

정상세포에서 hypoxia-inducible  
factor-1(HIF-1) 활성화에  
metabotropic glutamate  
receptor(mGluR)가 미치는 영향

연세대학교 대학원  
의과학과  
서 기 호

정상세포에서 hypoxia-inducible  
factor-1(HIF-1) 활성화에  
metabotropic glutamate  
receptor(mGluR)가 미치는 영향

지도교수 안 영 수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

서 기 호

# 서기호의 석사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2008년 12월

## 감사의 글

많이 부족한 저에게 연구자의 자세와 방법을 일깨워 주신 안영수 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 제가 잘못된 길을 갈 때 마다 따끔한 충고와 많은 가르침을 주신 김철훈 교수님, 바쁘신 와중에도 저의 논문을 위해 자문과 심사를 해주신 신경과 김경환 교수님께도 머리 숙여 감사 드립니다.

좋은 연구를 위해 많은 조언과 질타를 해주신 약리학 교실의 김경환 교수님, 김동구 교수님, 이민구 교수님, 박경수 교수님, 김주영 교수님, 정재용 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 언제나 학생의 편에서 많은 이야기를 해주신 포천중문의대 이진우 교수님께 진심으로 감사 드립니다.

저와 함께 즐거운 추억을 간직한 뉴로랩 식구들인 김영화 쌤, 정호 형, 재연이, 영신이, 언제나 활기찬 랩1 식구들, 성희 형, 현영이 형, 지연 누나, 정남 누나, 정수 누나, 광진오 쌤, 현우, 재석이, 우영이, 소원이, 따뜻하게 사람을 대하는 랩2 식구들, 임주원 선생님, 주쌤, 순옥, 열심히 일하는 랩5 식구들, 성복, 윤정, 아영쌤, 모두에게 감사 인사 드립니다.

교실에서 편하게 생활할 수 있게 도와주신 임종수

선생님, 김건태 선생님, 민선해 선생님 감사 드립니다. 지금은 졸업한 인숙 누나, 뽐, 쫘, 미경, 상배 형에게도 감사 드립니다.

저를 지금까지 믿어주신 아버지, 어머니, 형에게도 감사하다는 말을 전합니다. 그리고 옆에서 언제나 큰 힘이 되어준 소중한 사람에게도 감사 드립니다.

서기호 씬

# 목 차

|   |    |
|---|----|
| 국문요약  | 1  |
| I. 서론   | 3  |
| II. 재료 및 방법                                       | 6  |
| 1. 항체와 시약   | 6  |
| 2. 세포 배양  | 6  |
| 3. Immunoprecipitation and Western blotting       | 6  |
| 4. Real-time RT-PCR                               | 7  |
| 5. Enzyme-linked immunosorbent assay              | 9  |
| 6. 통계처리   | 9  |
| III. 결과   | 10 |
| 1. Glutamate에 의한 ERK의 활성화 유도                      | 10 |
| 2. Glutamate에 의한 HIF-1 $\alpha$ 의 mRNA 발현과 단백질 유도 | 13 |
| 3. Glutamate에 의한 HIF-1 $\alpha$ 전사인자 표적물질인 VEGF의  |    |

|   |    |
|---|----|
| mRNA 발현과 단백질 유도.....  | 15 |
| 4. Glutamate에 의해 유도된 HIF-1 $\alpha$ mRNA 발현에 대한<br>U0126의 영향..... | 17 |
| 5. Glutamate에 의해 유도된 VEGF mRNA 발현과 단백질에 대<br>한 U0126의 영향.....     | 19 |
| IV. 고찰.....   | 21 |
| V. 결론.....  | 24 |
| 참고문헌.....   | 26 |
| 영문요약.....   | 31 |

## 그림 차례

- 그림1. Glutamate에 의한 ERK 인산화 변동..... 11
- 그림2. Glutamate에 의한 HIF-1 $\alpha$ 의 mRNA 발현과 단백질 발현..... 14
- 그림3. Glutamate에 의한 VEGF의 mRNA 발현과 단백질 발현..... 16
- 그림4. U0126 전처리 후 glutamate에 의해 유도된 HIF-1 $\alpha$  mRNA 변동..... 18
- 그림5. U0126 전처리 후 glutamate에 의해 유도된 VEGF의 mRNA와 단백질 변동..... 20



## 국문요약

성상세포에서 hypoxia-inducible factor-1(HIF-1) 활성화에 metabotropic glutamate receptor(mGluR)가 미치는 영향

뇌졸중은 뇌혈관이 폐색되어 산소공급이 제대로 되지 않아서 생긴 신경성질환이다. 저 산소상태가 되면 뇌 신경세포들은 여러 가지 요인에 의해서 사멸하게 되는데, 과량으로 유리된 glutamate에 의한 사멸도 중요한 요인 중 하나이다. 이러한 뇌 신경세포사멸에 뇌 성상세포도 관여한다고 보고 되어졌다. 저 산소상태일 때 발현이 증가하는 전사인자인 hypoxia-inducible factor-1(HIF-1)은 세포 생존인자와 세포 성장인자 등 다양한 유전자를 유리시킨다. HIF-1은 HIF-1 $\alpha$ 와 HIF-1 $\beta$  소단위로 이루어져 있으며, 전사인자로서의 역할을 수행하기 위해서 두 소단위가 모두 필요하다. HIF-1의 활성화는 산소농도에 의해 조절되며, 또한 신호전달에 의해서도 조절된다고 보고되었다. 뇌 성상세포 표면에 발현하는 metabotropic glutamate receptor(mGluR)는 유전자 발현을 유도할 수 있게 신호전달을 활성화시킨다. 최근 연구에서는 mGluR의 활성화가 MAK kinase

