

사람 망막아세포종 세포에 발현된 P2Y₁₁ 수용체의 확인

김윤희¹ · 김대린² · 전고이³ · 이종혁³ · 공인덕⁴

연세심미안 눈성형센터¹, 계명대학교 간호대학 기초간호과학교실², 연세대학교 원주의과대학 안과학교실³,
연세대학교 원주의과대학 생리학교실 및 기초의학연구소⁴

목적 : 사람 망막아세포종 세포에 발현되어 있는 P2Y₁₁ 수용체를 확인하고 생리적 기능의 일부를 규명하고자 하였다.
대상 및 방법 : P2Y₁₁ 수용체 활성화를 확인하기 위해 망막아세포종 WERI-Rb-1 세포를 대상으로 칼슘 이미징 기법을 이용하여 세포내 칼슘농도(Ca^{2+})를 측정하였으며, P2Y₁₁ 수용체 mRNA의 발현은 RT-PCR 기법을 사용하였다.

결과 : 1) ATP 투여시 세포내 Ca^{2+} 이 증가하였으며, 이는 세포외 Ca^{2+} 을 제거하였을 경우에도 유사하게 증가하였다. 2) ATP에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 세포내 저장소(Endoplasmic reticulum, ER)로부터 동원되는 것으로 나타났다. 3) P2Y₁₁ 수용체 효현제인 BzATP 투여시 Ca^{2+} 은 ATP에 의한 세포외 칼슘이온농도의 31.2±3.7%에 해당하였다. 4) RT-PCR 방법을 통해 P2Y₁₁ 수용체의 mRNA 발현을 확인하였다.

결론 : 망막아세포종 세포에는 P2Y₁₁ 수용체가 발현되어 있으며, P2Y₁₁ 수용체를 매개로 한 세포내 칼슘농도의 증가는 세포분화, 증식, 세포사멸, 종양세포의 병리적 변화 등의 조절기전에 관여하리라 사료된다.

〈한안지 48(8):1134-1142, 2007〉

ATP (adenosine 5'-triphosphate)는 세포내에서 일차적인 에너지원으로 이용될 뿐만 아니라 세포외에도 미량 존재하며 세포내 다양한 생리적 기능에 관여하는 것으로 잘 알려져 있다. 세포외액의 ATP와 같은 adenine 뉴클레오타이드 및 adenosine의 작용은 세포외막에 존재하는 수용체를 매개로 이루어지는데, 이러한 수용체를 퓨린성 수용체(purinergic receptor)라 한다. 이는 여러 가지 효현제(agonist) 및 길항제(antagonist)의 효과와 선택성 등을 기준으로 크게 P1과 P2 수용체로 구분한다. Adenosine과 AMP (adenosine monophosphate)의 작용이 우세한 P1 수용체는 다시 A₁, A₂, A₃로, ADP와 ATP의 작용이 우세한 P2 수용체는 리간드-의존성(ligand-gated)

이온채널인 P2X와 G-단백과 연결된 P2Y로 나누어진 다.¹

현재까지 포유류에서 cloning된 P2X 수용체 아형은 최소 8개 이상이며(P2X₁₋₈), P2Y 수용체에도 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ 등의 아형들이 보고되어 있다.^{2,3} P2Y 수용체 아형들 중 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ 수용체는 사람에게서 클로닝되어 왔고 기능적으로 활성화된 형태라고 알려져 있다.^{2,4,5} P2Y_{11,12,13,14} 수용체들은 최근에 알려진 아형들로 그 분포와 기능적 특성들에 대해서는 다른 수용체 아형들에 비해 알려진 바가 적다.³

일반적으로 세포외액에서의 퓨린 뉴클레오타이드와 뉴클레오타이드는 포유동물의 눈, 뇌, 뼈, 태반, 골격근, 폐, 비장, 신장, 심장 등과 같은 조직에 광범위하게 분포하고 있으면서^{3,6} 다양한 생리적 기능을 조절하고, 세포내 신호전달 조절을 통한 세포의 성장, 분화, 증식, 사멸 등의 기전을 매개하며⁷, 면역계 질환, 염증, 통증, 신경퇴행성 질환, 골다공증 등의 다양한 병리적 기전에도 관여한다.³ 뿐만 아니라 퓨린성 수용체는 암이나 허혈성 손상, 약물 및 방사선 독성, 외상성 조직 손상, 뼈의 재흡수, 스트레스 및 출혈성 쇼크 등과 같은 병태생리적 상황에서 보호기전을 활성화시키는데도 관여하는 것으로⁸ 알려져 있다.

〈접수일 : 2006년 6월 2일, 심사통과일 : 2007년 5월 8일〉

통신저자 : 이 종 혁

강원도 원주시 일산동 162
연세대학교 원주기독병원 안과
Tel: 033-741-1390, Fax: 033-745-2965
E-mail: jhlee@wonju.yonsei.ac.kr

* 본 논문의 요지는 2006년 대한안과학회 제95회 춘계학술대회에서 포스터로 발표되었음.

