

흰쥐 신경교 성장세포에서 활성화  
산소종이 EGF 유도성 칼슘 신호에  
미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

변 해 미

흰쥐 신경교 성장세포에서 활성  
산소종이 EGF 유도성 칼슘 신호에  
미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

변 해 미

흰쥐 신경교 성상세포에서 활성화  
산소종이 EGF 유도성 칼슘 신호에

미치는 영향

지도교수 신 동민

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

년 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

변 해 미

# 변해미의 석사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

년 월 일

감사의 글

## <목차>

국문요약.....	1
I. 서론.....	3
II. 재료 및 방법 .....	9
1. 재료.....	9
2. 실험 방법.....	10
가. 정상세포의 분리 및 배양.....	10
나. 세포내 Fura-2의 측정.....	11
다. 세포내 칼슘 농도의 측정.....	11
라. 면역 반응 염색 .....	12
마. 형질전환 .....	13
바. 세포 내 활성 산소종의 수준 측정.....	14
사. 통계학적 분석.....	15
III. 결과.....	16
1. 표피세포 성장인자로 인한 칼슘 농도의 증가와 활성 산소종의 연관성 확인.....	16
2. 표피세포 성장인자에 의해 내재적인 ROS의 생성.....	17
3. Rac1의 변동이 표피세포 성장인자로 인한 세포 내 칼슘 수준의 변동에 미치는 영향.....	18

4. Peroxiredoxin II의 변동이 표피세포 성장인자로 인한 세포 내 칼슘 수준의 변동에 미치는 영향 .....	21
5. 표피세포 성장인자로 인한 PLC $\gamma$ 1의 인산화와 NAC, DPI로 인한 PLC $\gamma$ 1의 인산화 수준의 변동.....	24
IV. 고찰.....	30
V. 결론.....	38
VI. 참고문헌.....	41
영문요약.....	52

## 그림 차례

Fig. 1. EGF induces intracellular $\text{Ca}^{2+}$ signaling through the generation of reactive oxygen species.....	18
Fig. 2. EGF generates ROS in cultured rat cortical astrocytes...	20
Fig. 3. Overexpression of Rac1V12, the constitutively activated Rac1, attenuates $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases induced by EGF in cultured rat cortical astrocytes.....	22
Fig. 4. Overexpression of Rac1N17, the dominant negative form of Rac1, reduces $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases induced by EGF in cultured rat cortical astrocytes.....	23
Fig. 5. Overexpression of Prx II, which eliminates $\text{H}_2\text{O}_2$ , reduces $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases induced by EGF in cultured rat cortical astrocytes.....	25
Fig. 6. Overexpression of DN-Prx II, the dominant negative form of Prx II, enhances $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases induced by EGF in cultured rat cortical astrocytes.....	26
Fig. 7. EGF induces Tyr 783 phosphorylation of PLC $\gamma$ 1 in a time dependent manner in rat cultured cortical astrocytes.....	28
Fig. 8. Endogenously produced ROS enhances EGF-induced PLC $\gamma$ 1 activation in cultured rat cortical astrocytes.....	29



## 흰쥐 신경교 성상세포에서 활성 산소종이 EGF 유도성 칼슘 신호에 미치는 영향

성상세포 (astrocytes)는 신경교세포 (glial cells)의 대부분을 차지하는 세포이다. 성상세포는 신경세포가 분비하는 신경 전달 물질을 적절히 제거하며, 신경세포 사이에서 이온 농도 조절을 통해 신경세포 기능의 항상성을 유지하고, 신경세포를 손상으로부터 보호하는 작용을 한다. 이러한 역할을 수행하기 위해서는, 세포외부 신호에 대한 세포 내 다양한 신호전달 경로의 활성화가 필요한데, 세포외부 신호 중 하나인 표피세포 성장인자 (epidermal growth factor, EGF)는 성상세포의 증식과 분화를 조절한다. EGF가 활성화시키는 신호전달 경로 중 대표적인 것은 칼슘신호와 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)에 의한 신호로 EGF에 의해 세포 내 칼슘 농도가 증가되고, 활성 산소종이 생성되는 것으로 알려져 있다. 이렇게 증가한 활성 산소종은 다양한 세포 내 단백질의 산화-환원 수준에 변화를 일으킬 수 있는데, 칼슘신호와 연관된 단백질 또한 활성 산소종에 의한 영향을 받을 가능성이 있다. 이에 본 연구에서는 성상세포에서 EGF로 유발된 활성 산소종 신호가 세포 내 칼슘신호에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보려고 하였다.

성상세포에서 EGF의 자극은 세포 내 칼슘 농도를 증가시켰다. 이러한 칼슘 신호 변동은 세포막 인지질 가수분해효소인 phospholipase C $\gamma$ 1의

인산화에 의존적이었다. 또한 EGF 자극은 세포 내 활성 산소종의 농도를 증가시켰다. 활성 산소종 생성에 관여하는 NADPH oxidase의 조절단백인 Rac1을 과발현시킨 결과, 활성 산소종과 세포 내 칼슘 농도가 EGF만에 의한 것보다 모두 증가하였으며, Rac1 발현을 억제한 경우 세포 내 칼슘 농도가 감소됨은 확인하였다. 활성 산소종 중 특이적으로 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )를 제거하는 효소인 peroxiredoxin 제 2아형 (Prx II)을 과발현시킨 결과, 세포 내 칼슘 농도가 EGF만에 의한 것보다 감소하였으며, Prx II 발현을 억제한 경우 세포 내 칼슘 농도가 증가함을 확인하였다. 이상의 결과로 미루어 정상세포에서 EGF로 유발되는 활성 산소종은 EGF 유도성 칼슘 신호를 증폭시키며, 활성 산소종 중 하나인  $H_2O_2$ 가 이 역할을 수행하는 것으로 판단된다.

-----  
핵심되는 말 : 정상세포, 칼슘 신호 전달, 활성 산소종, 포피세포 성장인자

흰쥐 신경교 성상세포에서 활성 산소종이 EGF 유도성  
칼슘 신호에 미치는 영향

< 지도 교수 신 동민 >

연세 대학교 대학원 의과학과

변 해 미

I. 서론

성인의 뇌는 약  $10^{11}$ - $10^{12}$ 개의 신경세포를 가지고 있으며, 최소한 신경세포의 두 배에 달하는 수의 신경교세포 (glial cells)들이 신경세포에 대해 지지 작용과 보호 작용을 갖고 있다. 신경교세포는 크게 미세 아교세포 (microglia)와 대신경교세포 (macroglia)로 나뉜다. 미세 아교세포는 포식세포 (macrophage)와 유사하게 식세포성 기능 (phagocytic function)을 가진 세포이며, 대신경교세포는 희소돌기 아교세포 (oligodendrocytes)와 성상세포 (astrocytes)로 이루어져 있다. 성상세

포는 뇌의 발생 과정뿐만 아니라 정상적인 뇌 활동을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 신경세포가 분비하는 신경 전달 물질을 적절히 제거하거나, 뇌 내의 이온 농도를 조절함으로써 신경세포활성을 보조하는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근에는 신경세포의 시냅스 형성 (synaptogenesis), 시냅스 숫자 조절 (synapse number), 시냅스 기능 (synapse function) 및 시냅스 가소성 (synaptic plasticity) 조절과 같은 정상세포의 능동적인 역할 규명이 이루어지고 있다. 이러한 사실은 정상세포가 신경세포의 작용을 원활하게 유지시켜 주는 수동적인 기능뿐만 아니라 신경세포의 고유한 기능으로 알려져 왔던 신호전달에도 관여할 수 있음을 의미한다.<sup>1,2</sup>

정상세포에서 표피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)는 직접적으로 신경세포의 증식을 유도하는 동시에 간접적으로는 세포외기질 단백질 합성을 증가시킴으로써 신경돌기생성을 유도한다. EGF가 정상세포의 세포막 수용체에 결합하면 수용체의 이합체 형성이 이루어지고, receptor tyrosine kinase (RTK)가 활성화됨으로써 다양한 세포 내 신호전달에 관여한다.<sup>3-6</sup> 이외에도 EGF는 임신기간 중 태반 용모의 성장과 분화에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며,<sup>7,8</sup> 장내 이온 전달을 조절하는 데 있어 필수적인 역할을 수행한다고 알려져 있다.<sup>9</sup> 또한, 산의 분비를 억제하여 상처로부터 소화관 점막을 보호함으로써 위십이지장 궤양의 치유를 촉진한다는 보고도 있다.<sup>10</sup>