kinase(MEK)/extracellular signal-regulated kinases(ERK)와 phosphatidylinositol-3 kinase(PI3K) 경로를 활성화시킨다고 보고되었다. 그러나 뇌 정상세포에서 glutamate에 의한 mGluR의 활성화가 HIF-1에 어떤 효과를 나타내는지는 아직까지 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 뇌 정상세포인 C6 세포에 glutamate를 처리하여 HIF-1에 미치는 영향과 그에 따른 기전을 연구하였다. 먼저 glutamate에 의해 ERK가 활성화 되는 것을 Western blotting을 이용하여 확인하였으며, 또한 HIF-1의 소단위인 HIF-1 $\alpha$  mRNA 양과 단백질 발현, HIF-1 표적물질인 VEGF의 mRNA와 단백질 발현이 glutamate에 의해 증가되는 것을 real-time RT-PCR과 Western blotting, Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용하여 확인하였다. MEK 억제제인 U0126을 이용하여 glutamate에 의해 유도된 HIF-1 $\alpha$ 와 VEGF의 mRNA와 단백질 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 결론적으로 mGluR의 활성화가 HIF-1에 의해 조절되는 신경보호 표적인자들을 유리시켜 뇌 신경세포들을 보호 할 것이라고 생각된다.

---

핵심 되는 말: 정상세포, C6, HIF-1, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, ERK, U0126

정상세포에서 hypoxia-inducible factor-1(HIF-1) 활성화에  
metabotropic glutamate receptor(mGluR)가 미치는 영향

<지도교수 안 영 수>

연세대학교 대학원 의과학과

서 기 호

## I. 서론

뇌졸중은 뇌경색이나 뇌출혈에 의해 갑자기 사망에 이르게 하거나 신체적, 정신적 장애를 일으키는 심각한 신경계 질환이다. 뇌혈관 폐색으로 인해 뇌 신경세포에 저 산소상태(hypoxia)가 되면 뇌 신경세포 말단부위에서 과량의 glutamate가 유리되어 뇌 신경세포 사멸을 야기한다<sup>1-4</sup>. 반면에 뇌 신경세포 주위에 분포해 있는 뇌 정상세포는 저 산소상태 일 때 발현되는 hypoxia-inducible factor-1(HIF-1)을 발현시켜 다양한 유전자를 유리하여 뇌 신경세포 사멸을 보호한다.

HIF-1은 정상상태보다 산소 농도가 낮거나 무산소상태일 때 발현

이 증가하는 전사인자이며 HIF-1 $\alpha$  단백질과 HIF-1 $\beta$  단백질로 구성되어 있다. HIF-1 $\beta$  단백질은 산소 농도에 영향을 받지 않고 일정하게 세포 내에 존재하는 단백질인 반면에 HIF-1 $\alpha$  단백질은 산소 농도에 의해 조절되어진다<sup>5, 6</sup>. HIF-1 $\alpha$  단백질은 정상상태(21%, normoxia)일 때에는 proline residue (Pro402, Pro564)가 hydroxylase에 의해 hydroxylation이 되고, hydroxylation이 된 HIF-1 $\alpha$  단백질에 Von Hippel-Lindau(VHL) 단백질이 결합하여 ubiquitin-proteasome 경로를 거쳐 파괴된다<sup>7, 8</sup>. 저 산소상태(1%, hypoxia)일 때는 proline residue가 hydroxylation이 되지 않아 VHL 단백질이 결합하지 못한다. 그러므로 ubiquitin-proteasome 경로를 피하게 되고 HIF-1 $\alpha$  단백질은 세포질에서 증가된다<sup>9</sup>. 최근에는 HIF-1 $\alpha$  단백질이 산소 농도에 의해서만 조절되는 것이 아니라 IL-6와 같은 cytokine과 insulin과 같은 성장인자의 자극으로 MAK kinase kinase(MEK)/ extracellular signal-regulated kinases(ERK) 경로와 phosphatidylinositol-3 kinase(PI3K) 경로가 활성화되어 조절된다고 보고되었다<sup>10-16</sup>. 또한 저 산소상태 일 때 PI3K/Akt와 MEK/ERK 경로가 활성화되고, 이는 세포질 안에 증가된 HIF-1 $\alpha$  단백질을 인산화 함으로써 HIF-1 $\alpha$  단백질의 안정성을 높게 된다<sup>17, 18</sup>. 안정화된 HIF-1 $\alpha$  단백질은 핵 속으로 빠르게 이동하여 HIF-1 $\beta$  단백질과 결합하고 전사인자로서의 역할을 수행한다. 결합한 HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$  단백질들은 300/CBP와 같은 coactivator 단백질

들과 결합하여 hypoxia responsive element(HRE)에 붙어 vascular endothelial growth factor(VEGF), erythropoietin(EPO)과 같은 뇌 신경세포를 보호하는 유전자들을 유리시킨다<sup>19-23</sup>.

저 산소 상태일 때 유리되는 glutamate는 신경세포나 정상세포의 세포 표면에 존재하는 glutamate 수용체에 결합하여 작용한다<sup>24</sup>. Glutamate 수용체 중 하나인 metabotropic glutamate receptor(mGluR)는 뇌 정상세포 표면에 발현하고 있으며, mGluR의 활성화는 유전자를 유리시키는 신호변환 과정을 유발시킨다. 즉, glutamate에 의해 mGluR가 활성화되고 활성화된 mGluR은  $Ca^{2+}$ 을 증가시킨다. 증가된  $Ca^{2+}$ 은 Ras/Raf-1를 통하여 MEK를 활성화 시키며 활성화된 MEK는 다시 ERK를 활성화 시킨다<sup>24, 25</sup>. 또한 mGluR의 C-terminal에 결합하는 Homer 단백을 통해서도 ERK를 활성화시킨다<sup>26</sup>. 활성화된 ERK는 세포증식(proliferation), 세포생존(cell survival), 세포분화(differentiation), 학습과 기억 등 다양한 기전에 관여한다<sup>27-29</sup>.

