

3-Hydroxykynurenine (3HK)에 의한 SKN-SH 세포사멸 과정에서 heat shock protein 90에 의한 활성기 산소의 억제 효과

김대성, 이명우, 노유현, 이도연, 이현정, 박재형, 한정우,
이광길, 여주홍, 이원복, 김성수
중앙대학교 의과대학 해부학 교실

간추림 : 간질, 염증성 바이러스 감염성 치매 그리고 파킨슨씨병과 같은 몇몇 신경퇴행성 질환에서도 발견되는 3-hydroxykynurenine (3HK)의 신경세포 독성과, 이를 다양한 세포들에서 세포 파괴 상황에서 보호 작용을 하는 것으로 알려져 있는 열충격 단백질(heat shock protein; HSP)이 보호 작용을 나타낸다고 알려져 있으나, 아직까지 3HK에 의한 신경세포 사멸에서 활성기 산소 발생의 역할과 이에 대한 HSP 90의 보호 작용 기작은 아직까지 명확히 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 3HK에 의해 활성기 산소가 축적되고 caspase가 활성화됨으로써 세포 자멸사가 발생한다는 결과를 제시하였다. 효과적인 항산화 물질로 알려져 있는 N-acetylcysteine (NAC)를 전처리하였을 때 활성기 산소 축적과 caspase 활성을 억제함으로써 SKN-SH 세포에서 3HK에 의한 세포 자멸사를 효과적으로 억제하였다. SKN-SH 신경세포에서 3HK에 의한 세포 독성이 열충격 단백질에 의해서 감소되었는데, HSP는 3HK에 의한 활성기 산소 축적과 세포 자멸사를 효과적으로 억제하였다. HSP90 anti-sense oligonucleotide를 전처리했을 때 HSP의 세포 보호 효과가 사라졌으나, 다른 종류의 HSP anti-sense oligonucleotide를 전처리하였을 경우에는 세포 보호 효과가 사라지지 않았다. 이러한 결과는 HSP90이 활성기 산소 축적과 caspase 활성화를 감소시킴으로써 3HK에 의한 세포 독성으로부터 SKN-SH 세포를 보호함을 제시한다.

찾아보기 낱말 : 3-hydroxykynurenine, 열충격 단백질 90, 활성기 산소, caspase, 세포자멸사

서론

3-Hydroxykynurenine (3HK)는 tryptophan의 주요 대사과정인 kynurenine 과정의 대사 중재자로 선행된 연구들에서 헌팅턴씨병(Huntington's disease) 뇌의 줄무늬체 부위와 피질에서 정상보다 2-3배 높게 발현 되는 것이 보고되었다(Reynolds와 Pearson

1989, Pearson과 Reynolds 1992). 뇌에서 3HK의 증가는 간질, 염증성 바이러스 감염성 치매 그리고 파킨슨씨병과 같은 몇몇 신경퇴행성 질환에서도 발견되었다(Ogawa 등 1992, Sardar 등 1995, Stone 2001). 위의 모든 증후군들은 몇몇 신경성 기능 이상의 특징을 가지고 있는 것들이다.

활성기 산소(Reactive Oxygen Species; ROS)는 다양한 감염성 질환과 같은 많은 발병기작에서 그 연관성이 알려지고 있는 superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), 그리고 hydroxyl radical (OH)을 포함하는 것이다 (Halliwell과 Gutteridge 1984, 1990, Devary 등 1992, Bender 등 1997). 비록

*이 논문은 2004학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임
교신저자: 김성수(중앙대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: sungsu@cau.ac.kr

많은 세포들에서 활성기 산소를 조절하기 위해 다양한 효소성 또는 비효소성 체계가 발생되지만, 일부 활성기 산소는 세포 보호 체계를 제거하고 단백질, 지질, 핵을 손상 시킨다 (Stadtman 1992, Sandstrom 등 1994). 도파민과 자외선 자극에 의한 세포 독성등과 같은 다양한 세포 독성과정에서 활성기 산소발생이 보고 되었다 (Pourzand와 Tyrrell 1999, Junn과 Mouradian 2001).

적당한 열 충격을 지속적으로 가하면 열충격 단백질 (heat shock proteins)이라는 복합 유전자족의 생성이 증가된다. 열 충격 단백질 90 (heat shock protein 90, HSP90)은 이런 단백질의 종류중 하나로, 다양한 세포 단백질 성숙분열 과정에서 세포내 이동과 그들의 활성화 조절을 통해 중요한 역할을 하고 있다 (Sato 등 2000, Weikl 등 2000). 또한 HSP90은 대부분의 세포에서 많이 발현되며 (Jakob과 Buchner 1994) 열자극과 그이외의 다양한 세포자극에 의해서 많이 증가 된다 (Luna 등 2000, Railson 등 2000). 이것은 HSP90이 신경세포를 포함한 다양한 세포들에서 세포 파괴 상황에서 보호 작용을 한다는 것을 제시한다 (Mailhos 등 1994, Polla와 Cossarizza 1996). 우리의 선행된 연구들에서도 SKN-SH 세포에서 3HK에 의한 세포사멸사가 초기 HSP90의 발현에 의해서 억제되는 것을 보고하였다 (Lee 등 2001). 또 다른 연구들에서도 HSP (HSP25 또는 HSP70)가 L929세포에서 TNF- α 에 의해 유발된 산화적 손상의 감소를 유발한다는 것을 밝혔으며 (Park 등 1998), Jurkat T 세포에서도 활성기 산소에 의한 세포사멸을 HSP가 억제한다고 보고 되었다 (Creagh와 Cotter 1999). 그러나 SKN-SH와 같은 신경 세포에서 3HK에 의한 활성기 산소 발생의 역할과 이에 대한 HSP 90의 보호 작용 기작은 아직까지 명확히 밝혀지지 않았다.

