

NG108-15 세포에서 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 신호의 탈감작과 protein kinase C의 역할

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, 생리학교실¹

김경미 · 성종호¹ · 김명준¹ · 이덕주¹ · 조양혁¹ · 한상준¹ · 김명석¹ · 윤신희¹ · 김부성

Role of Protein kinase C in Desensitization of Somatostatin-induced Calcium Signalling in NG108-15 Cells

Kyoung Mi Kim, Jong Ho Sung¹, Myung Jun, Kim¹, Duck Joo Rhie¹, Yang Hyeok Jo¹, Sang June Hahn¹, Myung Suk Kim¹, Shin Hee Yoon¹, Bu Seung Kim

*Department of Internal Medicine and Department of Physiology¹,
College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea*

ABSTRACT

Background: Activation of G-protein coupled-somatostatin receptors induces the release of calcium from inositol 1, 4, 5-trisphosphate-sensitive intracellular stores. G-protein-coupled receptor signaling decreases with prolonged exposure to an agonist.

Subjects and Methods: Fura-2-based digital Ca^{2+} imaging was used to study the effects of prolonged exposure to an agonist on the somatostatin-induced intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) increases in NG108-15 cells, which were differentiated with CO_2 -independent medium and 10 μM forskolin.

Results: Exposure to somatostatin (1 μM) for 30 min completely desensitized the NG108-15 cells to a second somatostatin-induced response. The cells recovered gradually over 20 min following washout of the somatostatin. The desensitization was not due to depletion of the intracellular Ca^{2+} stores, and pretreatment for 30 min with bradykinin (100 nM), which activates phospholipase C, or DADLE (D-Ala²-D-Leu⁵ enkephalin, 1 μM), which activates phospholipase C, failed to cross-desensitize the somatostatin-evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases. Treatment with 8-cpt-cAMP (0.1 mM) for 30 min did not influence the somatostatin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases. Phorbol 12, 13-dibutyrate (PdBu, 1 μM) blocked the response completely. Down-regulation of PKC due to 24 h exposure of PdBu (1 μM) inhibited the somatostatin-induced desensitization.

Conclusion: Prolonged exposure of somatostatin to NG108-15 cells desensitized the somatostatin-induced release of Ca^{2+} from the intracellular store, with protein kinase C also involved in the desensitization (J Kor Soc Endocrinol 20:353~361, 2005).

Key words: Somatostatin, Desensitization, Protein kinase C, NG108-15 cells, Ca^{2+} , Phospholipase C

서 론

소마토스타틴 (somatostatin)은 성장호르몬 분비 억제인

자로 시상하부에서 처음 분리된 이후 물질의 분비기전과 세포의 증식과정을 포함한 다양한 생체기능의 조절에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 소마토스타틴은 중추신경계에서 신경전달물질 (neurotransmitter) 혹은 신경조절물질 (neuromodulator)로도 작용하는 것으로 알려져 있다 [1~3].

접수일자: 2005년 4월 6일

통과일자: 2005년 6월 30일

책임저자: 윤신희, 가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

최근에 소마토스타틴 수용체는 5가지가 존재한다는 것이 밝혀졌고 그 유전자가 클로닝(cloning) 되었다[4]. 소마토스타틴은 아편 유사체등과 마찬가지로 G 단백(G protein) 중 억제성 G 단백(Gi)을 경유하여 세포 내 신호를 전달한다. 소마토스타틴이 수용체에 결합하면 억제성 G 단백을 분해시켜 α -소단위(subunit)와 $\beta\gamma$ -소단위로 되는데 이들 소단위가 세포내 여러 구성 성분과 결합하여 세포의 기능을 조절하고 있는 것으로 알려져 있다. 현재까지 알려진 대표적인 소마토스타틴의 작용을 보면 α 소단위를 경유하여 adenylyl cyclase를 억제하고, Ca^{2+} 통로(channel)를 억제하며, $\beta\gamma$ 소단위를 거쳐 K^+ 통로를 자극하여 세포의 흥분성을 전반적으로 억제하는 것이 그 주된 기능으로 알려져 왔다[2, 5~8]. 그러나 최근에 이런 억제성 G 단백질에 의해 매개되는 수용체들이 세포의 기능을 억제한다는 것과는 반대로 세포의 활성을 증가시키는 특성도 있음을 몇몇 연구자들이 보고한 바 있다[9,10]. 소마토스타틴 수용체도 수용체를 인공적으로 발현시킨 세포는 물론 내인성으로 소마토스타틴 수용체가 원래 존재하는 NG108-15 세포에서 소마토스타틴 수용체를 자극 시 세포 내 phospholipase C의 활성화에 의해 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)를 증가시켜 세포 내 Ca^{2+} 농도($[Ca^{2+}]_i$)를 증가시킨다고 보고하였다[11~14].

자극 혹은 억제 물질에 반복 노출되거나 지속적으로 노출될 때 그 물질에 의한 반응이 점차적으로 약화되는 현상을 탈감작(desensitization)이라 한다. 일반적으로 G 단백질 매개 수용체(G protein-coupled receptor) 계열의 수용체에 의한 신호전달은 탈감작되는 것으로 알려져 있다. G 단백질 매개 수용체의 인산화(phosphorylation)가 신호전달의 탈감작에 관여하는 것으로 알려져 있다[15]. 소마토스타틴 수용체도 phospholipase C를 활성화하여 생성된 IP_3 에 의해 세포 내 Ca^{2+} 농도를 증가시키는 것으로 보고되고 있기 때문에, phospholipase C의 활성화 시 생성된 diacylglycerol과 Ca^{2+} 에 의해 protein kinase C(PKC)가 활성화되고, 이 활성화된 PKC가 소마토스타틴 수용체에 의한 Ca^{2+} 신호를 탈감작시킬 가능성이 있다.