근자에 이르러 눈의 조직에 분포되어 있는 퓨린성 수용체를 규명하기 위한 많은 연구가 진행되어, 눈의 구조 및 기능에 관련된 조직에 따라 그 발현양상이 다양하지만 눈조직에 광범위하게 발현되어 있는 퓨린성 수용체 아형들은 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆인 것으로 규명되었다.^{3,6,9-14} 이 중에서도 특히 P2Y₂ 수용체 아형은 각막,^{7,11,15,16} 결막,^{9,13,17} 모양체,^{18,19} 윌러 세포,^{3,6,20,21} 망막,²² 맥락막(suprachoroid),²³ 렌즈 상피세포²⁴ 등 광범위한 눈조직에 분포하고 있으면서 결막 상피를 통한 Cl⁻-이온과 수분의 이동 및 결막 술잔세포(goblet cell)로부터 점액분비를 자극, 망막하 수분재흡수 기전 등에 관여하는 것으로 알려져, 임상적으로 안구건조증¹²과 망막박리의 치료제로 개발되어 활용되고 있다. 그 외 최근 들어 P2Y₁ 수용체에 의해서도 일부 눈의 조직에서 세포내 칼슘동원²⁵이나 Ca²⁺ wave²⁶ 등의 조절이 이루어지는 것이 밝혀져 있다. 그러나 눈 조직에서 발견되는 퓨린성 수용체의 다양한 분포에도 불구하고 일부 수용체 아형의 발현특성 및 기능적 특성에 관해서만 잘 알려져 있을 뿐이며, 비교적 근래에 포유류에서 클로닝된 P2Y 수용체 아형들(P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄)이 눈 조직에 분포되어 기능적으로 활성화되는지에 관해서는 알려진 바가 적다.

따라서 망막아세포종은 망막세포와 동일한 줄기배아 세포로부터 기원되며^{27,28} 사람 망막에서 다양한 퓨린성 수용체가 규명된 점,²⁹ 그리고 미분화된 세포로서의 망막아세포종의 특성을 고려해 볼 때 망막아세포종 세포에도 퓨린성 수용체가 존재하여 기능적으로 활성화되어 있을 것으로 보이며, 특히 최근에 알려진 퓨린성 수용체 중 칼슘동원 기전이 밝혀져 있는 P2Y₁₁ 수용체의 발현여부는 확인된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 망막아세포종(retinoblastoma) 세포를 대상으로 여기에 발현되어 있을 것으로 예상되는 P2Y₁₁ 수용체를 확인하고 이의 퓨린성 신호전달 신호전달의 기전을 세포내 칼슘이온 농도의 변화와 관련지어 탐색해 보고자 하였다.

대상과 방법

1. 모델 세포주 및 배양

본 연구에서 사용한 망막아세포종은 백인 여성(Caucasian female)의 눈에서 분리한 WERI-Rb-1 세포를 ATCC(American Type Culture Collection, HTB-169)로부터 분양받아 사용하였다. WERI-Rb-1 세포는 Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (Cambrex, Walkersville, MD,

USA)에 10% 우 태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 100,000 unit/L antimycotic-antibiotics (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)가 첨가된 배지에서 배양하였다. 세포주는 ATCC의 프로토콜에 따라 3~4일 간격으로 배지를 갈아주었고 7일을 주기로 계대배양 하였다. McFall et al³⁰은 WERI-Rb-1 세포주의 배가 시간(doubling time)이 96시간으로 보고되었으나 동일한 배지를 이용하여 배양한 본 연구에서는 약 일주일의 소요되었다.

2. 실험용액 및 약물

2.1. 실험용액

칼슘 이미징 실험을 위한 세포외 관류액(external solution: PSS)의 조성(mM)은 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES 그리고 10 glucose (pH 7.4)이었다. 실험 시에는 모든 약물을 약 2 /min의 속도로 독립현미경 위에 설치된 챔버에 관류시켜 실험하였다.

2.2. 약물

우 태아혈청(FBS) 및 antimycotic-antibiotics는 GibcoBRL로부터, Fluo-3/AM은 Molecular probes (Eugene, OR, USA)로부터 각각 구입하였고, RPMI는 CAMBREX사로부터 구입하였다. 또한 adenosine 5'-triphosphate (ATP), 2'-3'-O-(4-benzoyl)-benzoyl-ATP (BzATP), thapsigargin은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Fluo-3/AM은 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 사용하였고 그 외의 모든 시약은 삼차증류수에 녹여 사용하였다.

3. 세포내 칼슘이온농도(Ca²⁺) 측정

세포내 칼슘이온농도(Ca²⁺)의 변화를 측정하기 위해 형광이미지 시스템(fluorescence imaging system)을 사용하였으며 그 방법은 동일한 세포에서 칼슘이온 농도를 측정한 Kim et al³¹의 방법을 참조하였다. 먼저 세포배양액 1 ml에 Fluo-3 /AM 5 μM 농도를 첨가한 후 1분간 초음파 처리 (sonication) 후 여기에 망막아세포종 세포가 붙어있는 coverslip을 넣은 다음 37℃ 세포 배양기(humidified CO₂ incubator, 95% air 5% CO₂)에서 1시간 부하시킨다. 부하가 끝나면 세포외 관류액으로 2회 세척하여 세포외액의 잔여

Fluo-3/AM을 충분히 제거한 다음 도립현미경(IX51, Olympus, Japan)위의 관류 챔버(Warner Instrument, Hamden, CT, USA)에 올려놓고 관류액(normal PSS)을 중력에 의해 2 ml/min 속도로 20분 이상 관류시켜 충분한 탈에스테르화(deesterification)가 되도록 하였다.

형광이미지는 175-W Xenon lamp로부터 나오는 광원(light source) 중 Fluo-3AM에 적합한 488 nm (F488) 파장으로 여기(excitation) 시켰을 때 530 nm의 파장에서 방출(emission)되는 형광 세기를 CCD 카메라(cooled charge-coupled device camera, Cascade, Roper, USA)가 증폭시켜 이미지로 나타내었는데, 이때 얻어지는 형광이미지는 약물 투여시는 0.1 Hz의 빈도로 30초간 측정하였으며 세척 동안에는 0.03 Hz의 빈도로 측정하여 광원으로 인한 세포손상을 최소화하였다. 세포내 칼슘이온농도는 자극을 주기 전 Fluo-3/AM 부하로 인한 기본 형광값(F₀)에서 약물을 투여하였을 때 변화되는 형광값(F)의 비율로 측정하였으며 F/F₀값이 세포내 칼슘이온농도의 변화를 반영하도록 하였다. 세포마다 Fluo-3에 부하되는 정도에 차이가 있어, 본 연구에서는 F₀값이 1,000이상으로 충분히 잘 부하된 세포에서 얻은 값만을 포함시켰다.

