

흰쥐 신경교 세포에서 H_2O_2
유도성 칼슘 신호의 발생 기전

연세대학교 대학원

의과학과

김 승 혜

흰쥐 신경교 세포에서 H_2O_2
유도성 칼슘 신호의 발생 기전

지도교수 신동민

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2005 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

김 승 혜

김승혜의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 신 동 민 인

심사위원 서 정 택 인

심사위원 김 경 환 인

연세대학교 대학원

2005 년 12 월 일

감사의 글

먼저 아낌없는 격려와 지도를 해주신 신 동민 지도 교수님과 이 승일 주임 교수님께 감사 드립니다. 또한 논문을 마치기 까지 많은 자문을 해주신 치과 대학 약리학 교실 서 정택 교수님과 의과대학 신경과학 교실 김 경환 교수님께 감사 드립니다. 그리고 치과 대학 미생물학 교실 유 윤정 교수님, 차 정현 교수님, 생화학 교실 박 광균 교수님, 정 원운 교수님, 조직학 교실 정 한성 교수님, 해부학 교실 김 희진 교수님께 감사 드립니다. 앞으로 박사 과정으로 진학하는 의과 대학 해부학 교실 김 명희 교수님께도 감사의 말씀 전해드리고 싶습니다. 곁에서 많은 배움과 격려를 해주신 홍 정희 선생님, 정 현주 선생님, 안 정미 선생님, 전 옥순 선생님, 김 재영 선생님, 조 장기 선생님, 안 혜은 선생님, 민석 오빠, 해 오빠, 수영 언니, 소영 언니, 두식 오빠, 주연 언니, 효숙 언니, 경원 언니, 민정 언니, 정순 언니, 양신 언니, 영민 오빠, 호길 오빠, 많은 조언을 해주신 제현 오빠, 현우 오빠, 원우 오빠께 감사 드립니다. 든든한 동기 해미와 이쁜 새색시가 될 소영이, 종민 오빠와 진은이, 예나, 수현이에게도 고맙단 말을 전하고 싶습니다. 그리고 구강과학 연구소 박 정국 선생님, 남호 오빠, 태진 오빠, 혜진 언니, 수현 언니 고맙습니다. 무엇보다 항상 아낌없는 사랑과 힘을 주시는 존경하는 부모님과 무현 오빠 그리고 친척분들께 감사 드립니다. 그리고 클래식 기타 동아리 한아울, 장애우 봉사 동아리 키비탄, 생명과학과 선·후배 동기님들, 친구들 고맙습니다. 길게만 느껴졌던 2년간의 석사과정 동안 힘들기도 했지만 많은 것을 배우고 경험을 하였습니다. 더욱 열심히 생활하고 발전된 모습을 보여드리도록 노력하겠습니다. 항상 건강하시고, 좋은 일이 깃드시길 바랍니다.

김 승혜 올림

차 례

그림 차례	Ⅲ
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 실험방법	7
1. 재료	7
2. 실험 방법	7
가. 신경교 세포의 분리	7
나. 세포 내 칼슘 농도의 측정	8
다. 면역형광 검사법	9
라. 활성산소종의 측정	10
마. siRNA-PLC γ 1 을 이용한 형질전환	10
바. 통계학적 분석	11
III. 결과	12
1. H ₂ O ₂ 로 유도된 세포 내 칼슘농도의 증가	12
2. H ₂ O ₂ 유도성 칼슘 신호의 칼슘 동원 부위 검색	15
3. H ₂ O ₂ 유도성 칼슘 신호와 IP ₃ 의존성 칼슘 저장고, 또는 ryanodine 의존성 칼슘저장고와의 상관성 분석	18
4. H ₂ O ₂ 유도성 칼슘 신호와 세포 내 IP ₃ 농도 증가와의 연관성	18

5. H ₂ O ₂ 에 의한 PLC γ 1의 인산화.....	21
6. H ₂ O ₂ 유도성 칼슘 신호와 siRNA를 이용한 PLC γ 1의 발현 억제.....	21
7. 환원제가 H ₂ O ₂ 로 유도된 칼슘 신호에 미치는 영향.....	25
IV. 고찰	27
V. 결론	31
VI. 참고문헌	32
영문요약	43

그림 차례

Fig. 1. The effect of H ₂ O ₂ on [Ca ²⁺] _i in cultured rat cortical astrocytes.	13
Fig. 2. The effect of retreatment with H ₂ O ₂ on [Ca ²⁺] _i	14
Fig. 3. The effect of extracellular Ca ²⁺ on H ₂ O ₂ -induced [Ca ²⁺] _i increases.	16
Fig. 4. The effect of thapsigargin on H ₂ O ₂ -induced [Ca ²⁺] _i increases.	17
Fig. 5. The effect of ryanodine or 2-APB on H ₂ O ₂ -induced [Ca ²⁺] _i increases.	19
Fig. 6. The effect of the treatment with U73122, an inhibitor of PLC, on H ₂ O ₂ -induced [Ca ²⁺] _i increases.	20
Fig. 7. Western blotting of phospho-tyrosine 783 of PLC γ 1 with the treatment of H ₂ O ₂ in a dose-dependent manner.	22
Fig. 8. The effect of knock-down of PLC γ 1 on H ₂ O ₂ -induced [Ca ²⁺] _i increases.	23
Fig. 9. The effect of DTT, a reducing agent, on H ₂ O ₂ -induced [Ca ²⁺] _i increases.	26

국문요약

흰쥐 신경교 세포에서 H_2O_2 유도성 칼슘 신호의 발생 기전

활성산소종은 세포의 대사과정에서 산소가 물로 환원되는 과정 중에 생성된 생물학적 부산물로서 독작용과 노화, 그리고 증식성 질환 발생 등의 주원인으로 여겨지고 있다. 더불어 최근에는 주요한 세포 내 신호전달의 조절 매개체로서 다양한 세포 내 반응에 관여하는 것으로도 알려져 있다. 활성산소종 중 하나인 H_2O_2 는 이차전령체로서 거의 모든 기타 신호전달계 단백들을 산화-환원 작용을 통해 영향을 주고 있다고 여겨지는데, 신호전달 체계 중 하나인 칼슘신호 단백질 역시 활성산소종에 의해 영향을 받을 가능성이 있다. 그러나 아직까지 생리적 활성농도에서 활성산소종이 어떤 기전을 통해 칼슘 신호를 활성화시키는 지에 대해 정확히 알려져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 흰쥐 신경교 세포에서 H_2O_2 로 칼슘 신호가 유발되는지와 이의 발생 기전을 알아보려고 하였다.

신경교 세포를 H_2O_2 로 처리하면 세포 내 칼슘농도의 주기적 변동이 유발되었으며, 이는 가역적이었다. 소포체 칼슘펌프 억제제인 thapsigargin을 전처리하면 H_2O_2 유도성 칼슘신호가 나타나지 않았다.