따라서 본 연구에서는 신경세포주인 NG108-15 세포에 제2형 소마토스타틴 수용체가 존재하는 것으로 알려졌고[6], 이 소마토스타틴 수용체가 phospholipase C를 경유하여 세포 내 Ca^{2+} 농도를 증가시키기 때문에[14], NG108-15 세포에서 Ca^{2+} 신호를 측정하여 첫째, 소마토스타틴의 장기간 노출 시 소마토스타틴 수용체에 의한 Ca^{2+} 신호의 탈감작을 유발하는 지를 확인하고, 둘째, 이 탈감작의 시간경과에 따른 회복 과정을 관찰하며, 셋째, 다른 G 단백질 매개 수용체 항진제들 사이에서도 교차 탈감작(cross-desensitization)이 일어나는 지를 관찰한다. 또한 이 소마토스타틴에 의한 탈감작에 PKC가 관여하는지를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구재료

Fura-2 acetoxymethyl ester (AM)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Gibco 사(Grand Island, NY, USA)에서, bradykinin, 8-(4-chlorophenylthio)-adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate (8-cpt-cAMP), D-Ala2-D-Leu5 enkephalin (DADLE), phorbol 12,13-dibutyrate (PdBu), 소마토스타틴-14, 그리고 다른 모든 시약은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입했다.

2. 세포배양

NG108-15 세포를 T25 cm^2 플라스크에서 5% FBS, 0.1 mM sodium hypoxanthine, 0.4 μ M aminopterin, 16 μ M thymidine이 함유된 DMEM으로 95% 대기와 5% 이산화탄소(CO_2)를 공급하면서 대량 배양하였다. 세포 내 Ca^{2+} 농도를 측정하기 위해 이들 세포를 25 mm 직경의 원형 유리 커버슬라이드에 붙여 배양하여 커버슬라이드의 80%까지 차게 증식시켰다. 증식된 세포를 우태아혈청을 첨가하지 않은 이산화탄소 비의존성 배지(CO_2 -independent medium)와 5 μ M forskolin으로 4~6일 동안 배양하여 분화시켰다[9]. 이렇게 분화한 세포는 소마토스타틴에 대한 반응물이 증가하였다.

3. 실험절차

커버슬라이드에 배양한 세포를 6 μ M fura-2 AM을 사용하여 0.5% 우혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 함유한 HEPES 완충 Hank염 용액(HEPES, 20 mM; NaCl, 137 mM; $CaCl_2$, 1.26 mM; $MgSO_4$, 0.4 mM; $MgCl_2$, 0.5 mM; KCl, 5.0 mM; KH_2PO_4 , 0.4 mM; Na_2HPO_4 , 0.6 mM; $NaHCO_3$, 3.0 mM; glucose, 5.0 mM)으로 실온에서 45~60 분 동안 배양하여 세포 내로 fura-2 AM이 들어가도록 하였다. 커버슬라이드를 특수용기 flow-through 수조(chamber)에 올려놓고 분당 2 ml의 속도로 multi-port 밸브를 사용하여 이 염용액과 시약이 들어 있는 염용액을 관류하여 실험하였다[9]. 1 μ M 소마토스타틴과 DADLE은 90초 동안 그리고 100 nM bradykinin은 60초 동안 세포에 노출시켜 세포 내 Ca^{2+} 농도의 증가를 유발시켰으며, 1 μ M 소마토스타틴과 1 μ M DADLE, 그리고 100 nM bradykinin을 30분 동안 지속적으로 노출시켜 소마토스타틴과 DADLE, 그리고 bradykinin에 의한 Ca^{2+} 신호를 탈감작시켰다. 2차 전령(second messenger)에 의한 소마토스타틴의 Ca^{2+} 신호의 탈감작을 유도하기 위해서는 0.1 mM 8-cpt-cAMP와 1 μ M PdBu는 30분간 처리하였다. 마지막으로 1 μ M PdBu를 24

시간 전처리하여 세포 내 PKC를 다운 레귤레이션시켰다.

세포 내 Ca^{2+} 농도의 디지털 영상측정: fura-2가 먹여진 세포가 들어있는 수조를 도립 현미경(Nikon Eclipse TE-300, Tokoyo, Japan)의 관찰대에 놓고 340 nm와 380 nm (10 nm band pass)로 세포를 흥분시켜 510 nm (40 nm band pass)에서 방출된 형광상을 Quantix cooled CCD camera (1305X1280 pixels binned to 261×256) (Photometrics, Tuxan, AZ, USA)로 얻었다. 커버슬라이드에서 세포를 제거한 후 각 실험끝 배경상을 얻는다. 세포 내 Ca^{2+} 농도 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)의 계산은 아래의 식을 사용해 계산하였다[16].

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \beta(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

위 식에서 R은 340 nm와 380 nm 파장의 빛에 노출 시 510 nm에서 방출된 형광의 비율이며, K는 fura-2의 해리상수로 224 nM이고, 상수 β 는 Ca^{2+} 없는 HEPES 완충 Hank염 용액과 5 mM CaCl_2 가 들어있는 HEPES 완충 Hank염 용액에서 380 nm에서 흥분시켰을 때 510 nm에서 측정된 방출된 형광의 비율이다. 세포내 Ca^{2+} 농도의 calibration은 NG108-15세포를 fura-2 AM을 세포 안으로 들어가도록 한 후 5분간 1 mM EGTA를 함유한 Ca^{2+} 이 없는 HEPES 완충 Hank염 용액으로 관류한 다음, 10 μM ionomycin이 들어간 1 mM EGTA를 함유한 Ca^{2+} 이 없는 HEPES 완충 Hank염 용액으로 세포 내 Ca^{2+} 을 유리시킨 후, 1 mM EGTA를 함유한 calcium이 없는 HEPES 완충 Hank염 용액으로 관류하여 R_{\min} 를 구하였다. 또한 5 mM CaCl_2 들어있는 HEPES 완충 Hank염 용액으로 관류한 다음, 5 mM CaCl_2 과 함께 10 μM ionomycin이 들어있는 HEPES 완충 Hank염 용액을 사용하여 R_{\max} 를 구하였다.