측정한 형광이미지는 소프트웨어 패키지인 MetaFluor 6.1 (Universal Imaging Corporation, USA)로 기록한 뒤, 단일세포의 F/F₀값을 평균내어 자료를 분석하였으며, 이들 형광(F/F₀)값의 최대(peak amplitude)치를 비교하여 분석하였다.

4. 역전사 연쇄 중합반응(RT-PCR)

먼저 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법을 사용하여 WERI-Rb-1 세포들로부터 전체 RNA를 분리하였다.³² 즉, 세포를 guanidinium thiocyanate buffer로 lysis 시킨 다음 phenol 및 chloroform을 가하여 얼음 위에서 15분 이상 보관하였다. 이를 4°C에서 10,000 xg로 20분간 원심 분리하여 상층액만을 조심스럽게 취하였다. 이 상층액을 동량의 isopropanol과 섞은 다음 -70°C에서 1시간 이상 RNA를 침전시켰다. 다시 4°C에서 10,000 Xg로 20분간 원심 분리하여 RNA pellet을 얻었으며, 이를 다시 75% ethanol로 씻어낸 후 원심 분리하여 RNA 시료를 얻었다.

cDNA의 합성은 2 µg RNA와 0.5 µg random hexamer를 먼저 70°C에서 5분간 반응시키고, reverse transcriptase 200 units, dNTP 25 nmoles,

RNase inhibitor 20 units 등이 포함되게 하여 37°C에서 1시간 반응시킴으로써 이루어졌다. 이어 PCR은 여러 퓨린성 수용체에 대한 시발체(primer)를 이용하여 이루어졌으며, 이들의 염기서열은 표 1에 요약하였다. PCR 반응액에는 합성된 cDNA 0.05 µg, 각각의 primer pair (10 pmoles), 1.25 units의 AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 10 nmoles의 dNTP 등이 포함되게 하여, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분으로 35 cycle 동안 반응시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.1% agarose gel에 전기영동하여 U.V.하에서 관찰하였다.

5. 자료분석

결과는 평균(Mean)과 표준오차(SEM)로 나타내었으며, 통계적인 의미는 unpaired t-검정과 분산분석(one-way ANOVA)으로 검증하여, p값이 0.05 이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

결 과

1. ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화

Fluo-3/AM으로 부하된 WERI-Rb-1 세포들은 ATP (10 µM) 투여시 대부분의 세포들(80% 이상)에서 일시적인 세포내 칼슘이온농도의 증가가 뚜렷이 관찰되었으며(Fig. 1), 평균 F/F₀의 값은 7.1±0.2 (N=5, n=52)이었다. ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의존적으로 증가하였으며(그림에 나타나지 않음), 일정한 시간 간격으로 ATP를 반복 투여했을 때 Figure. 1에서 보이는 바와 같이 그 효과가 일부 감소하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의할 만한 수준은 아니어서(F=0.612, p=0.55), 동일 세포들에 대한 ATP 투여의 효과가 탈감작(desensitization)없이 반복적으로 재현됨을 알 수 있었다.

다음으로는 Endoplasmic reticulum (ER) 막의 Ca²⁺-ATPase 차단제인 thapsigargin (TG) 1 µM을 투여하여 세포내 칼슘저장소를 고갈시킨 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다. TG 투여 후 급격한 세포내 칼슘이온농도의 증가가 있었으며 1분 전후로 최고값에 도달하였고 이후 약 8분에 걸쳐 서서히 감소되어 TG 투여 이전 수준에서 비교적 일정한 값을 유지하였다. TG 전처리 후 이와 같은 시점에서 다시 ATP를 투여하였을 때 Figure 2에 나타난 바와 같이 세포내 칼슘이온농도의 증가는 처음 대조군

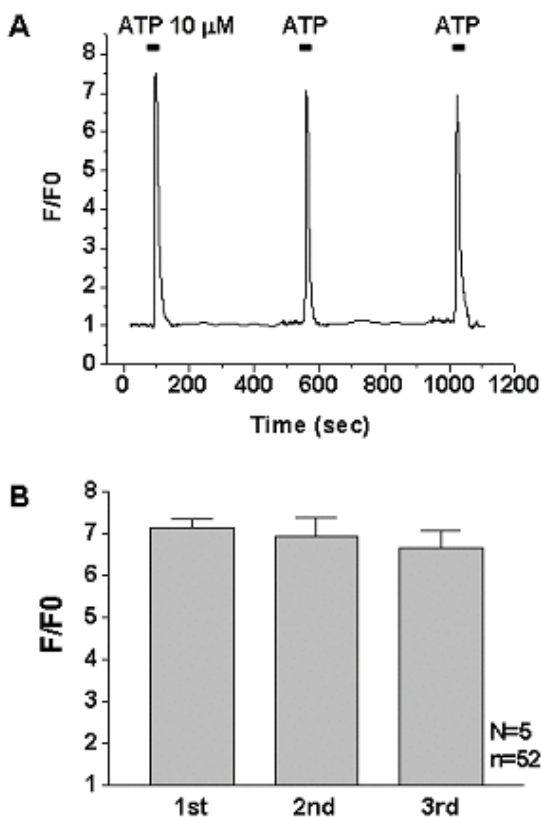


Figure 1. ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ response in WERI-Rb-1 cells. WERI-Rb-1 cells, which was loaded with 5 μ M Fluo-3/AM for 1 hour, was mounted in a flow chamber. A: 100 μ M ATP increased intracellular calcium level ($F/F_0=7.1\pm0.2$), which response was not desensitized by additional ATP application. There were not significant differences in the peak amplitude of $[Ca^{2+}]_i$ responses among 3 repeated ATP application. F_0 =basal fluorescence value loaded by Fluo-3/AM, F =fluorescence changed after introducing ATP, n =total cell number, N =experimental number, solid line=the duration for applying ATP.