현재 glutamate가 뇌 정상세포 표면에 발현된 mGluR를 활성화시킬 경우 저 산소상태일 때 야기되는 전사인자인 HIF-1에 어떤 효과를 나타내는지는 아직까지 밝혀지지 않았다. Glutamate에 의해 활성화된 mGluR는 ERK를 활성화 시킨다고 보고 되어 있으며, 또한 HIF-1의 활성화는 ERK에 의해서 조절된다고 알려져 있기 때문에

glutamate에 의해 활성화된 mGluR가 ERK를 통해 HIF-1의 활성을 조절할 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서는 정상세포에서 glutamate에 의해 활성화된 mGluR가 HIF-1의 활성을 조절 하는지 확인하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 항체와 시약

HIF-1 $\alpha$  항체는 Novus Biologicals(Littleton, CO, USA)에서, phospho-ERK와 total ERK 항체는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였고, 2차 항체인 anti-mouse는 Zymed(San Francisco, CA, USA)에서, anti-rabbit은 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. MEK 억제제인 U0126와 glutamate는 Sigma-Aldrich(Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 2. 세포 배양

랫드의 정상세포 중에서 유래한 세포주인 C6 세포를 10% fetal bovine serum(Welgen, Worcester, MA, USA)과 항생제(100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin, Welgen)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(Welgen)에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Forma Scientific, Marietta, OH, USA)에서 배양하였다.

### 3. Immunoprecipitation and western blotting

세포 추출물을 얻기 위해 C6 세포에 다양한 처리를 한 후 차가운 phosphate-buffered saline(PBS)으로 두 번 세척하고 lysis buffer(50mM Tris pH8.0, 150mM NaCl, 1% Triton X-100)를 넣고 4°C에서 10분간 용해하였다. 용해한 세포를 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액을 채취하였다. Bicinchoninic acid(BCA, Thermo scientific, Rockford, IL, USA)법을 이용하여 bovine serum albumin을 기준으로 단백질 정량 후 동일한 단백을 취하였다. 동일한 단백질에 적정량의 HIF-1 $\alpha$  항체를 넣고 4°C에서 16시간 incubation한 후 protein G agarose bead(GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA)를 2시간 결합시킨 다음 lysis buffer를 이용해서 4번 세척하였다. Protein G agarose bead에 결합된 단백질에 2 $\times$ SDS sample buffer를 넣고 5분간 끓인 후 원심 분리하여 얻은 상층액을 SDS-PAGE를 하였다. 전기 영동 후 단백질은 Immobilon-P membrane으로 전이시켰다. 전이시킨 membrane은 비 특이적인 단백질의 결합을 배제시키기 위하여 5% 탈지분유가 포함된 TBS-T(Tris-buffered saline with 0.1% tween 20)에 넣고 상온에서



1시간 blocking한 후 HIF-1 $\alpha$ 와 phospho-ERK, total ERK 항체를 1:1000으로 희석해서 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시켰다. 항체와 반응시킨 membrane은 TBS-T로 10분씩 3번 세척한 후 1차 항체의 유래 종에 따라 발색반응을 일으키는 효소가 부착되어 있는 적절한 2차 항체로 상온에서 1시간 반응시키고 TBS-T로 10분씩 3번 세척하였다. Enhanced chemiluminescence kit(Thermo scientific)를 이용하여 발광 시키고 이를 x-ray film(Agfa-Gevaert N.V., ISO, Belgium)에 노출시켜 현상하였다.

#### 4. Real-time RT-PCR

C6 세포의 mRNA 발현은 real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction(real-time RT-PCR)을 이용하여 측정하였으며, 내부 대조물질로는  $\beta$ -actin을 사용하였다. C6 세포의 총 RNA는 RNeasy mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. 추출한 RNA 200ng와 oligo(dT)(Promega, Madison, WI, USA)0.5 $\mu$ g, nuclease-free water를 넣고 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 합성한 후 Improm-II<sup>TM</sup> 5 $\times$ reaction buffer(Promega), MgCl<sub>2</sub> 25mM, dNTP mix(10mM each dNTP), Improm-II<sup>TM</sup> reverse transcriptase(Promega)를 넣고 25 $^{\circ}$ C에서 5분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분,

70°C에서 15분 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 각 well에 동량의 cDNA를 넣고 HIF-1 $\alpha$ , VEGF,  $\beta$ -actin에 특이적인 primer와 SYBR<sup>R</sup> Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 섞은 후 PCR을 시행하였다. PCR은 ABI PRISM 7700(Applied Biosystems)을 사용하였으며 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 40 cycle로 HIF-1 $\alpha$ , VEGF,  $\beta$ -actin에 대한 mRNA를 증폭시켰다. HIF-1 $\alpha$ 의 primer 서열은 5' -CCG CAG TGT GGC TAC AAG AA-3' (forward primer), 5' -TGA GGA ATG GGT TCA CAA ATC A-3' (reverse primer)이며, VEGF의 primer 서열은 5' -CCG CAG TGT GGC TAC AAG AA-3' (forward primer), 5' -TGA GGA ATG GGT TCA CAA ATC A-3' (reverse primer)이며,  $\beta$ -actin의 primer 서열은 5' -GAC CCA GAT CAT GTT TGA GAC C-3' (forward primer), 5' -GGC CAT CTC TTG CTC GAA GTC-3' (reverse primer)이었다. Pcr해서 나온 결과는 C<sub>t</sub> method<sup>30</sup>에 따라 분석하였으며  $\beta$ -actin의 발현 양으로 sample을 표준화하였다.