4. 자료분석 및 통계 검정

반응한 세포의 정의는 기준치(baseline)보다 100 nM 이상 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가를 보인 세포로 규정하였다. 실험 값은 평균(mean) \pm 표준오차(standard error, SE)로 표시하였고, 소마토스타틴에 대한 반응으로 증가된 최대 세포 내 Ca^{2+} 농도에서 기초상태의 세포 내 Ca^{2+} 농도의 차인 Ca^{2+} 농도의 증가량으로 표시하였으며, 약물이나 처치의 효과를 비교하기 위해서 후에 처치한 소마토스타틴 자극에 대한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가량(peak 2)을 첫 번째 소마토스타틴 자극에 대한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가량(peak 1)으로 나눈값을 백분율로 표시한 값(response amplitude = peak 2 / peak 1)으로 나타내었다. 실험성적은 t-검정(non-paired Student's t-test)으로 분석하였으며 P 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

결 과

1. 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가 반응의 탈감작

Fig. 1A와 B에서 보는 바와 같이 90초 동안 1 μM 소마토스타틴에 노출시킨 경우 빠르고 일시적인 세포 내 Ca^{2+} 농도의 증가를 보였다. 이 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가는 세포 내 저장소에서 세포질 내로 Ca^{2+} 의 유리에 의한 결과라는 것은 이미 보고된 바 있다[14]. 전체 세포 중 36% (n=191)에서 1 μM 소마토스타틴 자극 시 반응하였다. 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도는 자극 전 42 ± 6 nM에서 자극시 평균 387 ± 34 nM로 증가하였다. 소마토스타틴에 의해 유발되는 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가 후 25분간 소마토스타틴이 없는 완충액을 관류시켜 세포를 회복시킨 후 다시 소마토스타틴을 주면 세포 내 Ca^{2+} 농도는 다시 증가했다. 이때 소마토스타틴을 주어서 나타나는 반응은 처음 반응의 $85 \pm 4\%$ 정도였다. 그러나 소마토스타틴에 30분 동안 노출후 소마토스타틴에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 나타나지 않았다(Fig. 1C & D). 이렇게 소마토스타틴을 지속적으로 노출후 소마토스타틴 노출 시 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가가 나타나지 않는 것을 탈감작이라 한다.

소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가의 탈감작이 소마토스타틴을 제거한 후 회복시키면 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가가 다시 나타나는 것을 Fig. 2에서 보여주고 있다. NG108-15 세포에 1 μM 소마토스타틴을 30 분간 주어서 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가를 탈감작시킨 후 소마토스타틴이 없는 완충액 만을 관류시켜 탈감작에서 각각 2, 6, 10, 20분간 회복시킨 후 다시 소마토스타틴을 90 초간 주어 소마토스타틴에 의한 2차 반응을 유발시켰다. 탈감작 후 회복기간에 비례하여 2번째 소마토스타틴에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가가 나타남을 보여 준다.

2. 소마토스타틴과 다른 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가 유발 물질과의 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가에서 교차 탈감작 유무

Bradykinin은 NG108-15세포에서 백일해독(pertussis toxin) 비반응성 G단백인 Gq를 매개로 phospholipase C를 활성화하여 세포 내 Ca^{2+} 농도의 증가를 강력하게 유발하는 물질이다[17]. 먼저 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가의 탈감작이 bradykinin에 장기간 노출 시 영향을 받는지 확인하였다(Fig. 3). 30분간의 1 μM 소마토스타틴에 의한 탈감작을 유발한 후 60초간 100nM bradykinin에 노출시킬 때 bradykinin에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가의 탈감작은 나타나지 않았다(Fig. 3A). 반대로 30분간 bradykinin으로 탈감작을 유발한 후에 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+}

