

세라마이드에 의한 신경세포사멸에서 p53 조절을 통한 사립체 손상에 관한 연구

이도연, 이현정, 노유현, 윤지영, 한인숙
정윤희, 김경용, 김성수, 이원복
중앙대학교 의과대학 해부학교실

간추림 : 본 연구에서는 세포자멸사의 이차적 신호전달물질로서 신경퇴행성 질환과 노화현상에 관여하는 중요한 원인물질로 신경독성작용을 나타내는 세라마이드의 신경모세포종 SK-N-SH 세포에 미치는 독성효과와 그 기작을 규명하고자 하였다.

세포 투과성인 C2-세라마이드를 SK-N-SH 세포에 처리한 후 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였으며, P53 및 사립체와의 관련성 등을 확인하였다.

SK-N-SH는 20~40 µM 농도의 세라마이드를 24시간 동안 처리시 시간 및 농도 의존적으로 세포생존이 약 50% 감소하였으며, 48시간 이상 지나면 거의 모든 세포가 팽윤되고 세포막이 터지는 괴사형의 사멸형태를 나타내었다. 핵 내의 형태학적 변화를 보기 위하여 Hoechst 33258을 시행한 결과, 핵의 응축이 유발됨을 확인하였다. 세라마이드 처리시 SK-N-SH 신경모세포종 세포에서 p53의 발현은 처리 1시간부터 증가되어 8시간에 가장 증가하는 세포 내의 과발현이 유도되었으며, 핵으로 이동하여 핵 내의 축적이 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 더불어 p53 antisense 처리시 p53은 발현되지 않았으며, 세라마이드로 인한 세포자멸사를 효과적으로 억제하였다. 또한, p53과 사립체와의 관련성 여부를 확인하기 위하여 세라마이드에 의한 사립체 손상 여부와 p53 antisense를 처리한 후 사립체 손상을 확인한 결과, p53의 전사 억제시 세라마이드로 인해 증가되었던 사립체 손상이 효과적으로 저해되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 세라마이드는 신경모세포종인 SK-N-SH에 대해서 세포자멸사 형태의 세포사멸을 유발하였으며, 그러한 신경세포사멸과정에서 p53과 하위 사립체 기능이 매우 중요하게 매개되어 세포사멸을 조절하고 있음을 알 수 있었다. 더불어 p53 경로를 저해시킴으로서, 하위 사립체 손상을 억제하고, 세라마이드에 의한 신경세포사멸경로 차단하여 신경보호효과를 나타낼 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 세라마이드, 세포자멸사, SK-N-SH, P53, 사립체 막전위차

서론

세포자멸사 (apoptosis)는 다세포생물에서 항상성을 유지하는 중요한 기작으로서 주위 조직에 상해를 주지 않으면서 손상된 세포만을 선택적으로 제거하는 일련의 조절된 세포사멸 과정이다 (Wyllie

1980, Raff 1992, Jacobson 등 1993, Vaux 등 1994, Alnemri 등 1996). 이와 같은 세포자멸사는 발생과정에서와 같이 일련의 내적인 실행계획의 활성화에 의해 유발되기도 하고 외부자극에 의해 촉발된 광범위한 죽음 신호 전달에 의해 일어나기도 한다 (Thompson 1995, Whyte와 Evan 1995). 이러한 세포자멸사는 정상적인 발생단계에서 뿐만 아니라 신경계의 퇴행성 질환, 암, 자가면역질환, 바이러스 감염과 같은 질병 발생 과정에도 중요한 역할을 한다

*이 논문은 2005학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.
교신저자: 이원복 (중앙대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: whitefox@cau.ac.kr

(Vaux 등 1994, Thompson 1995). 특히, 알츠하이머 병, 파킨슨병, 헌팅턴병과 같은 신경세포 퇴화와 관련된 질병 등에서 세포자멸사가 가속됨이 보고되고 있다. 이렇듯 세포자멸사는 분화, 증식 및 생존에 중요하게 적극적으로 일어나는 과정이며 더불어 여러 신경퇴행성질환의 한 병리학적 요인으로 역할을 담당하는데, 이러한 세포사멸에 관여하는 중요한 이차 신호전달물질로 세라마이드의 중요성이 최근 점차 부각되어져 왔다.

세라마이드(ceramide)는 구조적으로 N-acetyl sphingosine으로 세포막을 이루는 인지질 중 하나인 스피고마이엘린(sphingomyelin)이 주로 자극에 의해 활성화되는 스피고마이엘리네이스(sphingomyelinase)에 의해 생성되는 지질성 이차 신호전달물질로서 세포성장지연, 분화, 세포자멸사 등에서 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다(Perry 등 1998). 현재까지 세라마이드에 관한 연구는 주로 조혈계, 특히 백혈병 세포주에 대해 연구되어 왔으나, 스피고마이엘린 경로는 세포표면의 수용체나 환경 인자로부터의 자극을 핵으로 전달하는 일반적인 신호전달계 중 하나일 것으로 생각되고 있다(Hannun 1996). 실제로 TNF- α (Obeid 등 1993, Jarvis 등 1994), IL-1 (Andrieu 등 1995), INF- γ (Kim 등 1995), Fas/APO-1 (Cifone 등 1994, Martin과 Green 1995, Tepper 등 1995) 등의 길항제들과 자외선 조사 (Haimovitz-Friedman 등 1994, Santana 등 1996, Verheji 등 1996)과 항암제 (Strum 등 1994, Jaffrezou 등 1996) 등의 작용이 스피고마이엘린 주기를 활성화시키거나 또는 세라마이드의 증가를 통해 작용하는 것으로 보고되었고, 세포-투과성의 합성 세라마이드를 처리하거나 세균의 스피고마이엘리네이스를 처리하는 경우 스피고마이엘린 주기를 활성화시키는 길항제를 처리한 경우와 유사하게 세포사멸이 유도되므로 세라마이드가 세포자멸사를 매개하는 신호전달 물질일 것으로 생각되고 있다. 특히 신경 조직의 경우 스피고마이엘린의 함유량이 다른 조직에 비해 월등히 많으며 스피고마이엘리네이스의 활성도 높은 것으로 알려져 있는데, 이는 발생과정에서의 신경세포의 예정 세포 사멸 과정이나 신경퇴행성 질환 등에서 나타나는 세포자멸사 과정과 깊은 관련

성을 시사하는 것으로 생각할 수 있다.