## 5. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

C6 세포에 glutamate를 24시간 처리한 후 세포 배양액 1ml을 취하여 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심 분리해서 상층액을

채취하였다. 채취한 상층액은 VEGF ELISA kit(R&D System, Mineapolis, MN, USA)를 이용하여 배양액 내에 포함된 VEGF 양을 측정하였다.

## 6. 통계처리

통계 검정은 t-test를 사용하여 결정하였고, P값이 0.05이하일 때 의미 있는 차이로 규정하였다. 모든 값은 평균±표준 오차(mean±S.E)로 표현하였다.

### III. 결 과

#### 1. Glutamate에 의한 ERK의 활성화 유도

정상세포에서 glutamate에 의해 ERK가 활성화 유무를 알아보았다. C6 세포에 glutamate를 시간, 용량 별로 처리한 후 각 세포에서 단백질을 추출하여 phospho-ERK 항체와 total ERK 항체를 사용해서 Western blotting 법을 실시하였고, Western blotting하여 나온 결과는 Scion image software를 사용하여 밴드의 강도를 측정하였다. 실험결과 C6 세포에서 glutamate에 의해 ERK의 인산화가 10분일 때 증가되었으며 30분일 때 ERK의 인산화가 감소되었다. Glutamate에 의해서 total ERK의 양적 변화는 없었다(그림1 A, B). Glutamate의 용량이 100, 200, 500 $\mu$ M로 올라 갈수록 ERK의 인산화 되는 양이 증가되었다(그림1 C, D). 이 결과로 glutamate에 의해 ERK가 활성화 된다는 것을 확인할 수 있었다.

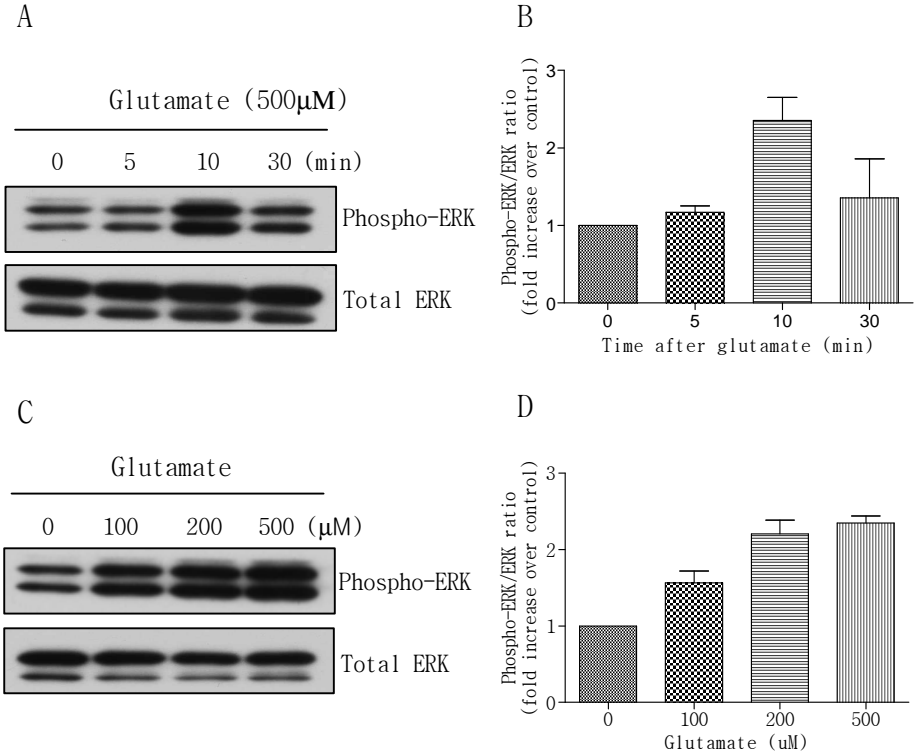


그림 1. Glutamate에 의한 ERK 인산화 변동.

(A) C6 세포에 glutamate(500 $\mu$ M)를 시간 별로 처리한 후 각 세포에서 단백을 추출하여 phospho-ERK 항체와 total ERK 항체를 사용해서 Western blotting 법을 실시하였다. (B) Scion image software를 사용하여 glutamate를 시간 별로 처리한 결과의 강도를 측정하였다(N=3). (C) C6 세포에 glutamate를 용량 별로 10분 간

처리한 후 각 세포에서 단백을 추출하여 phospho-ERK 항체와 total ERK 항체를 사용해서 Western blotting 법을 실시하였다. (D) Scion image software를 사용하여 glutamate를 용량 별로 처리한 결과의 강도를 측정하였다(N=3).

## 2. Glutamate에 의한 HIF-1 $\alpha$ 의 mRNA 발현과 단백질 유도

Glutamate에 의한 HIF-1의 소단위인 HIF-1 $\alpha$ 에 변화를 보았다. C6 세포에 glutamate(500 $\mu$ M)를 시간 별로 처리한 후 각 세포에서 mRNA와 단백을 추출하여 real-time RT-PCR법과 immunoprecipitation, Western blotting을 이용하여 발현 양을 측정하였다. 실험결과 glutamate에 의해서 HIF-1 $\alpha$  단백질 양이 6시간 때 증가한 것을 확인하였다(그림2 A). 이러한 HIF-1 $\alpha$  단백질 양이 증가한 것이 HIF-1 $\alpha$ 의 안정성에 의한 증가인지, 합성에 의한 증가인지를 알아보기 위해 real-time RT-PCR을 수행하였고 그 결과 시간 의존적으로 glutamate에 의해 HIF-1 $\alpha$  mRNA 양이 증가하는 것을 보았다(그림2 B). 이상의 결과들로 glutamate는 HIF-1 $\alpha$ 의 단백질 발현을 증가시킨다는 것을 확인하였으며, 이 증가된 HIF-1 $\alpha$  단백질은 단백질의 안정성 보다는 단백질의 합성에 의해 유도 되었다는 것을 알 수 있다.