소포체 칼슘이온통로인 1,4,5 trisinositol phosphate (IP_3) 수용체의 억제제인 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)를 전처리한 경우 H_2O_2 유도성 칼슘신호 생성이 유발되지 않았으나, 또 다른 소포체 칼슘 이온통로인 ryanodine 수용체를 억제한 경우 유발되었다. 환원제인 dithiothreitol 처치시 H_2O_2 유도성 칼슘신호가 억제되었다. H_2O_2 는 세포막 인지질 분해소인 phospholipase $C\gamma_1$ ($PLC\gamma_1$)의 783 서열 타이로신기를 인산화시켰는데 이는 H_2O_2 농도에 의존적이었다. PLC의 저해제인 U73122와 siRNA를 이용한 $PLC\gamma_1$ 의 발현 저하는 각각 H_2O_2 유도성 칼슘신호 생성을 억제하였다. 이상의 결과들로 미루어 흰쥐 신경교 세포에서 H_2O_2 가 $PLC\gamma_1$ 을 활성화시켜 IP_3 의존적인 칼슘 저장고로부터 칼슘을 동원하여 칼슘 신호를 생성시키는 것으로 판단된다.

핵심되는말 : 활성산소종, 신경교 세포, 칼슘신호, H_2O_2 , $PLC\gamma_1$

흰쥐 신경교 세포에서 H₂O₂ 유도성

칼슘 신호의 발생 기전

<지도교수 신동민>

연세대학교 대학원 의과학과

김 승 혜

I. 서론

활성산소종 (Reactive oxygen species, ROS)은 세포 내 미토콘드리아의 전자전달계나¹, 세포 외 환경요인인 자외선 (ultraviolet)², 이온화 방사선 (ionizing radiation)³, 그리고 산화 화학 물질 (redox chemical)⁴ 등에 의한 세포의 대사과정에서 산소가 물로 환원되는 과정 중에 생성된 생물학적 작용의 부산물로서 superoxide anion (O₂⁻) 과 hydrogen peroxide (H₂O₂), 그리고 hydroxyl radical (OH[·]) 등의 형태가 있다⁵. 활성산소종은 세포에서 독작용과 노화⁶ 그리고 증식성 질환발생 등의 주원인으로 여겨지고 있다⁷. 활성산소종과 연관된 질환으로는 신경질환의 일종인 알츠하이머 질환 (Alzheimer's disease)⁸,

증식성질환, 죽상경화증 (atherosclerosis)⁹, 당뇨병 (diabete mellitus)¹⁰, 류마티스성 관절염 (rheumatic arthritis)¹¹ 등이 알려져 있다.

더불어 최근에는 활성산소종이 주요한 세포 내 신호전달의 조절 매개체로서 다양한 세포 내 반응에 관여하는 것으로도 알려져 있다. 예를 들면, 표피세포 성장인자 (epidermal growth factor, EGF) 수용체의 활성화에 의해 생성된 활성산소종은 EGF 수용체의 활성을 더욱 증가시키는 양성 되먹임 현상을 나타내며¹²⁻¹⁴, 이와 유사한 기전에 통해 인슐린 수용체 활성을 조절하고 있다¹⁵. 또한 mitogen-activated protein kinase 신호전달체계^{16,17}와 protein kinase C (PKC)를 활성화하기도 한다¹⁸. 이외 전사인자인 activator protein-1¹⁹과 nuclear factor kappaB (NFκB)를 활성화시키는 것으로 알려져 있다^{20,21}. 이와 같이 활성산소종은 독작용 외에 여러 신호전달체계에 관여하는 단백질의 산화-수준을 변화시켜 세포대사, 분화, 그리고 성장 등의 반응을 조절하고 있는 이차전령체로도 여겨지고 있다^{22,23}.

세포 내 반응을 매개하는 신호전달체계 중 칼슘 신호는 근육수축, 세포대사, 분비, 분화, 그리고 세포사멸에 이르기 까지 다양한 세포 과정에 관여한다²⁴. 칼슘신호는 세포외부 신호인 호르몬과 신경전달물질, 그리고 성장인자 등에 의해 유발된다^{25,26}. 세포막에 존재하는 G 단백질과 연계된 수용체 (G protein-coupled receptors,

GPCRs)²⁷ 및 receptor tyrosine kinases 에 외부자극이 주어지면 phospholipase C (PLC)가 활성화되어 phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP₂)를 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃)로 가수분해시키며, 생성된 IP₃ 는 소포체 막에 존재하는 IP₃ 수용체에 결합하여 소포체로부터 칼슘을 유출시킴으로써 세포 내에서 또 다른 반응을 야기하는 이차전령체로서 역할을 한다²⁸⁻³⁰. 이와 같이 세포 내 칼슘 농도가 증가되면 소포체 칼슘펌프 (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, SERCA)나 세포막의 plasma membrane Ca²⁺ pump (PMCA)가 활성화되어 세포 내 칼슘농도를 세포외부에 비해 낮추게 된다^{31,32}.

활성산소종이 칼슘신호전달에 미치는 영향에 대하여는 여러 종류의 세포에 활성산소종을 인위적으로 처치하여 알려져 왔다. *In vitro* 상에서 H₂O₂가 세포막 인지질 분해효소인 phospholipase C γ 1 (PLC γ 1)의 인산화를 촉진시켜 이차전령체인 IP₃의 농도 증가에 따라 소포체로부터 칼슘을 동원한다는 보고가 있으며³³⁻³⁵, B cell line과 hepatoma cell에서 H₂O₂가 IP₃수용체의 IP₃에 대한 친화도를 증가시켜 칼슘신호를 증폭시킨다고 한다³⁶. 또한 세포막 칼슘이온통로나 long transient receptor potential channel 2에 영향을 주며, SERCA와 PMCA를 조절한다고도 한다³⁷⁻⁴¹. 그러나 대부분의 연구에서 세포 내 칼슘 농도의 증가는 1 mM 이상의 고농도 H₂O₂에 의해 유도된 것으로 H₂O₂의 생

리적 농도 범위로 알려진 1-100 μM 에서는 세포 내 칼슘신호의 생성과 이의 기전에 대해서 알려져 있지 않다^{5,22}.

신경교 세포는 뇌세포의 대부분을 차지하며 뇌세포의 항상성을 유지시켜주는 역할을 수행한다^{42,43}. 현재까지 신경교 세포에서 활성산소종에 대한 연구는 주로 활성산소종의 독작용에 의해 유발되는 질환에 있어서 신경교 세포의 항산화 효과에 대해 집중되어 왔다⁴⁴. 또한 칼슘신호 연구 역시 신경교세포에서 효현제가 GPCRs 또는 receptor tyrosine kinases를 활성화시켜 PLC β 나 PLC γ 가 세포내 칼슘을 동원하는 전형적인 전달기전에 대하여 집중되어 왔다. 본 연구자는 예비실험을 통해 흰쥐 신경교 세포에서 30 μM H_2O_2 만으로 세포 내 칼슘 농도의 주기적 변동을 관찰한 바 있다. 이는 신경교 세포에서 활성산소종이 이차전령체로서 칼슘신호전달 단백질들의 산화-환원 수준을 변화시켜 칼슘신호전달 기전에 관여할 가능성을 의미한다. 그러나 이러한 활성산소종이 신경교 세포에서 어떤 기전에 의해 칼슘을 동원하는지, 그리고 활성산소종의 작용 부위와 이의 생리학적 의미에 대해서는 아직까지 밝혀지지 않았다. 이에 본 연구에서는 생리적 농도에서 활성산소종에 의해 유발되는 칼슘신호가 어떠한 기전에 의해 유발되는 지를 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 실험방법

1. 재료

신경교 세포는 흰쥐 1일령의 대뇌 피질을 분리하여 HEPES-buffered minimum essential medium (MEM)에서 배양시켜 7-10일 후 사용하였다. H_2O_2 , dithiothreitol (DTT), thapsigargin, 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), ryanodine, 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF), U73122과 U73343은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Fura-2-acetoxymethyl ester (AM) 은 Teflabs (Austin, Tex, USA)에서 구매하였다. PLC γ 1에 대항하는 단일클론항체와 PLC γ 1이 특이적으로 인산화 된 tyrosine 783은 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)에서 구매하였다.

