

C6 신경아교종 세포주에서 망간에 의한 Inducible Nitric Oxide Synthase 유도

계명대학교 의과대학 예방의학교실 및 질병유전단백체연구소¹⁾,
계명대학교 동산의료원 동산병원 산업의학과²⁾

유경임¹⁾ · 이동철²⁾ · 정인성^{1,2)} · 이미영^{1,2)} · 신동훈^{1,2)}

— Abstract —

Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Manganese in C6 Glioma Cells

Gyeong-Im Yu¹⁾, Dong-Hyul Lee²⁾, In-Sung Chung^{1,2)}, Mi-Young Lee^{1,2)}, Dong-Hoon Shin^{1,2)}

*Department of Preventive Medicine, School of Medicine and Institute for Medical Genome Research, Keimyung University¹⁾
Department of Occupational Medicine, Dongsan Hospital Keimyung University Dongsan Medical Center²⁾*

Objective: It is well established that manganese neurotoxicity is associated with clinical symptoms similar to those of idiopathic Parkinson's disease. Recent research has shown that the exposure to manganese (MnCl₂) leads to induction of iNOS in BV2 microglial cells via iNOS transcriptional up-regulation and activation of both MAPKs and PI3K/Akt signaling pathways. Here, we further investigated the effect and the action mechanism of MnCl₂ on iNOS expression in C6 glioma cells.

Methods: Western blot analyses demonstrated that treatment with MnCl₂ at 250 μM was sufficient to induce iNOS at both the protein and mRNA levels in C6 cells.

Results: These studies demonstrated that the induction of iNOS protein and mRNA was visible after 4 h- and 2 h-treatment with MnCl₂, respectively. MnCl₂ treatment led to strong phosphorylation of JNKs and ERKs, members of MAP kinases (MAPKs), and Akt, a PI3-kinase (PI3K) downstream effector, in C6 cells. MnCl₂ treatment had no effect on IκB-α in C6 cells. Notably, pretreatment with LY294002 (a PI3K inhibitor), which inhibited phosphorylation of Akt by MnCl₂, caused strong suppression of MnCl₂-induced iNOS protein and mRNA expression in C6 cells. Moreover, pretreatment with SP600125 (an inhibitor of JNKs) and PD98050 (an inhibitor of ERKs), which respectively interfered with MnCl₂-mediated phosphorylation of JNKs and ERKs, led to the partial suppression of MnCl₂-induced iNOS protein. Interestingly, pretreatment with LY294002 inhibited phosphorylation of not only Akt, but also ERKs and JNKs, in response to MnCl₂. Moreover, there was an effective suppression of MnCl₂-mediated phosphorylation of AKT by SP600125.

Conclusion: These results collectively suggest that MnCl₂ induces iNOS expression in C6 glioma cells via activation of PI3K/Akt and JNK-ERK MAPK signaling proteins, whose activations seem to be mutually interconnected in response to MnCl₂.

Key Words: Manganese, Inducible nitric oxide synthase, C6 glioma cells

서 론

망간은 중추신경계의 정상적인 생화학적 작용과 세포의 작용에 필수 미량원소로서¹⁾ 뇌에 분포하는 망간의 80%는 mitochondrial superoxide dismutase, glutamine synthase, calmodulin-dependent phosphatase, calcineurin, pyruvate carboxylase 등의 보조인자로 존재하며^{2,3,4)} 인테그린과의 상호작용에 의해서 신경돌기 생성의 조절에 관여한다⁵⁾.

망간의 노출원으로는 철강, 용접, 건전지 분극제에 의한 직업적 노출이 있으며, 최근에는 자동차 연료 첨가제로 이용되는 methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT)에 의한 망간 노출도 문제시 되고 있다^{6,7)}. 만성적으로 망간에 노출이 되면 운동기능 감소증, 근긴장이상, 경직, 진전, 심각한 보행 장애 등의 신경독성 증상이 나타나며, 이러한 증상은 파킨슨병과 유사한 것으로 알려져 있다⁸⁾.