지금까지의 연구들을 통해 세포투과성의 세라마이드 유사체가 다양한 세포에서 세포자멸사를 유발하는 것은 잘 알려진 사실이며 (Mathias 등 1998), 이러한 세라마이드의 작용과 관련된 작용 인자들에 대해서도 많은 연구 결과가 보고되고 있으나, 그럼에도 불구하고 세라마이드에 의한 세포자멸사의 하위경로에 대해서는 명확히 규명된 바가 없다.

과거의 대부분의 세포자멸사 관련 유전자들의 연구는 *C. elegans* (Ellis 등 1991)에서 연구되어 왔으나, 최근 들어서 포유동물 세포에서도 세포자멸사를 유발하거나 억제하는 여러 조절인자들이 밝혀지고 있다. 중추신경계에서 작용하는 세포자멸사의 조절 인자에는 p53, Bcl-2 family, immediate early gene, neurotrophic factor, neuropeptide 등이 있다. 이 중에서도 세포자멸사를 유발하는 대표적인 유전자 중의 하나가 종양억제제로 알려진 p53이다. p53은 DNA 손상, 저산소증 등에 의해 유발되는 신호전달 경로에 관여하며 세포주기의 정지와 세포사멸을 유발한다. 정상적으로 세포 내에서 p53은 극히 짧은 반감기로 인해 매우 낮은 수준으로 발현되고 있다. DNA 손상을 유발하는 물질에 의해 일어난 전사 후의 p53의 안정화는 p53 발현 수준을 증가시키는 것으로 알려지고 있다. 다시 말해 DNA 손상 유발 물질에 의한 p53의 발현 증가는 세포주기 정지나 세포자멸사를 유발하게 된다 (Levine 1997). 이런 죽음 신호를 촉발시킬 수 있는 것들은 성장 인자의 고갈, 리간드나 면역세포 표면 수용체와의 결합 등 여러 가지 형태로 나타나는 것이 알려져 있지만 (Wu 등 1995, Pitti 등 1996), 그 신호전달체계의 대부분은 아직 자세히 규명되지 못하고 있다.

최근까지 세라마이드에 의한 세포자멸사 신호전달과정과 p53의 관련성에 관심이 집중되고 있으나, 그 역할에 대해서는 상반된 보고들이 이어지고 있다. 그 예로서, p53의 활성화가 내재적인 세라마이드 수준에서 향상된다고 하는 보고가 있었던 반면, 세라마이드의 세포성장 억제 농도에서는 p53의 발현 수준을 증가시키지 않는다는 보고가 있다 (Dbaibo 등 1998). 이는 p53이 actinomycin D나 감마선(gamma irradiation)과 같은 상황에 노출될 경우와 같이

p53이 주요한 조절 역할을 수행하고 있는 상황에서는 p53이 세라미이드의 상위에서 작용할 것이라는 것을 제시해 주는 결과라 하겠다. 세라미이드는 또한 p53에 의존적이지 않은 세포사멸사 경로에 관여할 수도 있을 것으로 제시되고 있다. 그러므로 아직까지 세라미이드로 유발된 세포사멸사에서의 p53의 관련성과 그 역할에 대해서는 아직까지 정확히 규명되지 못하고 있다고 하겠다(Haupt 등 1996).

이에 본 연구에서는 세라미이드에 의해 유도되는 신경모세포종 SK-N-SH 세포의 사멸과정을 매개하는 p53과 같은 전사인자의 관련성을 확인하고자 한다. 또한 p53 의존적인 세포사멸 과정에 Bax가 관련되어 있음은 비교적 잘 알려진 편이나(Walkinshaw와 Waters 1994, Blum 등 1997), 그 밖의 세포 사멸 조절인자들과의 관련성에 대해서는 더 연구되어야 할 부분들이 많이 있다. 그 중에서도 본 연구에서는 세라미이드에 의한 사립체 막전위차의 변화를 확인함으로써 미토콘드리아 기능손상과의 관계를 확인하고자 하며, 더불어 p53과 사립체 기능과의 상호 작용에 대해서 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포배양 (cell culture)

흰쥐 신경모세포종 세포 (neuroblastoma cell)인 SK-N-SH 세포를 PEI-coated 96 well culture plate에 MTT reduction assay를 시행하기 위해서 40,000 cells/well의 밀도로 깔아주었다. SK-N-SH 세포는 DMEM에 10% FBS (fetal bovine serum)를 보충한 배양액으로 배양하였다. plating한 다음날 저혈청 배지 (DMEM with 1% FBS)로 바꾸어주고 본 실험에서 사용하고자 하는 각각의 물질을 적당 시간동안 처리하였다.