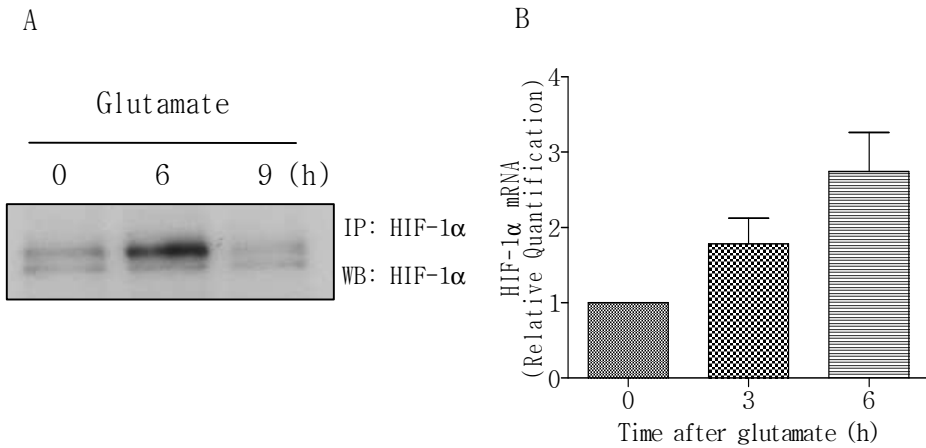


그림 2. Glutamate에 의한 HIF-1 $\alpha$ 의 mRNA 발현과 단백 발현.

(A) C6 세포에 glutamate(500 $\mu$ M)를 6, 9시간 처리한 후 세포에서 단백을 추출하여 HIF-1 $\alpha$  항체를 사용해서 immunoprecipitation 한 후 Western blotting법을 실시하였다. (B) C6 세포에 glutamate(500 $\mu$ M)를 3, 6시간 처리한 후 세포에서 mRNA를 추출하여 real-time RT-PCR을 수행하였다(N=4).



### 3. Glutamate에 의한 HIF-1 $\alpha$ 전사인자 표적물질인 VEGF의 mRNA 발현과 단백질 유도

C6 세포에 glutamate(500 $\mu$ M)를 12, 24시간 처리한 후 세포에서 mRNA를 추출하여 발현 양을 측정하고, 세포 배양액을 일부 취하여 원심 분리 후 상층액만을 취하여 VEGF 단백 발현을 ELISA법을 이용하여 측정하였다. 실험결과 glutamate를 12시간 처리한 군과 처리하지 않은 군과의 큰 차이가 없었으나 24시간 처리한 군에서는 VEGF의 mRNA양이 처리하지 않은 군보다 2배 증가하였다(그림3 A). VEGF의 배지 내 단백질 양(pg/ml)은 glutamate를 처리하지 않은 배지에  $304.8 \pm 19.2$ , glutamate를 처리한 배지에서  $482.2 \pm 36.7$ 이었다(그림3 B). 즉, glutamate에 의해 HIF-1의 표적인자인 VEGF의 mRNA와 단백질 발현이 유도된다는 것을 확인 할 수 있다.

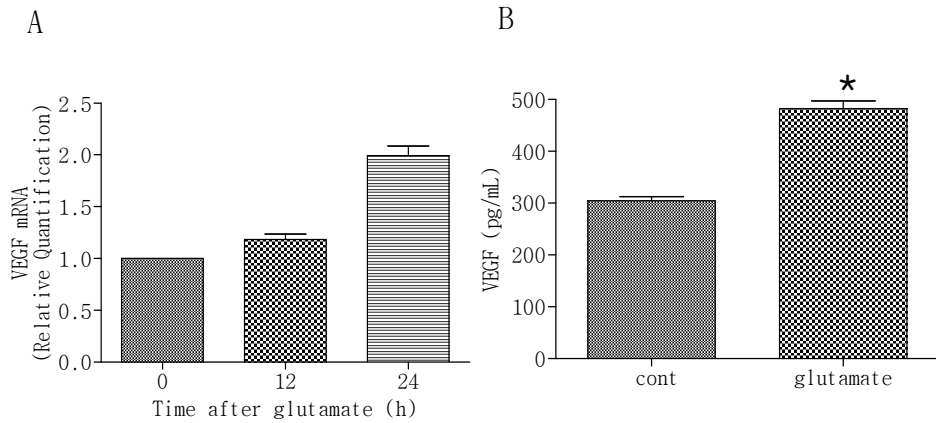


그림 3. Glutamate에 의한 VEGF의 mRNA 발현과 단백 발현.

(A) C6 세포에 glutamate(500 $\mu$ M)를 12, 24시간 처리한 후 세포에서 mRNA를 추출하여 real-time RT-PCR을 수행해서 VEGF mRNA 양을 보았다(N=3). (B) C6 세포에 glutamate(500 $\mu$ M)를 24시간 처리한 후 세포 배양액에서 VEGF 단백 양을 ELISA법을 이용해서 측정하였다(N=6, \*P<0.05 vs. control(cont)).

#### 4. Glutamate에 의해 유도된 HIF-1 $\alpha$ mRNA 발현에 대한 U0126의 영향

C6 세포에 glutamate(500 $\mu$ M)를 처리한 군과 U0126을 전처리 한 후 glutamate를 처리한 군, 아무것도 처리하지 않은 군의 세포에서 각각 mRNA를 분리하여 real-time RT-PCR을 이용하여 HIF-1 $\alpha$  mRNA 발현을 측정하였다. 실험결과 glutamate에 의해 증가된 HIF-1 $\alpha$  mRNA 발현이 MEK 억제제인 U0126에 의해 억제됨을 보았다. 따라서 glutamate에 의해 증가된 HIF-1 $\alpha$ 는 MEK/ERK 경로를 통하여 신호전달 된다는 것을 알 수 있었다.

