

Sphingosine Kinase 활성제인 K6PC-5의 1-methyl-4-phenylpyridinium 유발 도파민성 신경세포 사멸에 대한 보호 작용

전남대학교 의과대학 생리학교실, ¹전남대학교 의학연구소, ²여수 전남병원 가정의학과

장수정 · 최승식² · 김송희 · 박종성¹ · 정한성^{1*}

Protective Effects of K6PC-5, A Sphingosine Kinase Activator, Against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced Dopaminergic Neuronal Cell Death

Sujeong Jang, Seung Sik Choi², Song Hee Kim, Jong-Seong Park¹ and Han-Seong Jeong^{1*}

Department of Physiology, Chonnam National University Medical School, ¹Chonnam National University Research Institute of Medical Sciences, Gwangju, ²Department of Familial Medicine, Yeosu Chonnam Hospital, Yeosu, Korea

Sphingosine-1-phosphate (S1P), a bioactive sphingolipid metabolite, regulates multiple cellular responses such as Ca^{2+} signaling, cellular growth and survival, and differentiation. Sphingosine kinase (SphK) is a key enzyme in modulating the levels of S1P and is emerging as an important regulating enzyme. Here we have investigated whether K6PC-5, a newly synthesized SphK activator, plays a neuroprotective role by activating cell survival systems such as protein kinase C, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), and acting on the anti-apoptotic and the pro-apoptotic genes in SN4741 dopaminergic cells. 1-methyl-4-phenylpyridinium is a neurotoxin that selectively inhibits the mitochondrial functions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. In the present study, we found that MPP^+ induced a decrease in SN4741 mouse dopaminergic cell viability. K6PC-5 restored the reduced phospho-PKC and phospho-PI3K activities caused by MPP^+ toxicity. In addition, gene expression analysis revealed that K6PC-5 prevented both the MPP^+ -induced expression of the pro-apoptotic gene mRNA, Bax, and the decrease of the anti-apoptotic gene mRNA, bcl-w. These results suggest that the neuroprotective mechanism of K6PC-5 against MPP^+ -induced apoptotic cell death includes stimulation of PKC and PI3K, and modulation of cell survival and death genes.

Keywords: K6PC-5 compound; Sphingosine kinase-1; 1-methyl-4-phenylpyridinium; Parkinson disease; Dopaminergic agents

서 론

파킨슨병은 흔한 퇴행성 신경질환으로 55세 이상의 노인

층에 주로 나타나지만 청년이나 유소년에서도 드물게 나타날 수 있다. 그 특징적 병변은 흑질(substantia nigra)에서 나타나는 도파민성 신경세포의 50~70%가 상실되며 병리학적 소견으로는 남아있는 도파민성 신경세포에 호산성 Lewy body를 보이게 된다. 현재까지 알려진 원인으로는 산화성 스트레스, 비정상 단백질의 응집 등의 환경적 요인과 유전적 요

게재결정: 2008년 7월 23일

*교신저자: 정한성, 501-760, 전남대학교 의과대학 생리학교실, Phone: 062-220-4273, FAX: 062-232-1242, E-mail: jhsjeong@hanmail.net

인 모두 파킨슨병의 진행에 관여한다고 알려져 있으나 아직도 이에 대한 연구들이 계속 진행되고 있는 실정이다.¹⁻⁴ 파킨슨병에 관한 연구는 신경독들을 사용하여 만든 모델에서 주로 시행되고 있는데 특히 catecholamine성 신경만을 선택적으로 파괴하는 것으로 알려진 6-hydroxydopamine (6-OHDA)과 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)이 널리 사용된다. 이 중 MPTP는 뇌혈관장벽을 통과하여 성상세포(astrocyte)에서 MAO-B에 의하여 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)로 대사된 다음 transporter molecule에 의하여 도파민성 신경으로 들어가 mitochondrial complex I을 억제함으로써 세포 독성을 나타낸다고 알려져 있다. 이 외에도 살충제에서 발견된 rotenone과 제초제에서 발견된 paraquat이 인간에게도 파킨슨병을 유발함이 알려지면서 파킨슨병 연구 모델로 사용된다. Paraquat은 특히 MPTP의 활성 대사산물인 MPP⁺와 구조적으로 매우 유사하며 paraquat과 rotenone 그리고 또 다른 농약성분인 maneb은 모두 흑질의 도파민성 신경만을 선택적으로 파괴시킴으로써 동물모델 뿐만 아니라 인간에서도 파킨슨병과 유사한 운동결손을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 최근에는 α -synuclein, parkin, ubiquitin C-terminal hydrolase L1 등의 유전인자에 선택적 결손이 있을 때 파킨슨병과 유사한 증상이 관찰되어 이들 유전인자에 인위적 조작을 가하여 유전자변형 동물모델들을 만들기도 한다.⁴⁻⁸