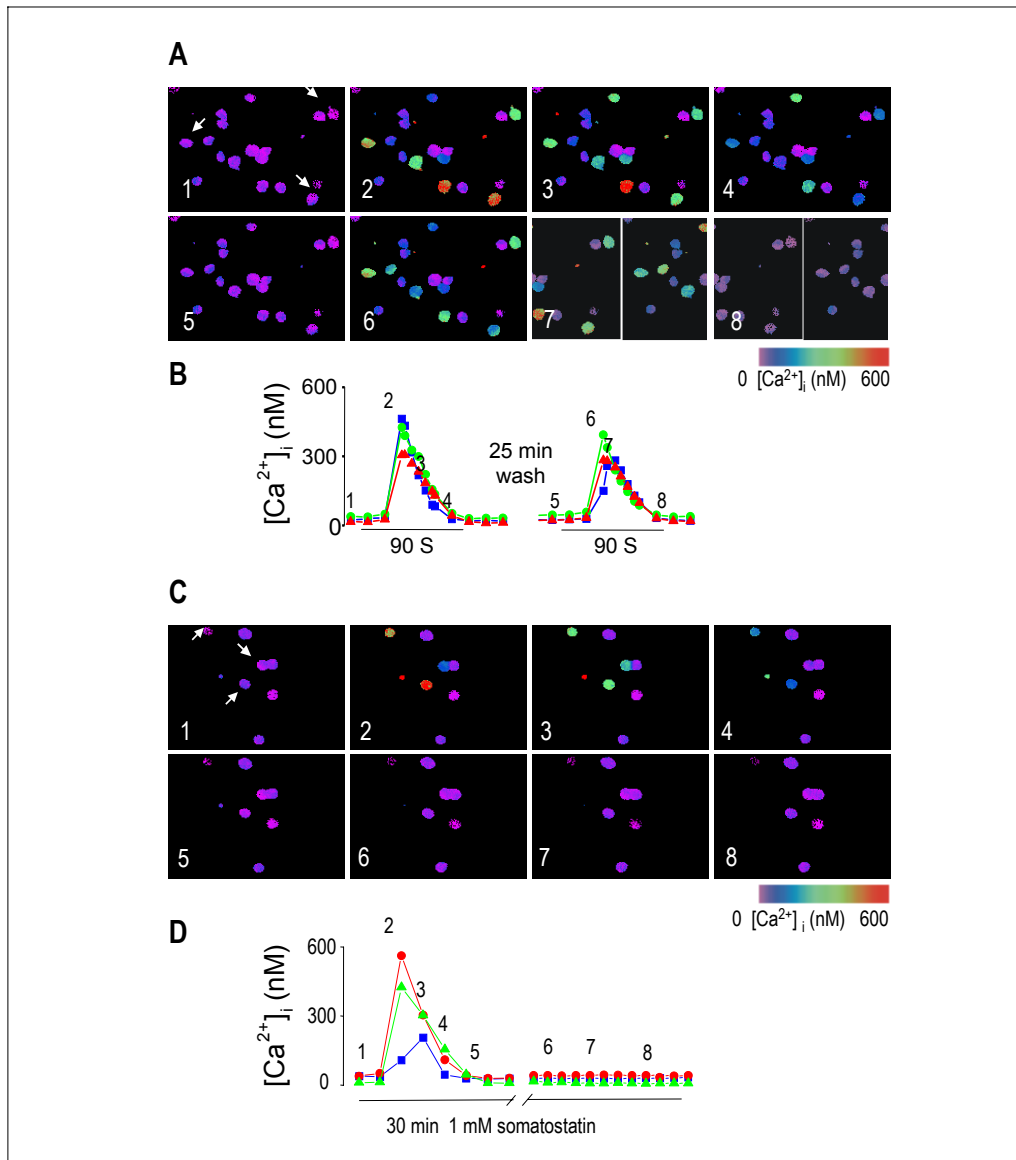


Fig. 1. Prolonged exposure to somatostatin desensitizes somatostatin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in NG108-15 cells. (A) Pseudocolor representations of $[Ca^{2+}]_i$ were derived from fura-2-based digital images. Somatostatin-induced $[Ca^{2+}]_i$ transients were elicited by superfusion with 1 μ M somatostatin for 90s at 25 min intervals in this field. Responses from the three cells indicated by arrows in A, frame 1 are plotted in B. Somatostatin was applied as indicated by the horizontal bars. The numbers along the plot refer to the frame numbers in A. (C) Pseudocolor images show that Somatostatin responses were completely desensitized following a 30 min exposure to Somatostatin (1 μ M). Responses from the three cells indicated by arrows in C, frame 1 are plotted in D. Somatostatin was applied continuously as indicated by the horizontal bar. Gaps in the recording (during which the cells were not illuminated) are indicated by diagonal lines. The numbers along the plot refer to the frame numbers in C

농도 증가의 탈감작도 나타나지 않았다 (Fig. 3B).

이러한 교차 탈감작이 소마토스타틴과 δ 아편 유사체 수용체 항진제인 DADLE (D-Ala2-D-Leu5 enkephalin) 사이에서 발생하는지 관찰하였다. δ 아편 유사체 수용체는 소마토스타틴과 마찬가지로 억제성 G 단백을 경유하여 NG-108-15 세포에서 phospholipase C를 활성화하여 세포 내

Ca^{2+} 농도를 증가시키는 물질로 알려져 있다[8,10,17].

Bradykinin에서의 결과와 마찬가지로 30분간 소마토스타틴의 노출에 의한 탈감작 후 DADLE에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가에 아무 영향을 주지 않았다 (Fig. 4A). 이것은 반대로 30분간 DADLE에 노출한 후 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가를 관찰한 결과에서도 마찬가지였다

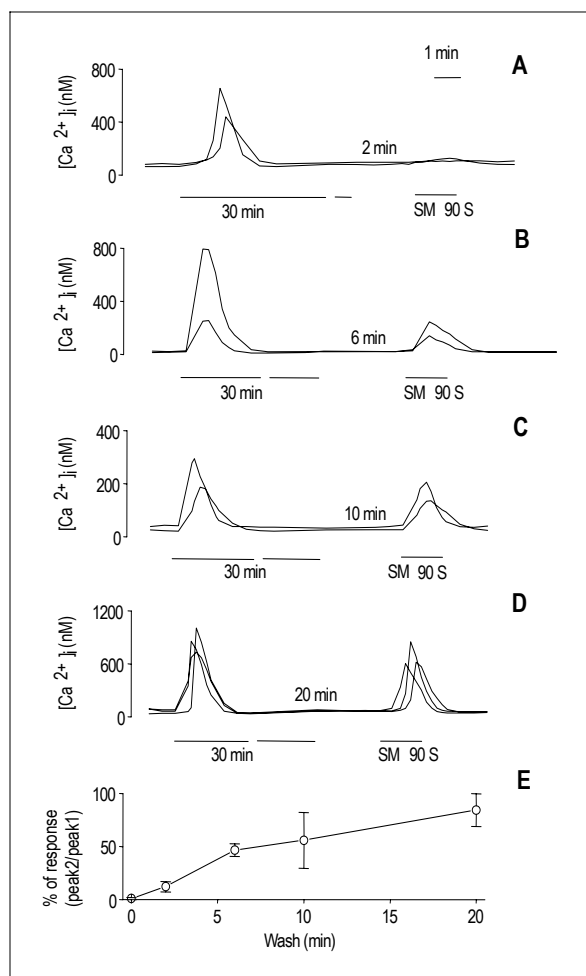


Fig. 2. Somatostatin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases displayed a graded recovery from desensitization in NG108-15 cells. (A-D) Representative traces show recovery from 30 min exposure to somatostatin ($1 \mu\text{M}$) following wash periods of various duration. NG108-15 cells were washed with Hepes Hank's buffer (A) 2, (B) 6, (C) 10, or (D) 20 min prior to a second challenge with somatostatin ($1 \mu\text{M}$). (E) Summary plot shows the time course of recovery from desensitization for the wash times presented in A-D. Data are means \pm SE of at least 9 cells.