값의 $8.1\pm0.9\%$ 로 대부분의 효과가 억제되는 것을 관찰할 수 있었다($p<.001$, $n=52$).

2. 퓨린성 수용체 효현제에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화

퓨린성 수용체들 중 세포내 칼슘이온농도에 영향을 미치는 아형을 규명하기 위해 먼저 P2Y 수용체 효현제들이 Ca^{2+} 에 미치는 효과를 비교해 보았다. 먼저 P2Y 수용체 효현제인 2MeS-ATP ($EC_{50}=0.4\pm0.01 \mu$ M)에 의해서는 세포내 칼슘이온농도가 증가하였으나 대표적 P2X 수용체 효현제인 $\alpha\beta$ -MeATP (100 μ M)에 의해서는 유의한 변화가 없는 것으로 보아(Fig. 3)

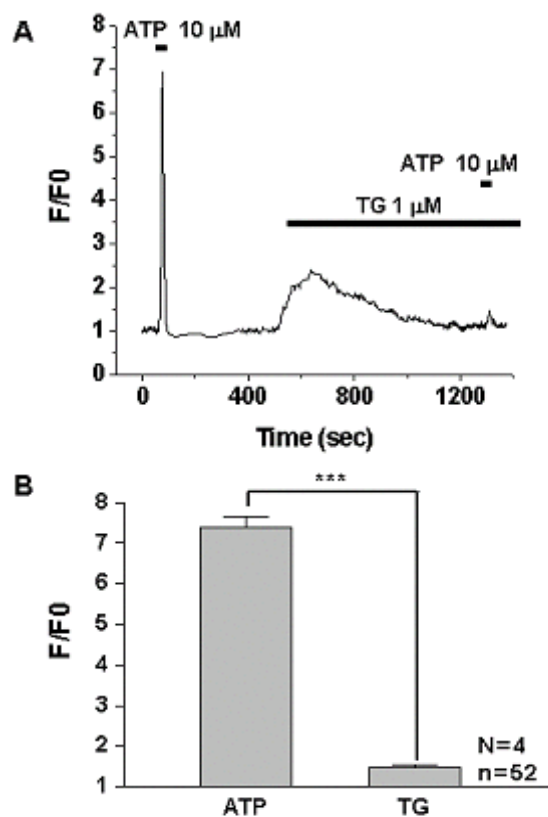


Figure 2. Effect of Thapsigargin (TG) on ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in WERI-Rb-1 cells. Original trace (A) and histogram (B) showing an almost complete suppression of maximal amplitude of 10 μ M ATP-induced calcium transient after pretreatment with 1 μ M thapsigargin (TG). Drugs were applied for 9 min as indicated by thick bars. F_0 =basal fluorescence value loaded by Fluo-3/AM, F =fluorescence changed after introducing ATP, n =total cell number, N =experimental number, solid line=the duration for applying TG.*** $p<.001$)

WERI-Rb-1 세포에서는 P2X 수용체가 기능하고 있지 않음을 예측해 볼 수 있다. 또한 P2Y₁₁ 수용체 아형의 효현제인 BzATP (100 μ M)에 의한 Ca^{2+} 은 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 $31.2\pm1.2\%$ 에 해당하였으며(Fig. 4), BzATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 증가는 Ca^{2+} -free 조건에서도 유사하게 관찰되어 P2Y₁₁ 수용체에 의한 세포내 칼슘조절 기전이 WERI-Rb-1 세포에도 기능하고 있음을 알 수 있었다.

3. RT-PCR 방법을 이용한 퓨린성 수용체의 분자생물학적 규명

약물학적 방법을 통해 망막아세포종 세포에서 세포내 신호전달 기전이 주로 P2Y 퓨린성 수용체에 의해

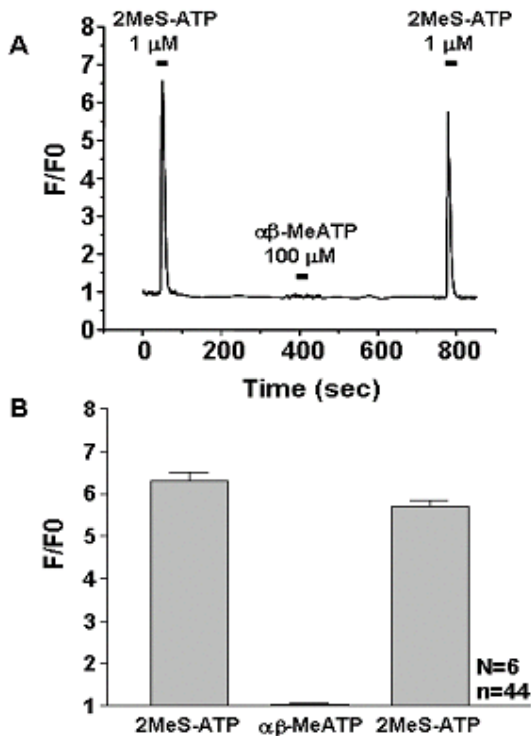


Figure 3. Differential effect of P2Y and P2X purinoceptor agonists on $[Ca^{2+}]_i$ in WERI-Rb-1 cells. Original trace (A) and histogram (B) showing 2MeS-ATP (1 μ M), P2Y agonist, induced calcium transient, but those intracellular calcium rise was not represented by the application of the P2X agonist, $\alpha\beta$ -MeATP (100 μ M). F0=basal fluorescence value loaded by Flu-3/AM, F=fluorescence changed after introducing agonists, n=total cell number, N=experimental number, solid line=the duration for applying agonists.