망간의 신경세포 손상기전은 여러 인자들이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며, 지금까지 잘 알려진 손상의 기전은 망간이 세포내 사립체에 축적되어 사립체 내의 칼슘이온의 유입을 증가시켜 세포손상에 관여하며, 도파민의 자가산화와 망간에 의한 반응성 산소종의 생성 자극, 등의 가설이 제시되고 있다⁹⁾. 또한 망간 신경독성이 nitric oxide (NO) 산물의 증가로 미세교세포 (microglial cell)와 성상교세포(astroglial cell)의 활성화를 초래하며, 인접 신경세포의 손상을 일으킨다는 보고가 있으나^{10,11)} 망간에 의한 신경세포의 손상기전은 아직까지 확실히 알려진 것은 없다.

중추신경계에서 대식세포와 같은 면역세포의 기능을 담당하는 신경교세포는 중추 신경계의 신경보호에 중요한 역할을 하지만, 뇌 허혈과 신경독성물질에 노출 시 임파구 등의 염증반응세포에 의해 분비된 사이토카인과 같은 물질에 의해 활성화되어 NO와 그 분해산물(OONO-, NO₂, NO₂-)을 생성하여 신경세포의 사멸을 매개한다^{12,13)}.

망간의 신경독성의 작용은 기저핵에 선택적으로 축적되거나, 신경세포에 직접적인 작용을 하여 정상세포 기능부전 또는 신경전달물질 불균형을 일으키는데 관련되어 있다는 연구보고가 있다^{14,15,16)}.

망간은 산소자유기에 의해 3가 망간이온(Mn³⁺)으로 산화되어 신경세포에 독작용을 일으키며¹⁵⁾ 또한 과산화이온, 하이드록시 라디칼, 과산화 수소 등과 같은 반응성 산소종의 생성을 증가시키고, 도파민이나 카테콜아민을 산화시켜 신경세포에 독성을 일으킨다^{17,18)}.

NO 생성효소인 nitric oxide synthase (NOS)는 정상 대식세포에서는 발현되지 않으나 염증이 각종의 유해인자에 의한 조직손상이 발생할 경우에 활성화된 대식

세포에서 발현되는 inducible NOS (iNOS), 정상 신경세포에서 항상 발현되는 neuronal NOS (nNOS)와 정상 혈관의 내피세포에서 항상 발현되는 endothelial NOS (eNOS)등 3가지의 동종효소가 알려져 있다^{19,20)}. nNOS와 eNOS는 항상 세포내에 존재하는 constitutive NOS (cNOS)로 알려져 있으며, Ca²⁺에 의존적인 반면, iNOS는 유도 단백질이며 Ca²⁺에 비의존적이다²⁰⁾. iNOS는 nNOS와 eNOS에 비하여 많은 양의 NO를 생성하며¹⁹⁾ 여러 가지 질소화합물을 만들어 세포독성 작용을 나타내어 세포괴사 뿐만 아니라 세포자멸사를 유도한다고 알려져 있다^{19,21)}.

신경계에 작용하는 brain type의 NOS는 특정신경세포에 항상 존재하며 신경세포가 자극을 받아서 세포내에 Ca²⁺이 증가하게 되면 활성화되어서 소량의 NO를 합성하게 되며 이 NO가 주위로 확산되어 신경전달의 역할을 하고, 어떤 병적인 상태로 인해 N-methyl-D-aspartate 수용체를 통해 다량의 Ca²⁺이 신경세포내 유입되면 많은 양의 NO가 생성되어 신경세포에 손상을 미칠 수 있다²²⁾.

건강한 뇌의 정상세포에서는 iNOS가 발현되지 않으나 허혈성, 외상성, 신경독성, 혹은 염증성 손상으로 설치류와 인간의 반응성 성상교세포에서 iNOS를 발현한다²³⁻²⁷⁾.

뇌를 구성하는 조직은 뇌의 핵심적 기능을 신경세포와 신경세포들을 지지해주고 도와주는 교세포(glial cell)로 구분하며, 대부분의 축내 종양은 이들 세포 중 교세포에서 주로 기원하며 이를 신경아교종(glioma)이라고 한다. 신경교종은 원발성 뇌종양의 약 50%를 차지하고 있으며, 성상세포종은 원발성 뇌종양의 약 25%로 가장 흔히 볼 수 있다.