Sphingolipid는 진핵세포의 세포막을 이루는 성분으로 그 대사산물인 ceramide, sphingosine, sphingosine-1-phosphate (S1P)는 신경세포의 흥분성 조절, 세포의 증식 및 고사, 세포 노화, 세포분열 정지 및 분화과정의 신호전달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.^{9,10} 그 중 S1P는 다른 신호전달 물질들처럼 세포내 농도가 매우 낮으며 sphingosine kinase (SphK) 1과 2에 의하여 sphingosine으로부터 합성되고 S1P phosphatase에 의해 sphingosine으로, S1P lyase에 의해 phosphoethanolamine과 hexadecenal로 대사됨으로써 세포내 농도가 정교하게 조절된다.¹¹ S1P는 세포막의 endothelial differentiation gene-1으로 알려진 특정 G 단백질 결합 수용체에 결합함으로써 여러 세포에서 그 성장과 생존을 촉진시킨다고 알려져 있어 그 전구물질인 ceramide와 sphingosine이 세포 사멸 및 성장 억제 작용과는 대조를 보이며, 이들 대사산물들은 상호변환이 가능하며 그 상대적인 농도에 의해 세포의 운명을 결정짓는 것으로 알려져 있다. S1P는 RAS와 extracellular-signal regulated kinase (ERK) 1/2를 통해 세포의 증식을 촉진하며¹² S1P합성 효소인 SphK1은 사립체를 통한

세포사를 억제하고, stress-activated protein kinase (SAPK)와 Jun aminoterminal kinase (JNK)을 차단하며 nuclear factor κ B를 활성화시킴으로써 세포사멸을 억제한다고 알려져 있다.^{13,14} 또한 SphK1나 증가된 세포내 S1P는 세포주기의 G1-S 전이를 촉진시키고 DNA합성도 증가시킴으로써 세포 증식을 촉진시킬 뿐만 아니라,¹⁵ 혈관 생성, 심장 발달, 면역 및 세포 이주에도 관여한다.¹⁶ 최근 본 연구진의 공동연구자들이 직접적으로 SphK를 활성화시키는 K6PC-5라는 신약 제재를 개발하여 HaCaT세포의 분화를 촉진시키고 피부에서 항노화작용을 나타낸다고 보고하였다.¹⁷

본 연구에서는 파킨슨병의 생체 모델로서 생쥐 도파민성 세포주인 SN4741 세포를 이용하여, SphK 활성제인 K6PC-5가 이들 도파민성 신경세포에서 MPP⁺에 의해 유발되는 신경독성을 보호하는 작용이 있는지 그리고 있다면 어떠한 경로를 통하여 그 도파민성 신경세포 보호 작용을 나타내는지 유전인자와 신호전달 체계 레벨에서 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. SN4741 도파민성 신경세포주 배양 및 처리

SN4741 생쥐 도파민성 신경세포를 high glucose DMEM (HyClone, Logan, UT)에 열처리로 불활성화한 10% fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT)을 첨가하여 poly-L-lysine (Sigma, MO, USA) 코팅된 100-mm dish (Sarstedt, Sparks, NV)에 배양하였다. 감염을 막기 위해 100 U/ml의 penicillin과 100 μ g/ml의 streptomycin을 추가하여 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. K6PC-5에 의한 신경세포 보호작용을 확인하기 위하여 MPP⁺ 투여하기 1시간 전에 K6PC-5를 배양액에 첨가하였으며 MPP⁺ 투여 24시간 후에 세포 사멸 정도와 세포내 사멸관련 mRNA 및 신호전달 단백질의 발현을 관찰하였다. K6PC-5 (Neopharm, Daejeon, Korea)는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co.)에 100 mM의 농도로 녹인 후 실험하기 직전에 DMSO를 이용하여 적정 농도로 희석하여 사용하였으며 배양액 내 최종 DMSO의 농도는 0.1%를 넘지 않도록 하였다. SN4741 도파민성 신경세포에서 MPP⁺에 의한 독성과 K6PC-5에 의한 신경세포 보호작용을 규명하기 위하여 실험군을 대조군, MPP⁺ 1 mM 단독처리군, K6PC-5 0.1 μ M 처리 후 MPP⁺ 1 mM 처리군, K6PC-5 1 μ M 처리 후 MPP⁺ 1 mM 처리군, K6PC-5 5 μ M 처리 후 MPP⁺ 1

mM 처치군, K6PC-5 5 μ M 단독처치군으로 나누었다.