2. 실험 방법

가. 신경교 세포의 분리

태어난 지 1 일이 지난 neonatal Sprague-Dawley 계 흰쥐를 단두하고 대뇌피질을 무균 상태로 분리하여 HEPES-buffered minimum essential medium (MEM)에 위치시켰다. 조직을 pasteur pipette 을 이용하여 기계적으로 분리하는데 pasteur pipette 의 구멍크기를 큰 것에서 작은 것으로 단계적으로 실시하였다. 조직을

1000 r.p.m. 에서 원심분리하여 상층액을 버린 후 세포를 다시 HEPES 를 포함한 MEM 용액에 넣는다. 배양접시에 poly-L-lysine (0.1 mg/ml)을 입힌 coverslip 을 넣고 세포를 50 mm 배양접시 당 0.5×10^6 개가 되도록 2.5 % fetal bovine serum 를 포함한 HEPES-MEM 용액에서 배양하였다. 세포를 37 °C, 5% 이산화탄소가 유지되는 배양기에서 5-12 일 동안 배양한 후 실험에 사용하였다. 신경세포는 5-7 일 간 배양 후에 사용하며 신경교 세포는 10-12 일 간 배양 후 사용하였다. MEM 배지에서 계대하여 신경교 세포를 선택적으로 배양하여 실험에 사용하였다.

나. 세포 내 칼슘 농도의 측정

세포 내의 칼슘 농도의 변화는 칼슘에 결합하는 형광염료인 fura-2/AM 을 이용하여 측정하였다. 흰쥐 (SDrat, 1 일령) 대뇌피질에서 분리한 세포에 7.5 μ M fura-2 AM 을 넣어 37 °C 에서 40 분간 반응시킨 후 cell chamber 에 부착하고 physiological salt solution (PSS; 1 mM CaCl_2 , 10 mM glucose, 5 mM KCL, 1 mM MgCl_2 , 140 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.4, Osmolarity 310 mosm)에 H_2O_2 를 넣고 분당 2 ml 의 속도로 흘려주면서 세포 내의 칼슘의 변화를 microfluorometer (MetaFlour system)로 측정하였다. 세포 외 칼슘을 제거하기 위해서는 용액에 CaCl_2 를 넣지 않고 1 mM

EGTA 를 넣어 주었다. 세포 내 칼슘농도 ($[Ca^{2+}]_i$)의 측정은 excitation wavelength 340 과 380 nm 에서 emission fluorescence 510 nm 변화의 값을 Grynkiewicz 식에 따라 다음과 같이 산정하였다 (Grynkiewicz, 1985): $[Ca^{2+}]_i = K_D \cdot S_{f2} / S_{b2} [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]$. 이때 K_D : fura-2 의 K_D 값, R : 측정된 340/380 fluorescence 비율, R_{min} : 2.5 mM EGTA 에 반응한 세포의 340/380 fluorescence 비율 값, R_{max} : 25 μ M ionomycin 에 반응한 340/380 fluorescence 비율 값, S_{f2} : R_{min} 때 380 nm 의 형광강도 값, S_{b2} : R_{max} 때 380nm 의 형광강도 값을 나타냈다.

다. 면역형광 검사법

세포를 lysis buffer (50 mM Tris(pH7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 100 μ g/ml PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 mM DTT, 1 mM NaVO₃)에서 반응시킨 후, 동일한 양의 단백질을 10 % SDS-polyacrylamide gel 에서 전기영동하였다. 전기영동 후 nitrocellulose membrane 으로 이동시킨 후 membrane 을 상온에서 5 % non-fat dried milk 에 blocking 하였다. 1 시간 후에 anti-phospho PY783 으로 4 °C 에서 16 시간 이상 반응시켰다. Washing buffer 로 3 회 씻은 후 1:1000 으로 희석된 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody 와

1 시간 반응 시킨 후 ECL detection system 으로 반응 정도를 확인하였다.

라. 활성산소종의 측정

활성산소종은 fluorescent probe 인 DCF 를 사용하여 측정하였다. 세포를 5 μ g/mL DCF 에 5 분 동안 incubation 한 후에 Hank's balanced salt solution (HBSS; 8 g/L NaCl, 0.4 g/L KCL, 0.0424 g/L Na₂HPO₄, 0.06 g/L KH₂HPO₄, 0.14 g/L CaCl₂, 0.2 g/L MgSO₄·7H₂O), 0.35 g/L NaHCO₃, 1 g/L Glucose, pH 7.4)으로 세포를 씻어주었다. DCF 형광은 confocal microscope (Carl Zeiss, LSM510)로 excitation wavelength 는 488 nm, emission wavelength 는 525 nm 에서 측정하여 세포 내 활성산소종의 변화를 측정하였다.

마. siRNA-PLC γ 1 을 이용한 형질전환

LipofectAMINE 2000 transfection reagent (Carlsbad, CA)으로 small interfering RNA (siRNA)는 siRNA 에 pSUPER vector 를 삽입하여 만든 1 g/ml PLC γ 1 (siRNA-PLC γ 1)과 1.2 mg/ml GFP-phospholipase C δ 1 (미국 Texas Southwestern Medical Center 의 Dr. Muallem 으로부터 받아서 보유하고 있음)을 같이 MEM 배지에서 처치하여 형질변환시킨다. 48 시간 동안 배양시킨 후 GFP 형광으로

형질전환 된 세포를 확인하였다. 형질전환이 성공할 경우 GFP 형광을 나타내는 세포에 fura-2 를 축적하여 칼슘농도 측정 실험을 하였다. siRNA 에 의한 내인성 PLC γ 1 의 부족은 면역형광 검사법을 통하여 확인하였다.

바. 통계학적 분석

Student T-test 를 실시하여 결과를 통계적으로 분석하였으며, P value < 0.05 는 통계적으로 유의성 있는 차이로 간주하였다.

III. 결과

1. H₂O₂로 유도된 세포 내 칼슘농도의 증가

흰쥐 신경교 세포에 활성산소종의 일종인 H₂O₂를 처치한 결과 30 μM 농도에서 세포 내 칼슘 농도의 주기적 변화 (칼슘 oscillations)가 유발되었다 (Fig. 1). 10 μM 농도에서는 칼슘농도가 급속히 증가한 후 감소한 후 기저상태를 보이는 경우가 대부분이었으며, 100 μM 농도에서는 칼슘농도가 급속히 증가한 후 일정수준에서 유지되는 biphasic한 형태를 보였다. 30 μM 농도에서 세포 내 칼슘 농도의 주기적 변화의 빈도는 5.1 ± 0.5 peaks/20min였다 (n=5, p <0.05). H₂O₂로 유도된 칼슘 oscillations은 급속히 칼슘 농도가 증가한 후 기저 상태까지 감소하는 형태 (repetitive base-lined type of Ca²⁺ oscillations)를 보였다.

한편 H₂O₂의 유도된 세포 내 칼슘농도의 증가가 가역적인지를 알아보기 위하여 H₂O₂ (30 μM)를 처치한 후 5분 정도 씻어준 후, H₂O₂를 재 처치하자 칼슘신호가 생성되었다 (n=5, Fig. 2).