이루어지고 있음을 확인한 후, WERI-Rb-1 세포막에 발현되어 있는 P2Y 수용체 아형을 규명하기 위해 망막아세포종 세포로부터 RNA를 분리한 다음, 특정 아형에 선택적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이, 퓨린성 수용체 아형들 중 포유동물에 일반적으로 발현되어 있는 것으로 잘 알려진 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂ 수용체 mRNA가 모두 망막아세포종 세포에 발현되어 있음을 알 수 있었다. 그 외에도 특이하게 P2Y₈ 수용체 mRNA가 발현되었다.

고 찰

본 연구에서는 세포내 칼슘이온 측정법 및 분자 생물학적 방법을 이용하여 망막아세포종 세포주의 하나인 WERI-Rb-1 세포에 발현된 퓨린성 수용체 중의 하나

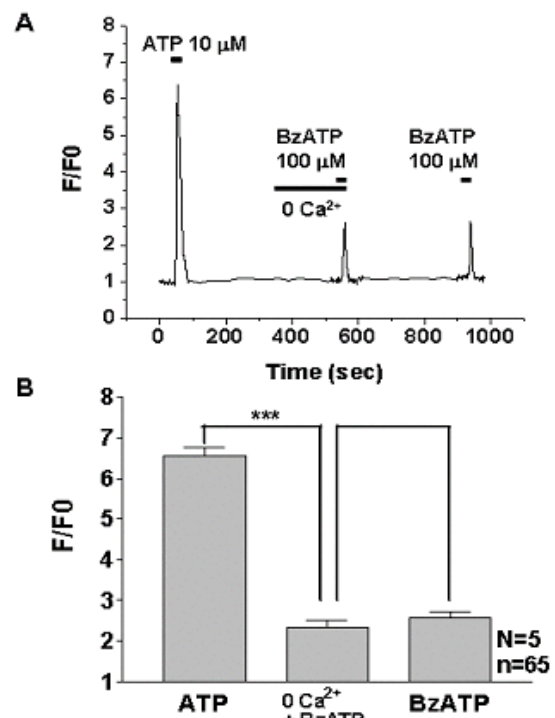


Figure 4. Effect of BzATP on $[Ca^{2+}]_i$ increase in WERI-Rb-1 cells. Original trace (A) and histogram (B) showing BzATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise was almost to $31.2 \pm 3.7\%$ of maximal amplitude of 10 μ M ATP -induced calcium transient, and BzATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ response was similar in the incubation of calcium free solution (0 Ca^{2+}). F0=basal fluorescence value loaded by Flu-3/AM, F=fluorescence changed after introducing agonists, n=total cell number, N=experimental number, solid line=the duration for applying agonists.

인 P2Y₁₁ 수용체의 존재를 확인하였다.

먼저 약리학적 방법을 이용한 칼슘 이미징 실험 결과 미분화된 망막아세포종 세포에서 ATP 투여에 따른 일시적인 세포내 칼슘이온농도의 증가가 관찰되었는데, 세포내 칼슘이온 농도의 증가는 약 30초 이내에 모두 회복되는 것에서 알 수 있듯이 그 반응이 매우 일시적이었다. 이와 같은 칼슘농도의 일과성 반응은 동일 세포주에서 무스카린성 수용체에 의한 세포내 칼슘반응을 확인한 Kim et al.³²의 연구에서도 동일하게 나타난 특징으로, P2Y 퓨린성 수용체 중 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, 및 P2Y₆는 이들 모두 PLC 경로를 통한 IP₃의 생성에 의해 칼슘조절에 관여한다는 공통점을 가지고 있다.

망막아세포종 세포에 분포된 퓨린성 수용체의 아형을 알아보기 위해 분자생물학적 방법과 약리학적 방법

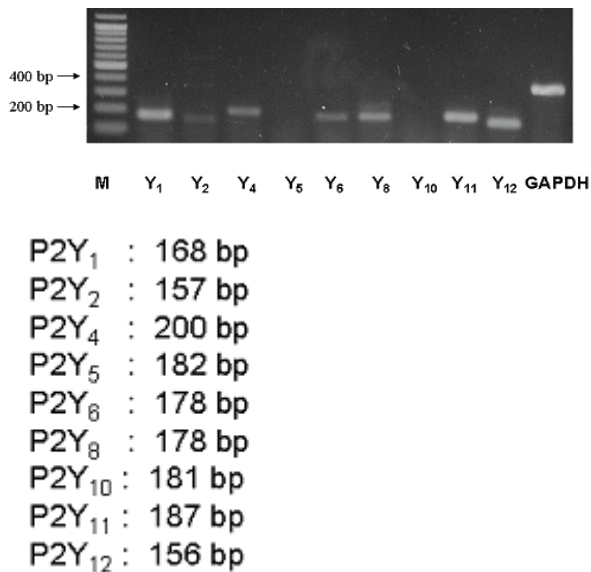


Figure 5. RT-PCR analysis of mRNA encoding the subunits of P2Y receptors expressed in WERI-Rb-1 cells. Total RNA isolated from WERI-Rb-1 cells were reverse transcribed and amplified by PCR with specific primers to the subunits of P2Y receptors. The resultant PCR products were visualized on agarose gel, containing ethidium bromide. As an internal control, GAPDH was also amplified. Estimated product size for each subunit is shown in parenthesis. M, DNA size marker.