따라서 본 실험에서는 사람 신경모세포종 SKN-SH 세포에서 3-HK에 의한 세포독성 신호전달 과정에서 활성기 산소의 역할을 규명하기 위해서 3HK에 의한 세포사멸에서 활성기 산소와 HSP90의 생성을 측정하였다. 그 결과 HSP90이 활성기 산소 생성과 caspase의 활성을 억제함으로써 SKN-SH의 세포사멸을 보호함을 밝혔다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 열충격 (Heat shock)

사람 신경모세포종인 SKN-SH은 가열로 불활성화 시킨 fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies) 이 10% 첨가된 RPMI 1640 medium (Life Technologies, Burlington, ON, USA)에서 37°C, 습도 95%, CO₂ 5%를 유지한 상태로 배양하였다. 3HK (Sigma, St Louis, MO, USA)를 처리하기 2시간 전에 1% FBS가 포함된 배양액으로 갈아주고, 세포에 열충격을 가하기 위해서 세포를 42°C에서 30분동안 노출시킨 후 37°C로 옮겼다. 5시간 후 세포에 3HK를 처리하여 실험을 진행하였다.

2. 세포 생존율 (MTT Assay)

세포는 phenol red가 포함되어 있지 않은 10% FBS/RPMI 1640 100 μ L에 well당 5×10^4 개로 96-well plate (corning, NY, USA)에 24시간동안 배양하였다. 세포에 물질을 처리하기 2시간 전에 phenol red가 포함되어 있지 않은 1% FBS/RPMI 1640 배양액 90 μ L를 교체하였다. 대조군인 10% Triton X와 항산화 물질인 N-acetylcysteine (NAC) (Sigma, St Louis, MO, USA)를 처리할 때에는 250 μ M 3HK를 처리하기 2시간 전에 전처리하였다. 3HK를 처리한 후에 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma, St Louis, MO, USA) 10X solution (10 mg/ml) 11 μ L를 처리하였다. 마지막으로 모든 배양액과 MTT 용액을 제거하고 100 μ L 100% DMSO를 넣은 후 20분동안 흔들어서 세포와 결정화된 염료를 완전히 용해시켰다. ELISA 측정기를 통해 570 nm의 파장에서 측정하였고, 결과는 전체 100% 중 대조군에 대한 formazan 생성 비율로 나타났다.

3. Western Blotting

Western blot을 위해서 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)으로 씻은 후 세포를 모아 저온상태를

유지한 RIPA 완충액(1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM Na_3VO_4 , 40 mM NaF, 5 mM EGTA, 0.2% SDS, 0.2 mM PMSF, 100 μM Leupepsin)을 넣어 용해시켰다. 용해된 세포를 $15,800 \times \text{g}$ 로 4°C에서 10분동안 원심 분리한 후 상층액만 모아 protein assay kit (Bio-Rad, CA, USA)를 사용하여 정량화하였다. 전기영동을 위하여 단백질을 sample buffer (5% mercaptoethanol, 15% glycerol, 3% SDS, 0.1 M Tris, pH 6.8)에 용해시키고 3분동안 끓여주었다. 그 후에 10% SDS gel에서 분리하였다. 이렇게 분리된 단백질은 semidry trans-blot system (Schleicher & Schuell, Germany)를 사용하여 polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes로 옮겼다. 이렇게 옮겨진 단백질을 5% nonfat dry milk가 첨가된 Tris-buffered saline (TBS) (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl)으로 2시간동안 실온에서 blocking하였다. 그리고 TBS로 3회 수세 후 3% nonfat dry milk가 첨가된 TBST (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 anti-HSP90 antibody (1 : 1000 dilution) (Santa Cruz Biotech)나 anti- β -actin antibody (1 : 1000 dilution) (Santa Cruz Biotech)를 첨가하여 실온에서 12시간 정도 반응시켰다. 다음날 이것을 TBST에서 3회 수세한 후 다시 3% nonfat dry milk에 horseradish peroxidase-conjugated 이차 항체 (1 : 2000 dilution) (Santa Cruz Bio-tech)를 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 다시 TBST로 3회 수세 후 단백질은 ECL 방법 (Amersham Pharmacia Biotech, UK)을 이용해서 가시화하였다. 이렇게 얻어진 결과로 단백질을 densitometry (Vilber Lourmat, France)를 이용해서 HSP90 또는 β -actin의 띠를 분석해서 얻었다.