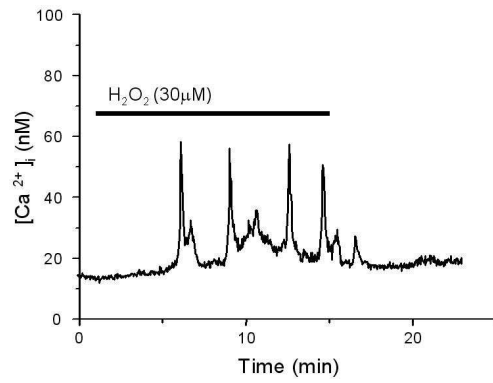


Fig.1. The effect of H₂O₂ on [Ca²⁺]_i in cultured rat cortical astrocytes. Cells were exposed to 30 μM of H₂O₂ at least 20 min. The trace is representative of 18-20 cells in five independent experiments. Results are means ± S.E.M.

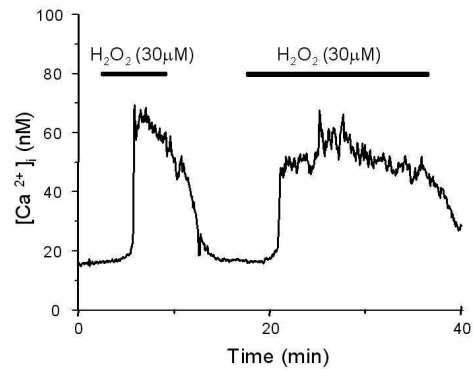


Fig.2. The effect of retreatment with H₂O₂ on [Ca²⁺]_i. Cells were exposed to 30 μM of H₂O₂ at least 10 min and washed with PSS at least 5 min. Then, cells were re-treated with 30 μM of H₂O₂. The trace is representative of 18-20 cells in five independent experiments. Results are means ± S.E.M.

2. H₂O₂ 유도성 칼슘 신호의 칼슘 동원 부위 검색

H₂O₂ 로 유도된 칼슘 신호가 세포 외부 칼슘의 유입에 의해 생성되었는지, 또는 세포 내 칼슘 저장고로부터의 유출에 의한 것인지 알아보려고 하였다. 30 μ M H₂O₂ 를 처치한 상태에서 외부 칼슘을 제거한 용액을 흘려준 다음, 다시 칼슘이 있는 용액을 관류시켰는데, 외부 칼슘이 제거된 경우에도 칼슘신호가 생성되었다 (n= 18, Fig. 3).

세포 내 칼슘저장고 중 세포 내 어느 기관으로부터 칼슘을 동원하는 지를 알아보려고 하였다. 소포체 칼슘펌프 억제제인 1 μ M Tg을 약 5 분간 처치하여 Tg-의존성 칼슘저장고를 고갈시킨 후에 H₂O₂ (30 μ M)를 처치하고 H₂O₂에 의해 세포 내 칼슘신호가 생성되는 지 확인한 결과 생성되지 않음을 확인하였다 (n=20, Fig. 4A). 또한 이의 역순으로 한 실험에서 H₂O₂에 의해 세포 내 칼슘 저장고로부터 칼슘이 유리되면 Tg에 의해 칼슘 농도가 더 이상 증가하지 않았다 (n= 20, Fig. 4B).

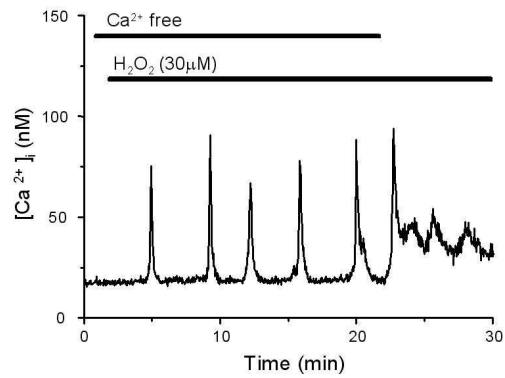


Fig.3. The effect of extracellular Ca^{2+} on H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases. Ca^{2+} was removed from the bath solution and then 30 μM H_2O_2 was added. Cells were exposed to 30 μM H_2O_2 in the absence of Ca^{2+} in solution as indicated by the bars. The trace is representative of 15–20 cells in eighteen independent experiments.

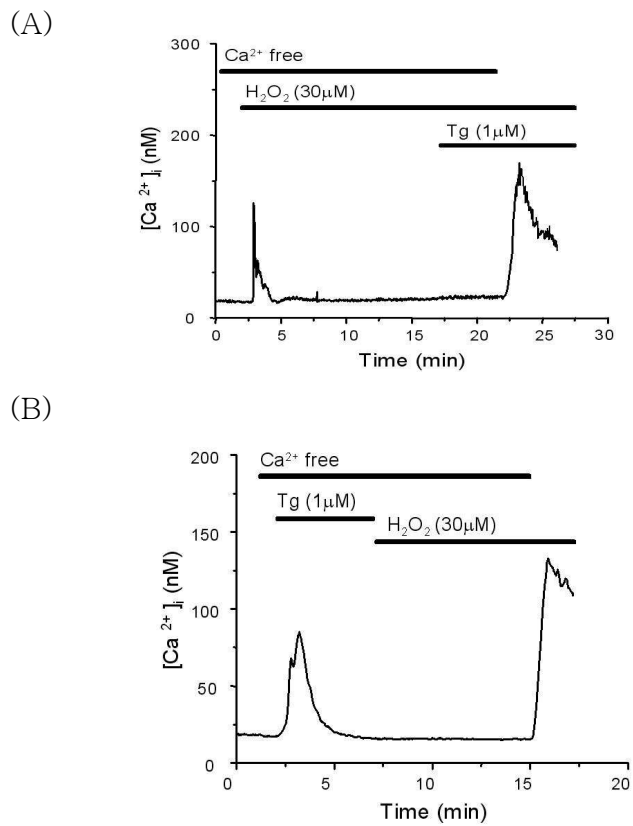


Fig.4. The effect of thapsigargin on H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases. (A) Cells were exposed to $30 \mu\text{M}$ H_2O_2 followed by $1 \mu\text{M}$ thapsigargin (Tg) in the absence of Ca^{2+} in solution as indicated by the bars. (B) Cells were exposed to $1 \mu\text{M}$ Tg followed by $30 \mu\text{M}$ H_2O_2 in a nominally Ca^{2+} -free solution.

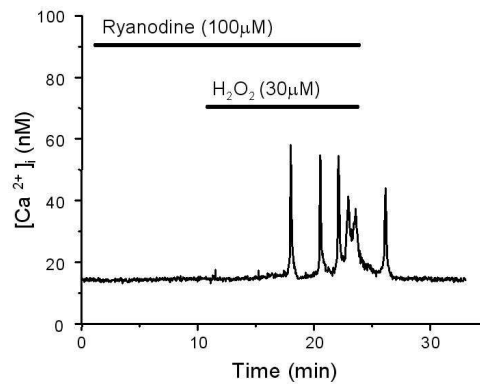
3. H₂O₂ 유도성 칼슘 신호와 IP₃ 의존성 칼슘 저장고, 또는 ryanodine 의존성 칼슘저장고와의 상관성 분석

H₂O₂ 유도성 칼슘 신호와 소포체 막에 존재하는 IP₃ 수용체, 또는 ryanodine 수용체와의 상관성을 알아보려고 하였다. Ryanodine 수용체를 억제하기 위해 100 μM ryanodine을 약 10분 정도 처치한 후 H₂O₂ (30 μM)를 처치한 결과, H₂O₂ 유도성 칼슘 신호가 생성되었다 (n=17, Fig. 5A). IP₃수용체의 억제제인 75 μM 2-APB를 전처치하면 H₂O₂ 유도성 칼슘 신호가 생성되지 않았으나, 2-APB를 제거하고 H₂O₂를 처치하자 칼슘 신호가 생성되었다 (n=15, Fig. 5B).