을 이용하여 확인하고자 하였다. 먼저, RT-PCR 결과에서 망막아세포종 세포막에는 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₈, P2Y₁₁, P2Y₁₂ 아형의 퓨린성 수용체들의 mRNA가 검출되었다. 이들 퓨린성 수용체들은 대부분 사람을 비롯하여 포유동물 조직에서 널리 분포하며 기능적으로 활성화되어 있는 아형들이다.²⁻⁶ 특이한 결과로는 망막아세포종에 P2Y₈의 mRNA에 발현되어 있다는 점이다. P2Y₈ 수용체는 기존의 연구에서 미분화된 HL60 (human leukemia) 세포를 제외하고는 사람조직에서 보고되지 않은 아형이다.³³ 본 연구에서는 이들의 특성 및 기능적 관련성을 확인할 수 없었으나, 추후 미분화 및 분화 종양세포에서 P2Y₈ 수용체가 신호전달 기전에 관여하는지에 관한 심층연구가 필요하다고 본다. 한편, 퓨린성 수용체들의 효현제를 이용한 약리학적 실험결과에서 P2Y₁과 P2Y₁₁ 수용체 효현제에 의한 일과성 칼슘반응이 관찰되었다. 특히, P2Y₁₁ 수용체에 의한 세포내 칼슘증가는 P2Y₁ 수용체에 의한 값보다 작았지만 이러한 결과는 망막을 비롯한 다양한 눈조직에서 관찰한 퓨린성 수용체의 발현특징에서 보고되지 않은 사실이다. 기존의 연구에서 퓨린성 수용체는 정상적인 눈에서 뿐만 아니라 병태생리적 변화가 온 눈 조직에서도 여러 신호전달 경로에 영향을 미치는데, 이

와 같은 다양한 생리적 기능조절에 주로 관여하는 퓨린성 수용체는 P2Y₂인 것으로⁹⁻¹⁴ 알려져 있으며, 일부 보고에서 P2Y₁ 퓨린성 수용체가 쥐의 망막조직 (retinal slices)의 뿔러세포에서 Ca²⁺ wave를 일으키며,²⁶ 발달중의 닭 배아(developing chick embryo)에서 MAP kinase 신호전달과 DNA 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.³⁴ 이처럼 지금까지 대부분의 눈조직에서 우세하게 발현되어 있으면서 다양한 기전에 관여하는 것으로 알려진 P2Y₁ 및 P2Y₂ 수용체 이외에, 망막 관련 조직에서 일부 병적기전의 발생과정에서는 P2Y₁₁ 수용체가 중요한 의의를 갖는 것으로 보인다. 이것은 현재 안과영역에서 퓨린성 수용체의 임상적 적용분야가 주로 P2Y₂ 수용체에 집중되어 있는 것을 감안할 때, 앞으로 퓨린성 수용체를 목표(target)로 한 안과질환의 치료범위의 확대가능성을 의미한다 하겠다. 그 이유로 앞서 진술한 바와 같이, 망막조직에서 확인된 P2Y 퓨린성 수용체의 발현 혹은 기능적 특성에 대한 보고는 여전히 제한되어 있으며,³ 사람망막을 대상으로 퓨린성 수용체를 탐색한 연구는 주로 정상적인 뿔러 세포²¹와 망막상피세포²²등에 국한되어 있어, 상피조직 이외의 눈조직과 병적 상황이 초래된 눈조직에서의 퓨린성 수용체의 발현양상과 생리적 조절기전은 다른 특성을 나타낼 것으로 추측되기 때문이다. 본 연구에서 규명된 P2Y₁₁ 수용체의 발현 및 세포내 신호전달 특성은 이러한 관점에서 퓨린성 수용체에 대한 추후연구의 필요성과 퓨린성 수용체의 임상적용 범위 확대의 가능성을 높여준다고 할 수 있을 것이다. 또한 망막전구세포(retinal precursor cell) 모델로 연구되어 온 망막아세포종 세포에서 이루어지는 신호전달 기전은 다양한 세포군으로 이루어진 망막의 정상 생리와 병태 생리기전을 설명하는 기초지식이 될 수도 있다.

P2Y 퓨린성 수용체에 의한 세포내 신호전달 기전은 기본적으로 phospholipase C (PLC) 활성화 - inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) 생성 - 세포내 칼슘동원의 과정으로 이어지는 PLC-IP₃경로와 연관된다.^{35,36} 이렇게 동원된 세포내 칼슘에 의해 직접적으로 세포기능이 조절된다.³⁷ 또 다른 경로로는 adenylyl cyclase (AC)를 경유하는 기전이 알려져 있다.² P2Y 수용체들 중 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ 수용체 아형들은 PLC 경로를 활성화시켜 IP₃를 생성함으로써 세포내 칼슘저장소로부터 칼슘을 동원하는 기전에 관여하고,³⁸ P2Y₁₁은 PLC경로와 AC 기전을 모두 활성화시키는 것으로 알려져 있다.³⁹ 본 연구에서 P2Y₁₁ 퓨린성 수용체의 세포내 칼슘동원 기전은, 세포의 칼슘이온을 제거한 상태에서도 ATP에 의한 세포내 칼슘반응이 감소하지 않았고 PLC 경로 차단제인 U-73122와 IP₃

수용체 차단제인 2-APB 전처치가 ATP에 의한 세포 내 칼슘이온농도의 증가를 현저하게 억제하는 것으로 보아 대부분의 기전은 PLC-IP₃ 경로를 경유할 것으로 생각된다. 이러한 결과는 동일 세포주에서 콜린성 수용체에 의한 칼슘조절 기전과는 다소 차이를 보이는데, Kim et al (2004)³¹은 망막아세포종 세포에서의 칼슘조절은 세포내 칼슘저장소로부터의 유리뿐만 아니라 세포막을 통한 칼슘유입 기전에 의해서도 일부 조절된다고 하였다. 이처럼 동일한 칼슘조절 기능에 관여하고 있을지라도 수용체마다 조절 메커니즘이 약간씩 차이가 있음을 알 수 있고, 이러한 차이로 인해 세포 고유기능에 특장적인 방식으로 신호전달 과정이 전개되는 것으로 보인다.