4. 활성기 산소 측정

3HK에 의해 생성된 Hydrogen peroxide는 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (Sigma)를 처리하여 측정하였다. 세포에 15분동안 $10 \mu\text{M}$ DCF-DA를 처리한 후 슬라이드 유리에 올려놓고 봉입한다. 봉입된 세포를 UV supply system (Olympus IX 70, Tokyo, Japan)을 갖춘 형광 광학 현미경으로 관찰하

였다. 세포 내 활성기 산소를 정량화하기 위해서 세포를 $10 \mu\text{M}$ DCF-DA를 처리한 후 37°C에서 15분 동안 배양하였다. 그 다음 flow cytometer (GENios, Tecan, NC, USA)를 이용해 485 nm 자극파장, 530 nm 방사파장에서 DCF 형광 세기를 측정하였다. DCF-DA가 없는 대조군 세포의 배경에서 나오는 형광 세기를 모든 표본에서 감산하였다. 평균 DCF 형광 지수는 3HK만 처리한 세포에서 측정한 각 표본에서 나온 평균 DCF 형광을 나누어 계산하였다.

5. Caspase Substrate Cleavage Assay

세포를 $150 \times \text{g}$ 로 10분동안 원심 분리하여 모은 후 50 mM Tris, pH 7.5, 0.03% NP-40, 1 mM DTT를 포함한 lysis buffer $100 \mu\text{L}$ 을 더하여 섞고, 생성된 용해질을 20분동안 얼음 속에서 흔들면서 배양한 후에 $15,800 \times \text{g}$ 로 5분동안 원심 분리하였다. 상층액을 모은 후 protein assay kit (Bio-Rad, CA, USA)를 이용해서 단백질을 정량화하였다. Caspase cleavage를 평가하기 위해서 세포 추출물 $20 \mu\text{g}$ 에 pan-caspase의 기질인 0.25 mM Z-Val-Ala-Asp (OMe)-CH2F (Enzyme System Products, Livermore, CA, USA)를 넣어 총 $100 \mu\text{L}$ 의 양을 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 405 nm 파장에서 흡광도를 ELISA 측정기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 측정하였다. 효소 활성화 지수는 상대적인 값을 임의의 단위로 나타냈다. 평균 caspase 활성화 지수는 측정한 각 표본의 평균 caspase 활성화를 3HK만 처리한 경우의 caspase활성화로 나누어서 나타내었다.

6. HSP90 Anti-sense Oligonucleotide Test

세포 생존율, 활성기 산소 형성, caspase 활성화에서 HSP90의 효과를 조사하기 위해서 HSP90 anti-sense oligonucleotide로 HSP90의 발현을 억제하였다. $10 \mu\text{M}$ HSP90 anti-sense oligonucleotide를 3HK 처리 전 6시간 동안 SKN-SH 세포에 처리하였다. Anti-sense oligonucleotide의 염기서열은 5'-GGACGCT-GAAGCAACTG-3'이다.

7. 통계분석

데이터는 평균과 표준편차로 나타내었다. 그룹간

의 상관관계와 차이를 알아보기 위해서 *t* test를 이용하였다. $p < 0.05$ 이상일 경우 통계적으로 유의한 것으로 검정하였다

결 과

1. 3-HK에 의한 신경세포 자멸사 과정에서 활성기 산소의 축적

3HK가 SKN-SH 세포 사멸을 유발하는지 조사하기 위해서 MTT assay를 통해 3HK를 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 3HK를 처리한 후 36시간에 관찰한 결과 농도 의존적으로 세포사멸이 유발되었다(Fig. 1). 3HK가 활성기 산소를 유발시키는지 조사하기 위해서 DCF-DA 형광을 이용하여 3HK를 처리한 세포에서 생성되는 활성기 산소를 측정하였

다. 활성기 산소 축적 정도를 나타내는 형광 농도가 1시간동안 3HK를 처리한 세포에서 처리하지 않은 세포보다 약 10배 정도 높게 측정되었다(Figs. 2A, 2B, 2F). 또한 항산화 물질인 NAC를 전처리한 경우에 3HK에 의한 세포 자멸사와 활성기 산소 축적이 효과적으로 억제되었다(Figs. 1B, 2B, 2C, 2F). 따라서 이러한 결과는 SKN-SH 세포에서 3HK에 의한 세포 자멸사가 활성기 산소와 관련이 있음을 보여준다.

2. 3-hydroxykynurenine에 의해 생성된 활성기 산소에 대한 HSP90의 효과

250 μ M 3HK에 의해 유발되는 신경 세포 사멸이 세포에 적절한 열충격을 가함으로써 효과적으로 억제되었다(Fig. 1B). 열충격을 가한 후 3HK를 처리한 세포의 생존율이 열충격을 가하지 않은 세포에 3HK