정상세포는 다양한 세포 반응을 유발하기 위해 여러 신호전달 체계를 이용하는데, 그 중 대표적인 것이 칼슘신호 전달체계이다. EGF 유도성 세포 내 칼슘 신호는 glutamate나 ATP와 같은 신경 전달 물질을 유리시킴으로써 정상세포 주변에 존재하는 신경 세포 사이에서 일어나는 정보 교

환과 피드백 기전에 영향을 미치고, 국부적인 혈류 조절에 있어 중요한 역할을 가진다.<sup>11-13</sup> 이외 칼슘신호전달체계는 근육 수축 (muscle contraction), 분비 (secretion), 시냅스 가소성 (synapse plasticity), 세포 증식 (cell proliferation), 그리고 세포 사멸 (cell death) 등과 같이 다양한 세포 내 반응을 조절한다.<sup>14</sup> 칼슘신호는 주로 호르몬과 신경 전달 물질들이 세포 내 칼슘 저장고로부터 칼슘을 유리시키거나 세포 외부에서 칼슘을 유입시킴으로써 세포 내 칼슘 농도를 증가시켜 나타난다.<sup>15</sup> EGF가 유도하는 여러 가지 세포 내 반응 중 하나인 칼슘신호는 잘 알려져있다.<sup>16</sup> EGF가 수용체에 결합하면 수용체의 타이로신 잔기에 인산화가 이루어짐으로써 phospholipase C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ )와 같은 효소 단백질이 활성화된다. 활성화된 PLC는 세포막 인지질의 하나인 phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)를 가수분해하여 inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP<sub>3</sub>)와 diacylglycerol (DAG)을 생성하게 되며, 이 중 IP<sub>3</sub>는 세포내 대표적인 칼슘 저장고인 소포체 (endoplasmic reticulum; ER)의 막에 존재하는 IP<sub>3</sub> 수용체에 결합하여 세포 내 유리 칼슘을 증가시키고 DAG는 protein kinase C (PKC)를 활성화시킨다.<sup>17</sup> 더불어, EGF는 다양한 기전을 통해 세포 외부에 존재하는 칼슘을 유입시킨다. 세포 내부 칼슘 저장고로부터 유리된 칼슘과 세포막을 통과하여 세포 내부로 유입된 칼슘 사이의 상호작용이 세포 내 칼슘이 기저 수준 보다 높게 지속되는 칼슘 신호나 반복적으로 세포 내 칼슘이 증가하는 형태의 칼슘 신호와 같은 다양한 형태의 EGF 유도성 칼슘 신호를 유발한다.<sup>18</sup> 이외에도 세포막에 존재하며 세포 외부로 칼슘을 펴내는 plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase (PMCA)와 소포체 막에 존재하며 세포질 내 칼슘을 소포체내로 펴들이는

sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) 역시 EGF에 특이적인 칼슘 신호를 생성하는 데 영향을 미치는 것은 물론, 더 나아가 EGF의 자극으로 인한 세포 반응이 일어난 후 세포 내 칼슘 수준을 기저 수준으로 낮추어 주는 역할을 수행한다.

EGF 유도성 신호전달에 관여하는 이차전령체로서는 칼슘뿐만 아니라 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)도 알려져 있다. 활성 산소종은 크기가 작고 확산이 잘 되며 거의 모든 세포에 존재하기 때문에 세포 외부 자극에 의한 합성과 생성된 활성 산소종의 제거가 용이하다. 이러한 점에서 활성 산소종은 세포 내 전령체의 필요조건을 만족시킨다.<sup>19</sup> 지방세포에서는 활성 산소종 중  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 글루코오스 운반 과정에서 일어나는 인슐린의 자극 효과와 지질 합성과 같은 유사한 반응을 일으키며, cGMP에 의존적인 단백질 인산화 효소를 통한 신호전달체계도 활성 산소종에 의해서 조절된다. 또한 타이로신에 특이적인 단백질 인산화 효소는 촉매 부위에 핵심적인 thiol 기를 가지고 있는데, 활성 산소종에 의해 이 thiol 기의 변성이 일어나면 다른 단백질의 인산기를 제거하는 주요 기능이 사라진다.<sup>20,21</sup> 과거의 활성 산소종은 지질, 핵산, 단백질 등과 같은 세포 구성 물질에 산화적 손상을 일으키는 물질로 알려져 왔지만, 위와 같은 연구 결과에서 볼 수 있듯이 활성 산소종이 독성 작용 뿐만 아니라 다양한 생리학적 기능을 수행하는 세포 내 신호 전달 분자라는 것이 입증되고 있다.<sup>22</sup> 그런데 활성 산소종이 이차전령체로서 작용하기 위해서는 기타 이차전령체와 마찬가지로 활성 산소종의 급속한 생성과 제거가 필수적이다. 활성 산소종은 전환 성장인자 (transforming growth factor- $\text{I}_\beta$ ), 혈소판 유래 성장인자 (platelet-derived growth factor), EGF와 같은 자극

에 의해 NADPH 산화체계를 이용해 일시적인 세포 내 활성 산소종의 생성을 유발시킨다.<sup>23-27</sup> NADPH 산화체계는 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)에 의해서 활성화가 이루어지는 small GTP binding protein인 Rac에 의해서 조절된다.<sup>28</sup> 이 효소단백체계는 NADPH로부터 전자를 옮겨줌으로써 superoxide anion ( $O_2^-$ )을 만들고, 만들어진  $O_2^-$ 는 급속하게  $H_2O_2$ 로 전환된다.<sup>29</sup> 이렇게 생성된 활성 산소종중 하나인  $H_2O_2$ 는 hydroxyl radical로 빠르게 전환됨으로써 제거되는데, 여기에 관여하는 효소에는 catalase, glutathione peroxidase (GPx), 그리고 peroxiredoxin (Prx) 등이 있다.<sup>30,31</sup> Catalase는  $H_2O_2$ 를 물로 분해하는데, 세포 내에 산재하기도 하지만 주로 미토콘드리아와 과산화소체 (peroxisomes)에 분포한다. GPx도 catalase와 역할은 동일하지만, catalase보다  $H_2O_2$ 에 대한 친화도가 더 높다.<sup>32</sup> 그런데 GPx는 Prx와 비교하여 세포 내 존재하는 양이 적다.<sup>33</sup>

활성 산소종은 세포의 다양한 신호전달기전에서 세포 내 자유칼슘이온과 함께 작용하는 것으로 알려져 있다. 이러한 상호작용은 세포증식과 세포사멸사이의 균형을 이루는 데 중요하다. 또한 활성 산소종은 세포 내 여러 가지 신호전달기전을 유도하거나 증폭시킨다. 근육 세포의 소포체에서 칼슘을 유리시킴으로써 유발되는 근육 수축은 활성 산소종의 농도에 의존적이며, 심근 세포에서 활성 산소종은 cyclic adenosine 5'-diphosphoribose와 같은 물질을 생성해냄으로써 칼슘의 이동을 조절한다. 이와 같이, 세포 내 이차전령체의 역할을 수행하는 활성 산소종과 칼슘 신호의 상호 연관성은 EGF로 유발되는 활성 산소종이 세포 내 칼슘신호 변동요인이 될 수 있음을 시사한다.

34,35

EGF라는 하나의 자극은 세포 내의 다양하고 중요한 신호 전달 기전과 관련된 세포 내 칼슘신호의 변동과 활성 산소종 생성을 유발시킬 수 있다. 하지만 EGF의 자극으로 인해 생성된 활성 산소종과 EGF 유도성 세포 내 칼슘 신호 변동 사이의 관계는 아직까지 정확하게 알려진 바 없다. 따라서, 대표적인 세포 내 신호 전달 기전으로 알려진 칼슘신호 전달체계와 활성 산소종 생성 기전 사이의 관계를 규명하는 일을 매우 중요한 일이라고 여겨진다.