2. MTT reduction assay

MTT reduction assay는 기존에 보고된 방법을 약간 변형하여 시행하였다 (Shearman 등 1994, 1995, Kaneko 등 1995). 배양된 세포에 세라미이드를 첨가

한 뒤 37°C에서 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 후에 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) 용액을 최종 농도가 0.5 mg/mL 농도가 되도록 각 well에 첨가한 후에 4시간 반 동안 더 배양하였다. MTT의 환원에 의해서 형성된 formazan 침전물을 용매 (0.1 N HCl in absolute isopropanol)에 녹인 후에 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 표본의 값은 해당되는 용매만을 추가한 대조군 값을 100%로 하고 0.9% Triton X-100에 의해 세포가 완전히 파괴되었을 때의 MTT reduction 정도를 0%로 하여 상대적인 값으로 표시하였다.

3. 면역세포화학염색 (immunocytochemistry)

세라미이드를 처리한 세포와 p53 antisense oligonucleotide를 전 처리한 세포를 trypsin작용으로 떼어내어 모은 후 PBS 수세과정을 거쳐 cytospin (Hanil, Korea) 500 rpm에서 3분 동안 gelatin을 코팅한 슬라이드에 부착시켰다. 세포가 부착된 슬라이드는 상온에서 1시간 동안 말린 후 4% paraformaldehyde (in PBS pH 7.4)로 15분간 고정하고 PBS 수세 후, 세포 내에 존재하고 있던 peroxidase의 효과를 차단하고 세포 투과성을 높이기 위하여 알코올에 첨가한 3% H₂O₂에서 10분간 처리하였다. 10% non-immune serum (Zymed Co., USA)으로 30분간 처리한 후 p53의 일차항체를 (Santa Cruz, USA) 1 : 100의 비율로 희석한 후 37°C 배양기에서 2시간 반응시켰다. 이후 PBS로 수세한 후 2차 항체 (biotinylated anti-IgG, Zymed Co., USA)를 실온에서 90분간 처리하였다. PBS 수세한 후 3차 항체 (streptavidin peroxidase conjugate, Zymed Co., USA)로 1시간 반응시킨 후 DAB 용액으로 발색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

4. p53 antisense oligonucleotide 처리에 의한 p53의 억제

세라미이드에 의한 세포사멸 과정에서 p53의 역할을 보기 위해서는 20개 염기가 phosphorothioate 결합으로 이루어진 5'-CGCTAGGATCTGACTGC-

3' 서열의 antisense oligonucleotides를 합성하여 세포 배양액에 최종 농도 10 μM이 되도록 30분간 전처리하였다. 이 서열은 쥐 p53 mRNA의 번역 개시부에 상보적인 서열로서, 이러한 antisense oligonucleotide의 작용 특이성은 p53의 발현을 p53 항체를 사용하여 면역세포화학적으로 확인하였다.

5. 사립체의 막 전위차 (mitochondrial membrane potential)의 변화 측정-TMRE staining

사립체 막전위차의 변화를 알아보기 위해서는 형광 염색시료인 tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE, Molecular Probes)를 세포가 들어있는 배양액에 100 nM의 농도로 15분간 처리하였다. 양성을 나타내는 TMRE는 사립체의 막전위차에 의해 사립체 막 안쪽으로 이동하고, 염색되는 형광 세기에 따라 막전위차가 정상적으로 유지가 되고 있는지 나타낸다. TMRE의 형광 세기는 fluorometer를 이용하여 excitation 549 nm, emission 574 nm에서 측정하였다. 형광 영상은 형광 현미경 (Olympus IX70)을 이용하고 CCD 카메라를 이용하여 관찰하였다.

6. 통계처리

데이터는 평균과 표준편차로 표시하였으며, 그룹간의 상관관계와 차이를 알아보기 위해서 SigmaPlot version 6.0 (SPSS)를 이용하여, student's *t*-test로 유의차를 검사하였다. $p < 0.05$ 이상일 경우, 통계적으로 유의한 것으로 검정하였다.

결 과

1. 세포투과성 C2-세라미드의 신경모세포종 SK-N-SH 세포사멸 유발

신경모세포종 SK-N-SH는 세라미드 처리 2시간 전에 1% FBS를 포함하는 배지에서 배양하였다. 세라미드에 의해 유발된 세포독성에 의한 세포사멸은 MTT reduction assay로 측정하였다. 신경모세포종 SK-N-SH를 세포투과성 C2-세라미드 (20~40 μM)로 처리하였을 경우, 시간과 용량 의존적으로 세포사멸이 유발되었다 (Fig. 1A). 이전에 보고되었던 PC12 세포에서의 경우와 마찬가지로 세라미드 처리 후 세포생존율이 감소되었으며 24시간 후 약