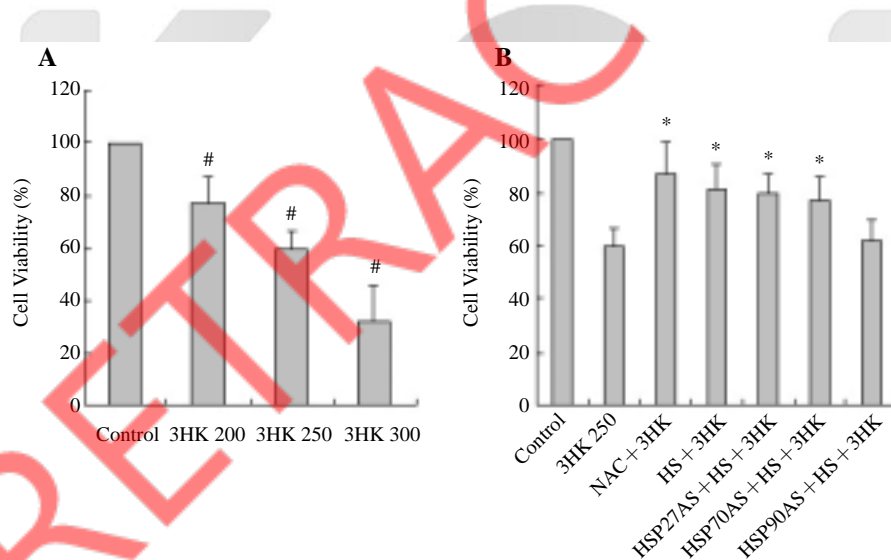


Fig. 1. Effect of NAC or mild heat shock on 3HK-induced neuronal apoptosis. A, Cells were pre-incubated with 1% FBS/RPMI 1640 for 2 h and then treated with 3HK for 36 h. Cell viability was determined at indicated various doses of 3HK by MTT assay. B, Cells were unpretreated (3-Hydroxykynurenine; 3HK) or pretreated with 1 mM of N-Acetylcystein (NAC) for 2 h and then treated with 250 μ M of 3HK for 36 h (NAC + 3HK). Heat-shocked (heat shock for 30 min at 42°C and recovery for 5 h at 37°C) cells were treated with 250 μ M of 3HK for 36 h (Heat-shock (HS) + 3HK). Cells were pretreated with 10 mM of HSP27 (HSP27 Anti-sense (AS) + HS + 3HK), HSP70 (HSP70 AS + HS + 3HK), or HSP90 (HSP90 AS + HS + 3HK) anti-sense oligonucleotides for 6 h before exposure to heat shock. After recovery, the cells were treated with 250 μ M of 3HK for 36 h. Values, presented as percentage of control cells incubated with vehicle, are mean \pm SEM of five separate experiments. The difference from the cells treated with vehicle (#) or 3HK (*) alone was statistically significant ($p < 0.05$).