## II. 재료 및 실험방법

### 1. 재료

실험동물은 1일령 흰쥐를 구입하여 사용하였다. Epidermal growth factor (EGF), N-acetyl-cysteine (NAC), diphenyleneiodonium (DPI), 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 등은 Sigma aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Bovine serum albumine (BSA)는 Amresco (Solon, OH, USA)에서 구입하여 사용하였고, dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), 100 mg/L sodium succinate 와 75 mg/L succinic acid를 함유한 minimum essential medium (MEM), trypsin-EDTA, opti-MEM, penicillin, streptomycin, glutamine과 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Paisley, UK)에서, fura-2-acetoxymethyl ester와 Pluonic F-127은 Molecular probe (Eugene, OR, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포에 DNA를 형질전환시킬 때 사용하는 reagent인 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (1 mg/ml)은 Invitrogen<sup>TM</sup> (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 면역 반응 염색에 사용된 단일 항체인 PLC $\gamma$ 1과 PLC $\gamma$ 1의 783번째 타이로신에 인산화가 이루어진 PY783은 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 가. 정상세포의 분리 및 배양

1일령 흰쥐의 머리 부분을 절제하여 희생 시킨 후, 즉시 대뇌를 분리, DPBS에 담근 상태에서 대뇌 피질의 막을 최대한으로 제거하였다.<sup>36</sup> 이후 막이 제거된 대뇌 피질을 DPBS와 함께 pipetting으로 물리적인 충격을 가해 줌으로써 조직에서 세포를 분리해 내었다. 12000 rpm에서 5분간 원심분리를 통해 얻은 세포를 무혈청 배지로 한 번 세척해 준 후, 다시 12000 rpm에서 5분간 원심분리를 통해 세포를 얻었다. 분리된 세포를 100 mm 배양접시에 깔고 5% CO<sub>2</sub> 와 95% air가 지속적으로 제공되는 37° C 세포배양기에서 배양했으며, 세포 내 칼슘을 측정하기 위한 실험을 수행하기 위하여, 세포를 22 mm x 22 mm 크기의 cover slip을 넣은 35 mm 배양접시에  $1 \times 10^5$  개로 깔고, 3-5일 간 배양 후 사용하였다. 면역 반응 실험에 이용할 세포는 60 mm 배양 접시에  $1 \times 10^6$  개로 깔아서 사용하였고, 세포 배양 배지는 2 mM glutamine, 25 mM glucose, 100 mg/ml penicillin, 25 ng/ml streptomycin 과 10 % FBS가 함유된 MEM을 사용하였다. 배지 교환은 3일에 한번 씩 해주었으며, 세포 계대 배양 시에는 trypsin-EDTA (0.25%)를 사용하였다.

#### 나. 세포내 Fura-2의 축적

칼슘 농도 변화에 민감한 형광물질인 fura-2/AM을 3 ml의 세포 배양액에 최종농도가 3.5 mM이 되도록 동량의 pluonic acid와 함께 넣고 어두운 실온에서 40분 동안 산소를 제공하면서 기다렸다. 세포 내로 들어간 fura-2/AM은 esterase에 의해 분해되어 세포막을 통과하지 못하는 fura-2 형태로 축적 되는데, fura-2의 세포내 축적이 끝나면 세포 내 칼슘 측정 실험에 이용하였다.<sup>37</sup>

#### 다. 세포내 칼슘 농도의 측정

세포내 자극을 가하고 이에 대한 칼슘 반응을 계측하기 위해 perfusion system을 사용하였다. Perfusion chamber 내 용적은 1 ml로서, 세포내 칼슘 농도를 측정하기 위하여 세포가 부착 된 cover slip (22 mm x 22 mm)을 perfusion chamber 내에 고정시킨다. 세포가 부착 된 cover slip을 perfusion chamber에 고정 시킨 후 미세 형광 분석기 (microfluorometer, MetaFlour system)와 연결된 역상 현미경 (inverted microscope; Nikon, Japan)위에 고정시키고 유동펌프를 사용하여 분당 2 ml의 속도로 용액을 관류하였다. 계측된 세포 내 칼슘 농도의 변화는 컴퓨터에 연결하여 연속적으로 기록하였다. Excitation 파장은 340 nm와 380 nm를 사용하고 emission 파장은 510 nm가 되도록 하

였다. 두 파장으로부터 활성화 된 값은 각 각의 파장 값에서 다음과 같은 계산을 거친 이 후 적용되었다.

$$\text{Ratio} = F_{340}/F_{380}$$

세포로부터 나오는 형광은 현미경에 부착되어져 있는 CCD (Photon Technology International Inc, Lawrenceville, NJ) 카메라로 측정하였다.<sup>37</sup>

#### 라. 면역 반응 염색

1일령 흰쥐의 정상세포에서 EGF로 유발된 세포 내부 칼슘 신호의 변화가 세포 내부의 칼슘이 증가하는 주요 기작과 밀접한 관련이 있는 단백질인 PLC $\gamma$ 1의 활성화와 연관이 있는지 알아보기 위하여 PLC $\gamma$ 1의 항체를 이용한 면역반응 염색실험을 수행하였다. 배양된 세포에 lysis buffer (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 50 mM Tris, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 ug/ml aprotinin, 1 mM leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate)를 첨가하여 30분 동안 4°C에서 배양하였다. 4°C 원심분리기에서 12000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 취함으로써 세포 전체 단백질을 추출해내었다. 이후, Bradford 정량법<sup>38</sup>을 이용하여 정량하였다. 동량의 단백질을 전기영동 한 후 gel을 nitrocellulose filter membrane에 전기적으로 단백질을 이동시켰다. 단백질이 이동 된

membrane을 sealing bag에 넣고 10 ml의 blocking solution (6% non-fat skim milk in T-TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.04% Tween-20) 으로 상온에서 1시간동안 blocking을 하고, T-TBS로 가볍게 세척해줌으로써 6% non-fat skim milk를 제거하였다. 일차 항체는 3% BSA 용액 (3% BSA in T-TBS)에 1:1000 비율로 희석하여 4℃에서 밤새 반응시켰다. 밤새 반응시킨 일차 항체를 제거한 후, T-TBS로 10분씩 3번 세척해 준 후, 이차 항체는 HRP가 결합되어 있는 항-쥐 항체를 3% blocking 용액에 1:2000 ~ 5000 비율로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양 한 후 T-TBS로 20분씩 3번 세척하였다. 면역형광항체법의 결과는 ECL (Enhanced Chemiluminescent Detection System; Amersham Pharmacia Biotech Inc.) 용액을 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하여 얻어졌다.

#### 마. 형질전환

Prx II의 cDNA와 DN-Prx II의 cDNA는 강상원 박사 (서울, 이화 여자 대학교)로부터 제공받았다.<sup>33</sup> Peroxiredoxin II (Prx II; 1 g/ml)의 cDNA, Dominant negative-Prx II (1 g/ml), Rac1N17 (The dominant negative form of Rac1; 1 g/ml) 그리고 Rac1V12 (The constitutively activated Rac1; 1 g/ml)의 cDNA를 각각 eGFP-C1

(1.2 ug/ml, Clontech, PaloAlto, CA, USA)과 함께 세포 내로 형질전환 시켰다. 모든 형질전환 실험은 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)를 이용해 이루어졌다. 형질전환 시키기 하루 전에 세포 배양 배지를 항생제가 없는 것으로 교체했고, 형질전환 시킬 때는 FBS가 없는 세포 배양 배지를 사용하여 starvation 시켰다. 형질전환을 시키고 4시간 뒤에는 항생제는 없고 나머지 배지 조성은 보통 세포 배양 시 사용하는 배지와 동일한 배지로 교체해주었다. 형질전환시킨 세포는 인위적으로 넣어준 DNA가 단백질로 충분히 발현할 수 있도록 48시간 동안 5% CO<sub>2</sub>, 95% air로 일정하게 유지되는 37°C 배양기에서 배양 한 후 실험에 이용하였다. 형질전환시킨 DNA의 단백질 발현 유무는 함께 형질전환시킨 eGFP-C1의 형광으로써 확인하였다.