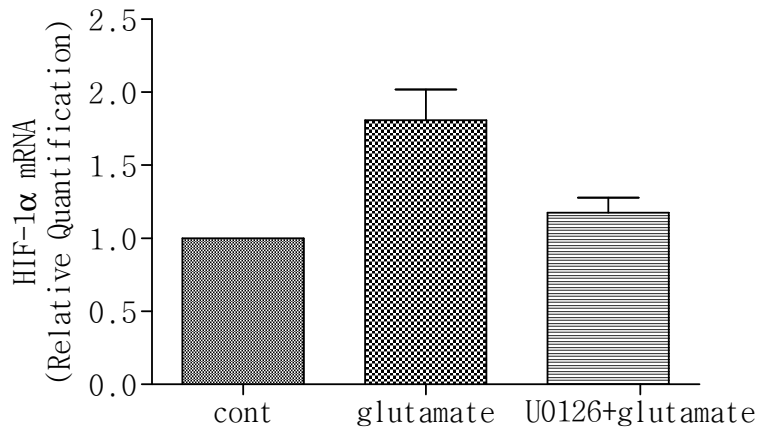


그림 4. U0126 전처리 후 glutamate에 의해 유도된 HIF-1 $\alpha$  mRNA 변동.

C6 세포에 6시간 동안 glutamate(500 $\mu$ M)를 처리한 세포와 glutamate 처리 1시간 전에 MEK 억제제인 U0126(10 $\mu$ M) 처리 후 glutamate를 처리한 세포, 아무것도 처리하지 않은 세포에서 각각 mRNA를 추출하였다. 추출한 mRNA는 real-time RT-PCR을 이용하여 HIF-1 $\alpha$  mRNA 발현을 측정하였다.

## 5. Glutamate에 의해 유도된 VEGF mRNA 발현과 단백질 유도에 대한 U0126의 영향

C6 세포에 24시간 동안 glutamate(500 $\mu$ M)를 처리한 군과 U0126을 전처리 한 후 glutamate를 처리 한 군의 세포에서 각각 mRNA를 분리하여 real-time RT-PCR을 이용하여 VEGF mRNA 발현을 측정하였으며, 세포 배양액을 분리하여 ELISA법을 이용하여 VEGF 단백질 발현을 측정하였다. 실험결과 glutamate에 의해 증가된 VEGF mRNA 발현이 U0126을 전처리 한 세포에서 억제됨을 보았으며(그림4 A), VEGF 단백질 발현 또한 아무것도 처리하지 않은 세포는  $308.3 \pm 74.1$ , glutamate만 처리한 세포는  $479.3 \pm 55.1$ , U0126을 전처리 후 glutamate를 처리한 세포는  $217.1 \pm 6.2$ 로서 U0126 전처리로 glutamate에 의한 VEGF 단백질의 증가가 봉쇄되었다(그림4 B). 이 결과들로 보아 glutamate에 의한 HIF-1의 표적인자인 VEGF의 mRNA와 단백질 발현의 신호 전달이 MEK/ERK 경로를 통하여 전해진다는 것을 알 수 있었다.

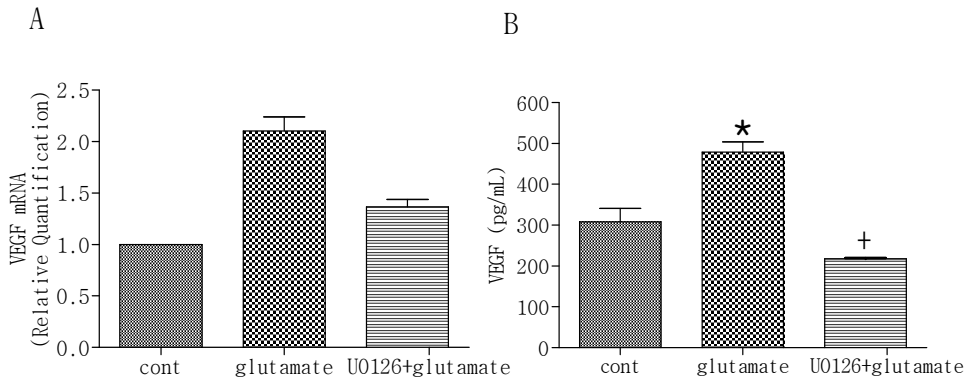


그림 5. U0126 전처리 후 glutamate에 의해 유도된 VEGF의 mRNA와 단백질 변동.

(A) C6 세포에 24시간 동안 glutamate(500 $\mu$ M)를 처리한 세포와 glutamate 처리 1시간 전에 MEK 억제제인 U0126(10 $\mu$ M) 처리 후 glutamate를 처리한 세포에서 각각 mRNA를 추출하였다. 추출한 mRNA는 real-time RT-PCR을 이용하여 VEGF mRNA 발현을 측정하였다.

(B) C6 세포에 24시간 동안 glutamate(500 $\mu$ M)를 처리한 세포와 glutamate 처리 1시간 전에 MEK 억제제인 U0126(10 $\mu$ M) 처리 후 glutamate를 처리한 세포에서 각각 배양액을 채취하여 VEGF 단백질 양을 ELISA법을 이용해서 측정하였다(N=5, \*P<0.05 vs. control(cont), †P<0.05 vs. glutamate).