교세포 염증반응들이 파킨슨병의 병리과정이나 악화과정에 관련성이 있으나²⁸⁾ 정확한 기전이 알려져 있지 않으나, 교세포에서 유도된 NO가 최근 파킨슨병의 모델로서 보고되고^{29,30)} 있으므로, 이 연구에서는 쥐의 성상교세포종 세포주인 C6 신경아교종 세포에서 iNOS 발현을 통한 망간의 세포독성효과와 작용기전에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

1. C6 신경아교종 세포주 배양

C6 신경아교종 세포주 배양에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Hyclone, Utah, USA)과 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Hyclone, Utah, USA)을 첨가한 DMEM (Hyclone, Utah, USA) 배지를 사용하였으며, 37℃와 5% CO₂가 유지된 상태에서 배양하였다. 세포가 100 mm plate 바

닥에 80% 정도 찾을 때 1×Trypsin-EDTA (Invitrogen corporation Gibco, NY, USA)로 세포를 떨어뜨린 후 세포를 Hemocytometer로 count하여, 6 well plate에 5×10^6 cells/well가 되게 2 mL씩 분주하였다.

실험에 사용한 시약은 manganese chloride (MnCl₂, Sigma, Missouri, USA)와 저해제 SP600125 (Biomol, PA, USA), PD98059 (Biomol, PA, USA), LY294002 (Biomol, PA, USA)이다.

2. 단백질 추출

세포를 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)로 씻어준 다음 회수하고 세포용해완충액(50 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 0.1% SDS), Protease inhibitor cocktail (1×), 1 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L NaF, 1 mmol/L 2-glycerophosphate)을 혼합하여 넣고 얼음에서 30분간 둔 후 4 °C, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다.

3. Western blot analysis

Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, CA, USA)을 사용하여 추출된 단백질을 정량하여 농도를 구하였다. 일정량(40 µg/lane)의 단백질을 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel) 전기영동 후 nitrocellulose membrane (Milipore Co. Bedford, MA)으로 전기이동을 실시하였다. 그 다음 membrane을 5% skim milk가 함유된 TBS-T용액(20 mM Tris (pH7.5), 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20)에 1시간 이상 두어 blocking 한 후 TBS-T용액으로 1번 수세하고 일차항체를 12시간, 이차항체를 2시간 반응 시킨 후 ECL Western detection reagents (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 특정 단백질의 발현을 검출하였다. 일차항체는 iNOS (Upstate, NY, USA), β-actin (Sigma, Missouri, USA), phospho-Akt (p-Akt, Cell Signaling, MA, USA), phospho-extracellular signal regulated kinases (p-ERKs, Cell Signaling, MA, USA), phospho-Jun-N-terminal kinases (p-JNKs, Cell Signaling, MA, USA), inhibitory kappa B-alpha (I κ B- α , Cell Signaling, MA, USA)을 각각 1:2000으로 희석하여 사용하였으며, 이차항체로서 Anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) 또는 Anti-mouse IgG (Amersham Biosciences, Bucking-

hamshire, UK)를 1:2000으로 희석하여 사용하였다.