2. 세포 생존율 측정

3,[4,5-dimethylthiazol]-2-yl (MTT)는 세포 내로 흡수된 다음 mitochondria의 succinate dehydrogenase에 의하여 formazan으로 전환되므로 세포내 formazan 축적정도는 직접적으로 mitochondria의 활동성과 세포의 생존정도를 나타낸다. 본 실험에서는 96-well plate에 well 당 1×10^4 개의 세포를 분주한 다음 배양액 200 μ l를 넣어 37°C에서 24시간 배양한 후 2 mg/ml 농도의 MTT 용액(Sigma)을 50 μ l 추가하였다. 3시간 후 220 μ l의 상층액은 제거하고 150 μ l의 DMSO (Sigma)를 추가한 다음 ELISA plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 570 nm optical density를 측정하여 대조군과 비교하였다.

3. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

6-well plate (Nunc)에 각 well 당 5×10^4 개의 세포를 분주한 다음 0.1, 1, 5 μ M의 농도로 K6PC-5를 1시간 동안 전처리 한 후 MPP⁺를 6시간 동안 처리하고 Trizol reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA)를 1 ml씩 분주하여 RNA를 뽑는다. 1 μ g의 total RNA를 M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 섞어 42°C에서 90분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하고 이것을 RT-PCR의 template로 이용하였다. RT-PCR은 25~35 cycles 동안 Ex-Taq polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)을 이용하여 PCR 기계(Takara Bio Inc.)에서 진행하였다. 각각의 primer는 다음과 같다(gene, forward, reverse, and cDNA product length). Bcl-2, TACCGTCGTAAGTTCGCAGAG, GGCAGGCTGAGCAGGGTCTT, 350 bp; Bcl-w, GTTTCGCCGCGACCTTCTCT, CCCCCTCAGCACTGTCTCTCA, 362 bp; Bcl-xl, TGGTCGACTTTCTCTCTCTAC, AGAGATCCACAAAGATGTCC, 557 bp; Bad; GGAAGACGCTAGTGCTACAGA, CTCCTTTGCCCAAGTTTCGA, 434 bp; Bax, GGAGACACCTGAGCTGACCTTGA, TCTTCTTCCAGATGGTGAGCGAGG, 452 bp; Caspase-6, GGCAACCACGTTTACGCATAC, GGCGCTGAGAGACCTTTCTGT, 406 bp; p21, ATGTCCAATCCTGGTGATGT, TGCAGCAGGGCAGAGGAAGT, 306 bp; GAPDH, ACCACAGTCCATGCCATCAC, TCCACCA

CCCTGTTGCTGTA, 452 bp. 각각의 RT-PCR 결과물은 2%의 아가로스 젤에서 그 크기와 발현정도를 확인하였다.

4. Western blot analysis

6-well plate (Nunc)에 각 well 당 5×10^4 개의 세포를 분주한 다음 0.1, 1, 5 μ M의 농도로 K6PC-5를 1시간 동안 전처리 한 후 MPP⁺를 3시간 동안 처리하고 단백질을 추출 용액을 100 μ l 넣고 얼음 위에 10분 정도 둔 다음 스크래퍼를 이용해 세포를 떼어내어 튜브에 모아 13,200 rpm으로 4°C에서 15분간 원심분리한 후 가라앉은 덩어리를 제외한 상층액을 새 튜브에 모은 후 정량하여 사용하였다. 정량한 단백질 20 μ g과 시료 버퍼를 넣고 100°C에서 15분간 끓인 다음, 8% SDS-polyacrylamide separating gel과 5% SDS-stacking gel을 만든 후 앞서 만든 시료를 로딩하고 120 V에서 80분간 전기영동 한 후 transfer module에 넣고 60 V에서 1시간 동안 transfer하여 membrane에 blotting 한다. Blotting 한 membrane을 1% 탈지유가 포함된 0.1% Tween20/PBS 버퍼에 넣고 1시간 동안 차단한 다음 세척하고 1차 항체가 포함된 버퍼를 이용하여 항체를 결합시킨 후 여러 번 세척한다. 같은 방법으로 2차 항체를 결합시키고 여러 번 세척한 후 Luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 필름에 노출 후 현상하였다.