(Fig. 4B). 또한 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가의 탈감작을 30분간 유발한 후에 세포 내 저장소에서 Ca^{2+} 를 동원하는 bradykinin이나 DADLE에 의해 세포 내 Ca^{2+} 농도의 증가가 정상적으로 유발되었다.

3. 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가에 미치는 8-cpt-cAMP와 PdBu의 영향

수용체 항진물질에 의한 수용체의 인산화가 G 단백질에 연관된 세포 내 신호의 탈감작에 관여하는 것으로 알려져 있다 [15]. 또한 소마토스타틴은 억제성 G 단백질을 매개로 adenylyl cyclase의 활성을 억제하여 세포 내 cAMP 수준

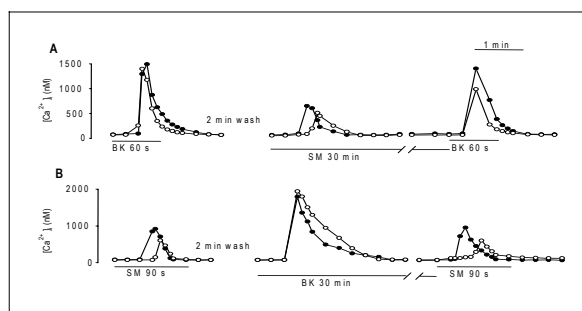


Fig. 3. No cross desensitization between somatostatin (SM)- and bradykinin (BK, Gq-coupled receptor agonist)-induced responses in NG108-15 cells. (A) Bradykinin (100 nM)-evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases were not affected by 30 min exposure to $1 \mu\text{M}$ somatostatin. (B) Somatostatin ($1 \mu\text{M}$)-evoked responses were not affected by 30 min exposure to 100 nM bradykinin.

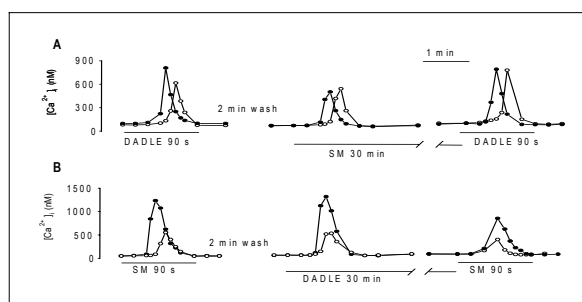


Fig. 4. No cross desensitization between somatostatin (SM)- and DADLE (δ -opioid receptor agonist, Gi-coupled receptor agonist)-induced responses. (A) DADLE ($1 \mu\text{M}$)-evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases were not affected by prolonged exposure to $1 \mu\text{M}$ somatostatin. (B) Somatostatin ($1 \mu\text{M}$)-evoked responses were not affected by 30 min exposure to $1 \mu\text{M}$ DADLE.

을 낮추고, phospholipase C의 활성을 증가시켜 IP_3 에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가와 diacylglycerol에 의한 PKC를 활성화시킬 수 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 세포 내 단백질의 인산화에 의해 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가의 탈감작이 유발되는 지를 확인하였다. 세포 내 protein kinase A (PKA)의 활성을 증가시키는 8-cpt-cAMP (0.1 mM)를 30분 동안 전처리하였을 때 소마토스타틴에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 증가는 유의하게 감소되지 않았다 (Fig. 5A & C). 그러나 PKC의 활성을 증가시키는 $1 \mu\text{M}$ PdBu를 전처리하였을 때 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가가 거의 나타나지 않아서 완전히 탈감작됨을 관찰하였다 (Fig. 5B & C).

4. PKC의 다운 레귤레이션이 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 증가의 탈감작에 미치는 영향

세포가 phorbol ester에 지속적으로 노출되면 phorbol es-

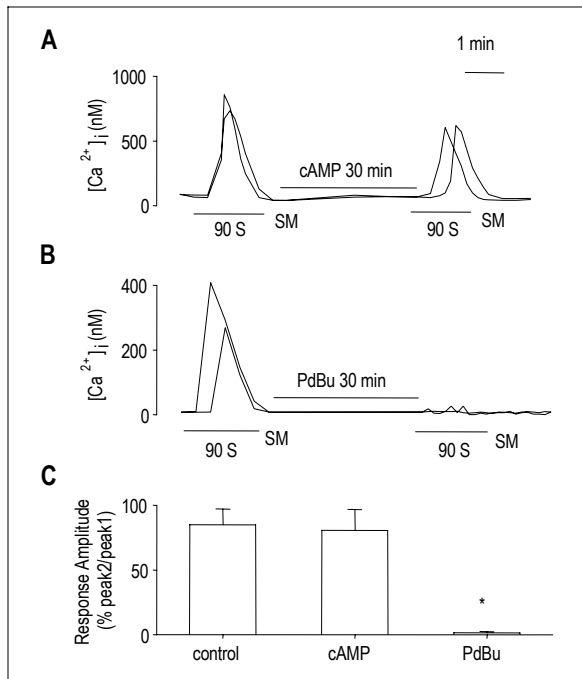


Fig. 5. Effects of cAMP and PdBu on somatostatin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in NG108-15 cells. Cells were treated for 30 min prior to and during the second somatostatin application with (A) 0.1 mM 8-bromo-cAMP or (B) 1 μ M PdBu. (C) Histogram summarizes responses normalized to initial control response for control (n=29), cAMP-treated (n=5), and PdBu-treated cells (n=7). Data are means \pm SE. * $P < 0.01$ relative to control and cAMP.

ter에 의해 활성화되는 PKC가 다운 레귤레이션되어 그 기능이 없어지는 것으로 보고되었다[18]. NG108-15 세포들을 24시간 동안 phorbol ester의 하나인 1 μ M PdBu가 들어 있는 배지에서 배양하여 세포 내 PKC를 다운 레귤레이션시킨 다음 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가의 탈감작이 나타나는지를 관찰하였다. PdBu의 24시간 전처리 후에 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가가 나타났다 (Fig. 6B). PdBu를 24시간 전처리하지 않은 세포에서는 30 분 소마토스타틴에 노출 후 6분에 소마토스타틴을 다시 가하면 소마토스타틴에 의한 탈감작이 나타났지만 (Fig. 6A & C), PdBu로 24시간 처리한 세포에서는 소마토스타틴에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 반응의 탈감작에서 거의 회복됨을 알 수 있다 (Fig. 6B & C).