#### 바. 세포 내 활성 산소종 수준 측정

세포 내 활성 산소종 수준은 세포 내 활성 산소종에 민감한 형광 물질인 DCF-DA를 이용해 측정하였다.<sup>39</sup> 35 mm 배양 접시에  $1 \times 10^5$  개로 plating 된 성장세포의 배지를 제거 한 후, hanks balanced salt solution (HBSS)로 2번 세척해준다. DCF-DA를 HBSS에 5 g/ml의 농도로 희석 한 후, astrocytes가 깔린 배양 접시에 넣어 주고 어두운 실온에서 5분간 배양했

다. Excitation 파장은 488 nm, emission 파장은 525 nm로써 DCF-DA의 형광 수준은 confocal laser scanning microscope (Leica, Buffalo, NY)를 이용해 측정하였다. DCF-DA의 광산화를 피하기 위하여, 모든 실험은 동일한 실험 조건하에 빠른 scanning으로 이루어졌다.

#### 사. 통계학적 분석

Student T-test를 실시하여 통계학적으로 분석하였으며,  $P < 0.05$  일 때, 유의성 있는 차이로 간주하였다.

### III. 결과

#### 1. EGF로 인한 정상세포 내 일시적인 칼슘 수준의 증가와 활성 산소종의 연관성 확인

EGF로 인해서 증가된 세포 내 칼슘 신호를 정상세포에서 측정하였다. Fura2의 형광 강도 비율 (340/380nm)을 세포 내 칼슘 농도로 표시하였다. 사용되어진 실험 방법은 세가지로 EGF로 자극하였을 시, 정상세포내 칼슘 농도의 변화, 5 mM N-acetyl-cysteine (NAC, 활성 산소종 제거 물질)을 먼저 처리한 후, EGF로 자극하였을 시, 정상세포 내 칼슘 농도의 변화, 그리고 10  $\mu$ M DPI (NADPH oxidase의 억제제)를 먼저 처리한 후, EGF로 자극하였을 시, 정상세포 내 칼슘 신호의 변화를 측정하였다. 정상세포를 10 ng/ml의 EGF로 자극하였을 때 일시적인 세포 내 칼슘 농도의 증가 현상이 나타났다(n=4)(그림 1, A). 5 mM NAC과 10  $\mu$ M DPI를 먼저 처리한 후, EGF로 자극하였을 때는 전처리 없이 EGF로만 자극하였을 때와 비교하여 세포 내부 칼슘 농도가 감소되었다(n=4)(그림 1, B). 또한, EGF의 자극을 지속한 채, 5 mM NAC 이나 10  $\mu$ M DPI의 처리를 중지하면, 억제되었던 세포 내 칼슘 신호가 다시 증가하였다(n=4)(그림 1, C). NAC 또는 DPI를 EGF와 함께 먼저 처리



하면 EGF만으로 유도되는 세포 내 칼슘 농도의 증가 현상이 억제 되었고, EGF와 동시에 처리한 NAC 또는 DPI의 처리를 중단하였을 때, 세포 내 칼슘 농도가 다시 증가하였다.

## 2. EGF로 인한 내재적인 활성 산소종의 생성

EGF가 정상세포 내부에서 활성 산소종을 생성해 내는지 확인하기 위하여 세포 내 활성 산소종의 수준을 측정하였다. 10 ng/ml의 EGF 처치시 대조군과 비교하여 세포 내 DCF-DA의 형광 정도가  $59 \pm 3.52\%$  증가 ( $p=0.0351$ ,  $n=5$ )하였다 (그림 2A의 b). 5 mM NAC을 EGF와 동시에 세포에 처리하였을 때, EGF만으로 자극했을 때와 비교하여 DCF-DA의 형광 정도가  $59 \pm 5.33\%$  ( $p=0.0153$ ,  $n=5$ ) 감소하였고, 10  $\mu$ M DPI와 EGF로 함께 세포를 자극했을 때 EGF만 처리하였을 때와 비교하여 DCF-DA의 형광 정도가  $43 \pm 5.33\%$  ( $p=0.0221$ ,  $n=5$ ) 감소하였다 (그림 2, B).

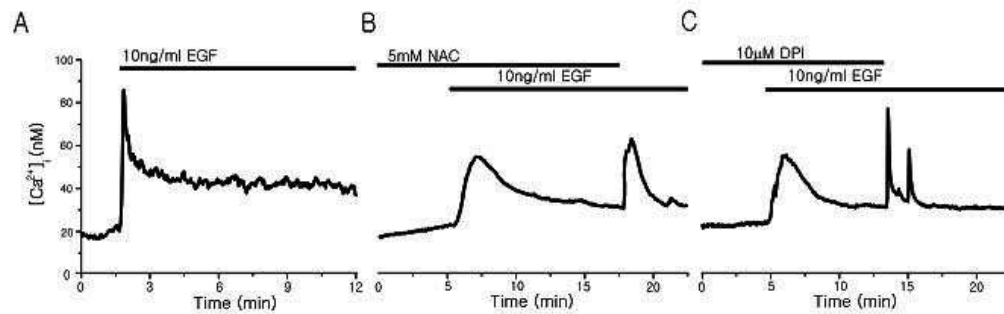


Fig. 1. Epidermal growth factor (EGF) induces intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling through the generation of reactive oxygen species. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level to 10 ng/ml EGF increases transiently in the absence (A) or presence of 5mM NAC (B) or 10  $\mu\text{M}$  DPI (C) are denoted by the bars. Note that pretreatment with NAC or DPI suppressed  $\text{Ca}^{2+}$  responses to EGF and the removal of NAC and DPI permitted the  $\text{Ca}^{2+}$  level. Results are representative of 15–20 cells in three or four independent experiments.

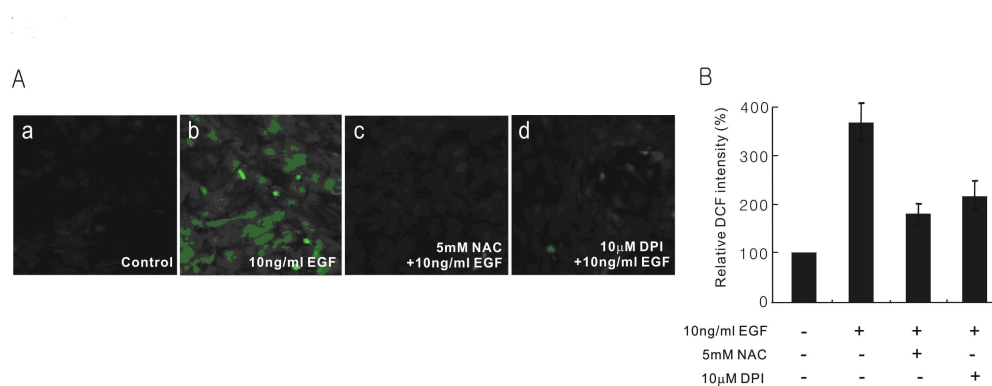


Fig. 2. EGF generates ROS in cultured rat cortical astrocytes. (A) Astrocytes were loaded with DCF for 5 min (a, b, c and d). Cells were treated with 5 mM NAC (c) or 10  $\mu$ M DPI (d) for 2 min followed by an addition of 10 ng/ml EGF (b, c and d) for 2 min. The fluorescence of DCF was subsequently visualized by confocal laser scanning microscopy. (B) The DCF fluorescence was quantified and the relative intensities were calculated by setting the fluorescence intensity of control cells to 100 % (n=5). Results are means S.E.M.

3. Rac1의 변동이 EGF로 인한 세포 내 칼슘 수준의 변동에 미치는 영향

활성 산소종 생성 기전 관련 단백질인 Rac1의 constitutively activated form (Rac1V12) dominant negative form을 pEGFP-C1과 함께 상세포 내로 함께 형질 발현시킨 후 세포 내 칼슘 수준을 측정하였다. 인위적으로 넣어준 DNA가 단백질로 발현되었는지의 유무는 함께 형질 발현시킨 pEGFP-C1의 형광으로 확인하였다. Rac1V12 을 과발현시킨 경우 대조군과 비교하여 세포 내 칼슘 농도가  $67\% \pm 5.04\%$  ( $p=0.0221$ ,  $n=4$ ) 증가하였다 (그림 3, B). Rac1의 dominant negative form인 Rac1N17을 pEGFP-C1과 함께 형질 전환시킨 경우 대조군과 비교하여  $55\% \pm 5.33\%$  칼슘 농도가 감소하였다 ( $p=0.0351$ ,  $n=4$ ) (그림 4, B).