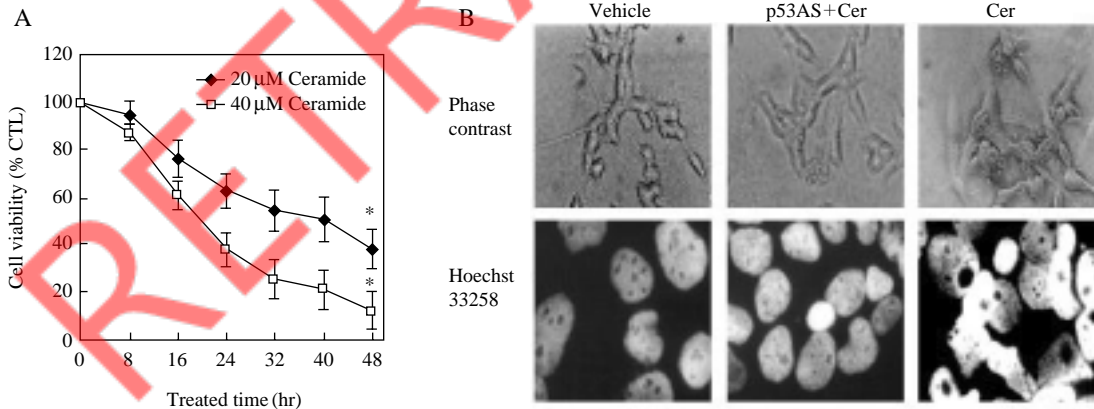


Fig. 1. Ceramide (Cer) induces apoptotic cell death in neuroblastoma SK-N-SH cells. (A) Time- and dose- dependent changes of cell viability by exogenous ceramide. SK-N-SH cells were pre-incubated in 1% FBS DMEM for 2 hr and then treated with 20 or 40 μM of C2-ceramide. C2-ceramide was dissolved in ethanol (final concentration, 0.1%). After 24 hr the cell viability of SK-N-SH cell was estimated using the MTT reduction assay. Data, presented as percent of control cells incubated with vehicle, are mean ± SEM of four separate experiments. (B) Microscopic morphology of ceramide treated SK-N-SH cells. Cells were visualized by phase contrast and Hoechst 33258 epi-fluorescence. The figures are representative for four different experiments. * $p < 0.05$ versus vehicle alone.

50%의 세포가 사멸되는 것으로 나타났고, 48시간 후에는 살아있는 세포가 거의 관찰되지 않았다. 세라미드에 의한 SK-N-SH 세포의 세포사멸 기작을 규명하기 위해 형태학적 양상을 관찰하였으며, 세포의 핵 변화를 관찰하기 위해서 Hoechst 33258 염색을 시행하였다. 위상차현미경 관찰 결과 20 μ M C2-세라미드로 처리한 경우 24시간 후에 SK-N-SH 세포는 세포사멸사에 의한 세포사멸 형태를 나타내었다(Fig. 1B). MTT 환원 실험을 시행하여 얻은 세포생존율에서와 같은 결과로 세라미드를 처리하여 배양한 세포의 약 50%가 신경돌기의 소실과 세

포형태가 둥글거나 찌그러지는 형태의 변화가 나타났다. 이러한 형태의 변화를 나타낸 대부분의 세포에서는 세포사멸사의 대표적 특징인 세포막수포현상(membrane blebbing)이 관찰되었다. 세라미드를 처리한 세포군에서는 생존하고 있는 세포들도 신경돌기의 수와 길이가 감소하는 양상을 나타내었다(Fig. 1B). 또한, Hoechst 33258 염색을 시행한 결과, 24시간 1% FBS 배지로 갈아준 후 세라미드를 처리하지 않은 대조군에서의 세포에서는 완전하고 둥그란 모양의 핵 형태가 관찰되었다. 종종 응축된 핵 형태를 띤 세포가 관찰되기는 했지만 이는 1%의

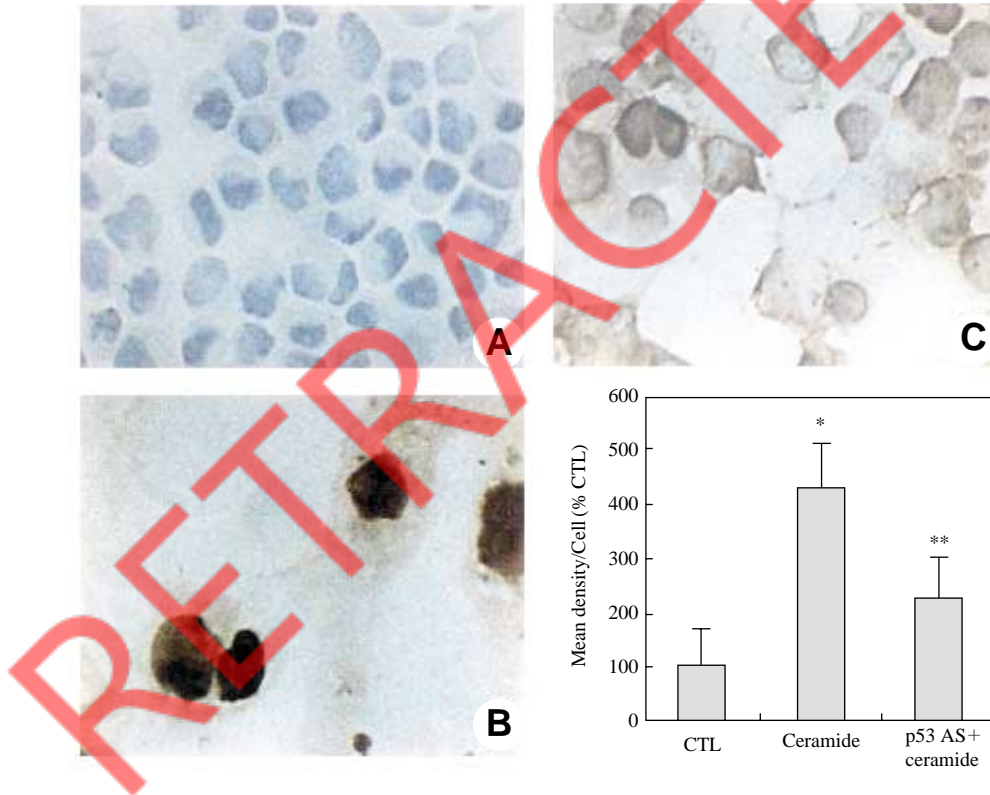


Fig. 2. P53 expression of cells was detected by immunocytochemical techniques using anti-p53 antibody as a primary antibody, a secondary antibody, and ABC system as a visualizing method. Cultured SK-N-SH cells were treated with vehicle (A), 20 μ M C2-ceramide for 6 hr alone, (B) or pre-treated of 10 μ M of p53 antisense oligonucleotides for 6 hr (C) prior to C2-ceramide addition. Expression levels were captured and quantified using NIH image (ver. 1.56) program. The values of Y-axis are calculated by sum of mean density of positively DAB-stained pixels (brown) per cells, normalized to the control p53 levels (CTL). Values are the mean SD of determinations made in three randomly selected regions of captured images. Presenting microphotographs are representative regions counter-stained with hematoxylin dyes (blue). * $p < 0.05$ versus vehicle alone. ** $p < 0.05$ versus 20 μ M C2-ceramide alone.