4. H₂O₂ 유도성 칼슘 신호와 PLC와의 연관성

H₂O₂ 유도성 칼슘 신호가 IP₃의 증가에 관여하는 단백질인 PLC와 연관성이 있는가를 확인하기 위하여, PLC의 일반적인 억제제인 U73122와 대조군으로 U73343를 H₂O₂와 동시에 처치하였다. 30 μM H₂O₂와 10 μM U73122를 함께 처치하자 칼슘반응이 억제되었으며, U73343을 처치한 경우 H₂O₂ 유도성 칼슘 신호가 나타났다 (Fig. 6A). 칼슘 oscillations의 빈도는 U73343에서 6.45 ± 1.21 peaks/20min, U73122에서 0.8 ± 0.78 peaks/20min로 통계적으로 유의적이었다 (n=11, p < 0.05) (Fig. 6B).

(A)



(B)

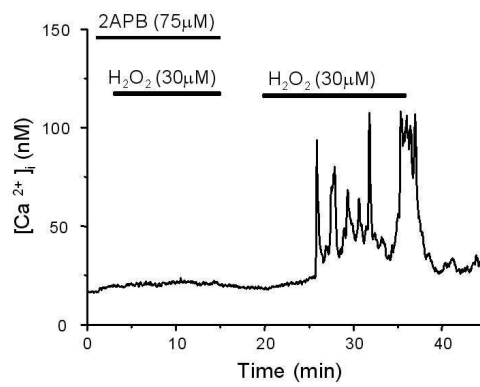
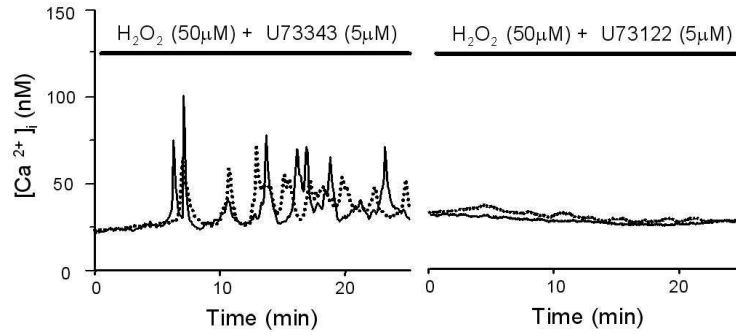


Fig.5. The effect of ryanodine or 2-APB on H₂O₂-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases. Cell were exposed to 100 μ M ryanodine (A), or 75 μ M 2-APB (B) prior to the addition of 30 μ M H₂O₂.

(A)



(B)

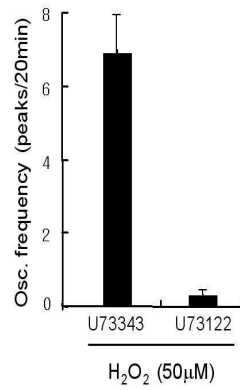


Fig. 6. The effect of U73122, an inhibitor of PLC on H₂O₂-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases. (A) Cells were exposed to 30 µM H₂O₂ in combination with U73343 or U73122 as indicated by the bars. (B) Quantitative results in oscillation frequency (peaks/20 min). Results are means \pm S.E.M.

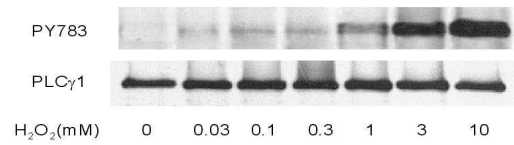
5. H₂O₂에 의한 PLC γ 1의 인산화

H₂O₂에 의해 PLC γ 1의 인산화 정도가 변화하는지를 측정하였다. 100 μ M H₂O₂에서는 대조군에 비해 PLC γ 1의 인산화 정도가 34.29 ± 6.23 %의 증가, 300 μ M은 55.47 ± 4.87 %의 증가, 1 mM은 82.12 ± 6.64 %의 증가, 그리고 3 mM은 93.06 ± 6.33 %의 증가하여 H₂O₂의 농도에 의존적으로 PLC γ 1의 인산화가 증가함을 확인하였다 (n=6, p < 0.05) (Fig. 7A, 7B).

6. H₂O₂ 유도성 칼슘 신호와 siRNA를 이용한 PLC γ 1의 발현 억제

PLC의 PLC γ 1의 발현 억제가 H₂O₂ 유도성 칼슘 신호에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 siRNA에 pSUPER vector를 삽입하여 만든 PLC γ 1 (siRNA-PLC γ 1)를 eGFP-N1와 함께 형질변환시켰다. 먼저 siRNA-PLC γ 1을 처리했을 때 단백질 수준이 줄어드는 것을 면역형광 검사법을 통하여 확인하였는데, 발현 정도는 siRNA-PLC γ 1에서 0.5 ± 0.058 배로 PLC γ 1의 발현이 pSuper에 비하여 감소되었다 (n=4, P < 0.01) (Fig. 8A). GFP 형광으로 세포의 형질전환 여부를 확인한 후 (Fig. 8B), pSuper에 30 μ M H₂O₂를 처리하자 칼슘 신호가 유발되었으나 siRNA-PLC γ 1에서는 30 μ M H₂O₂를 처리하자 칼슘 oscillations은 거의 유발되지 않았는데, 칼슘 oscillations의 빈도는 pSuper는 6.70 ± 0.99 peaks/20min, siRNA-PLC γ 1은 0.70 ± 0.69 peaks/20min이었다 (n=10, P < 0.01, Fig. 8C).

(A)



(B)

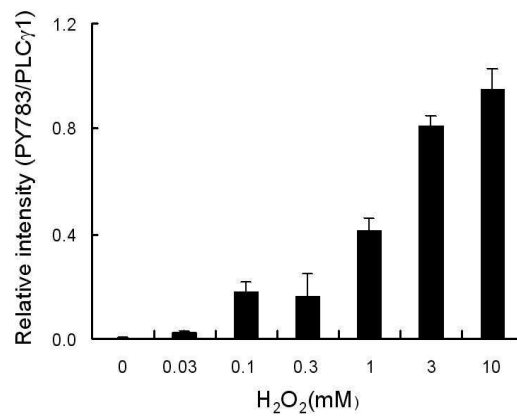
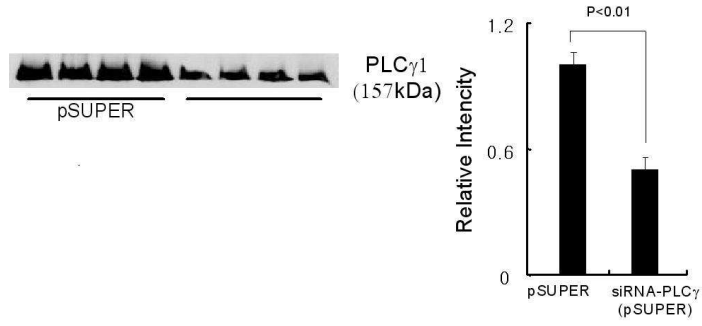
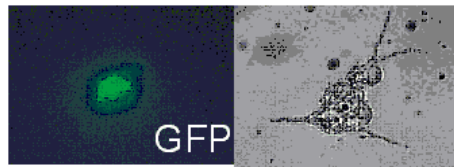


Fig.7. Western blotting of phospho-tyrosine 783 of PLC γ 1 with the treatment of H₂O₂ in a dose-dependent manner. Cells were treated with the indicated concentrations of H₂O₂ for 10 min, and lysates were subjected to immunoblot analysis with antibodies to phosphospecific tyrosine 783 (PY783) or PLC γ 1. (B) Data from 6 experiments were quantified and the ratio (PY783/ PLC γ 1) was calculated. Results are means \pm S.E.M.