고 찰

본 연구에서 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 의 동원은 NG108-15 세포에서 소마토스타틴이 지속적으로 존재함으로써 세포 내 Ca^{2+} 의 동원이 일어나지 않았다. 즉 탈감작이 일어난다. 이러한 결과는 소마토스타틴도 G 단백을 경유

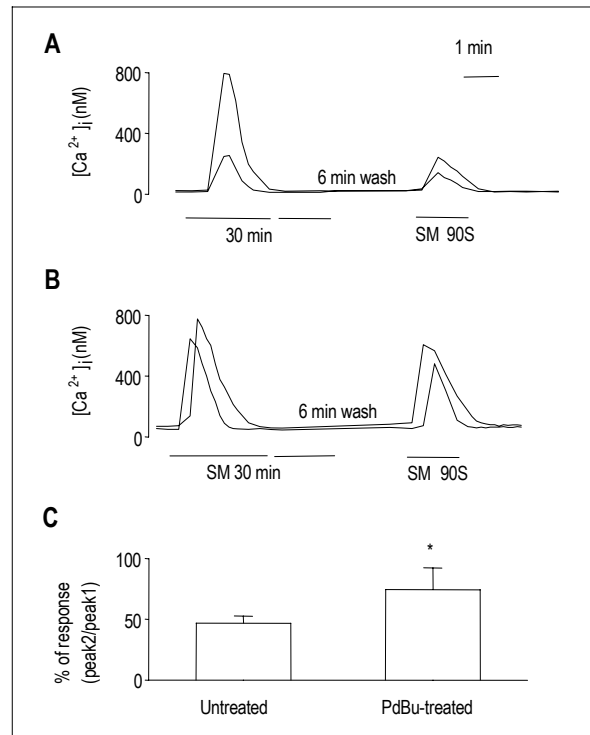


Fig. 6. Effects of chronic PdBu treatment on somatostatin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in NG108-15 cells. NG108-15 cells were grown in the presence of 1 μ M PdBu for 24h. (A) Somatostatin (1 μ M)-evoked responses were desensitized following a 30 min exposure of somatostatin (1 μ M) and a 6 min wash in untreated cells. (B) Somatostatin-induced desensitization inhibited by chronic PdBu treatment. (C) Histogram summarizes responses normalized to initial control response for untreated cells (n=36) and chronic PdBu-treated cells (n= 5). * $P < 0.05$ relative to untreated.

하여 세포 내로 신호를 전달하기 때문에, G 단백을 경유하여 일어나는 대부분의 세포 내 신호 전달현상이 일반적으로 탈감작된다는 보고를 뒷받침한다[19]. 더 나아가 G 단백 중 억제성 G 단백을 경유하여 세포 내 Ca^{2+} 을 동원하는 아편 유사체에 의한 탈감작과 상당히 유사하였다[20]. 그러나 소마토스타틴에 의한 탈감작의 경우 탈감작에서 회복되는 과정이 아편 유사체에 의한 것보다는 약간 빨랐다.

이러한 소마토스타틴 수용체에 의한 세포 내 Ca^{2+} 동원의 탈감작은 phospholipase C를 활성화시키는 다른 물질과 교차 탈감작 (cross-desensitization)이 존재하지 않는, 소마토스타틴에 의해서만 일어나는 동질성 탈감작 (homogenous desensitization)이 일어났다. 즉 G 단백 중 Gq를 매개로 phospholipase C를 활성화시키는 bradykinin과 억제성 G 단백을 경유하여 세포 내 Ca^{2+} 동원의 탈감작을 유발하는 소마토스타틴 사이에는 아무 교차 탈감작이 관찰되지 않았다. 또한 같은 억제성 G 단백을 경유하여 세포 내 Ca^{2+} 을 동원하는 δ 아편 유사체 수용체 항진제인 DADLE과 소마

토스타틴 사이에서도 아무 교차 탈감작이 일어나지 않았다.

더 나아가 이러한 소마토스타틴 수용체의 활성화에 의한 세포 내 Ca^{2+} 동원의 탈감작은 세포 내 Ca^{2+} 저장소의 고갈로 인해 일어나는 현상도 아니었다. 이러한 사실은 본 실험에서 소마토스타틴을 30분간 전처리하여 소마토스타틴에 의한 탈감작을 유발시킨 직후, bradykinin이나 DADLE를 처리하였을 때 bradykinin과 DADLE에 의한 세포 내 Ca^{2+} 동원이 정상적인 것으로 알 수 있었다. 즉 NG108-15 세포에서 소마토스타틴에 의해 Ca^{2+} 을 유리하는, IP_3 에 반응하는 세포 내 저장소는 소마토스타틴에 의해 탈감작되는 30분 동안에 Ca^{2+} 으로 다시 채워져 있다는 것을 의미한다. 이것은 NG108-15 세포에서 세포 내 Ca^{2+} 저장소에서 Ca^{2+} 을 강력하게 동원하는 bradykinin 처리 후 2분 후에 이미 세포 내 저장소의 반이 채워진다는 보고에 의해 잘 뒷받침되고 있다[21].