혈청에서 24시간 배양한 효과 때문일 것으로 생각된다. 이와는 반대로 20 μ M의 세라마이드를 24시간 처리한 SK-N-SH 세포에서는 세포사멸사형 세포사멸의 대표적 특징인 핵의 응축과 분절화가 뚜렷하게 관찰되었다. 세라마이드의 비활성 유사체인 dihydroceramide는 세포생존율에 유의한 효과를 나타내지 못하였으며 이는 C2-세라마이드로 인해 SK-N-SH 세포의 세포사멸이 특이적으로 유발된 결과임을 의미하는 부분이라 하겠다 (Fig. 3).

2. 세라마이드에 의해 유발된 SK-N-SH 세포의 세포사멸에서 P53의 발현과 역할

세라마이드에 의해 유발된 세포사멸에서 p53 단

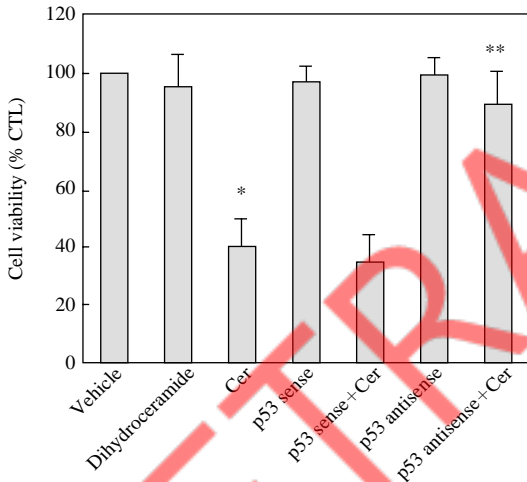


Fig. 3. Specific effect of p53 antisense oligonucleotides on ceramide (Cer) toxicity. Twenty micromolar ceramide treatment for 24 hr induced neuronal cell death, whereas the same concentration of dihydroceramide did not. Treatment with sense or antisense p53 oligonucleotides in the absence of C2-ceramide resulted in no significant change in viability compared with vehicle-treated controls. Pre-treatment with p53 antisense oligonucleotides showed protective effects upon ceramide-induced cytotoxicity, whereas p53 sense oligonucleotide did not. The percentage of surviving cells was measured by the MTT reduction assay. Values are the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. Asterisks indicate significant differences from that of ceramide only treated control. * $p < 0.05$ versus vehicle alone. ** $p < 0.05$ versus 20 μ M C2-ceramide alone.

백질이 발현되는지를 알아보기 위하여 면역세포화학염색을 시행하였다. 그 결과 세라마이드를 처리하지 않은 경우에는 p53이 발현되지 않았다 (Fig. 2A). 그러나 20 μ M의 세라마이드를 처리한 경우 p53 단백질의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. P53은 세포의 핵에서 강하게 발현되었다 (Fig. 2B). 이러한 p53의 발현은 세라마이드 처리 1시간 후부터 측정 가능하였으며 4시간에 최대치로 발현되었으며 이후에는 점차 감소하는 양상을 나타내었다.

세라마이드에 의해 유발되는 세포사멸에 대한 p53의 역할은 p53에 특이적인 antisense oligonucleotide를 사용하여 실험하였다. p53 antisense oligonucleotide의 전 처리는 세라마이드에 의해 유발된 p53 단백질의 발현수준의 증가를 효과적으로 저해하였다 (Fig. 2C). 한편, p53 antisense oligonucleotide의 전 처리는 약 90% 정도의 세포사멸 억제 효과를 나타내었다. 반면 p53 sense oligonucleotide는 세라마이드에 의한 세포사멸에 아무런 효과도 나타내지 않았다 (Fig. 1B, 2A). 이러한 p53 antisense oligonucleotide의 세포사멸 억제 효과는 세라마이드에 의한 세포의 형태학적 변화도 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 1B). 그러므로 이러한 결과는 세라마이드에 의한 세포사멸이 p53에 의존적인 경로에 의해 진행되고 있다는 것을 제시하는 것이라 하겠다.

3. 세라마이드에 의한 사립체 막전위차 (mitochondrial membrane potential)의 변화와 p53과의 관련성

세라마이드에 의해서 사립체의 기능과 관련하여 막 전위차의 변화가 있는지를 알아보기 위하여, 사립체에 특이적인 반응을 하는 형광염색시료인 TMRE를 이용하여 형광현미경으로 관찰하고, 형광의 발색정도를 fluorometer로 측정하였다. 그 결과 대조군에서는 사립체 막전위차가 정상적으로 유지되고 있는 것을 관찰할 수 있었던 반면, SK-N-SH 세포에 30 μ M의 세라마이드를 처리한 후 6시간의 경우에는 막전위차가 정상적으로 유지되지 못해 형광의 세기가 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig.