4. Total RNA 분리 및 역전사 증합효소연쇄반응

Total RNA는 Tri Reagent kit (Mrcgene, Cincinnati, USA)를 이용하여 분리하였다. 분리한 total RNA 3 µg을 M-MLV Reverse Transcriptase 5×reaction buffer (Promega, Madison, USA) 6 µL, 10 mM dNTP Mix (Promega, Madison, USA) 3 µL, 2,500 U Ribonuclease inhibitor (Promega, Madison, USA) 0.45 µL, 10,000 U M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA) 0.3 µL와 50 pmol/µL oligo dT (Bioneer, Chungbuk, Korea) 1.5 µL를 넣어 총 30 µL로 역전사(reverse transcription)를 시행하였다. 역전사로 만들어진 cDNA 1 µL에 10×Reaction buffer (JMR Holdings, London, UK) 2.5 µL, 10 mM dNTP Mix (Finnzymes, Espoo, Finland) 0.6 µL, 1,000 U Super-Therm Polymerase (JMR Holdings, London, UK) 0.2 µL와 rat iNOS, GAPDH의 10 pmol/µL sense와 antisense primer (Bioneer, Chungbuk, Korea)를 각 0.6 µL 씩 넣어 총 25 µL로 Rat iNOS는 94°C에서 1분간 denaturation, 54°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 조건에서 30 cycle을, GAPDH는 94°C에서 30초간 denaturation, 57°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 조건에서 18 cycle을 증합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 자동화기계 Gene-Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, Foster City, CA)에서 PCR을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel에 전기영동 하여 크기를 확인 하였다. Rat iNOS의 primer의 염기 서열은 sense의 경우 5'-CTC CTT CAA AGA GGC AAA AAT A-3', antisense의 경우 5'-CAC TTC CTC CAG GAT-3'이며 증폭된 PCR 산물의 크기는 729 bp이다. GAPDH의 염기 서열은 sense의 경우 5'-GGT GAA GGT CGG TGT GAA CG-3', antisense의 경우 5'-GGT AGG AAC ACG GAA GGC CA-3'이며 증폭된 PCR 산물의 크기는 703 bp이다.

결 과

1. C6 신경아교종 세포주에서 망간에 의한 iNOS 발현

C6 신경아교종 세포에 MnCl₂를 농도별로 처리하여 망

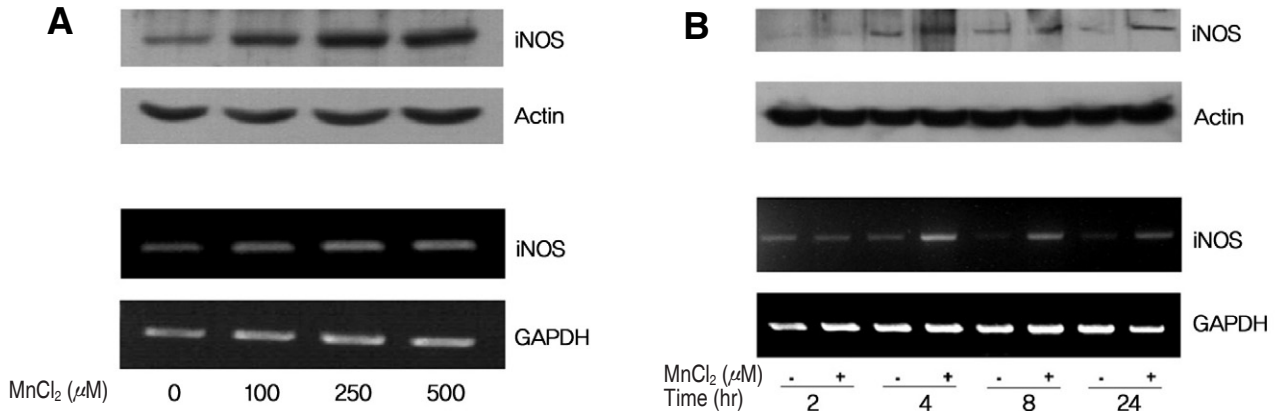


Fig. 1. Induction of iNOS by MnCl₂ in C6 glioma cells. (A) C6 glioma cell were treated with the indicated concentrations of MnCl₂ for 9 hr. Whole cell lysates and total RNA were prepared, and used for iNOS or actin immunoblot and iNOS or GAPDH RT-PCR, respectively. (B) C6 glioma cells were treated with MnCl₂ in the indicated times. At each time, whole cell lysates and total RNA prepared were used for immunoblot and RT-PCR, respectively.