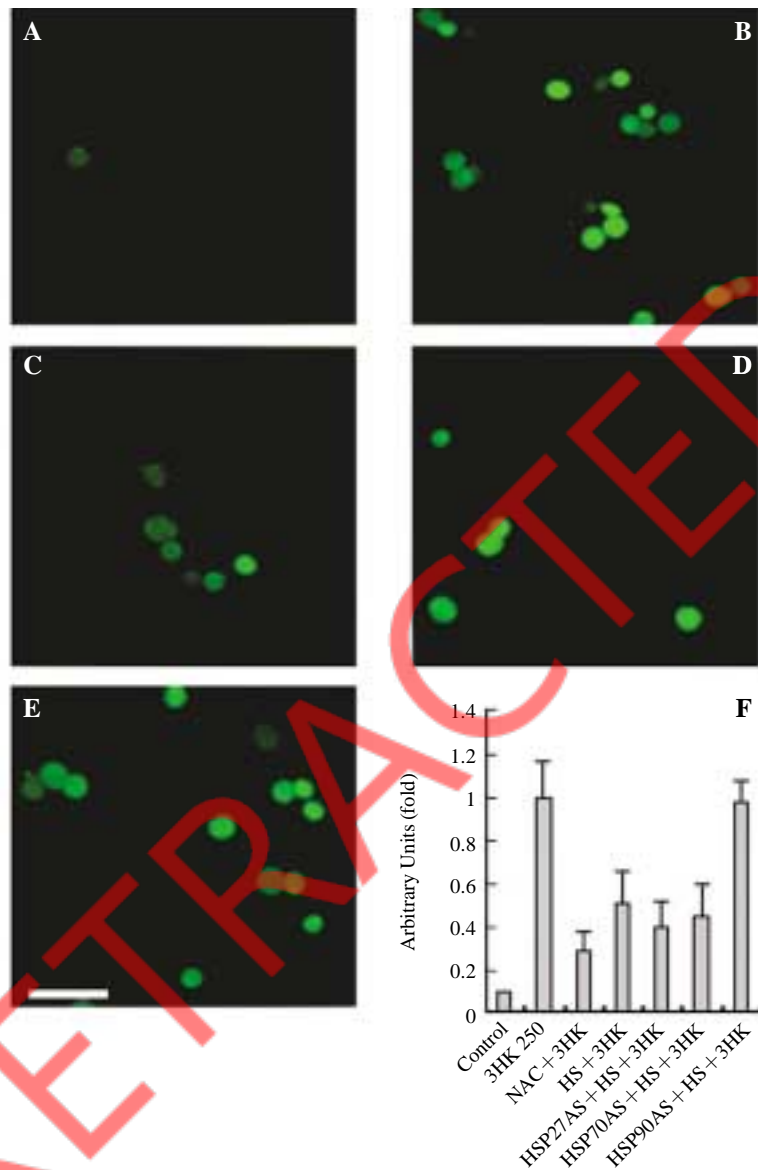


Fig. 2. Effect of NAC or mild heat shock on ROS production induced by 3HK. Cells were untreated (A) or treated (B) with 250 μ M of 3-Hydroxykynurenine (3HK) for 1 h. Pretreatment of cells with 1 mM of N-Acetylcystein (NAC) (C) was treated with 250 μ M of 3HK for 1 h. Heat-shocked (heat shock for 30 min at 42°C and recovery for 5 h at 37°C) cells were treated with 250 μ M of 3HK for 1 h (D). Cells were pretreated with 10 μ M of HSP90 anti-sense oligonucleotides for 6 h before exposure to heat shock. After recovery, the cells were treated with 250 μ M of 3HK for 1 h (E). Hydrogen peroxide generation induced by 3HK was measured by incubation with fluorescent probe 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). White scale bar = 15 μ m. F, Quantification of fluorescent levels by flow cytometer. Cells were pretreated with 10 mM of HSP27 (HSP27 Anti-sense (AS)+Heat Shock (HS)+3HK), HSP70 (HSP70 AS+HS+3HK), or HSP90 (HSP90 AS+HS+3HK) anti-sense oligonucleotides for 6 h before exposure to heat shock. After recovery, the cells were treated with 250 μ M of 3HK for 1 h. Fluorescent levels are expressed as arbitrary units of relative value. The figures are representative for four different experiments. *: The difference from the cells treated with 3HK alone was statistically significant ($p < 0.05$).

를 처리한 세포보다 약 30% 이상 높게 나타났다. HSP90 anti-sense oligonucleotides를 전처리한 경우에 열충격으로 인한 세포 보호효과가 대부분 저해되었으나, 다른 종류의 anti-sense oligonucleotides를 처리한 경우에는 저해되지 않았다. 이러한 결과는 HSP90이 3HK에 의한 신경세포 사멸에 대한 열충격의 보호 기작과 관련이 있음을 시사한다. 3HK에 의한 신경세포 자멸사에서 HSP90의 역할을 더 확인하기 위해서 3HK에 의해 생성된 활성기 산소에 대해 증가된 HSP90이 어떤 효과를 나타내는지 조사하였다. 그 결과 세포에 적절한 열충격을 가한 후 3HK를 처리했을 때 3HK만 처리한 세포보다 활성기 산소가 약 50% 정도 감소되었다(Figs. 2B, 2D, 2F). 또한 HSP90 anti-sense oligonucleotides를 전처리했을 경우 적절한 열충격에 의한 활성기 산소 감소가 저해되었고, 다른 종류의 HSP anti-sense oligonucleotide를 처리했을 경우에는 저해되지 않았다(Figs. 2D, 2E, 2F). Fig. 3에서 보듯이, western blot에서도 열충격(42°C에서 30분)을 가한 경우 열충격을 가하지 않은 세포보다 2배 이상 HSP90의 발현이 증가됨을 확인하였다. 결과로 제시하지는 않았으나 대조군과 비교해서 3HK 단독 처리했을 경우에 HSP90 발현에

변화가 나타나지 않았다. 마찬가지로 열충격에 의한 HSP90의 증가가 HSP90 anti-sense oligonucleotides를 전처리한 경우에 거의 억제되었다. 따라서 이러한 결과를 통해서 HSP90의 초기 발현이 3HK에 의한 세포 사멸 과정에서 활성기 산소의 축적을 저해함을 알 수 있다.

3. 활성기 산소에 의한 caspase 활성화에 대한 HSP90의 효과

3HK에 의한 신경 세포 자멸사 과정에서 caspase 활성화에 대한 활성기 산소의 역할을 확인하기 위해서 SKN-SH 세포에서 3HK에 의한 활성화된 caspase에 대한 강력한 항산화물질인 NAC의 효과를 조사하였다. Fig. 4에서처럼, NAC와 3HK를 함께 처리한 세포에서 caspase 활성도가 NAC를 처리하지 않고 3HK를 처리한 세포에서 보다 30% 정도 감소하였다. 또한 HSP90이 3HK에 의한 caspase 활성화를 억제하는지 확인하기 위해서 caspase substrate cleavage assay를 통해서 caspase 활성을 측정하였다. 열충격을 가한 세포에서 caspase 활성도가 열충격을 가하지 않고 3HK만 처리한 세포보다 약 30% 감소

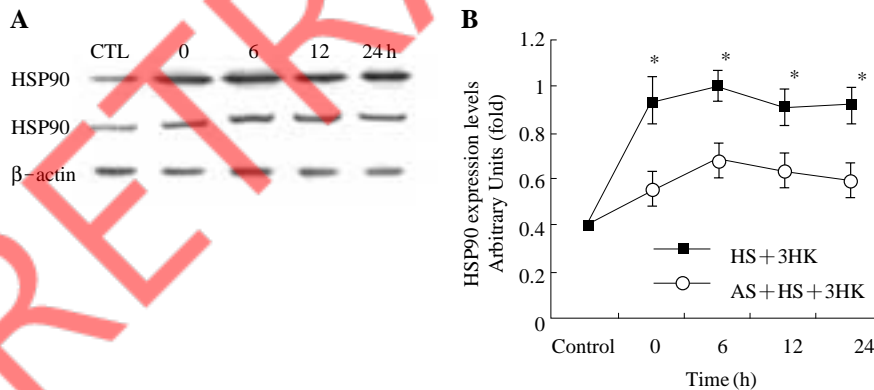


Fig. 3. Western blot analysis of HSP90 induced by mild heat shock in 3HK-treated SKN-SH cells. A, The expression of Heat Shock Protein (HSP90) was detected by western blotting with an HSP90 antibody at indicated time points. Cells were pretreated without (upper panel) or with (middle panel) 10 μ M of HSP90 anti-sense oligonucleotides for 6 h, and then heat-shocked for 30 min at 42°C, followed by recovery for 5 h at 37°C. After recovery, cells were untreated (lane2) or treated with 250 μ M of 3-Hydroxykynurenine (3HK) for 6 (lane3), 12 (lane4), and 24 h (lane5). The levels of β -actin were used as an internal standard for quantifying HSP90 (lower panel). CTL = control cell. B, Densitometry quantification of results in fig. A. The levels of HSP90 are expressed as arbitrary units of relative value. *: The difference from the cells treated with 3HK alone was statistically significant ($p < 0.05$).