(A)



(B)



(C)

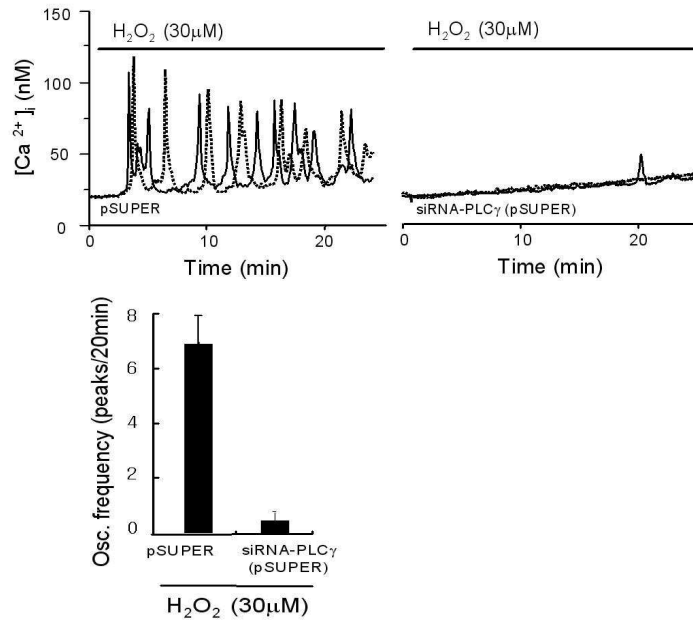


Fig. 8. The effect of knock-down of PLC γ 1 on H₂O₂-induced [Ca²⁺]_i increases. (A) Western blots of cell lysates transfected with pSUPER (empty vector) or siRNA for PLC γ 1 (siRNA-PLC γ 1). (B) Cells were cotransfected with GFP and siRNA-PLC γ 1 and [Ca²⁺]_i was measured. (C) Oscillation frequency (peaks/20 min) in cells transfected with or without siRNA-PLC γ 1 was counted during H₂O₂ stimulation in ten independent experiments. Results are means \pm S.E.M.

7. 환원제가 H₂O₂로 유도된 칼슘 신호에 미치는 영향

H₂O₂로 유도된 칼슘 신호가 관련 단백질의 산화에 영향을 받는지 알아보기 위하여, 환원제인 dithiothreitol (DTT)를 약 30분간 전처리하였는데, 세포에 30 μM H₂O₂와 1 mM DTT를 처리하자 칼슘 신호는 유발되지 않았다. (n=3, Fig. 9).

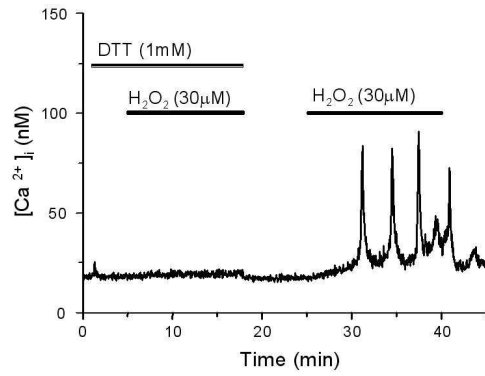


Fig.9. The effect of DTT, a reducing agent, on H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases. The Ca^{2+} responses of individual astrocytes to $30 \mu\text{M}$ H_2O_2 in the presence or absence of 1 mM DTT were shown. The result is representative of 16 cells in three independent experiments.

IV. 고찰

H_2O_2 에 의한 세포 내 칼슘 농도의 증가는 다양한 세포에서 알려졌다^{38,40,41,45}. 그러나 대부분의 연구에서 세포 내 칼슘 농도의 증가는 1 mM 이상의 고농도 H_2O_2 에 의해 유도된 것으로 H_2O_2 의 생리적 농도 범위인 1-100 μM 에서 세포 내 칼슘신호의 생성과 이의 기전에 대해서는 알려져 있지 않다. 세포 내 칼슘신호 전달은 빈도 (frequency)에 의해 조절되는 신호와 진폭 (amplitude)에 의해 조절되는 신호가 있는데²⁵, 빈도에 의한 칼슘 신호는 대부분의 세포에서 생리적 농도의 효현제와 반응하여 세포 내 칼슘 oscillations를 유발한다²⁴. 기존의 대부분의 세포에서 H_2O_2 가 세포 내 칼슘 농도를 증가시킨다는 보고는 있었지만, 세포 내 칼슘 oscillations를 유발한다는 보고는 거의 없다. 그런데 본 연구에서 30 μM H_2O_2 가 세포 내 칼슘 oscillations를 유발하였고, 이 이상의 고농도 처리시 세포 내 칼슘의 농도는 급속히 증가되어 감소한 후 일정수준을 유지하는 형태를 보였다. 이러한 세포 내 칼슘 신호는 가역적인 반응을 보였으며, 또한 세포 사멸을 동반하지 않았다. 이는 30 μM H_2O_2 가 세포 내 이차전달물질로서 칼슘 신호에서 작동할 가능성을 의미하며 H_2O_2 의 생리적 활성농도가 1-100 μM 이라는 보고와도 부합된다.

신경교 세포와 같은 비흥분성 세포에서 세포 내 칼슘 저장고로부터의 칼슘 유출과 세포막 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입은 칼슘

oscillations의 생성과 지속에 중요하다⁴⁶. 본 실험에서 H₂O₂로 유도된 세포 내 칼슘 oscillations는 세포외부에 칼슘이 없는 상태에서도 지속되었다. 이는 H₂O₂로 유도된 세포 내 칼슘 oscillations이 세포 내 칼슘 저장고로부터 동원된 칼슘 농도의 증가에 의해 생성됨을 의미한다. 세포 내 칼슘저장고로 주로 알려진 소기관으로는 소포체와 미토콘드리아 등이 있다²⁶. 이에 H₂O₂로 유도된 세포 내 칼슘 oscillations이 소포체인지를 확인하기 위하여, 특이적으로 소포체 칼슘펌프를 억제하는 Tg 처리시에 의해 소포체 칼슘 저장고를 고갈시킨 후 H₂O₂를 처리하였는데, 세포 내 칼슘 oscillations을 생성시키지 못하였다. 이는 H₂O₂로 유도된 세포 내 칼슘 oscillations이 Tg-의존성 칼슘 저장고인 소포체로부터의 칼슘 동원에 의해 생성되었음을 의미한다. 한편 H₂O₂는 세포 내 칼슘 통로인 ryanodine 수용체와 IP₃수용체를 활성화하여 소포체로부터의 칼슘 유출에 영향을 준다는 보고가 있는데^{38,47}, 특히 ryanodine 수용체가 산화되면 칼슘 통로가 활성화된다고 알려져 있다^{48,49}. 본 연구에서는 고농도인 100 μM ryanodine을 처리하여 ryanodine 수용체를 억제한 후에도 H₂O₂로 유도된 세포 내 칼슘 oscillations을 관찰하였다. 이는 신경교 세포에서 H₂O₂가 생성시킨 칼슘신호가 ryanodine 수용체와는 무관함을 의미한다. 반면 IP₃수용체의 억제제인 2-APB (75 μM)를 전처리한 세포 내 칼슘 oscillations을 관찰할 수 없었다. 2-APB는 불특정하게 IP₃수용체와