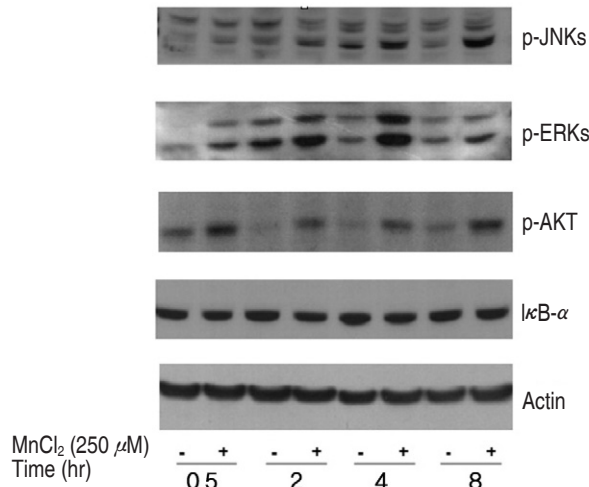


Fig. 2. Activation of JNK, ERK, Akt, but not NF- κ B by MnCl₂ in C6 glioma cells. C6 glioma cells were treated with or without MnCl₂ for the indicated times. At each time, whole cell lysates were prepared and used for p-JNKs, p-ERKs, p-Akt, I κ B- α or actin immunoblot using respective antibodies. p-JNKs, phospho-JNKs; p-ERKs, phospho-ERKs; p-Akt, phospho-Akt.

간에 의해 iNOS가 유도되는지 알아보았다. RT-PCR에서 MnCl₂ 농도 100 μ M 이상에서 iNOS mRNA의 발현 증가를 볼 수 있었으며, iNOS 단백질의 발현은 MnCl₂ 농도 100 μ M 이상에서 농도 증가에 따른 iNOS 단백질의 발현 증가를 볼 수 있었다(Fig. 1A).

C6 신경아교종 세포에 MnCl₂를 농도 250 μ M로 처리하여 시간에 따른 망간에 의한 iNOS의 발현을 알아보았다. MnCl₂ 처리 후 4시간, 8시간, 24시간에서 iNOS mRNA의 발현을 볼 수 있었으며, MnCl₂의 처리 시간이 증가됨에 따라 iNOS mRNA 유전자의 발현도 증가하는 것을 볼 수 있었다. iNOS 단백질의 경우 MnCl₂의 처리 후 4시간, 8시간, 24시간에서 iNOS 단백질의 발현을 볼 수 있었으

며, MnCl₂의 처리 시간이 증가됨에 따라 iNOS 단백질의 발현도 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1B).

2. C6 신경아교종 세포주에서 망간에 의한 신호전달 단백질의 인산화

iNOS 발현에 연관된 신호 전달 단백질을 알아보기 위해서 C6 신경아교종 세포주에 MnCl₂를 농도 250 μ M로 처리하여 시간에 따른 JNKs, ERKs, Akt의 인산화 활성을 본 결과 JNKs, ERKs, Akt의 시간에 따른 인산화 활성을 보였다. 반면 MnCl₂ 처리 시간에 따른 I κ B- α 분해는 보이지 않았다. JNKs는 망간 처리 후 4시간과 8시간에서 강한 인산화 활성을 보였으며, ERK는 30분, 2시간과 4시간에서 강한 인산화 활성을, Akt는 망간 처리 30분 후에 강한 인산화 활성을 보였다(Fig. 2).

3. 저해제에 의한 iNOS 발현 억제작용과 신호전달 단백질의 인산화 활성 억제작용

신호 전달 단백질의 저해제로 20 μ M SP600125 (JNK 저해제), 50 μ M PD98059 (ERK 저해제), 20 μ M LY294002 (Akt 저해제)를 각각 1시간 전 처리하고 MnCl₂를 농도 250 μ M로 처리한 후 iNOS 발현과 신호 전달 단백질의 인산화 활성을 본 결과 SP600125, PD98059, LY294002 모두에서 iNOS mRNA의 발현과 iNOS 단백질의 발현을 억제 시키는 것을 볼 수 있었으며, 특히 LY294002에서 가장 강한 억제 작용을 볼 수 있었다(Fig. 3). 한편, 각 신호 전달 단백질의 저해제 (20 μ M SP600125, 50 μ M PD98059, 20 μ M LY294002)를 1시간 전 처리하고 MnCl₂를 농도 250 μ M로 처리한 후 JNKs, ERKs, Akt의 인산화 활성을 본 결과 SP600125는 JNKs와 Akt의 인산화 활성 억제

를 보였으며, PD98059는 ERKs의 인산화 활성 억제제, LY294002는 JNKs, ERKs, Akt 모두에서 인산화 활성 억제제를 보였다(Fig. 4).