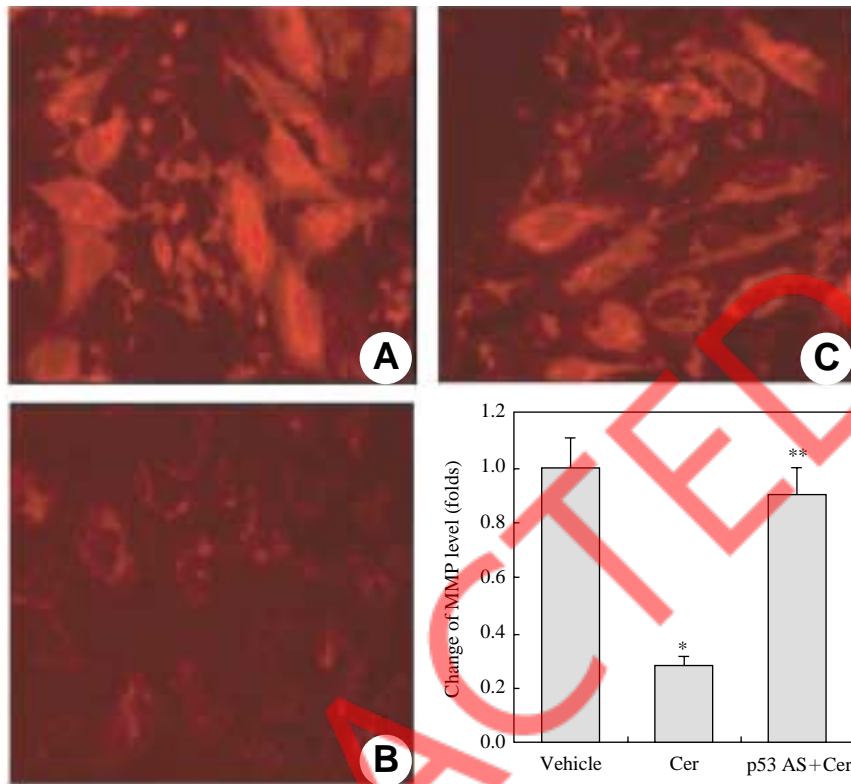


Fig. 4. The effect of p53 on collapse of mitochondrial membran potential, which is induced by ceramide. SK-N-SH cells plated on glass coverslips were maintained for 6h at 37°C in either culture medium, vehicle (A), medium containing 20 μM of ceramide (B), or 20 μM of ceramide+10 μM p53 antisense (C). Cells were then loaded with 100 nM of TMRE to measure mitochondrial membrane potential. $\Delta\Psi_m$ as TMRE fluorescence, was evaluated in SK-N-SH by fluorescence microscopy. Quantification of fluorescent levels (results of A-C). Intensity of TMRE fluorescence was quantified with Fluorometer. Fluorescent levels are expressed as arbitrary units of relative value. * $p < 0.05$ versus vehicle alone. ** $p < 0.05$ versus 20 μM C2-ceramide alone.

4). 그리고 p53 antisense oligonucleotide, 10 μM 을 6 시간 전 처리한 경우 세포의 외형이나 사립체의 형태가 대부분 정상적이어서 세라마이드에 의해 무너진 막전위차가 거의 대조군과 가깝게 보호되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 세라마이드에 의한 세포사멸과정이 p53 단백질 발현증가와 더불어 사립체의 막전위차가 붕괴되는 등의 기능저하를 통한 과정임을 확인하였고, 나아가 p53 단백질 발현 조절을 거쳐 그 하위로 추정되는 사립체 막전위차 붕괴를 효과적으로 차단함으로써 세라마이드에 의한 신경세포의 손상을 차단할 수 있는 것을 확인하였다.

고 찰

세라마이드가 신경세포를 포함하는 다양한 세포 종류에서 세포사멸사의 유발인자로 작용한다는 사실은 보고 된 적이 있으나(Burgg 등 1996), 사람 신경세포종에서의 세포사멸 기작에서의 세라마이드와 p53 및 사립체와의 관계에 대해서는 아직 명확히 규명되지 못하고 있다. 세라마이드의 축적에 의한 결과로 인한 세포사멸은 아마도 노화와 뇌 위축의 과정과 관련되어 있을 것으로 생각되고 있는데, 이는 세라마이드를 생성하는 스핑고마이엘리네이즈가

노화촉진생쥐의 대뇌 결절에서 연령에 의존적으로 증가하는 것이 보고됨에 근거하고 있다(Kim 등 1997). 스프링고마이엘린 신호전달 경로는 노화의 세포 배양 모델에서 노화형질 발현의 개시를 의미하며(Venable 등 1995), 이러한 노화는 스프링고마이엘린 전도(turnover) 상승을 동반하고 있다(Lightle 등 2000). 또한, 세포사멸과 관련된 뇌 위축의 특정 부위에 대해서는 아마도 세라마이드의 세포 형태에 의존적인 민감도(susceptibility)에 의해서 부분적으로는 설명될 수 있을 것이다.

최근까지의 연구는 C2-세라마이드 처리 후 사람 신경모세포종 SK-N-SH 세포에서 일어나는 세포사멸사와 관련된 분자적 조절 기전을 규명하는데 그 초점이 맞춰지고 있다. 전형적인 신경 세포사멸의 형태는 새로운 mRNA와 단백질의 생성을 필요로 한다(Johnson과 Deckwerth 1993). Mesner 등(1992)은 actinomycin D와 cycloheximide가 신경세포로 분화된 PC12 세포에서 세포사멸사를 저해한다는 보고를 한 바 있다. 본 연구에서도 SK-N-SH 세포를 세라마이드로 처리한 후 곧이어 유전자 활성화와 단백질 생성이 관찰되었다. 이는 본 연구에서 관찰된 형태학적 변화와 더불어 SK-N-SH 세포에서 세라마이드가 세포사멸사를 유발하고 있음을 제시하는 결과라 하겠다.