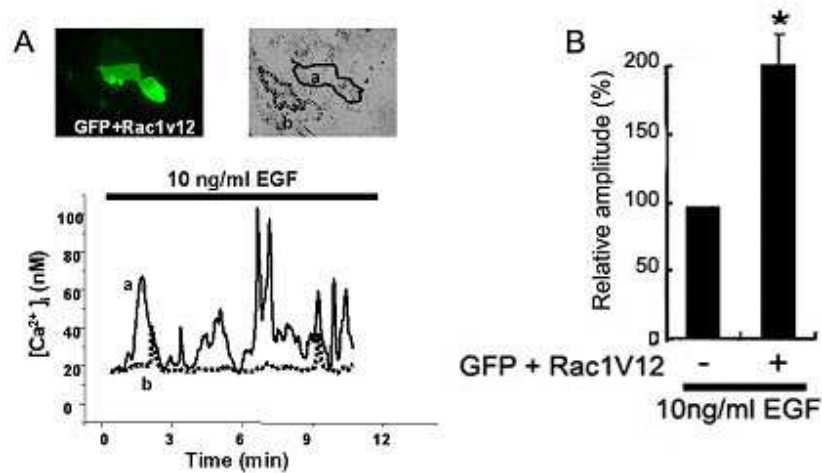


Fig. 3. Overexpression of Rac1V12, the constitutively activated Rac1, attenuates  $[Ca^{2+}]_i$  increases induced by EGF in cultured rat cortical astrocytes. Cells were transfected with Rac1V12 (A) and  $[Ca^{2+}]_i$  was measured. The relative amplitude (%) in cells transfected with Rac1V12 was counted experiments.(B) Results are means S.E.M. \*Indicates the difference of the oscillation frequencies between the transfected and non-transfected groups ( $p < 0.05$ ).

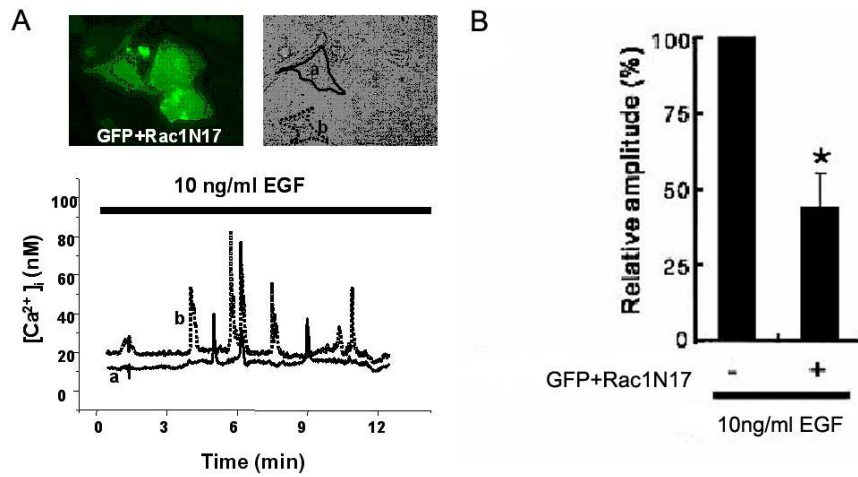


Fig. 4. Overexpression of Rac1N17, the Dominant negative form of Rac1, reduces [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases induced by EGF in cultured rat cortical astrocytes. Cells were transfected with Rac1N17 (A) and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was measured. The relative amplitude (%) in cells transfected with Rac1N17 was counted experiments.(B) Results are means S.E.M. \* Indicates the difference of the oscillation frequencies between the transfected and non-transfected groups (p < 0.05).

#### 4. peroxiredoxin II의 변동이 EGF로 인한 세포 내 칼슘 수준의 변동에 미치는 영향

내재적으로 생성된 활성 산소종이  $H_2O_2$ 인지 확인하기 위해 Prx II를 과발현시킨 결과, EGF로 유발되는 세포 내 칼슘 신호는 대조군에 비해  $62\% \pm 10.68\%$  ( $p=0.0351$ ,  $n=4$ ) 감소되었다. (그림 5, B) 또한, Prx II의 dominant negative form을 세포내 형질 전환시켰을 때는, EGF로 인해 유도된 세포 내 칼슘 신호가 대조군과 비교하여  $74\% \pm 10.68\%$  ( $p=0.0421$ ,  $n=4$ ) 감소하였다 (그림 6, B).

#### 5. EGF로 인한 PLC $\gamma$ 1의 인산화와 NAC, DPI로 인한 PLC $\gamma$ 1의 인산화 수준의 변동

정상세포에서 PLC $\gamma$ 1의 활성 산소종에 의한 인산화 여부를 확인하였다.<sup>41,40</sup> 10 ng/ml EGF로 정상세포를 자극하면 1분 이내에 PLC $\gamma$ 1의 인산화가 이루어지었으며 (그림 7, A), 자극 30분 후에는 인산화가 감소하였는데, EGF로 인한 PLC $\gamma$ 1의 인산화는 시간에 의존적이었다( $n = 3$ ) (그림 7, B). 5 mM의 NAC 이나 10  $\mu$ M의 DPI와 함께 EGF로 정상세포를 자극하였을 경우, PLC $\gamma$ 1의 인산화가 현저히 감소하였다 ( $n = 3$ ) (그림 8, A).

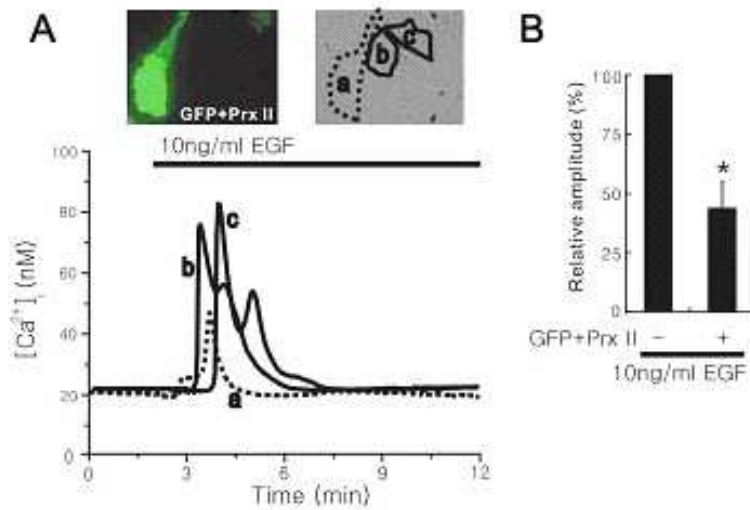


Fig. 5. Overexpression of Prx II, which eliminates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reduces [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases induced by EGF in cultured rat cortical astrocytes. Cells were transfected with Prx II (A) and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was measured. The relative amplitude (%) in cells transfected with Prx II was counted experiments.(B) Results are means S.E.M. \*Indicates the difference of the oscillation frequencies between the transfected and non-transfected groups (p < 0.05).