G 단백을 경유하여 세포 내 신호를 전달하는 수용체의 활성화는 음성되먹이기로 인산화되어 수용체를 G 단백으로부터 탈매개(uncoupling)시킴으로써 수용체의 지속적인 세포 내 신호전달을 차단할 수 있는 것으로 알려져 있다[15]. 현재까지 여기에 관련된 특별한 kinase들은 확실히 규명되지 않고 있다. 본 실험에서 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 동원의 탈감작은 PKA의 활성화 물질인 8-cpt-cAMP의 처리에 의해 일어나지 않았다. 실제로 소마토스타틴 수용체가 억제성 G 단백을 거쳐서 adenylyl cyclase를 억제한다는 보고[5, 6]는 본 실험에서 8-cpt-cAMP에 의한 PKA의 활성화가 소마토스타틴에 의한 신호의 탈감작을 유발시키는데 관여하지 않은 이유를 잘 설명해 준다. 그러나 PKC 활성화 물질인 PdBu에 의해서는 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 동원을 완전하게 탈감작시켰다. 이것은 PKC가 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 동원의 탈감작을 유발할 수 있다는 것을 시사한다. 일반적으로 phospholipase C의 활성화 시 생성된 IP_3 에 의해 세포 내 Ca^{2+} 저장소에서 유리된 Ca^{2+} 과 같이 생성된 diacylglycerol이 PKC를 활성화시키는 것으로 잘 알려져 있다. 실제로 인위적으로 소마토스타틴 수용체를 발현시킨 세포와 소마토스타틴 수용체가 내인성으로 존재하는 NG108-15세포에서 소마토스타틴 수용체의 활성화가 phospholipase C를 활성화시켜 IP_3 를 생성하며 이 IP_3 에 의해 세포 내 Ca^{2+} 을 증가시키는 것으로 보고되었다[12~14]. 즉 NG108-15 세포에서 소마토스타틴 수용체의 자극은 phospholipase C의 활성을 증가시켜 세포 내 Ca^{2+} 을 증가시키는데 이때 증가된 Ca^{2+} 과 같이 생성된 diacylglycerol이 세포 내 PKC의 활성을 증가시켜서, 소마토스타틴 수용체에 의한 신호전달에 관계하는 구조물을 인산화시켜 소마토스타틴에 의한 지속적인 신호전달이 일어나지 않도록 하는 것으로 생각된다. 이러한 사실은 PKC를 다운 레귤레이션시킨 후 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+}

동원의 탈감작이 존재하는지를 관찰한 실험에서 더욱 명확해진다. 세포를 PdBu와 같은 phorbol ester에 장기간 노출하면 phorbol ester에 의해 활성화되는 PKC는 다운 레귤레이션되어 없어지는 것으로 알려져 있다[18]. 본 실험에서 24시간 동안 PdBu를 전처리한 세포에서 소마토스타틴에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 증가는 나타났지만, 소마토스타틴에 의한 세포내 Ca^{2+} 동원의 탈감작이 나타나지 않았다. 이들 세포에서 세포 내 PKC가 존재하지 않으므로 PdBu를 전처리하지 않은 세포에서 나타나던 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 동원의 탈감작이 나타나지 않은 것이다. 따라서 소마토스타틴 수용체의 장기간 자극에 의한 세포 내 Ca^{2+} 동원의 탈감작은 소마토스타틴 수용체 자극에 의해 phospholipase C의 활성화로 발생한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가와 diacylglycerol로 PKC가 활성화되어 소마토스타틴 수용체 이후의 신호전달 체계의 인산화를 통해 일어나는 것으로 생각된다. 그러나 정확히 어떤 신호전달 물질이 PKC에 의해 인산화되어 탈감작이 일어나는지는 앞으로 더 규명되어야 할 것이다. 또한 어떤 PKC가 탈감작에 관여하는지도 더 연구되어야 할 것이다.

정상적으로 특정한 호르몬이나 신경전달 물질들이 체내의 다양한 기능을 적절히 조절하고 있다. 이들 물질들에 의한 신호들은 이들 물질이 장기간 존재할 때 음성되먹이기로 신경전달 물질이나 호르몬에 의한 효과를 약화시켜 체내의 항상상태(homeostasis)를 유지하는 것으로 알려져 있다. 이러한 조절기전은 이들 물질에 의한 과도한 자극 혹은 억제 상태가 지속되어 체내에 유해한 상태가 오는 것을 방지하는 것으로 생각된다. 이러한 조절체계는 세포수준에서도 존재하는 것이 밝혀지고 있는데 이것이 바로 수용체 신호의 탈감작이다. 본 연구에서 소마토스타틴 수용체 자극에 의한 세포 내 Ca^{2+} 동원에도 이 체계가 존재함을 입증하였다. 따라서 소마토스타틴 수용체가 존재하는 인체의 여러 가지 세포에서 특히 신경세포, 내분비세포, 평활근세포 등에서 지속적인 소마토스타틴 존재 시 세포 내 Ca^{2+} 동원의 탈감작이 세포의 신호전달 과정을 조절할 것으로 생각된다. 따라서 지속적 혹은 반복적인 소마토스타틴 수용체의 활성화로 생기는 탈감작이 이들 부위에서 어떤 역할을 하는지 규명되어야 할 것이다.

요 약

연구배경: G 단백 매개 수용체인 소마토스타틴 수용체의 자극은 NG108-15 세포에서 세포 내 IP_3 반응성 저장소에서 Ca^{2+} 을 유리시키는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 G 단백 매개수용체에 의한 신호전달은 장기간 항진제에 노출 시 탈감작되어 그 신호가 작아지는 것으로 알려져 있다.

방법: 본 연구에서는 fura-2를 이용한 세포 내 Ca^{2+} 농도

의 디지털 영상측정을 사용하여 소마토스타틴의 장기간 노출이 소마토스타틴 수용체에 의한 Ca^{2+} 신호의 탈감작을 유발하는지를 이산화탄소 비의존성 배지와 10 μ M forskolin으로 분화시킨 NG108-15 세포를 사용해 규명하였다.