비록 감마선이나 actinomycin D와 같은 유전적 독성 유발 물질이 p53 의존적인 양상으로 세라마이드를 축적한다는 보고가 있었지만, 세라마이드로 유발된 세포사멸사에서 p53의 역할에 대해서는 아직까지 명확히 규명되지 않고 있다(Dbaibo 등 1998). 이에 본 연구는 p53의 축적이 SK-N-SH 세포내에서 세라마이드에 의해 유발된 세포사멸사에서 중요한 역할을 수행한다는 증거를 제시하였다. 일반적으로 p53에 의존적인 세포사멸사의 유발인자들은 DNA 손상이나, cytokine, heat shock 등을 포함한다(Graeber 등 1994, Eizenberg 등 1995, Levine 1997). DNA 손상은 p53에 의존적인 반응에 대한 잘 알려진 자극 인자이며 여러 가지 세포 형태에서 p53 단백질의 축적과 관련되어 있다(Clarke 등 1993). 이와는 반대로 최근의 보고에서 세라마이드 경로가 p53의 하위 경로임이 제시되고 있다(Dbaibo 등 1998). 이러한

가능성은 actinomycin D나 감마선 조사에 의해 유발된 Molt-4 세포사멸에서 일차적인 p53의 활성화 후에 내재적인 세라마이드의 증가가 이루어짐에 근거를 두고 있으며, 세라마이드에 의해서는 p53의 발현수준의 증가가 전혀 이루어지지 않는다는 사실에 의해 뒷받침되고 있다. 그렇지만, p53에 의한 transcriptional transactivation에서의 변화는 단백질 수준에서 측정 가능한 변화 없이도 이루어질 수 있다는 사실을 숙지해야할 것이다(Levine 1997).

본 연구의 결과에서는 SK-N-SH 세포에서 세라마이드로 유발된 세포사멸사가 p53의 축적으로 인한 DNA 손상을 통하여 매개되는지는 알 수 없었다. 그러나 p53에 대한 antisense oligonucleotide는 세라마이드로 유발되는 세포사멸을 저해할 뿐 아니라 p53 단백질의 축적도 저해하였다. 이러한 결과는 p53 경로가 세라마이드의 하위경로로 작용하며 p53이 사람 신경모세포종 SK-N-SH 세포에서 세라마이드로 유발된 세포사멸사에서 중요한 역할을 수행할 것이라는 것을 의미하는 것이다. 그리고 더불어 세라마이드에 의한 p53의 하위 조절 경로에 대해서도 실험해 본 결과, 세포의 주요한 에너지대사를 관장하는 사립체 기능의 변화를 유발하는 것을 관찰하였으며, 구체적으로는 사립체의 막전위차 감소에 따른 붕괴현상을 크게 유도시키는 것을 확인하였다. 본 실험에서 확인한 세라마이드에 의해 유도되는 세포내 p53의 활성화 뿐 아니라, 사립체로의 이동(translocation)이 일어날 수 있는지, 그리하여 그 후 다양한 사립체 조절 인자와 서로 영향을 미칠 수 있는지 등 구체적으로 p53이 사립체의 막전위차 감소를 어떻게 조절하는지를 확인하기 위해서는, 정확한 사립체 내에서의 다양한 아포터시스의 관련인자들의 변화와 상호작용과 그들의 분자적 기전을 밝히는 보다 심도 있는 연구가 향후 반드시 필요할 것으로 생각된다. 본 연구진에서도 앞으로 Bcl-2나 Bax 등의 Bcl-2 family의 변화 등을 비롯하여, p53이라는 전사인자에 의해서 하위 단계에서 조절되는 또 다른 전사인자나 mitogen-activated protein kinase 등의 세포의 생존 및 사멸에 중요하게 작용한다고 알려져 있는 다양한 인자와의 관련성에 대한 연구를 수행할 계획이다.