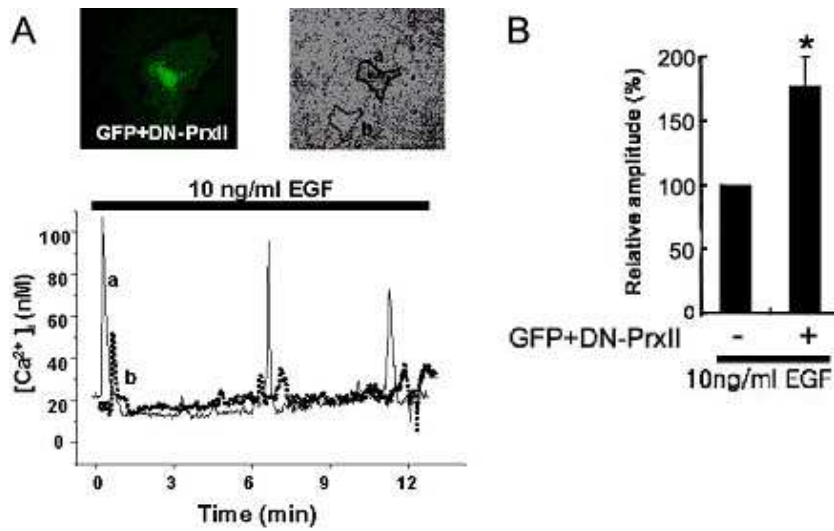


Fig. 6. Overexpression of DN-Prx II, the dominant negative form of Prx II, enhances  $[Ca^{2+}]_i$  increases induced by EGF in cultured rat cortical astrocytes. Cells were transfected with DN-Prx II (A) and  $[Ca^{2+}]_i$  was measured. The relative amplitude (%) in cells transfected with DN-Prx II was counted experiments.(B) Results are means S.E.M. \* Indicates the difference of the oscillation frequencies between the transfected and non-transfected groups ( $p < 0.05$ )

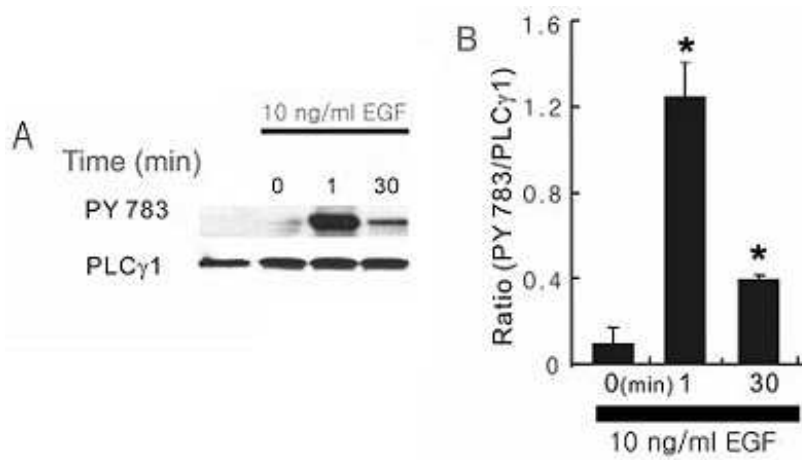


Fig. 7. EGF induces Tyr 783 phosphorylation of PLC $\gamma$ 1 in a time dependent manner in rat cultured cortical astrocytes. Cells were stimulated with 10 ng/ml EGF was added for the indicated times (0min, 1min, 30min). (A) Cells were then lysed and the lysates were subjected to immunoblot analysis with antibodies to phosphotyrosine (PY783) or PLC $\gamma$ 1. (B) Quantitation of results in (A). Ratio (PY783/PLC $\gamma$ 1) was calculated (n=3). Results are presented as mean S.E.M

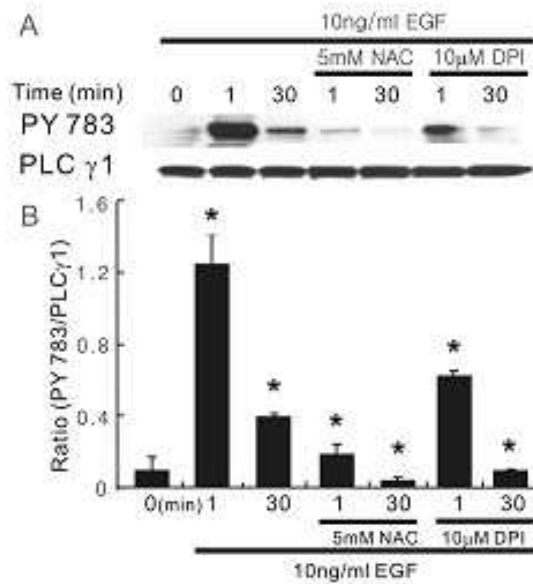


Fig. 8. Endogenously produced ROS enhances EGF-induced PLC $\gamma$ 1 activation in cultured rat cortical astrocytes. The effect of 5 mM NAC or 10  $\mu$ M DPI on 10 ng/ml EGF-induced PLC $\gamma$ 1 phosphorylation is shown. Cells were incubated with or without NAC or DPI for 2 min and then 10 ng/ml EGF was added for the indicated times. Cells were then lysed and the lysates were subjected to immunoblot analysis with antibodies to phosphotyrosine (PY783) or PLC $\gamma$ 1. (E) Quantitation of results in (D). Ratio (PY783/ PLC $\gamma$ 1) was calculated (n=3). Results are presented as mean S.E.M.

#### IV. 고찰

지난 수십 년간 성상세포는 신경세포의 기능에 가려 단순한 수동적인 활성으로서의 기능만 연구되어져 왔다. 그러나 최근 다양한 실험기구의 발전, 기록기술과 영상 기술의 진보와 더불어 신경세포에 대한 정보가 방대해 짐에 따라 뇌의 90%를 차지하고 있는 성상세포의 광범위한 작용에 초점을 맞추기 시작하고 있다. 뇌에서 성상세포 기능의 중요성은 진화상 우위를 차지하고 있는 척추동물의 경우 하나의 신경세포에 대한 성상세포 수가 증가하고 있음을 알 수 있다. 또한 성상세포는 형태학적인 측면에서 신경세포의 시냅스를 싸고 있으며 동시에 혈관내피세포에 근접하여 뇌혈관관문 (blood-brain barrier ;BBB) 구조 형성에 관여하고 있다. 따라서 생리학적 및 병리학적 관점에서 뇌기능에 성상세포가 중요한 역할을 하리라 추측된다. 즉, 성상세포의 광범위한 신호전달체계가 신경세포의 활성을 조절하며 시냅스 형성 및 활성조절에도 관여하고 또한 BBB 형성과 유지에 관여한다. 병리학적으로 성상세포는 경미한 신경세포의 상해에는 다양한 신경물질을 분비하여 신경세포 보호 작용을 한다. 그러나 뇌손상이 지속되거나 퇴행성 뇌질환 등에서 관찰되는 성상세포의 사멸은 결국 신경세포의 활성과 뇌에 심각한 손상을 준다. 따라서 성상세포에 대한 연구는 행동, 기억, 시냅스 기능 등 정상적인 뇌기능을 밝히게 될 뿐만 아

나라 뇌질환 연구에도 중요한 단서를 제공하게 된다. 이에 본 연구에서는 정상세포의 증식과 분화를 조절하는 EGF 유도성 신호전달체계 중 칼슘 신호와 활성산소종 신호의 상호 연관성을 알아보고자 하였다.

EGF는 세포 외부의 칼슘을 유입시키거나 다양한 세포들이 갖고 있는 세포 내부 칼슘 저장고로부터 칼슘을 유리해 냄으로써 세포 내 칼슘 수준을 증가시킨다.<sup>22,24,26,27,50</sup> 정상세포에서도 EGF로 인한 자극이 세포 내 칼슘신호의 변동을 야기 시키는지 확인하였는데, 초기에 일시적으로 세포 내 칼슘 수준이 증가하였다가 감소한 후 일정 수준에서 지속되는 양상을 확인하였다. 활성산소종 제거제인 NAC 또는 활성 산소종 생성 기작 관련 단백질인 NADPH Oxidase의 억제제인 DPI를 처리하여 칼슘 증가 수준이 EGF 단독처리에 비해 감소됨을 확인하여 EGF로 인한 세포 내 칼슘 농도의 증가 현상은 활성 산소종과 연관이 있음을 알 수 있었다. 또한 최근에 EGF 수용체에 의한 신호 전달 기전이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성 기전과 관련이 있다는 사실이 밝혀졌는데,<sup>23</sup> 이는 세포 내 산화-환원 수준의 변화로 인해 세포 내 칼슘 이동 기전이 변동될 가능성을 의미한다. 이에 정상세포내에서 EGF로 내재적인 활성 산소종이 생성해 내는지 알아보기 위하여 세포 내 활성 산소종의 수준을 직접 측정해 본 결과, EGF는 활성 산소종에 민감한 형광 물질인 DCF-DA의 형광 수준을 증가함을 확인하였다. 그리고 활성 산소종 제거제인 NAC을 EGF와 동시에 정상세포에 처리하였을

때, EGF만 단독 처리하였을 때와 비교하여 DCF-DA의 형광 수준이 감소하는 것으로 보아 EGF로 인해 증가된 DCF-DA의 형광 수준이 세포 내 활성 산소종임을 다시 확인하였다. 특히, NADPH oxidase의 억제제인 DPI를 EGF와 함께 성상세포를 자극할 시에도 역시 DCF-DA의 형광 수준이 감소하는 결과로 미루어 보아, EGF로 인해 생성된 활성 산소종은 NADPH oxidase의 활성화로 인해 생성되는 활성 산소종임을 의미한다.