5. 실험결과 분석

RNA와 단백질의 발현 정도는 각각의 밴드의 optical density를 densitometry (NIH Image analysis program, version 1.61)를 이용하여 정량하였으며 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다.

결 과

1. MPP⁺에 의한 세포 독성에서 K6PC-5의 도파민성 신경 세포 보호 작용

K6PC-5의 용매로 DMSO를 사용하였으므로 배양액 내 최종농도인 0.1%의 DMSO에 의한 세포의 생존율 변화를 관찰하기 위해 MTT assay를 시행한 결과 0.1% DMSO는 대조군에 비하여 $96.25 \pm 5.17\%$ 의 생존율을 보여 상기량의 DMSO에 의한 세포 생존율의 변화가 본 연구에서 사용한 농도의 MPP⁺나 K6PC-5 등의 화학물에 의한 세포 생존율의 변화에 유의한 영향을 미치지 않음을 확인하였고 다음 단계의 실험을

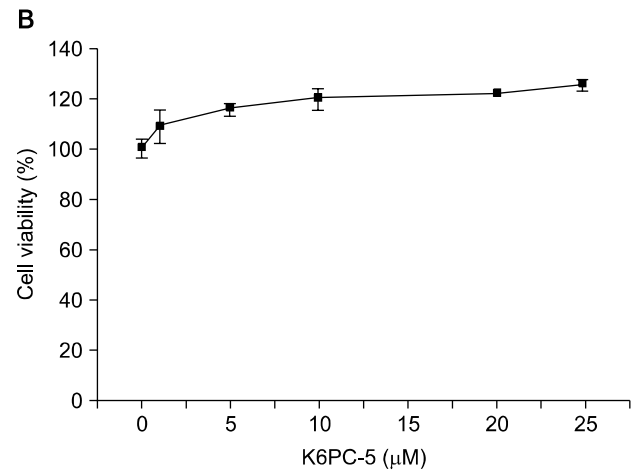
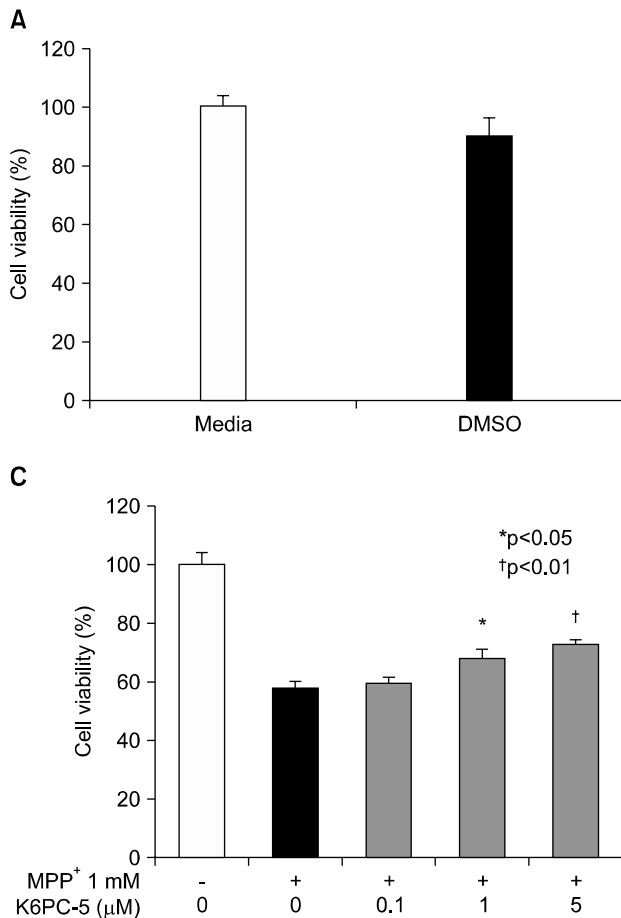


