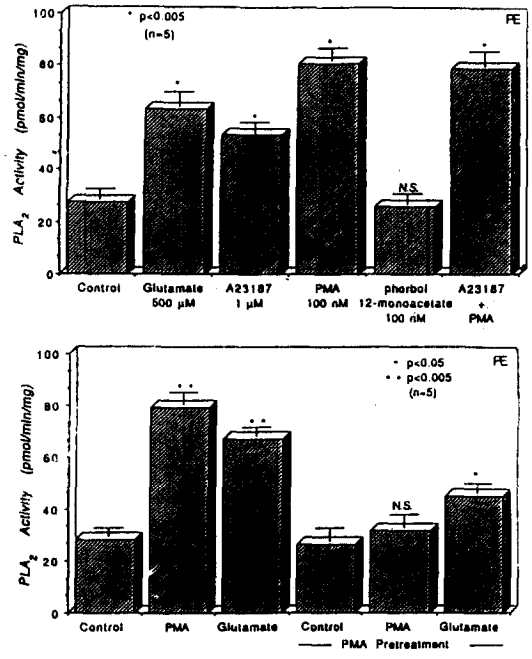

Fig. 3. Effects of A23187 and PMA on PLA_2 activity.

A-PLA_2 activity in extracts of cortical cultures exposed to glutamate, a calcium ionphore or a phorbol myristate acetate (PMA). Exposure of cortical cultures to glutamate, A23187 and PMA enhanced PLA_2 activity, with the largest effects seen with PMA. The effects of A23187 and PMA on PLA_2 activity were not additive. Treatment of the cultures with the inactive phorbol ester (phorbol 12-monoacetate) with no effect on PKC, did not enhance PLA_2 activity. 2-[1-^{14}C]AA-GPE was used as substrate. Error bars represent standard error of the mean in experiments on five platings. B-Effect of PKC down-regulation on glutamate's ability to increase PLA_2 activity. After 16 hours of exposure to 16 μM PMA, PLA_2 activity was at a baseline level. Acute exposure to PMA failed to stimulate PLA_2 activity and glutamate's effect on PLA_2 activity was significanty reduced in protein kinase C down-regulated cells. Error bars represent standard errors of the mean in experiments performed on five platings.

등으로 더욱 분리하거나, 항체를 이용한 면역화학적 방법 등에 의해 이 효소활성은 100 kDa의 세포질 PLA_2효소임을 알았고, Heparin에 결합한 효소활성은 그 Profile이나 Gel filtration 크로마토그라피 또는 면역화학적 방법에 의해 분자량 약 14 kDa의 효소로서 기존에 알려진 Group I 또는 Group II의 PLA_2 효소와는 다른 새로운 Type임을 알았다. 이들의 효소활성 모두가 화학적으로 안정된 수식에 의해 그 활성이 증가되었기 때문에 몇몇 활성증가에 대한 메카니즘이 예상된다. 즉 non-NMDA 수용체 즉 Metabotropic 수용체에 의해 PKC가 활성화되어 직접 PLA_2효소를 인산화시킬 수 있다. 또한 Ca^{2+} 이온 증가에 의해 활성화되는 MAP kinase에 의해 인산화될 수 있겠으며, 몇몇 연구자들에 의해 주장되어온 GTP-binding protein에 의해 직접 활성화될 가능성도 있다. 이러한 점들을 고려하여 이들 각각의 활성에 대해 Ca^{2+} 이온의 요구성을 조사하였다(Fig 5, 6). 두 활성은 모두 Ca^{2+} 이온을 요구하였고, Glutamate를 처리한 경우의 고분자량 PLA_2효소 활성은 모든 범위의 Ca^{2+} 이온 농도에서 증가를 보여 Ca^{2+} 이온에 의한 활성변화의 민감성은 관찰되지 않았다 (Fig. 5). 한편, Heparin affinity column에 결합하는

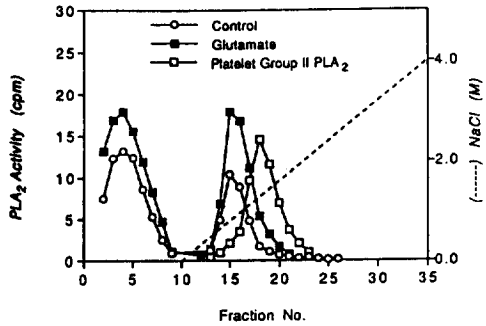

Fig. 4. Heparin-sepharose chromatographic separation of cytosolic PLA_2 activity.

There are two major peaks of PLA_2 activity in soluble fractions from control and glutamate-treated brain cortical cultures, one in the flow-through fractions (heparin non-binding), and one that elutes with a peak at 0.8 M NaCl (heparin-binding). There is increased activity in each of the two peaks in the extracts from glutamate-treated cells as compared with control cells. For comparison a 100,000×g supernatant of rat platelets was also loaded onto this column and eluted under the same conditions as neuronal PLA_2. Platelets group II activity eluted at a higher NaCl concentration than did the nerral heparin-binding activity. 2-[1-^{14}C]AA-GPE was used as substrate for PLA_2 activity.

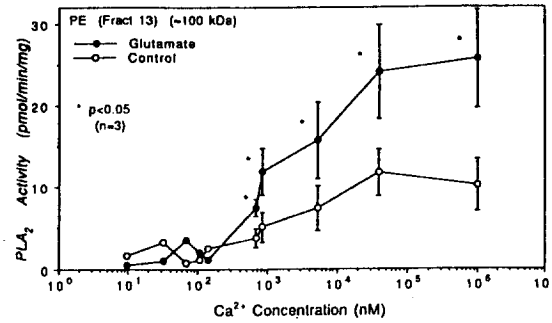

Fig. 5. PLA_2 activity of the larger molecular weight form as a function of $[Ca^{2+}]$.