비포식세포에서 다양한 종류의 사이토카인이나 성장인자로 인해 활성화되는 활성 산소종 생성 기전은 자극의 종류에 따라 다르지만 기능적으로는 중성구에서 나타나는 NADPH oxidase와 유사하다는 생화학적 증거가 보고되었다.<sup>43-46,48</sup> 실제로, NADPH oxidase를 구성하는 모든 구성 단백질의 대다수가 섬유모세포를 포함한 매우 다양한 세포에서 발현된다.<sup>49</sup> 활성 산소종의 생성 기전은 몇 종류의 세포가 가지고 있는 기전을 제외하고서는 정확히 알려진 바가 거의 없으나, 여러 가지 효현제로 인해 포식세포의 활성화가 이루어지면 최소한 4종류의 단백질로 이루어진 NADPH 산화체계 복합체의 형성이 이루어진다고 알려져 있다.<sup>35,42</sup> 이러한 효소 체계는 NADPH로부터 전자를 옮겨줌으로써 superoxide anion ( $O_2^-$ )을 만들어낸다. 이렇게 생성된  $O_2^-$ 은 빠른 속도로  $H_2O_2$ 으로 전환이 이루어지는데, 중성구에서의 NADPH oxidase의 활성화는 small GTP-binding protein Rac2에 의해 조절되는 반면 대식세포에서는 Rac1에 의해서 조절된다.<sup>50</sup> 이에 비포식 세포에 포함되

는 정상세포에서 Rac 단백질이 세포 내 활성 산소종 수준을 조절하는데 관여하는 지를 알아보기 위하여 Rac1을 과발현 또는 기능 억제시킨 결과, EGF로 유발되는 일시적인 세포 내 칼슘신호의 증가 현상이 단순히 세포 내 칼슘신호 전달경로만 이용하는 것이 아니라 EGF로 생성된 내재적인 활성 산소종의 영향을 받고 있음을 알 수 있었다.

섬유모세포에서 성장인자의 자극은 세포 내  $H_2O_2$ 를 생성하는데, 생성된  $H_2O_2$ 는 Prx I 이나 Prx II를 과발현시킴으로써 제거할 수 있다는 보고가 있는데, 이는 PrxI 이나 Prx II가 세포 내  $H_2O_2$ 의 농도를 조절하는데 관여하는 중요한 인자임을 보여준다.<sup>33</sup> 이외에 Prx II는 serum starvation, ceramide 또는 etoposide로 인한 세포사멸에 대한 보호 작용을 가지며, 미토콘드리아에서 cytochrome c 가 세포질로 방출되는 것을 억제한다.<sup>51</sup> 이와 같은 결과는 Prx I 과 Prx II가  $H_2O_2$ 를 제거함으로써 다양한 세포 외부 자극에 대한 신호 전달 기전에 참여하고 있음을 보여준다.<sup>52</sup> 정상세포에 Prx II를 과발현시켰을 때, EGF로 유발되는 세포 내 일시적인 칼슘 증가량은 대조군에 비하여 현저히 감소되는 것을 확인 할 수 있었으며, Prx II의 dominant negative form을 세포에 형질전환시켰을 때는, EGF로 인해 유도되는 일시적인 칼슘 증가량이 2배 이상 증가하는 등 보다 활발한 세포 내 칼슘신호의 변동을 확인하였는데, 이는 정상세포 내에서 EGF로 인해 발생하는 활성 산소종의 상당량이  $H_2O_2$ 임을 의미한다. 한편 여러 세포에서 PLC $\gamma$ 1이 활성 산소종에

의해 활성화가 된다는 보고에 의해, 정상세포에서 역시 PLC $\gamma$ 1의 인산화는 활성 산소종에 의존적이었다. 이러한 결과는 EGF로 인해 발생하는 내재적인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 세포 내 칼슘신호 전달체계의 변동에 영향력을 가짐을 의미한다.



## V. 결론

정상세포세포에서 활성산소종의 수준을 변화시켰을 때 EGF로 유도된 세포 내 칼슘 수준과 PLC $\gamma$ 1의 활성화를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상세포를 EGF로 자극하였을 때, 세포 내 일시적인 칼슘 농도가 증가 하였다.

2. EGF에 의한 일시적인 세포 내 칼슘 신호의 증가가 EGF로 인한 내재적인 활성 산소종과 연관이 있음을 확인하였다. 그리고 EGF로 유발된 활성 산소종은 PLC $\gamma$ 1의 인산화에 영향을 미침으로써 세포 내 칼슘 수준의 변동을 유발하였다.

3. Rac1의 constitutively form을 형질전환시켰을 때 활성 산소종에 의해 EGF 유도성 칼슘 농도가 증가하였고, Rac1의 dominant form을 형질전환시켰을 때 활성 산소종의 양의 감소에 의해서 칼슘신호의 변동이 감소하였다.

4. 활성 산소종 중 하나인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 특이적으로 제거하는 효소 단백질 Prx II

를 과발현시켰을 때,  $H_2O_2$ 의 상당량이 제거되었다. 반면, Prx II의 dominant negative form을 형질전환 시켰을 때는 세포 내에 발생하는 활성 산소종이 축적되고, 결과적으로 증가된 활성 산소종으로 인해 EGF로 인한 칼슘신호 역시 증가하였다.

5. EGF로 인한 일시적인 칼슘 신호의 변동은 PLC $\gamma$ 1의 활성화에 의해서 이루어지며, 이와 같은 PLC $\gamma$ 1의 인산화는 세포 내 활성 산소종의 영향을 받는다.

## VI. 참고 문헌

- (1) Emerit J, Edeas M, Bricarie F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Phamarcotherapy*. 2004;58:39-46.
- (2) Pascal Kurosinski. Glial cells under physiologic and pathologic conditions. *Archives of Neurology*. 2002;59:1524-152.
- (3) Schlessinger J. Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*. 1988;13:443-447.
- (4) Spaargaren M, Defize LH, Boonstra J, de Laat SW. Antibody-induced dimerization activates the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 1991;266:1733-1739.
- (5) Moolenaar WH, Bierman AJ, Tilly, BC, Verlaan I, Defize LHK., Honegger AM et al. A point mutation at the ATP-binding site of the EGF-receptor abolishes signal transduction. *EMBO J*. 1988;7:707-710.
- (6) Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990;61:203-212.

- (7) Rodrigo Martinez, Flavia Carvalho Alcantara Gomes. Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor–protein kinase a pathway. *J Neurosci Res.* 2005;80:341–349.
- (8) Marzioni D, Capparuccia L, Todros T, Giovannelli A, Castellucci M. Growth factors and their receptor: fundamental molecules for human placental development. *Ital J Anat Embryol.* 2005;110:183–187.
- (9) McCole DF, Rogler G, Varki N, Barrett KE. Epidermal growth factor partially restores colonic ion transport responses in mouse models of chronic colitis. *Gastroenterology.* 2005;129:591–608.
- (10) Pai R, Tarnawski A. Signal transduction cascades triggered by EGF receptor activation: relevance to gastric injury repair and ulcer healing. *Dig Dis Sci.* 1998;43:14S–22S.
- (11) Hansson E, Ronnback L. Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J.* 2003;17:341–348.
- (12) Morita M, Higuchi C, Moto T, Kozuka N, Susuki J, Itofusa R et

- al. Dual regulation of calcium oscillation in astrocytes by growth factors and pro-inflammatory cytokines via the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Neurosci.* 2003; 26:10944-10952
- (13) Newman EA. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 2003;26:536-542.
- (14) Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1:11-21.
- (15) Clapham DE. Calcium Signaling. *Cell.* 1995;80:259-268.
- (16) Peppelenbosch MP, Tertoolen LGJ, de Vries-Smits AMM, Qui R-G, M'Rabet L, Symons MH, et al. Rac-dependent and -independent pathways mediate growth factor-induced  $Ca^{2+}$  influx. *J Biol Chem.* 1996;271:7883-7886.
- (17) Peppelenbosch MP, Tertoolen LG, de Laat SW. Epidermal growth factor-activated calcium and potassium channels. *J Biol Chem.* 1991;266:19938-19944.
- (18) Moccia F, Berra-Romani R, Tritto S, Signorelli S, Taglietti V, Tanzi F. Epidermal growth factor induces intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2003;

194:139–150.