결과: NG108-15 세포를 30분 동안 1 μ M 소마토스타틴에 노출하면 소마토스타틴에 의해 유발되는 세포 내 Ca^{2+} 농도의 증가 현상은 완전히 탈감작되었다. 소마토스타틴에 의해 유도된 탈감작은 소마토스타틴을 제거하면 탈감작에서 서서히 회복되어 20분이 지나면 거의 사라졌다. 이 탈감작은 세포 내 저장소의 Ca^{2+} 고갈로 일어나는 것이 아니었다. 또한 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 동원의 탈감작은 Gq를 매개로 phospholipase C를 활성화하여 세포 내 Ca^{2+} 을 동원하는 bradykinin과 억제성 G 단백을 매개로 세포 내 Ca^{2+} 을 동원하는 δ 아편 유사체 (opioid) 수용체 항진제인 D-Ala2-D-Leu5 enkephalin사이에 아무 교차 탈감작이 없었다. 세포 내 PKA를 활성화시키는 8-cpt-cAMP (0.1 mM)를 30분 동안 전처리하였을 때 소마토스타틴에 의한 세포내 Ca^{2+} 동원은 아무 영향이 없었으나, PKC를 활성화시키는 1 μ M PdBu를 30분간 전처리한 경우에는 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 동원은 완전히 탈감작되었다. 더 나아가 24시간 동안 PdBu 전처리에 의해 세포 내 PKC를 고갈시켰을 때 소마토스타틴에 의한 Ca^{2+} 신호의 탈감작은 억제되었다.

결론: 장기간 NG108-15 세포가 소마토스타틴에 노출되면 소마토스타틴에 의한 세포 내 Ca^{2+} 의 동원은 탈감작되며, 이 탈감작에 PKC가 관여하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Hagen PM: Somatostatin receptor expression in clinical immunology. *Metabolism* 45:86-87, 1996
- Schindler M, Humphrey PPA, Emson PC: Somatostatin receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 50:9-47, 1996
- Schonbrunn A, Gu A-Z, Dournard P, Beaudet A, Tannenbaum GS, Brown PJ: Somatostatin receptor subtypes: specific expression and signaling properties. *Metabolism* 45:8-11, 1996
- Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE, Reisine T: Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16:86-88, 1995
- Yasuda K, Rens-Dominano S, Breder CD, Law SF, Saper CB, Reisine T, Bell GI: Cloning of a novel SRIF receptor, SSTR3, that is coupled to adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 267:20422-20428, 1992
- Vanetti M, Vogt G, Holt V: The isoforms of the mouse somatostatin receptor (MSSTR2A and MSSTR2B) differ in coupling efficiency to adenylyl cyclase in agonist-induced receptor desensitization. *FEBS Lett* 331:260-266, 1993
- Liapakis G, Tallent M, Reisine T: Molecular and functional properties of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism* 45:12-13, 1996
- Beaumont V, Hepworth MB, Luty JS, Kelly E, Henderson G: Somatostatin receptor desensitization in NG108-15 cells. *J Biol Chem* 273:33174-33183, 1998
- Jin W, Lee NM, Loh HH, Thayer SA: Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells. *J Neurosci* 14:1920-1929, 1994
- Smart D, Lambert DG: δ -opioids stimulate inositol 1,4,5-trisphosphate formation, and so mobilize Ca^{2+} from intracellular stores, in undifferentiated NG108-15 cells. *J Neurochem* 66:1462-1467, 1996
- Akbar M, Okajima F, Tomura H, Majid MA, Yamada Y, Seino S, Kondo Y: Phospholipase C activation and Ca^{2+} mobilization by cloned human somatostatin receptor subtypes 1-5, in transfected COS-7 cells. *FEBS Lett* 348:192-196, 1994
- Kubota A, Yamada Y, Kagimoto S, Yasuda K, Somiya Y, Ihara Y, Okamoto Y, Kozasa T, Seino S, Seino Y: Multiple effector coupling of somatostatin receptor subtype SSTR1. *Biochem Biophys Res Comm* 204:176-186, 1994
- Tomura H, Okajima F, Akbar M, Abdulmajid M, Shok K, Kondo Y: Transfected human somatostatin receptor type 2, SSTR2, not only inhibits adenylyl cyclase but also stimulates phospholipase C and Ca^{2+} mobilization. *Biochem Biophys Res Comm* 200:986-992, 1994
- Rhie D-J, Sung JH, Ha US, Ha U-S, Kim HJ, Min DS, Hahn SJ, Kim MS, Jo YH, Yoon SH: Somatostatin mobilizes calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells. *Brain Res* 975:120-128, 2003
- Freedman NJ, Lefkowitz RJ: Desensitization of G protein-coupled receptors. *Rec Prog Hormone Res* 51:319-335, 1996
- Gryniewicz G, Peonie M, Tsien RY: A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450,

- 1985
17. Yoon SH, Lo T-M, Loh HH, Thayer SA: δ -opioid-induced liberation of $G\beta\gamma$ mobilizes Ca^{2+} stores in NG108-15 cells. *Mol Pharmacol* 56:902-908, 1999
18. Nishizuka Y: Protein kinases in signal transduction. *Trends Biochem Sci* 163-169, 1984
19. Lohse MJ: Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179:171-188, 1993
20. Yoon SH, Jin WZ, Spencer RJ, Loh HH, Thayer SA: Desensitization of δ -opioid-induced mobilization of Ca^{2+} stores in NG108-15 cells. *Brain Res* 802:9-18, 1998
21. Lo T-M, Thayer SA: Refilling the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive store in neuroblastoma X glioma hybrid NG108-15 cells. *Am J Physiol: Cell Physiol* 33:C641-C653, 1993