Fig. 1. MTT⁺ neurotoxicity and protection by K6PC-5 in SN4741 mouse dopaminergic neuronal cell line as measured by MTT reduction assay (A, B, and C). (A) Compare to media treated cells, treatment of cells with DMSO showed no significant decrease in the cell viability. (B) The viability of SN4741 cells was increased with increasing concentration of K6PC-5. (C) Protective effect of K6PC-5 against dopaminergic neuronal cell death in SN4741 cells. SN4741 cells were pretreated with varying concentrations of K6PC-5 (0.1, 1, 5 μM) for 1 hr, followed by incubation with 1 mM MPP⁺ for 24 hr. The viability was markedly reduced by a 24 hr treatment with 1 mM MPP⁺, whereas 1 hr pretreatment with K6PC-5 (0.1, 1, 5 μM) conferred significant protection against MPP⁺-induced neurotoxicity. These data represent the mean ± SE (standard error) of three independent experiments, with each point done in quadruplicate.

진행하였다(Fig. 1A). SN4741 생쥐 도파민성 신경세포에 K6PC-5를 1 μM부터 25 μM까지 처리한 후 24시간 후에 세포의 생존율을 관찰한 결과, K6PC-5는 SN4741 도파민성 신경세포의 증식을 농도 의존적으로 높여 25 μM의 K6PC-5는 25.22 ± 2.10% 정도 높이는 것으로 확인되었다(Fig. 1B).

K6PC-5를 0.1, 1, 5 μM의 농도로 전처리 한 후 1 mM MPP⁺를 24시간 동안 처리하여 세포 생존율의 변화를 관찰한 결과, 1 mM MPP⁺ 단독 처리에서 나타난 58.10 ± 2.1%의 생존율이 농도 의존적으로 증가하여 5 μM K6PC-5와 함께 처리하였을 때는 73.35 ± 1.02%의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 1C). 이상의 실험결과 K6PC-5가 MPP⁺에 의한 SN4741 세포의 세포사를 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

2. MPP⁺에 의한 세포 고사 관련 유전자 발현에 미치는 K6PC-5의 작용

MPP⁺에 의한 도파민성 신경 세포 사멸 과정 중에 세포

내 고사 촉진 유전자와 고사 억제 유전자의 발현 양상과 K6PC-5에 의한 이들 유전자 발현의 변화를 RT-PCR을 통하여 확인하였다. K6PC-5 전처리 후 MPP⁺를 처리하고 이 때 관여할 것으로 생각되는 고사 억제 유전자로 알려진 Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xl의 mRNA 발현을 확인한 결과, Bcl-w 유전자는 MPP⁺ 단독 처리에서는 거의 발현되지 않다가 K6PC-5와 MPP⁺를 함께 처리하였을 때 K6PC-5의 농도 의존적으로 증가하였다. Bcl-2와 Bcl-xl 유전자는 K6PC-5와 MPP⁺에 의해서 그 발현의 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2A). 세포 고사 촉진 유전자로 알려진 Bad, Bax, Caspase-6, p21의 mRNA 발현을 확인한 결과, MPP⁺ 단독 처리에 의해 증가된 Bax mRNA의 발현이 K6PC-5 전처리후 MPP⁺를 처리하였을 때는 K6PC-5의 농도에 의존적으로 감소하였다. Bad, Caspase-6, p21의 mRNA 발현은 K6PC-5와 MPP⁺를 함께 처리하였을 때 변화를 보이지 않았지만 K6PC-5 단독 처리하였을 때 Caspase-6의 유전자 발현이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