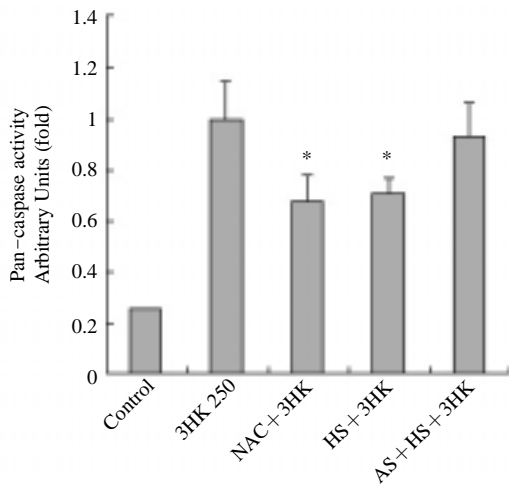


Fig. 4. Effect of NAC or mild heat shock on caspase activity induced by 3HK-generated ROS. Control was untreated cells (Control). Cells were untreated (3-Hydroxykynurenine: 3HK) or pretreated with 1 mM of N-Acetylcystein (NAC + 3HK) for 2 h, followed by treatment with 250 μ M of 3HK for 6 h. Heat-shocked (heat shock for 30 min at 42°C and recovery for 5 h at 37°C) cells were treated with 250 μ M of 3HK for 6 h (HS + 3HK). Cells were pretreated with 10 μ M of HSP90 anti-sense oligonucleotides for 6 h before being exposed to heat shock. After recovery, the cells were treated with 250 μ M of 3HK for 6 h (AS + HS + 3HK). Twenty micrograms of cellular extracts were incubated with 0.25 mM Z-Val-Ala-Asp (OMe)-CH₂F, a substrate of pan-caspase, in 100 μ L of total volume at 37°C for 1 h. Absorbance at 405 nm was measured with an ELISA Reader. Enzymatic activity is expressed as arbitrary units of relative value. Values are the mean SEM of five separate experiments. *: The difference from the cells treated with 3HK alone was statistically significant ($p < 0.05$).

하였다. HSP90 anti-sense oligonucleotide를 전처리했을 경우에는 열충격에 의한 caspase 활성화 감소가 억제되었다(Fig. 4). 따라서 이러한 결과는 3HK에 의한 신경세포 자멸사에서 HSP90이 활성기 산소에 의한 caspase 활성화를 감소시켰다는 것을 제시한다.

고찰

3HK의 증가는 파킨슨씨 병(Ogawa 등 1992)이나

HIV감염에 의한 치매(Sardar 등 1995), 간장성 뇌질환(Pearson and Reynolds 1991) 등 여러 가지 병변 상태에서 뇌(Pearson과 Reynolds 1989, 1992)에서 일어난다고 보고 되고 있다. 또한 몇몇 다른 연구들에서도 3HK가 전형적인 세포 자멸사 형태의 신경 세포사멸을 유발한다고 보고 된 바 있다(Nakagami 등 1996, Lee 등 2001). 그러나 그에 대한 정확한 신경세포 사멸 과정은 거의 밝혀진 것이 없다. 이번 연구에서 우리의 결과는 3HK가 활성기 산소의 생성을 통해 세포사멸이 유발된다는 것과 활성기 산소 생성 억제제가 이런 세포사멸을 막을 수 있다는 사실을 보였다. 따라서 3HK에 의한 SKN-SH 세포의 자멸사에서 활성기 산소가 중요한 역할을 하고 있다는 것을 밝힌 것이라고 하겠다. 다른 연구들에서도 glutamate, trophic factor의 제거, 그리고 철 이온 등에 의한 신경세포사멸이 활성기 산소의 생성을 동반한다는 사실을 보고하였다(Savolainen 등 1998, Foley와 Riederer 2000, Kirkland 등 2002). 초기의 연구에서 활성기 산소가 수많은 신경 퇴행성 질환들과 관계있으며, 다양한 세포에서 세포 자멸사를 유발한다는 것은 보고 되었다. 그러나 산화성 자극의 분자적 신호전달에서 상위 단계나 하위 단계에 대해서는 밝혀진 사실이 거의 없다. 본 실험에서는 신경 세포종에서 3HK에 의해 생성된 활성기 산소의 하위 신호전달 단계를 밝히기 위해서 실험을 진행했다. 이 실험 결과에서 항산화 효과를 가진 NAC 전처리에 의해서 3HK에 의한 SKN-SH에서의 caspase 활성화가 현저히 감소한 것을 확인하였다. 그것은 활성기 산소가 caspase 활성화의 상위단계에서 중요한 작용을 하고 있다는 것을 의미하는 것이다. 이것은 처음으로 3HK에 의한 SKN-SH세포에서의 세포 자멸사가 산화적 자극에 의해 유발되며 하위단계로 caspase가 활성화 된다는 것을 밝혔는데 그 의의가 크다고 하겠다.