이상의 결과에서 병태생리적 변화가 초래된 미분화 망막아세포종 세포에 발현된 P2Y₁₁ 수용체는 세포내 칼슘이온농도를 조절하여 세포의 증식과 분화를 촉진하고 이를 통해 세포의 발달과 성숙에 관여할 것으로 추측되는데 이와 관련된 구체적인 연구는 앞으로 활발히 진행될 것으로 사료된다.

결 론

사람의 망막아세포종 세포에 존재하는 P2Y₁₁ 퓨린성 수용체의 특성 및 의의를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

우선, ATP 투여 시 세포내 Ca²⁺이 증가하였으며, 일정한 시간 간격으로 ATP를 반복투여 하였을 때에도 반복적으로 재현되었다. ATP에 의한 세포내 Ca²⁺농도의 증가는 세포내 저장소(Endoplasmic reticulum, ER)로부터 동원되는 것으로 나타났다. 한편, P2Y₁₁ 수용체 효현제인 BzATP 투여 시 Ca²⁺은 ATP 의한 세포질내 칼슘이온농도의 31.2±3.7%에 해당하였으며, 역전사연쇄증합반응(RT-PCR)을 관찰한 결과 망막아세포종 세포에서 P2Y₁₁ 아형의 퓨린성 수용체를 코딩하는 mRNA가 존재함을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 망막아세포종 세포에서 ATP에 의한 세포내 Ca²⁺증가는 일부분이 P2Y₁₁ 퓨린성 수용체 아형이 활성화되어 세포내 칼슘저장소로부터 Ca²⁺을 동원하는 것으로 판단된다. 이러한 조절기전을 통해 망막아세포종 세포에서 P2Y₁₁ 수용체의 활성화는 세포의 증식, 분화, 성숙, 세포사멸, 종양세포로의 병리적 변화 등의 조절기전에 일부 관여할 수 있을 것으로 사료되며 본 연구의 결과는 비신경 조직에서 퓨린성 수용체에 대한 이해의 폭을 넓히는 중요한 기초정보로 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 아울러, 망막아세포종 세포에서 P2Y₁ 수용체와 함께 세포내 칼슘동원에 관여하는 P2Y₁₁ 수용체 아형의 신호전달 기전 확인

및 임상적용 가능성에 대한 심층연구도 필요한 것으로 보인다.

참고문헌

- 1) Burnstock G. Overview: purinergic mechanism. *Ann NY Acad Sci* 1990;603:1-17.
- 2) Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998;50:413-92.
- 3) Fries JE, Wheeler-Schilling TH, Kohler K, Guenther E. Distribution of metabotropic P2Y receptors in the rat retina: a single cell RT-PCR study. *Mol Brain Res* 2004;130:1-6.
- 4) Sak K, Webb TE. A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Arch Biochem Biophys* 2002;397:131-6.
- 5) Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, et al. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:52-5.
- 6) Fries JE, Wheeler-Schilling TH, Guenther E, Kohler K. Expression of P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, and P2Y₆ receptor subtypes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3410-4.
- 7) Cha SH, Hahn TW, Sekine T, et al. Purinoceptor-mediated calcium mobilization and cellular proliferation in cultured bovine corneal endothelial cells. *Jpn J Pharmacol* 2000;82:181-7.
- 8) Abbracchio MP, Burnstock G. Purinergic signaling: Pathophysiological roles. *Jpn J pharmacol* 1998;78:113-45.
- 9) Jumblatt JE, Jumblatt MM. Regulation of ocular mucin secretion by P2Y₂ nucleotide receptors in rabbit and human conjunctiva. *Exp Eye Res* 1998;67:341-6.
- 10) Pintor J. Purinergic signaling in the eye. In : Burnstock G, Sillito AM, eds. *The autonomic nervous system*. 4th ed. London. Harwood Academic Publisher, 1998; chap. 20-21
- 11) Kimura K, Nishimura T, Satoh Y. Effect of ATP and its analogues on [Ca²⁺]_i dynamics in the rabbit corneal epithelium. *Arch Histol Cytol* 1999;62:129-38.
- 12) Murakami T, Fujihara T, Nakamura M, Nakata K. P2Y (2) receptor stimulation increases tear fluid secretion in rabbits. *Curr Eye Res* 2000;21:782-7.
- 13) Shiue MH, Kulkarni AA, Gukasvan HJ, et al. Pharmacological modulation of fluid secretion in the pigmented rabbit conjunctiva. *Life Sci* 2000;66:105-11.
- 14) Cowlen MS, Zhang VZ, Warnock L, et al. Localization of ocular P2Y₂ receptor gene expression by in situ hybridization. *Exp Eye Res* 2003;77:77-84.
- 15) Srinivas SP, Yeh JC, Ong A, Bonanno JA. Ca²⁺ mobilization in bovine corneal endothelial cells by P2 purinergic receptors. *Curr Eye Res* 1998;17:994-1004.
- 16) Yang H, Reinach PS, Koniarek JP, et al. Fluid transport by cultured corneal epithelial cell layers. *Br J Ophthalmol*