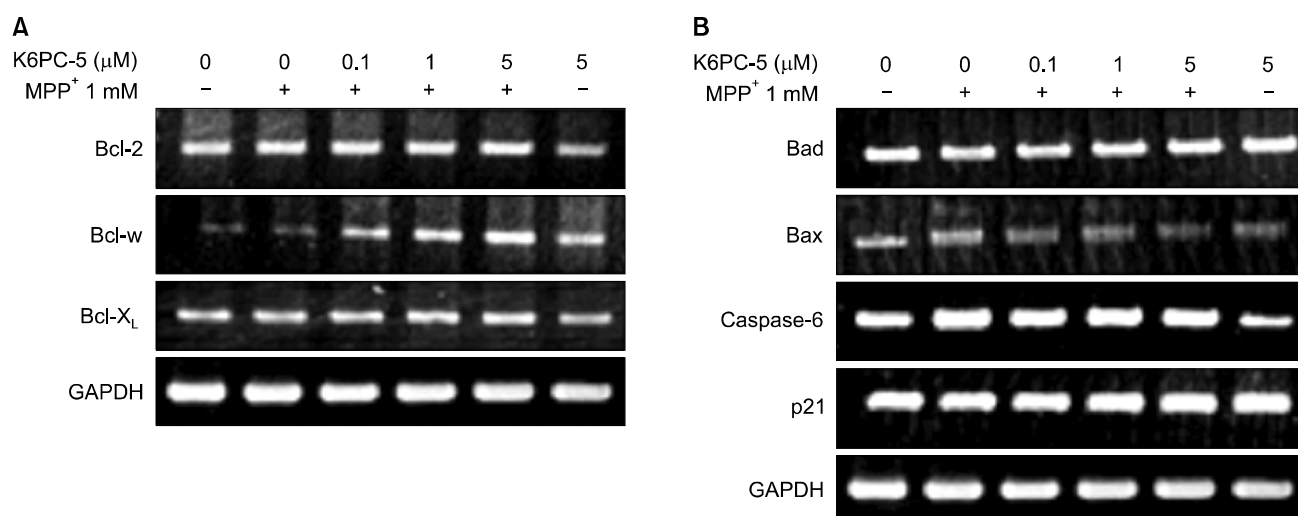


Fig. 2. Modulation of anti- and pro-apoptotic gene expressions by K6PC-5 and MPP⁺. SN4741 cells were treated with K6PC-5 (0.1, 1, 5 uM), MPP⁺ (1 mM), or the combination of the two compounds for 6 hr. Cellular RNA from each treatment was extracted and the mRNA expression for Bcl-2, Bcl-w, Bcl-X_L, Bad, Bax, Caspase-6, p21, and GAPDH was analyzed by RT-PCR.

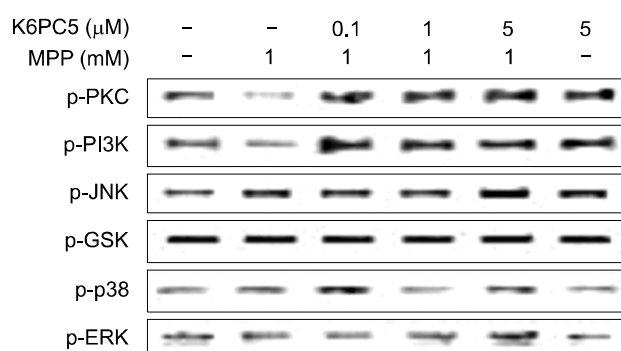


Fig. 3. Effects of K6PC-5 and MPP⁺ on p-PKC, p-PI3K, p-JNK, p-GSK, p-p38, and p-ERK immunoreactivities in SN4741 cells. Cells were treated with K6PC-5 (0.1, 1, 5 uM), MPP⁺ (1 mM), or the combination of the two drugs for 3 hr. Cell lysis buffer extracted cellular proteins from each treatment. Toxicity test of MPP⁺ (A) and EGCG (B) compounds in SN4741 mouse dopaminergic neuronal cell line. In vitro cytotoxic cell death for MPP⁺ and EGCG were assessed by MTT reduction assay in SN4741 cells at 24h.

3. PKC를 통한 K6PC-5의 도파민성 신경 세포 보호 작용

PKC는 신경 세포에서 그 생존과 증식에 관여하고 세포 외 상해로부터 신경세포를 보호하는 것으로 알려져 있다. MPP⁺에 의한 도파민성 신경 세포의 독성 모델에서 K6PC-5가 어떤 작용 기전을 통해 세포를 보호하는지 확인하고자 단백질의 선택적 항원을 이용하여 Western blot 분석을 시행하였다. 단백질의 총량과 인산화된 형태의 단백질량을 함께 분석하였을 때 유의한 변화를 확인할 수 있었다. K6PC-5 전처리 후 1 mM MPP⁺ 처리하였을 때 K6PC-5의 농도 의존적으로

인산화된 형태의 PKC와 phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)가 유의적으로 증가되어 SphK 활성화제인 K6PC-5가 PKC와 PI3K를 통하여 MPP⁺에 의한 세포사로부터 도파민성 신경 세포를 보호함을 보여주었다(Fig. 3). 그 외 세포고사로부터 신경세포를 보호하는 경로들인 JNK, p38 MAP kinase, ERK, glycogen synthase kinase (GSK) 단백질의 인산화형 단백질들은 유의한 변화가 없어 K6PC-5에 의한 MPP⁺독성 보호과정에 관여하지 않음을 알 수 있었다.