적절한 열 충격에 의해 증가된 HSP90이 3HK에 의해서 SHN-SH 세포의 세포사멸을 보호 할 수 있다는(Lee 등 2001) 것을 바탕으로, 본 실험에서는 HSP90과 3HK사이의 신호전달과정의 연결을 더욱 알아보기 위한 실험을 수행했다. 그 결과 HSP90이 효과적으로 활성기 산소의 축적을 억제하고 caspase

의 활성을 억제한다는 것을 보였다. 그것은 결과적으로는 3HK에 의한 세포사멸까지도 억제하는 것을 보였다. 그러나 HSP90의 보호 작용에 대한 기작은 완전히 밝혀진 것이 없었다. Mehlen 등에 의한 보고에 따르면 HSP의 한 종류인 HSP25가 세포내 GSH의 농도를 증가시킴으로 활성기 산소의 양을 감소시켰다(Mehlen 1996). 또한 세포내 작용기작에서 주요한 내재성 항산화 효소인 superoxide dismutase와 glutathione peroxidase가 활성기 산소 제거를 유발한다고 보고 되었다(Halliwell 1987). Hyperthermic 자극과 같은 HSP 생산 촉진은 계속적으로 다양한 세포 체계에서 항산화 효소의 활성화와 HSP 발현을 유발하였다(Currie와 Tanguay 1991). 따라서 이 연구에서 밝혀진 것처럼, HSP90 또한 내재성 항산화 효소의 양과 활성화를 증가시킬 수 있으며 이로 인해 활성기 산소에 의한 세포 독성에 대한 저항성을 형성시킬 수 있다는 결론에 도달할 수 있다.

HSP90은 접혀있는 모양을 갖는 구조를 형성하고 있고, 의학적으로 현재 많이 이용되는 신호전달 물질의 안정적인 조절물질로 잘 알려져 있다(Freeman과 Morimoto 1996, Pearl과 Prodromou, 2001). 알려진 보호물질로서의 HSP90 역할에서 열 충격에 의해 유발된 HSP90은 세포 사멸사 연속 전달과정을 유발하는 활성기 산소의 양을 조절하는 단백질과 결합한다. 이 결합은 활성화 되었을 때 산소 생성 물질의 감소나 활성기 산소 억제 물질의 증가에 의해 세포 사멸을 막는다. 그러나 3HK에 의해 유발된 활성기 산소에 대한 HSP90의 억제 작용에 관한 연구의 진행이 더 필요하다.

더욱이 본 실험 결과는 HSP90의 발현을 억제하는 anti-sense oligonucleotide를 통해서 3HK에 의해 증가된 활성기 산소의 감소 효과를 제거했고 caspase 활성화에 대해서도 똑같이 결과를 확인했다. 이 결과는 또한 증가된 HSP90이 활성기 산소 생성의 억제와 caspase 활성화 억제를 통해 3HK에 의한 신경 독성을 억제한다는 것을 보여주는 것이라 하겠다.

활성기 산소의 생산이 신경 항상성과 생존을 위해서 중요하기 때문에 이 연구는 HSP90의 발현 증가가 활성기 산소 생성과 caspase 활성화 억제를 통한 치료에 있어서 이용가치가 충분하다는 것을 보

여준다. 특히 3HK에 의한 신경성 사멸사에 대한 HSP90의 분자적 보호 작용기작에 대한 자세한 이해는 몇몇 신경퇴행성 질환에 대한 치료전략을 세우기 위해서 기초를 제공했다는 점에서 매우 중요한 연구라고 하겠다.

참고 문헌

- Bender K, Blattner C, Knebel A, Iordanov M, Herrlich P, Rahmsdorf HJ : UV-induced signal transduction. *J Photochem Photobiol* 37 : 1-17, 1997.
- Creagh E, Cotter T : Selective protection by hsp 70 against cytotoxic drug-, but not Fas-induced T-cell apoptosis. *Immunology* 97 : 36-44, 1999.
- Currie R, Tanguay R : Analysis of RNA for transcripts for catalase and SP71 in rat hearts after in vivo hyperthermia. *Biochem. Cell Biol* 69 : 375-382, 1991.
- Devary Y, Gottlieb R, Smeal T, Karin M : The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* 71 : 1081-1091, 1992.
- Foley P, Riederer P : Influence of neurotoxins and oxidative stress on the onset and progression of Parkinson's disease. *J Neurol* 247 : Suppl 2II, 82-94, 2000.
- Freeman B, Morimoto R : The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J* 15 : 2969-2979, 1996.
- Halliwell B : Oxidants and human disease : some new concepts. *FASEB J* 1 : 358-364, 1987.
- Halliwell B, Gutteridge J : Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219 : 1-14, 1984.
- Halliwell B, Gutteridge J : Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an overview. *Methods Enzymol* 186 : 1-85, 1990.
- Jakob U, Buchner J : Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci* 19 : 205-211, 1994.
- Junn E, Mouradian M : Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death : the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. *J Neurochem* 78 : 374-383, 2001.
- Kirkland R, Windelborn J, Kasprzak, J, Franklin, J : A Bax-