## IV. 고찰

최근 뇌졸중을 비롯한 다양한 퇴행성 질환에 의한 뇌 신경세포 사멸에서 뇌 성상세포가 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다<sup>4</sup>. 특히 뇌 성상세포는 신경세포의 생성, 유지, 발달, 분화의 중요한 역할을 수행하고 있으며, 세포 표면에 발현하고 있는 metabotropic glutamate receptor(mGluR) 또한 세포 생존에 관련된 유전자들을 유도하기 위한 신호전달을 준다<sup>31</sup>. 본 실험은 mGluR를 통한 신호전달이 뇌졸중과 같은 저 산소상태 일 때 발현되는 hypoxia inducible factor-1(HIF-1)에 어떤 영향을 미치는지 밝히며 이때 관여되는 기전을 밝히고자 하였다. HIF-1은 저 산소 상태일 때 발현되는 인자로서 HIF-1 $\alpha$ 와 HIF-1 $\beta$ 로 구성되어 있으며, 다양한 신경보호 물질들을 유리시킨다. 뿐만 아니라 MEK/ERK 경로를 통한 신호전달에 의해서도 HIF-1이 활성화 된다고 보고되었다<sup>12, 13, 15, 18</sup>. 최근에는 mGluR를 통하여 ERK단백이 활성화 된다는 논문도 보고되었다<sup>24, 32</sup>. mGluR는 신호전달을 하기 위해서 다양한 G 단백질과 결합을 하게 되며 이러한 결합으로 downstream 신호를 전달 할 수 있다. 본 연구에서도 glutamate에 처리하여 mGluR를 통해서 신호전달이 되는지를 확인하기 위해 ERK의 활성화를 보았으며, glutamate의 용량에 따른 ERK의 활성화 정도도 보았다. 실험결과 glutamate에 의

해 ERK단백이 활성화 되는 것을 확인하였으며, glutamate 용량이 증가 할수록 ERK단백 활성화가 증가하는 것을 확인하였다. 다음으로 한 실험은 HIF-1의 소단위인 HIF-1 $\alpha$ 가 glutamate에 의해 조절되는지를 보았고 MEK/ERK 경로를 통하여 조절되는지를 보았다. 몇몇 논문에서는 HIF-1의 활성화가 cytokine이나 insulin에 의한 HIF-1 $\alpha$  단백질 조절에 의해 조절된다고 보고하였다<sup>13, 16</sup>. 이때에도 HIF-1 활성화는 MEK/ERK 경로를 통하여 조절 된다고 하였다<sup>14</sup>. 본 연구에서는 glutamate를 처리하여 HIF-1 $\alpha$ 에 영향이 있는지를 보았으며 MEK/ERK 경로를 경유하는지도 보았다. 실험결과 glutamate를 처리한 군과 처리하지 않은 군을 비교해 보았을 때, 처리한 군이 처리하지 않은 군보다 HIF-1 $\alpha$ 의 mRNA와 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, MEK inhibitor인 U0126을 전처리 한 후 glutamate를 처리한 군과 전 처리 하지 않고 glutamate를 처리한 군을 비교해 보았을 때, 전 처리 한 군에서 glutamate에 의해 활성화 된 ERK 양이 감소되는 것을 확인하였다. 이 같은 결과로 glutamate는 HIF-1 $\alpha$ 의 단백질 합성을 증가시키며, MEK/ERK 경로를 경유하는 것을 확인하였다.

HIF-1을 경유로 증가하는 유전자의 발현은 정상세포 자신의 생존에도 중요하지만 신경세포 사멸에 중요한 역할을 할 것으로 생각되어 유전자의 전사 활성을 살펴보았다. Vascular endothelial growth factor(VEGF)는 혈관생성인자로서 혈관생성을 위해 혈관내피세포에 주로 작용한다고 알려져 있다<sup>33</sup>. 그러나 최근에는 VEGF가



혈관생성인자로서의 역할 이외에도 VEGFR-2를 경유로 세포 생존에 중요한 기전으로 알려진 PI3K/AKT 경로를 활성화하는 것으로 알려져 신경세포나 성상세포의 생존에 중요한 역할을 할 것으로 보고되고 있다<sup>31, 34</sup>. 본 연구에서 VEGF의 mRNA와 단백질 발현이 glutamate에 의해 조절되는지를 확인하였으며 이러한 변화가 MEK/ERK 경로를 경유하는지도 확인하였다. 먼저 glutamate를 처리 한 군과 처리하지 않은 군을 ELISA법과 real-time RT-PCR법을 이용하여 비교해 볼 때, glutamate를 처리한 군이 처리하지 않은 군보다 VEGF의 mRNA와 단백질 발현량이 증가하였고, U0126을 전처리 한 후 glutamate를 처리한 군과 전처리하지 않고 glutamate를 처리한 군을 비교해 보았을 때, 전처리 한 군에서 glutamate에 의해 발현이 증가된 VEGF의 mRNA와 단백질 발현량이 감소됨을 하였다. 이 같은 결과들로 보아 glutamate에 의해 HIF-1의 표적인자인 VEGF가 조절되어지며, 이때 경유하는 경로가 MEK/ERK 라고 본다. 따라서 본 실험을 통하여 mGluR의 신호전달이 MEK/ERK 경로를 경유하여 HIF-1 $\alpha$ 의 단백질 발현을 조절하고, HIF-1의 표적인자인 VEGF의 발현 또한 조절하는 것으로 생각된다.

이와 같은 실험결과들로 mGluR의 활성화에 의한 신호전달은 HIF-1을 경유하는 신경세포보호 유전자 발현을 유리시켜 신경세포사멸을 보호 할 것이라고 생각된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 정상세포에서 glutamate가 mGluRs를 통해서 HIF-1의 활성화에 미치는 영향과 그에 따른 기전 연구를 규명하고자 하였다.

실험결과는 다음과 같다.