Cell extracts were prepared from cultures exposed to 500 μM glutamate and from control sister cultures and fractionated by Superose 12 FPLC gel filtration chromatography. The activity of the larger form of the enzyme increased when $[Ca^{2+}]$ was increased over the physiological range (0.1～1.0 μM). PLA_2 activity at these Ca^{2+} concentrations was significantly enhanced by exposure of the cells to 500 μM glutamate for 20 minutes. 2-[1-^{14}C]AA-GPE was the substrate. Error bars represent standard errors of the mean in experiments on 3 platings.

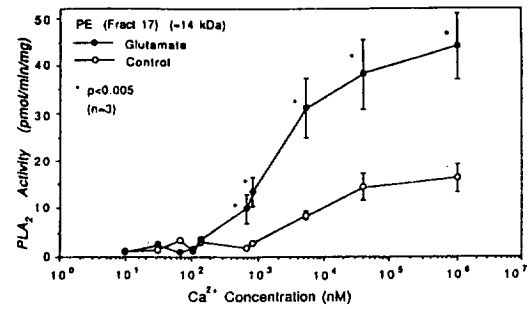

Fig. 6. PLA_2-activity of the smaller form as a function of $[Ca^{2+}]$.

The difference between the PLA_2 activity in cultures exposed to 500 μM glutamate for 20 minutes and control sister cultures was greater for the smaller molecular weight form of the enzyme fractioned on a Superose 12 FPLC column. Glutamate stimulation of cells induced a Ca^{2+}-dependent increase in cytosolic PLA_2 activity at significantly lower Ca^{2+} concentrations (1 μM) than observed in control cultures (5 μM). 2-[1-^{14}C]AA-GPE was the substrate. Error bars represent standard errors on experiments on three platings.

저분자량의 PLA_2효소의 경우, 정상적인 세포로부터 부분정제한 효소의 활성은 생리적으로 세포가 활성화될 때 증가하는 약 5×10^{-7} M의 Ca^{2+} 이온 농도에서 전혀 그 활성을 나타내지 않으나, Glutamate를 처리한 세포로부터 부분정제한 효소의 활성은 같은 Ca^{2+} 이온의 농도에서 현저한 활성을 획득하였다(Fig. 6). 이러한 활성 변화의 메카니즘은 지금까지 알려지고 또 예상되어온 것과는 다르므로 이러한 화학적 수식의 실체를 규명함은 물론 또한 그 효소의 실체를 밝히는 것은 앞으로 흥미있는 연구과제라고 생각된다. 이러한 효소활성 이외에도 Fig. 7에서 보여주는 바와 같이 Ca^{2+} 이온에 비의존적인 효소활성을 동정하였으며, 이들이 어떻게 세포손상과 관련하여 활성화되며, 이 과정에서의 그들의 역할을 규명하는 연구가 계속 진행되어야 할 것이다.

마지막으로 이러한 연구와 관련된 또다른 실험모델로서 뇌조직세포를 메칠수은과 망간과 같은 중금

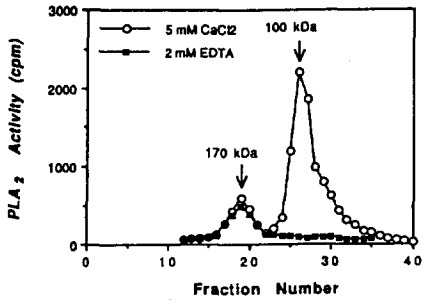

Fig. 7. Superose 12 FPLC gel filtration chromatography of heparin-non-binding fractions of cortical cell extracts.

Cortical brain culture extract was applied to a Heparin-Sepharose column (HiTrap 1 m*l*, Pharmacia Biotechnology Inc.). The heparin-non-binding fractions were collected and a portion of the active sample was concentrated into 250 μ*l*. The concentrate was applied to a 24-m*l* Superose 12 column and eluted at 0.5 m*l*/min, 1 m*l* fractions were collected. PLA_2 activity was measured using 2-[1-^{14}C]AA-GPC in the presence of 5 mM $CaCl_2$ or 5 mM EGTA. The column was calibrated using the following standards (bovine serum albumin; 66 kDa, ovalbumin; 45 kDa, porcine pancreatic PLA_2; 13.5 kDa).

속에 노출시킨 결과 Arachidonic acid가 현저히 유리되며 이와 평행하여 세포사를 관찰할 수 있었기 때문에, 중금속에 의한 뇌조직 손상에 PLA_2효소가 깊히 관련되어 있으리라 예상되며 수은을 비롯한 여러 중금속에 의한 뇌손상 메카니즘을 이들 효소와 관련하여 그 역할을 규명하므로써 이와 관련된 질병을 예방하고 치료할 수 있는 방법을 이해하는 데에 연구의 초점이 주어질 전망이다.

참고문헌

1. Nguyen, V.D., Cieslinski, D.A. and Humes, H.D. *J. Clin. Invest.*, **82**, 1085-1105 (1988).
2. Bonventre, J.V., *Kidney Int.*, **43**, 160-178 (1993)
3. Force, T. and Bonventre, J.V.: In Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume regulation. edited by K. Strange, Ann Arbor, CRC Press, pp. 147-180 (1994).
4. Dennis, E.A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 13057-13061 (1994).
5. Kim, D.K., Kudo, L. and Inoue, K., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1083**, 80-88 (1991).