소포체 칼슘펌프, 그리고 CCE 통로를 억제한다고 알려진 약물로^{50,51}, 본 실험에서 사용한 2-APB의 농도는 소포체 칼슘펌프를 억제시키는 농도보다 적은 양인 75 μM 을 사용하였고, 2-APB로 인한 세포 내 칼슘 농도의 증가는 관찰되지 않았다. 이는 H_2O_2 로 유도된 세포 내 칼슘 oscillations는 IP_3 수용체를 통한 칼슘 유출에 의해 생성된 것으로 해석된다.

H_2O_2 는 in vitro 상에서 $\text{PLC}\gamma 1$ 의 활성을 유도한다^{35,36}. $\text{PLC}\gamma 1$ 은 세포막에서 타이로신의 인산화에 의존적인 기전에 의해 tyrosine kinase 수용체를 활성화시켜⁵², $\text{PLC}\gamma 1$ 의 인산화를 촉진시키며 PIP_2 를 가수분해시켜 증가된 IP_3 는 세포 내 칼슘 농도를 증가시킨다³¹. 따라서 신경교 세포에서도 H_2O_2 (30 μM)로 유도된 세포 내 칼슘 oscillations의 발생에서 $\text{PLC}\gamma 1$ 이 중요한 역할을 할 것으로 추측되었다. 먼저 H_2O_2 를 농도별로 처리한 후 $\text{PLC}\gamma 1$ 의 인산화를 측정하여본 결과, 농도에 의존적으로 인산화 정도가 증가함을 확인하였다. 이는 H_2O_2 유도성 칼슘 oscillations의 발생에 $\text{PLC}\gamma 1$ 이 관여할 가능성을 의미한다. 아울러 $\text{PLC}\gamma 1$ 의 발현억제를 통해 H_2O_2 유도성 칼슘 oscillations의 발생이 나타나는 지를 확인해 본 결과, siRNA- $\text{PLC}\gamma 1$ 은 H_2O_2 로 유도된 세포 내 칼슘 oscillations를 억제하였다. 이는 $\text{PLC}\gamma 1$ 의 활성이 H_2O_2 로 유도된 세포 내 칼슘 oscillations 발생에 중요한 역할을 함을 의미한다. 또한 PLC의 억제제인 U73122를 처리

하자 H₂O₂ 유도성 칼슘 oscillations의 발생은 나타나지 않아, PLC가 H₂O₂ 유도성 칼슘 oscillations의 발생에 필수적 요소라고 판단된다. 한편 H₂O₂로 유도된 칼슘 oscillations는 환원제인 DTT에 의해 억제되었다. 이는 PLC γ 1과 연관된 칼슘 신호 관련 단백질의 산화가 H₂O₂로 유도된 세포 내 칼슘 oscillations의 발생에 관련이 있음을 의미한다.

이상의 연구 결과들은 신경교 세포에서 생리적 농도로 알려진 범위에서 H₂O₂를 처리하여 얻어진 것으로, 활성산소종이 이차전령체로서 칼슘 신호를 조절할 수 있는 가능성을 확인한 것이다. 그러나 본 실험에 사용한 H₂O₂가 생리적 농도 범위 일지라도 기존의 연구들과 같이 외부에서 인위적으로 활성산소종을 세포막을 통과시켜 얻은 결과이다. 이와 달리 신호전달의 매개체로 작동하기 위하여는 활성산소종의 내재적 발생이 (endogenous generation of ROS) 중요하다고 알려져 있다. 즉, 외부에서 주입한 활성산소종과 내재적으로 발생된 활성산소종은 신호전달단백인 MAPK, JNK, 그리고, NF κ B 신호전달 체계를 다르게 활성화시킨다고 한다⁵³. 따라서 본 실험의 결과를 토대로 하여, 향후 세포 내 대사나 신호전달과정에서 내재적으로 생성된 활성산소종이 세포 내 칼슘신호전달에 관여하는지와 그 발생기전을 연구한다는 것은 매우 의미 있는 일이라 판단된다.

V. 결론

H_2O_2 를 신경교 세포에 처치하여 세포 내 칼슘 농도의 변화를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. H_2O_2 는 가역적인 칼슘 신호를 생성하였는데, H_2O_2 농도에 의존적으로 IP_3 매개성 칼슘 신호와 유사한 경향을 보였다.
2. H_2O_2 로 유도된 칼슘 신호는 thapsigargin에 민감한, 그리고 IP_3 의존성 칼슘저장고인 소포체를 이용하였다.
3. H_2O_2 의 농도에 의존적인 형태로 $PLC\gamma 1$ 의 활성이 나타났다.
4. siRNA를 이용한 세포의 형질전환으로 $PLC\gamma 1$ 의 발현을 억제하거나, PLC 억제제의 처리하면 H_2O_2 로 유도된 칼슘 신호가 억제되었다.
5. 환원제를 처치하면 H_2O_2 에 의해 칼슘 신호가 유발되지 않았다.

따라서 H_2O_2 는 흰쥐 신경교 세포에서 $PLC\gamma 1$ 을 인산화하여 IP_3 에 의존적인 신호를 활성화하여 세포 내 칼슘신호를 유발한다.

VI. 참고문헌

1. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 2005;70:200-214.
2. Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol* 2004;43:326-335.
3. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 2003;22:5734-5754.
4. Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 1999;18:6104-6111.
5. Gamaley IA, Klyubin IV. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular function. *Int Rev Cytol* 1999;188:203-255.

6. Gourlay CW, Ayscough KR. A role for actin in aging and apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2005; 33:1260-1264.
7. Obey CG, Heistad DD, Faraci FM. Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. *Stroke* 1997;28:2290-2294.
8. McLarnon JG, Choi HB, Lue LF, Walker DG, im SU. Perturbations in calcium-mediated signal transduction in microglia from Alzheimer's disease patients. *J Neurosci Res* 2005;81:426-435.
9. Laufs U, Wassmann S, Czech T, Mu"nzl T, Eisenhauer M, Bo"hm M, Nickenig G. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:809-814.
10. Caimi G, Carollo C, Presti Lo. Diabetes mellitus: oxidative stress and wine. *Curr Med Res Opin* 2003;19:581-586.
11. Gail Darlington L, Stone TW. Antioxidants and fatty acids in

the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br J Nutr* 2001;85:251-269.

12. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1997;272:217-221.

13. Lee ZW, Kweon SM, Kim SJ, Kim JH, Cheong C, Park YM, et al. The essential role of H₂O₂ in the regulation of intracellular Ca²⁺ by epidermal growth factor in rat-2 fibroblasts. *Cell Signal* 2000;12:91-98.

14. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Rhee SG et al. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997;272:217-221.

15. Krieger-BH, Medda PK, Kather H. Insulin-induced activation of NADPH-dependent H₂O₂ generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by Gai2. *J Biol Chem* 1997;272:10135-

10143.

16. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H_2O_2 . Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996;271:4138-4142.

17. Tournier C, Thomas G, Pierre J, Jacquemin C, Pierre M, Saunier B. Mediation by arachidonic acid metabolites of the H_2O_2 -induced stimulation of mitogen-activated protein kinases (extracellular-signal-regulated kinase and c-Jun NH_2 -terminal kinase). *Eur J Biochem* 1997;244:587-595.

18. Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, et al. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H_2O_2 . *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11233-11237.

19. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H_2O_2 and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant response factor. *EMBO J*

1993;12:2005-2015.

20. Bowie A, O'Neill L. Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation. *Biochem Pharmacol* 2000;59:13-23.

21. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for Generation of H_2O_2 for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. *Science* 1995;270:296-299.

22. Drge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.

23. Varela D, Simon F, Riveros A, Jorgensen F, Stutzin A. NAD(P)H oxidase-derived H_2O_2 signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation. *J Biol Chem* 2004;279:13301-13304.

24. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature* 1998;395:645-648.

25. Berridge MJ. The AM and FM of calcium signalling. *Nature* 1997;386:759-760.
26. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, et al. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:3-10.
27. Kiselyova K, Shin DM, Muallem S. Signalling specificity in GPCR-dependent Ca²⁺ signaling. *Cell Signal*. 2003;15:243-253.
28. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995;80:259-268.
29. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:11-21.
30. Sneyd J, Tsaneva-Atanasova K, Yule DI, Thompson JL, Shuttleworth TJ. Control of calcium oscillations by membrane fluxes. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:1392-1396.

31. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:517-529.
32. Putney JW Jr, Broad LM, Braun FJ, Lievremont JP, Bird GS. Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* 2001;114:2223-2229.
33. Rhee SG. Inositol phospholipids-specific phospholipase C: interaction of the gamma 1 isoform with tyrosine kinase. *Trends Biochem Sci* 1991;18:297-301.
34. Wang XT, McCullough KD, Wang XJ, Carpenter G, Holbrook NJ. Oxidative stress-induced phospholipase C-gamma 1 activation enhances cell survival. *J Biol Chem* 2001;276:28364-28371.
35. Tokmakov AA, Sato KI, Iwasaki T, Fukami Y. Src kinase induces calcium release in *Xenopus* egg extracts via PLC gamma and IP₃-dependent mechanism. *Cell Calcium* 2002;32:11-20.

36. Qin S, Inazu T, Yamamura H. Activation and tyrosine phosphorylation of p72syk as well as calcium mobilization after hydrogen peroxide stimulation in peripheral blood lymphocytes. *Biochem J* 1995;308:347-352.
37. Akaishi T, Nakazawa K, Sato K, Saito H, Ohno Y, Ito Y. Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca^{2+} currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neurosci Lett* 2004;356:25-28.
38. Favero TG, Zable AC, Abramson JJ. Hydrogen peroxide stimulates the Ca^{2+} release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1995;270:25557-25563.
39. Hu Q, Corda S, Zweier JL, Capogrossi MC, Ziegelstein RC. Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1998;97:268-275.
40. Smith MA, Herson PS, Lee K, Pinnock RD, Ashford ML. Hydrogen-peroxide-induced toxicity of rat striatal neurones

involves activation of a non-selective cation channel. *J Physiol* 2003;547:417-425.

41. Pariente JA, Camello C, Camello PJ, Salido GM. Release of calcium from mitochondrial and nonmitochondrial intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells by hydrogen peroxide. *J Membrane Biol* 2001;179:27-35.

42. Hansson E, Ronnback L. Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J* 2003;17:341-348.

43. Drukarch B, Schepens E, Stoof JC, Lamgeneld CH, Van Muswinkel FL. Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 1998;25:217-220.

44. Liu Q, Kang JH, Zheng RL. NADPH oxidase produces reactive oxygen species and maintains survival of rat astrocytes. *Cell Biochem Funct* 2005;23:93-100.

45. Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, Schultz G, et al. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:129-137.
46. Sneyd J, Tsaneva-Atanasova K, Yule DI, Thompson JL, Shuttleworth TJ. Control of calcium oscillations by membrane fluxes. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:1392-1396.
47. Hu Q, Zheng G, Zweier JL, Deshpande S, Irani K, Ziegelstein RC. NADPH Oxidase Activation Increases the Sensitivity of Intracellular Ca^{2+} Stores to Inositol 1,4,5-Trisphosphate in Human Endothelial Cells. *J Biol Chem* 2000;275:15749-15757.
48. Xia R, Stangler T, Abramson JJ. Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well defined redox potential that is sensitive to channel modulators. *J Biol Chem* 2000;275:36556-36561.
49. Meissner G. NADH, a new player in the cardiac ryanodine receptor? *Circ Res* 2004;94:418-419.

50. Missiaen L, Callewaert G, De Smedt H, Parys JB. 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca^{2+} pump and the non-specific Ca^{2+} leak from the non-mitochondrial Ca^{2+} stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium* 2001;29:111-116.

51. Peppiatt CM, Collins TJ, Mackenzie L, Conway SJ, Holmes AB, Bootman MD, et al. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium* 2003;34:97-108.

52. Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, Schlessinger J. Activation of phospholipase C gamma by PI3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* 1998;17:414-422.

53. Giovanni P, Renata C, Silvia B, Tommaso G. Redox regulation of lymphocyte signaling. *IUBMB Life* 2000;49:381-389.

Abstract

Mechanism of H₂O₂-induced
Ca²⁺ signaling
in cultured cortical rat astrocytes

Seung Hyeoi Kim

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by professor Dong Min Shin)

Reactive oxygen species (ROS) are produced as the by-products of general metabolism, which are considered a major cause as cytotoxic effect, aging, and proliferational disease. Recently, ROS play an important role as regulatory mediators in a variety of signaling processes. H₂O₂, a kind of ROS, influences the function of various signaling molecules throughout changing redox state of target proteins, suggesting that H₂O₂ is an intracellular second

messenger. In the present work, we have investigated the role of H_2O_2 in the regulation of intracellular Ca^{2+} signaling system in cultured rat astrocytes. H_2O_2 mobilized $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in a reversible manner. H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations were inhibited by the pretreatment with thapsigargin, an inhibitor of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) pump. H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations were not inhibited by the pretreatment with 100 μM ryanodine, but inhibited by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), an inhibitor of 1,4,5 trisinositol phosphate receptors (IP_3Rs) and dithiothreitol (DTT), a reducing agent. H_2O_2 induced phosphorylation of tyrosine residue at 783 of PLC γ 1 in a dose-dependent manner. U73122, an inhibitor of PLC, and RNA interference against PLC γ 1 inhibited H_2O_2 -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations. These results suggest that H_2O_2 activates IP_3 -dependent intracellular Ca^{2+} signaling system and the phosphorylation of PLC γ 1 and activation of IP_3 -dependent signaling are essential for generation of H_2O_2 -induced Ca^{2+} oscillations in cultured rat astrocytes.

Key Words: reactive oxygen species (ROS), astrocytes, Ca^{2+} oscillations, H_2O_2 , PLC γ 1