1. Glutamate 처리로 C6 세포에서 ERK가 활성화 되었다.
2. Glutamate 처리로 C6 세포에서 HIF-1 $\alpha$  mRNA 발현과 단백질 발현이 증가하였다.
3. Glutamate 처리로 C6 세포에서 VEGF mRNA 발현과 단백질 발현이 증가하였다.
4. C6 세포에서 MEK 억제제인 U0126가 glutamate에 의해 야기된 HIF-1 $\alpha$  mRNA 발현을 억제 시켰다.

5. C6 세포에서 MEK 억제제인 U0126가 glutamate에 의해 야기된 VEGF의 mRNA와 단백 발현을 억제 시켰다.

이상의 결과로 보아 glutamate는 mGluR를 통하여 MEK/ERK 경로를 경유해서 HIF-1 $\alpha$  발현에 영향을 주고 HIF-1의 표적인자에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 결론적으로 저 산소상태 일 때 뇌 성상세포는 mGluR를 통한 신호전달로 HIF-1이 조절하는 신경보호 유전자를 유리시켜 뇌 세포를 보호 할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Drejer J, Benveniste H, Diemer NH, Schousboe A. Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J Neurochem* 1985; 45: 145-51.
2. Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. *Ann Neurol* 1986; 19: 105-11.
3. Juurlink BH, Sweeney MI. Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 121-8.
4. Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M. Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res* 2003; 28: 293-305.
5. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* 2007; 2007: cm8.
6. Furlan, D., Sahnane, N., Carnevali, I., Cerutti, R., Bertoni, F., Kwee, I., et al. Up-regulation of the hypoxia-inducible factor-1 transcriptional pathway in colorectal carcinomas. *Hum Pathol* 2008.
7. Hirota K, Semenza GL. Regulation of hypoxia-inducible

- factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 610-6.
8. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270: 1230-7.
9. Chavez JC, Agani F, Pichiule P, LaManna JC. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the brain of rats during chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 89: 1937-42.
10. Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate p65PAK, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and stress-activated protein kinase (SAPK) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 840-4.
11. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 38205-11.
12. Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., et al. Modulation of hypoxia-inducible

- factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; 60: 1541-5.
13. Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 2002; 512: 157-62.
14. Qian, D., Lin, H.Y., Wang, H.M., Zhang, X., Liu, D.L., Li, Q.L., et al. Normoxic induction of the hypoxic-inducible factor-1 alpha by interleukin-1 beta involves the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells. *Biol Reprod* 2004; 70: 1822-7.
15. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 1999; 274: 32631-7.
16. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL.

- Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999; 59: 3915-8.
17. Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., et al. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett* 2000; 468: 53-8.
18. Arsham AM, Plas DR, Thompson CB, Simon MC. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 alpha nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription. *J Biol Chem* 2002; 277: 15162-70.
19. Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-13.
20. Hasselblatt M, Paulus W. Astrocytic gene expression profiling upon hypoxia. *Neuroreport* 2006; 17: 51-4.
21. Wang YQ, Sun FY. [Neuroprotective mechanisms of vascular endothelial growth factor]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 2007; 38: 202-7.

22. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 59: 15-26.
23. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995; 270: 13333-40.
24. Wang JQ, Fibuch EE, Mao L. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem* 2007; 100: 1-11.
25. Mao, L., Yang, L., Arora, A., Choe, E.S., Zhang, G., Liu, Z., et al. Role of protein phosphatase 2A in mGluR5-regulated MEK/ERK phosphorylation in neurons. *J Biol Chem* 2005; 280: 12602-10.
26. Mao L, Yang L, Tang Q, Samdani S, Zhang G, Wang JQ. The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *J Neurosci* 2005; 25: 2741-52.
27. Yan CY, Greene LA. Prevention of PC12 cell death by N-acetylcysteine requires activation of the Ras pathway. *J Neurosci* 1998; 18: 4042-9.



28. Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 1994; 77: 841-52.
29. Impey S, Obrietan K, Storm DR. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 1999; 23: 11-4.
30. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 2000; 285: 194-204.
31. Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10242-7.
32. Berkeley JL, Levey AI. Cell-specific extracellular signal-regulated kinase activation by multiple G protein-coupled receptor families in hippocampus. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 128-35.
33. Rosenstein JM, Mani N, Silverman WF, Krum JM. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor

administration in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A  
1998; 95: 7086-91.

34. Jin K, Mao XO, Batteur SP, McEachron E, Leahy A, Greenberg  
DA. Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by  
vascular endothelial growth factor. Neuroscience 2001; 108:  
351-8.

## **Abstract**

Effect of metabotropic glutamate receptors(mGluRs) on HIF-1 activity  
in astrocytes

Gi Ho Seo

*Department of Medical Science  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Young Soo Ahn)

Hypoxia-inducible factor 1(HIF-1) is a heterodimeric transcription factor, which composed of a HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$  subunit. HIF-1 activation increases the expression of various genes including the vascular endothelial growth factor(VEGF), which is known to be a neuroprotective factor. The metabotropic glutamate receptors(mGluRs) divide into three group which have different functions. Activation of mGluRs lead to a variety of secondary messenger pathways including mitogen-activated protein kinase(MAPK) extracellular signal-regulated kinases(ERK). The effect of mGluRs on HIF-1 activity has not been uncovered yet. In this study, the effect and mechanism of mGluRs on the HIF-1 activity was investigated in astrocyte cell line, C6. It was noted that glutamate activated ERK and increased the gene expression

level of HIF-1 $\alpha$ . After treatment of astrocytes with glutamate, the gene expression level of VEGF was measured using real-time RT-PCR and Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). In astrocytes treated with glutamate, MEK inhibitor, U0126 inhibited increase in mRNA level of HIF-1 $\alpha$  and the gene expression level of VEGF induced by glutamate. These findings suggest that glutamate released in hypoxic condition may trigger the HIF-1-related neuroprotection through mGluRs in the astrocytes.

---

Key Words : astrocyte, C6, HIF-1, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, ERK, U0126