- induced pro-oxidant state is critical for cytochrome c release during programmed neuronal death. *J Neurosci* 22 : 6480–6490, 2002.
- Lee MW, Park SC, Chae HS, Bach JH, Lee HJ, Lee SM, Kang YK, Kim KY, Lee WB, Kim SS : The protective role of HSP90 against 3-hydroxykynurenine-induced neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 284 : 261–267, 2001.
- Luna M, Ferrario A, Wong S, Fisher A, Gomer C : Photodynamic therapy-mediated oxidative stress as a molecular switch for the temporal expression of genes ligated to the human heat shock promoter. *Cancer Res* 60 : 1637–1644, 2000.
- Mailhos C, Howard M, Latchman D : Heat shock proteins hsp90 and hsp70 protect neuronal cells from thermal stress but not from programmed cell death. *J Neurochem* 63 : 1787–1795, 1994.
- Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo A : Human hsp27, Drosophila hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *EMBO J* 15 : 2695–2706, 1996.
- Nakagami Y, Saito H, Katsuki H : 3-Hydroxykynurenine toxicity on the rat striatum in vivo. *Jpn J Pharmacol* 71 : 183–186, 1996.
- Ogawa T, Matson W, Beal M, Myers R, Bird E, Milbury P, Saso S : Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology* 42 : 1702–1706, 1992.
- Park Y, Han M, Blackburn R, Lee Y : Overexpression of HSP25 reduces the level of TNF alpha-induced oxidative DNA damage biomarker, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in L929 cells. *J Cell Physiol* 174 : 27–34, 1998.
- Pearl L, Prodromou C : Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. *Adv Protein Chem* 59 : 157–186, 2001.
- Pearson S, Reynolds G : Determination of 3-hydroxykynurenine in human brain and plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Increased concentrations in hepatic encephalopathy. *J Chromatogr* 565 : 436–440, 1991.
- Pearson S, Reynolds G : Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 144 : 199–201, 1992.
- Polla B, Cossarizza A : Stress proteins in inflammation. *EXS* 77 : 375–391, 1996.
- Pourzand C, Tyrrell R : Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem Photobiol* 70 : 380–390, 1999.
- Railson J, Lawrence K, Stephanou A, Brar B, Pennica D, Latchman D : Cardiotrophin-1 reduces stress-induced heat shock protein production in cardiac myocytes. *Cytokine* 12 : 1741–1744, 2000.
- Reynolds G, Pearson S : Increased brain 3-hydroxykynurenine in Huntington's disease. *Lancet* 2 : 979–980, 1989.
- Sandstrom PA, Tebbey PW, Van C, Buttke TM : Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV-associated glutathione peroxidase deficiency. *J Biol Chem* 269 : 798–801, 1994.
- Sardar A, Bell J, Reynolds G : Increased concentrations of the neurotoxin 3-hydroxykynurenine in the frontal cortex of HIV-1-positive patients. *J Neurochem* 64 : 932–935, 1995.
- Sato S, Fujita N, Tsuruo T : Modulation of akt kinase activity by binding to hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 10832–10837, 2000.
- Savolaine K, Loikkanen J, Eerikainen S, Naarala J : Glutamate-stimulated ROS production in neuronal cultures : interactions with lead and the cholinergic system. *Neurotoxicology* 19 : 669–674, 1998.
- Stadtman ER : Protein oxidation and aging. *Science* 257 : 1220–1224, 1992.
- Stone T : Endogenous neurotoxins from tryptophan. *Toxicol* 39 : 61–73, 2001.
- Weikl T, Muschler P, Richter K, Veit T, Reinstein J, Buchner J : C-terminal Regions of Hsp90 are Important for Trapping the Nucleotide during the ATPase Cycle. *J Mol Biol* 303 : 583–592, 2000.

Abstract

**Down-regulated Reactive Oxygen Species by Heat Shock Protein 90
in 3-Hydroxykynurenine-induced SKN-SH Cell Death**

Dae-Seong Kim, Myoung-Woo Lee, Yoo-Hun Noh, Do-Yeon Lee,
Hyun-Jung Lee, Jae-Hyung Bach, Jung-Woo Han, Kwang-Gill Lee,
Joo-Hong Yeo, Won-Bok Lee, Sung-Su Kim

Department of Anatomy, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

In this present study, we show that 3HK-induced reactive oxygen species (ROS) accumulation and caspase activation lead to apoptotic cell death. Pretreatment with N-acetylcysteine (NAC), an effective antioxidant, significantly attenuated 3HK-induced apoptosis by way of a reduction of ROS accumulation and caspase activity. SKN-SH cells were protected from 3HK-induced cytotoxicity by heat shock protein (HSP). HSP90 effectively attenuated 3HK-mediated ROS accumulation and apoptosis. In addition, the protective effect of HSP90 was abolished by pretreatment with HSP90 anti-sense oligonucleotide, but not when pretreated with anti-senses for other HSPs. These results suggest that HSP90 protects SKN-SH cells from 3HK-induced cytotoxicity by reducing ROS levels and caspase activity.

Key words : 3-Hydroxykynurenine (3HK), Heat shock protein 90 (HSP90), Reactive oxygen species (ROS), Caspase, Apoptosis