- 2000;84:199-204.
- 17) Li Y, Kuang K, Yerxa B, et al. Rabbit conjunctival epithelium transports fluid, and P2Y2 receptor agonists stimulate Cl⁻ and fluid secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:595-602.
- 18) Wax M, Sanghavi DM, Lee CH, Kapadia M. Purinergic receptors in ocular ciliary epithelial cells. *Exp Eye Res* 1993;57:89-95.
- 19) Shahidullah M, Wilson WS. Mobilisation of intracellular calcium by P2Y2 receptors in cultured, non-transformed bovine ciliary epithelial cells. *Curr Eye Res* 1997;16:1006-16.
- 20) Liu Y, Wakakura M. P1-/P2-purinergic receptors on cultured rabbit retinal müller cells. *Jpn J Ophthalmol* 1998;42:33-40.
- 21) Bringmann A, Pannicke T, Weick M, et al. Activation of P2Y receptors stimulates potassium and cation currents in acutely isolated human Müller (glial) cells. *Glia* 2002;37:139-52.
- 22) Sullivan DM, Erb L, Anglade E, et al. Identification and characterization of P2Y2 nucleotide receptors in human retinal pigment epithelial cells. *J Neurosci Res* 1997;49:43-52.
- 23) Sugamoto Y, Hirai K, Tokoro T. P2Y2 receptor elevates intracellular calcium concentration in rabbit eye suprachoroid J Med Dent Sci 1999;46:83-92.
- 24) Collison DJ, Duncan G. Regional differences in functional receptor distribution and calcium mobilization in the intact human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2355-63.
- 25) James G, Butt AM. Changes in P2Y and P2X purinoceptors in reactive glia following axonal degeneration in the rat optic nerve. *Neurosci Lett* 2001;312:33-6.
- 26) Li Y, Holtzclaw LA, Russell JT. Muller cell Ca²⁺ waves evoked by purinergic receptor agonists in slices of rat retina. *J Neurophysiol* 2001;85:986-94.
- 27) Kyritsis AP, Tsokos M, Triche TJ, Chader GJ. Retinoblastoma -origin from a primitive neuroectodermal tumor cell? *Nature* 1984;307:471-3.
- 28) Pearson R, Catsicas M, Becker D, Mobbs P. Purinergic and muscarinic modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. *J Neurosci* 2002;22:7569-79.
- 29) Mitchell CH. Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space. *J Physiol* 2001;534:193-202.
- 30) McFall RC, Sery TW, Makadon M. Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. *Cancer Res* 1977;37:1003-10.
- 31) Kim DR, Cha SK, Kong ID, et al. Characteristics of nicotinic receptor expressed in human retinoblastoma. *J Korean Ophthalmol Soc* 2005;46:1060-7.
- 32) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annal Biochem* 1987;162:156-9.
- 33) Adrian K, Bernhard MK, Breiting HG, Ogilve A. Expression of purinergic receptors (ionotropic P2X1-7 and metabotropic P2Y1-11) during myeloid differentiation of HL60 cells. *Biochim Biophys Acta* 2000;1492:127-38.
- 34) Sanches G, de Alencar LS, Ventura AL. ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated cascade. *Int J Dev Neurosci* 2002;20:21-7.
- 35) Harden TK, Boyer JL, Nicholas RA. P2-purinergic receptors: subtype- associated signaling responses and structure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:541-79.
- 36) Schachter JB, Li Q, Boyer JL, et al. Second messenger cascade specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y1- purinoceptor. *Br J Pharmacol* 1996;118:167-73.
- 37) Kügelgen IV, Wetter, A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn- Schmiedelberg's Arch Pharmacol* 2000;362:310-23.
- 38) Chen ZP, Levy A, Lightman SL. Nucleotides as extracellular signalling molecules. *J Neuroendocrinol* 1995;7:83-96.
- 39) Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1997;272:31969-73.

=ABSTRACT=

Identification of P2Y₁₁ Receptor Expressed in Human Retinoblastoma Cells

Yoon Hee Kim, M.D.¹, Dae Ran Kim, Ph.D.², Ko I Chun, M.D.³,
Jong Hyuck Lee, M.D.³, In Deok Kong, M.D.⁴

Shimmian Oculoplastic Center¹, Seoul, Korea

Department of Basic Nursing Science Keimyung University College of Nursing², Daegu, Korea

Department of Ophthalmology, Yonsei University Wonju College of Medicine³, Wonju, Korea

Department of Physiology and Institute of Basic Medical Science⁴, Wonju, Korea

Purpose: The present study aimed to identify the characteristics and physiological function of the P2Y₁₁ receptor, a receptor likely expressed in human retinoblastoma cells.

Methods: We measured possible P2Y₁₁ signaling in WERI-Rb-1 cells using a Ca²⁺ imaging technique and RT-PCR.

Results: 1) 10 μ M ATP elicited a strong but transient increase in Ca²⁺ in the WERI-Rb-1 cells, and this Ca²⁺ rise was well maintained after external Ca²⁺-depletion. 2) ATP-induced Ca²⁺ response arose entirely through Ca²⁺ mobilization. 3) P2Y₁₁ agonist (BzATP, 100 μ M) increased Ca²⁺ by 31.2 \pm 3.7 % of ATP effect. 4) mRNA for P2Y₁₁ subtype was identified using RT-PCR.

Conclusions: P2Y₁₁ purinergic activation can increase the intracellular calcium level through calcium mobilization in undifferentiated retinoblastoma cells, which may play an important role in cell proliferation, differentiation, and even pathologic processes.

J Korean Ophthalmol Soc 48(8):1134-1142, 2007

Key Words: Calcium, P2Y₁₁ receptor, Retinoblastoma cell

Address Reprint requests to **Jong Hyuck Lee, M.D.**

Department of Ophthalmology, Wonju Christian Hospital, College of Medicine, Yonsei University Wonju
#162 Ilsan-dong, Wonju-si, Gangwon-do 220-701, Korea

Tel: 82-33-741-1390, Fax: 82-33-745-2965, E-mail: jhlee@wonju.yonsei.ac.kr