이상으로 본 실험 결과를 통하여 세라마이드에 의한 p53 발현에 따른 사립체 기능 저하를 규명할 수 있었으며, 이를 효과적으로 제어하는 방어 기전을 조절한다면, 세라마이드에 의한 다양한 세포사멸 기전을 차단하거나 보호를 할 수도 있음을 기대할 수 있는 결과라 하겠다. 그러므로 본 연구의 결과는 노화와 퇴행성 질병과 관련된 신경세포의 노화과정에 대한 중요한 지표를 제시하고 나아가 이러한 질병의 극복을 위한 치료전략 수립을 위한 기초 자료 제시에 일조할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171-178, 1996.
- Andrieu N, Salvayre R, Jaffrezou JP, Levade T : Low temperatures and hypertonicity do not block cytokine-induced stimulation of the sphingomyelin pathway but inhibit nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 270: 24518-24524, 1995.
- Blum D, Wu Y, Nissou M.F, Arnaud S, Alim-Louis-Benabid, Verna JM : p53 and Bax activation in 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Res* 751: 139-142, 1997.
- Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M : Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. *J Neurochem* 66: 733-739, 1996.
- Cifone MG, De Maria R, Roncaioli P, Rippon MR, Azuma M, Lanier LL : Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 180: 1547-1552, 1994.
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML : Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362: 849-852, 1993.
- Dbaibo GS, Pushkareva MY, Rachid RA, Alter N, Smyth MJ, Obeid LM : P53-dependent ceramide response to genotoxic stress. *J Clin Invest* 102: 329-339, 1998.
- Eizenberg O, Faber-Elman A, Gottlieb E, Oren M, Rotter V, Schwartz M : Direct involvement of p53 in programmed cell death of oligodendrocytes. *EMBO J* 14: 1136-1144, 1995.
- Ellis RE, Horvitz HR, Two C : *Elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 124: 64-72, 1991.
- Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Giaccia AJ : Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 14: 6264-6277, 1994.
- Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z : Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 180: 525-535, 1994.
- Haupt Y, Barak Y, Oren M : Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *EMBO J* 15: 1596-1606, 1996.
- Hannun YA : Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274: 1855-1859, 1996.
- Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC : Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361: 365-368, 1993.
- Jaffrezou JP, Levade T, Bettaieb A, Andrieu N, Bezombes C, Maestre N : Daunorubicin-induced apoptosis triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J* 15: 2417-2424, 1996.
- Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S : Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 73-77, 1994.
- Johnson EM Jr, Deckwerth TL : Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 16: 31-46, 1993.
- Kaneko I, Yamada N, Sakuraba Y, Kamenosono M, Tutumi S : Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of beta-amyloid, and its derivative racemized at Ser residue. *J Neurochem* 65: 2585-2593, 1995.
- Kim MY, Linardic C, Obeid L, Hannun Y : Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* 266: 484-489, 1995.
- Kim SS, Kang MS, Choi YM, Suh YH, Kim DK : Sphingomyelinase activity is enhanced in cerebral cortex of senescence-accelerated mouse-P/10 with advancing age. *Bio-*

- chem Biophys Res Commun 237: 583-587, 1997.
- Levine AJ : P53, the cellular gatekeeper for growth and division, Cell 88: 323-331, 1997.
- Lightle SA, Oakley JI, Nikolova-Karakashian MN : Activation of sphingolipid turnover and chronic generation of ceramide and sphingosine in liver during aging. Mech Ageing 120: 111-125, 2000.
- Martin SJ, Green DR : Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts. Cell 82: 349-352, 1995.
- Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN : Signal transduction of stress via ceramide. Biochem J 335: 465-480, 1998.
- Mesner PW, Winters TR, Green SH : Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC12 cells resembles that in sympathetic neurons. J Cell Biol 119: 1669-1680, 1992.
- Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA : Programmed cell death induced by ceramide. Science 259: 1769-1771, 1993.
- Perry G, Nunomura A, Lucassen P, Lassmann H, Smith MA : Apoptosis and Alzheimer's disease. Science 282: 1268-1269, 1998.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A : Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J Biol Chem 271: 12687-12690, 1996.
- Raff MC : Social controls on cell survival and cell death. Nature 356: 398-400, 1992.
- Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M : Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. Cell 86: 189-199, 1996.
- Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL : Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. Proc Nat Acad Sci U S A 91: 1470-1474, 1994.
- Shearman MS, Hawtin SR, Taylor VJ : The intracellular component of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides. J Neurochem 65: 218-227, 1995.
- Strum JC, Small GW, Pauig SB, Daniel LW : 1-beta-D-Arabinofuranosylcytosine stimulates ceramide and diglyceride formation in HL-60 cells. J Biol Chem 269: 15493-15497, 1994.
- Tepper CG, Jayadev S, Liu B, Bielawska A, Wolff R, Yonehara S : Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 8443-8447, 1995.
- Thompson CB : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267: 1456-1462, 1995.
- Vaux DL, Haecker G, Strasser A : An evolutionary perspective on apoptosis. Cell 76: 777-779, 1994.
- Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S : Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. Nature 380: 75-79, 1996.
- Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM : Role of ceramide in cellular senescence. J Biol Chem 270: 30701-30708, 1995.
- Walkinshaw G, Waters CM : Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. Neuroscience 63: 975-987, 1994.
- Whyte M, Evan G : Apoptosis, The last cut is the deepest. Nature 376: 17-18, 1995.
- Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J : Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. J Clin Invest 95 : 1897-1905, 1995.
- Wyllie AH : Cell death; The significance of apoptosis Int Rev Cyt 68: 251-306, 1980.

Abstract

Study on the Mitochondrial Dysfunction by p53 Regulation in Ceramide-induced Neuronal Cell Death

**Do-Yeon Lee, Hyun-Jung Lee, Yoo-Hun Noh, Ji-Young Yun, In-Sook Han
Yoon-Hee Chung, Kyung-Yong Kim, Sung-Su Kim, Won-Bok Lee**

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

Ceramide induces cell death in a dose- and time-dependent manner in neuroblastoma SK-N-SH cells. To investigate the mechanism of SK-N-SH cell death by C2-ceramide, morphological features and Hoechst 33258 staining were analyzed.

In these morphologic study the cell death by ceramide showed typical apoptotic features, nuclear condensation, fragmentation, and membrane blebbing. Ceramide-induced apoptosis was accompanied by nuclear accumulation of p53. Inhibition of p53 expression with p53 antisense oligonucleotides inhibited apoptosis evoked by ceramide.

Also, ceramide induced mitochondrial event, collapse of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and interestingly, inhibition of p53 attenuated collapse of mitochondrial membrane potential, suggests that ceramide induces mitochondrial dysfunction through upregulation of p53 expression.

These results suggest that ceramide-induced apoptosis is dependent upon increase in cellular p53 levels which play a critical role in the regulation of apoptotic cell death and p53 modulates mitochondrial function such as mitochondrial membrane potential level.

Key words : Ceramide, Apoptosis, SK-N-SH, p53, Mitochondrial membrane potential (MMP)