(19) Bae YS, Sung JY, Kim OS, Kim YJ, Hur KC, Kazlauskas A, et al. Platelet-derived growth factor-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 2000;275:10527–10531.

(20) Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med.* 1999;31:53–59.

(21) Michael SW. Interaction of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1430–1442.

(22) Hepler JR, Nakahata N, Loveberg TW, DiGiuseppi J, Herman B, Earp HS, et al. Epidermal growth factor stimulates the rapid accumulation of inositol (1,4,5)-trisphosphate and a rise in cytosolic calcium mobilized from intracellular stores in A431 cells. *J Biol Chem.* 1987;262:2951–2956.

(23) Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. Epidermal Growth Factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide : Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1997;272:217–221.

(24) Gilligan A, Prentki G, Glennon C, Knowles BB, Epidermal

growth factor-induced increases in inositol trisphosphates, inositol tetrakisphosphates, and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in a human hepatocellular carcinoma-derived cell line. *FEBS Lett.* 1988;233:41-46.

(25) Pandiella A, Magni M, Lovisolo D, Meldolesi J. The effect of epidermal growth factor on membrane potential. Rapid hyperpolarization followed by persistent fluctuations. *J Biol Chem.* 1989;264:12914-12921.

(26) Chen WS, Lazar CS, Lund KA, Welsh JB, Chang C-P, Walton GM, et al. Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand-induced internalization and calcium regulation. *Cell.* 1989;59:33-43.

(27) Tinhofer I, Maly K, Dietl P, Hochholdinger F, Mayr S, Obermeier A, et al. Differential  $\text{Ca}^{2+}$  signaling induced by activation of the epidermal growth factor and nerve growth factor receptors. *J Biol Chem.* 1996;271:30505-30509.

(28) Park HS, Lee SH, Park D, Lee JS, Ryu SH, Lee WJ, et al. Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase,  $\beta\text{Pix}$ , Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . *Mol Cell Biol.* 2004;24:4384-94.

- (29) Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, et al. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J*. 1996;318:379-382.
- (30) Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:7017-7021.
- (31) Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*. 2001;52:35-41.
- (32) Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003;189:41-54.
- (33) Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*. 1998;273:6297-6302.
- (34) Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and



differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 2001;11:173–186.

(35) Okabe E, Tsujimoto Y, Kobayashi Y. Calmodulin and cyclic ADP-ribose interaction in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling related to cardiac sarcoplasmic reticulum: superoxide anion radical-triggered  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Antioxid Redox Signal*. 2000;2:47–54.

(36) OGAWA K. Cytoplasmic granules of astrocytes cultivated in vitro. *Ann Histochem*. 1961;6:363–369

(37) Shin DM, Dehoff M, Luo X, Kang SH, Tu J, Nayak SK, et al. Homer 2 tunes G protein-coupled receptors stimulus intensity by regulating RGS proteins and  $\text{PLC}\beta$  GAP activities. *J Cell Biol*. 2003;162:293–303.

(38) Naz RK, Bradford CR, Menge AC. Isoantigenicity of rabbit sperm, testis, and their extracts as demonstrated by Western blot enzyme immunobinding procedure. *Arch Androl*. 1984;13:279–87

(39) Orié NN, Zidek W, Tepel M. Chemoattractant- and mitogen-induced generation of reactive oxygen species in human lymphocytes: the role of calcium. *Exp Physiol*. 1999 ;84:515–20

(40) 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.

(41) Tokmakov AA, Sato KI, Iwasaki T, Fukami Y. Src kinase induces calcium release in *Xenopus* egg extracts via PLC gamma and IP<sub>3</sub>-dependent mechanism. *Cell Calcium.* 2002;32:11–20.

(42) Jones OT. The regulation of superoxide production by the NADPH oxidase of neutrophils and other mammalian cells. *BioEssays.* 1994;16:919–923.

(43) Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan C, Segal A. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature(London).* 1991;353:668–670.

(44) Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, et al. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J.* 1989;263:539–545.

(45) Lo YY, Cruz TF. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 1995;270:11727–11730.

(46) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW.

Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1994;74:1141-1148.

(47) Krieger-Brauer HI, Kather H. Antagonistic effects of different members of the fibroblast and platelet-derived growth factor families on adipose conversion and NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in 3T3 L1-cells. *Biochem. J.* 1995;307:549-556.

(48) Meier B, Jesaitis AJ, Emmendorffer A, Roesler J, Quinn MT. The cytochrome b-558 molecules involved in the fibroblast and polymorphonuclear leucocyte superoxide-generating NADPH oxidase systems are structurally and genetically distinct. *Biochem. J.* 1993;289:481-486.

(49) Jones SA, Wood JD, Coffey MS, Jones OT. The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts. *FEBS Lett.* 1994;355:178-182.

(50) Bokoch GM. Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1994;6:212-21

- (51) Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 1998;273:6279–6302.
- (52) Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo Ms, Rhee SG. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 1997;272:30615–30618.
- (53) Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong WJ, Kim KH. Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases. *IUBMB Life.* 2001;52:35–41
- (54) 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.
- (55) Tokmakov AA, Sato KI, Iwasaki T, Fukami Y. Src kinase induces calcium release in *Xenopus* egg extracts via PLC gamma and IP<sub>3</sub>-dependent mechanism. *Cell Calcium.* 2002;32:11–20.
- (56) Kim HK, Kim JW, Ziberstein A, Margolis B, Kim JG,

Schlessinger J, Rhee SG. PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis required PLC $\gamma$ 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell*. 1991;65:435–441.

(57) Pandiella A, Magni M, Lovisolo D, Meldolesi J. The effect of epidermal growth factor on membrane potential. Rapid hyperpolarization followed by persistent fluctuations. *J. Biol. Chem*. 1989;264:12914–12921.

Abstract

The roles of reactive oxygen species on  
EGF-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in primary cultured rat  
cortical astrocytes

Byun Hae Mi

*Department of Medical Science*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Dong Min Shin)

Astrocytes, the major glial cell type in the mammalian brain, associated with synapses integrate neuronal inputs and release neurotransmitters that modulate synaptic sensitivity. Also, astrocytes participate in formation and rebuilding of synapses and play a prominent role in protection and repair of nervous tissue after damage. Epidermal growth factor (EGF), a single-chain polypeptide

growth factor, is important for many cellular functions including neuronal cells proliferation and nerve cell process formation using a variety of cell signaling pathway. The  $\text{Ca}^{2+}$  and reactive oxygen species (ROS), typical second messengers, are increased in several cell systems by EGF. Specially, ROS provokes the change of redox signaling, and  $\text{Ca}^{2+}$  signal also is known to be influenced by ROS. However, the possibility that EGF-induced ROS changes  $\text{Ca}^{2+}$  signal has not been reported in astrocytes. Here, we investigated that interrelationship between EGF-induced ROS and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signal changes in astrocytes. EGF increased transiently intracellular calcium concentration, and it tends to be dependent on phosphorylation of PLC  $\gamma$  1. Also, EGF induced intracellular ROS generation. The transient increase of concentration of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and ROS in response to EGF were enhanced in astrocytes overexpressed Rac1, NADPH oxidase regulator. In the case of inhibition Rac1 expression, EGF-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signal was decreased. In overexpressed peroxiredoxin II (Prx II), a specific scavenger of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), concentration of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in response to EGF was decreased. EGF-induced

intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signal was increased in suppressed PrxII. This results suggest that the EGF-induce  $\text{Ca}^{2+}$  signal is potentiated by EGF-endogenously generated ROS, and  $\text{H}_2\text{O}_2$  plays a major role in enhancement of EGF-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signal.

-----

Key Words : astrocytes,  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, ROS, EGF