고 찰

본 연구는 SN4741 생쥐 도파민성 신경세포를 이용하여 SphK 활성화제인 K6PC-5가 MPP⁺에 의한 도파민성 신경 세포 독성에 대하여 보호 작용이 있는지 확인하고, 세포보호와 관련된 신호전달 단백질에 대한 그 작용 기전을 규명하고자 하였다.

파킨슨병 연구 모델에 널리 사용되는 신경독소인 MPTP는 체내로 흡수되어 뇌혈관장벽을 통과한 다음 정상세포에 의해 MPP⁺로 대사되어 기저핵의 흑질(substantia nigra pars compacta)에 있는 도파민성 신경세포에만 선택적으로 작용하여 특히 mitochondria complex I을 억제함으로써 파킨슨병과 유사한 특징적인 소견들을 유발하게 된다.⁴⁻⁸ 본 연구에서 생쥐 도파민성 신경세포주인 SN4741 세포는 도파민성 세포에 선택적 신경독인 MPP⁺에 의해 신경 세포의 사멸이 유

발되었으나 최근 개발된 SphK 활성화제인 K6PC-5를 MPP⁺ 투여 전에 배양액에 전 처치함으로써 MPP⁺ 독성으로부터 이들 도파민성 신경세포들이 효과적으로 보호되는 것을 확인하였다.

Sphingosine으로부터 SphK에 의하여 생성되는 S1P는 세포 내로 칼슘이온의 이동을 촉진시키고, 세포의 증식과 성장을 촉진시키며, 세포의 분화와 이주를 촉진시키는 것으로 알려져 있다.^{14,16,18} 이 중 세포의 성장조절이나 생존 촉진 및 세포사멸을 억제하는 경로로 지금까지 알려진 것들은 S1P가 세포주기에 직접 영향을 주거나 세포내 칼슘 신호전달과정을 조절하는 방법¹⁹ 외에도, S1P가 RAS와 ERK1/2 발현 조절을 통해 vascular endothelial growth factor의 세포의 증식작용을 증대하기도 하며, 또 혈청이 제거된 PC12 세포에서 S1P가 SAPK와 JNK 단백 발현을 조절하고 대표적 세포고사 관련 유전인자인 caspase의 발현도 억제함으로써 세포사를 억제하는 것 등인데,^{12,13} SphK 활성화제인 K6PC-5도 이와 유사한 기작을 통해 도파민성 신경세포를 보호작용을 나타내는지 확인하고자 하였다. 또 세포의 상해로부터 신경세포를 보호하는 것으로 알려진 대표적인 신호전달체계로는 p38, ERK MAP kinase, PI3K, JNK 그리고 PKC 경로 등이 있어 K6PC-5가 이들 경로를 통하여 작용하는지도 확인하였다. 본 연구에서 p38, ERK MAP kinase, JNK 단백 발현은 K6PC-5 전처치에 의하여 유의한 변화를 보이지 않았으나 PKC와 PI3K 단백질발현이 K6PC-5 농도에 의존하여 증가하는 것을 확인하여 K6PC-5의 SN4741 도파민성 신경세포에 대한 보호작용이 PKC와 PI3K를 경유함을 확인할 수 있었다. SN4741 세포에서 인산화된 PKC와 PI3K의 발현은 신경독인 MPP⁺ 처치에 의하여 감소되어 MPP⁺에 의한 세포사의 과정에 PKC와 PI3K의 억제가 관련되어 있음을 알 수 있고, 또한 MPP⁺에 의한 인산화된 PKC와 PI3K 발현 감소는 K6PC-5 전처치에 의하여 억제될 뿐만 아니라 대조군보다 더 증가된 발현을 보여 K6PC-5에 의한 도파민성 신경세포 보호작용은 PKC와 PI3K에 의존하여 나타난다는 것을 확인할 수 있었다. K6PC-5가 SphK를 통해 세포내 S1P 농도를 증가시킨다는 점을 고려하면 S1P의 세포보호작용이 기왕에 보고되었던 SAPK, JNK, ERK 등이 아닌 PKC와 PI3K를 통해서도 나타날 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.^{12,13} PKC는 신경 세포의 증식과 분화 조절에 필수적이고 세포의 생존과 세포사멸을 조절하고 뇌허혈과 같은 신경질환에서 그 발현이 현저히 감소한다고 알려져 있는데,^{20,21} 본 연구에서 SphK 활성화제인 K6PC-5도 PKC단백의

발현을 조절함으로써 MPP⁺ 독성으로부터 도파민성 신경세포를 보호하는 작용을 나타낸다는 것을 규명할 수 있었다.

또한 본 연구에서 항세포고사성 유전자인 Bcl-w의 발현과 전세포고사성 유전자인 Bax의 발현도 MPP⁺ 및 K6PC-5에 의하여 유의한 변화를 보였는데, Bcl-w는 K6PC-5 전처치에 의하여 그 농도에 비례하여 증가되었고, Bax는 MPP⁺에 의하여 그 발현이 증가되었다가 EGCG 전처치에 의하여 그 증가가 억제되었다. 이는 K6PC-5가 이들 세포고사 유전자에 대하여 작용함으로써 SN4741 도파민성 신경세포에 대한 MPP⁺ 독성을 보호해 주는 것을 확인시켜준다. 또한 비신경세포인 조혈세포에서 PKC ϵ 의 과발현이 bcl-2의 발현을 증가시킨다는 보고를 고려할 때,²² SN4741세포에서도 K6PC-5에 의한 인산화된 PKC의 발현 증가가 이들 항세포고사 유전인자들의 발현에 영향을 주었을 것으로 생각한다.

이상의 실험 결과로 새로운 SphK 활성화제인 K6PC-5는 생쥐 도파민성 신경세포인 SN4741세포에서 MPP⁺에 의해 억제된 PKC와 PI3K의 활성을 회복시키고 세포 사멸과 관련된 유전인자에 영향을 줌으로써 세포의 사멸을 억제하고 MPP⁺ 독성으로부터 보호함을 알 수 있었다.

알 림

본 연구는 2008년 전남대학교병원 임상연구소 연구비 지원으로 이루어졌음.

References

- Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MB. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 1994;63:793-807.
- Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 1996;47(6 Suppl 3):S161-70.
- Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53(Suppl 3):S26-38.
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39:889-909.
- Noh HG, Jang SJ, Park SJ, Kim SH, Jeong HS, Park JS. Protective effects of epigallocatechin-3-gallate against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced dopaminergic neuronal cell death. *Chonnam Med J* 2007;43:73-9.
- Krishnamurthi R, Stott S, Maingay M, Faull RL, McCarthy D, Gluckman P, et al. N-terminal tripeptide of IGF-1 improves functional deficits after 6-OHDA lesion in rats. *Neuroreport* 2004;15:1601-4.
- Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's

- disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 2004;318:215-24.
8. Ryu EJ, Angelastro JM, Greene LA. Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 2005;18:54-74.
9. Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J, Sandhoff K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim Biophys Acta* 2000;1485:63-99.
10. Zhang YH, Vasko MR, Nicol GD. Intracellular sphingosine 1-phosphate mediates the increased excitability produced by nerve growth factor in rat sensory neurons. *J Physiol* 2006;575(Pt 1):101-13.
11. Liu H, Chakravarty D, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002;71:493-511.
12. Shu X, Wu W, Mosteller RD, Broek D. Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 2002;22:7758-68.
13. Edsall LC, Cuvillier O, Twitty S, Spiegel S, Milstien S. Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells. *J Neurochem* 2001;76:1573-84.
14. Taha TA, Hannun YA, Obeid LM. Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39:113-31.
15. Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, et al. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol* 1999; 147:545-58.
16. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:397-407.
17. Youm JK, Jo H, Hong JH, Shin DM, Kwon MJ, Jeong SK, et al. K6PC-5, a sphingosine kinase activator, induces anti-aging effects in intrinsically aged skin through intracellular Ca(2+) signaling. *J Dermatol Sci* 2008;51:89-102.
18. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 1996;381:800-3.
19. Xia P, Wang L, Moretti PA, Albanese N, Chai F, Pitson SM, et al. Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. *J Biol Chem* 2002;277:7996-8003.
20. Cordey M, Gundimeda U, Gopalakrishna R, Pike CJ. Estrogen activates protein kinase C in neurons: role in neuroprotection. *J Neurochem* 2003;84:1340-8.
21. Levites Y, Amit T, Youdim MBH, Mandel S. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/ cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem* 2002;277:30574-80.
22. Gubina E, Rinaudo MS, Szallasi Z, Blumberg PM, Mufson RA. Overexpression of protein kinase C isoform epsilon but not delta in human interleukin-3-dependent cells suppresses apoptosis and induces bcl-2 expression. *Blood* 1998;91:823-9.