고 찰

망간은 중추신경계에서 mitochondrial superoxide dismutase⁴⁾ glutamine synthase²⁾ phosphoenolpyruvate carboxylkinase³¹⁾ 등 효소의 정상적인 기능에 중요한 역할을 하는 필수 원소로 알려져 있다³²⁾. 그러나 망간에 의해 만성적으로 노출이 되면 신경독성을 일으키며, 이러한 신경독성은 망간이 미세교세포나 성상교세포와 같은 교세포를 활성화하여 NO 생성을 증가시켜 일어난다는 보고가 있다^{10,11)}.

홍분독성의 손상에 따른 교세포에서의 iNOS의 생성은 glutamate와 interferon- γ , tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β 와 같은 염증성 사이토카인이 관여하여 나타난다는 보고가 있으며^{33,34)} 이러한 요소는 망간중독증의 손상 기전과 관련되어 있을 것으로 추측된다. 왜냐하면 망간에 노출되면 성상교세포 내 미토콘드리아의 기능이상과 glutamate 생성의 증가와 관련되어 홍분독성의 손상을 일으키기 때문이다^{35,36)}.

이 연구에서는 쥐의 성상교세포종 세포주인 C6 신경아교종 세포에 망간을 처리하여 iNOS의 발현을 통한 망간의 세포독성효과와 작용기전에 대해서 알아보았다.

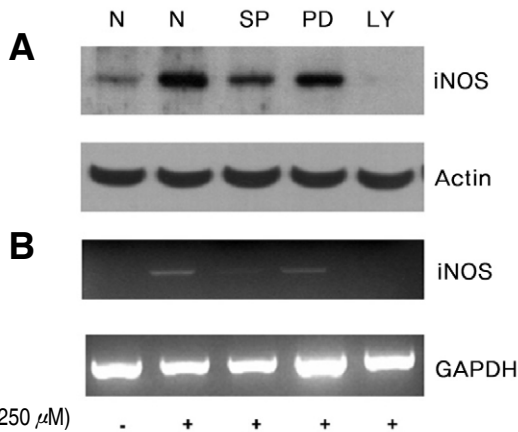


Fig. 3. Effects of SP600125, PD98059 or LY294002 on MnCl₂-induced iNOS expression in C6 glioma cells. (A) C6 glioma cells pretreated for 1 hr with SP600125 (20 μM), PD98059 (50 μM) or LY294002 (20 μM) were treated with MnCl₂ for 9 hr. Whole cell lysates prepared were analyzed by immunoblot to detect iNOS or actin. (B) C6 glioma cells pretreated for 1 hr with SP600125, PD98059 or LY294002 were treated with MnCl₂ for 9 hr. Total RNAs were prepared and analyzed for iNOS or GAPDH RT-PCR. N, no inhibitor; SP, SP600125 (JNK inhibitor); PD, PD98059 (ERK inhibitor); LY, LY294002 (Akt inhibitor).

C6 신경아교종 세포주에서 망간에 의해 iNOS mRNA 및 iNOS 단백질이 발현되었으며, 이 결과로 보아 망간에 의해 iNOS의 mRNA와 단백질 발현이 증가된다는 것을 확인 할 수 있었다. 망간에 의한 iNOS의 발현이 JNK-ERK MAPK와 PI3K/Akt 신호 경로의 활성화와 관련되어 있는 것을 확인 할 수 있었다. 최근 Bae 등³²⁾의 연구에서 BV2 미세교 세포주에 망간 처리 시 iNOS mRNA와 단백질이 발현되었으며, JNK-ERK MAPK와 PI3K/Akt 신호 경로에서의 활성화가 iNOS의 발현과 깊은 관련이 있다고 보고되었다. 이 결과는 교세포에서의 망간에 의한 iNOS 발현은 여러 신호 전달 단백질의 활성화에 의해 일어나는 것을 알 수 있다.

Barhouni 등¹⁾은 망간이 미토콘드리아의 반응성 산소종의 증가와 NF- κ B의 활성화에 의해 C6 신경아교종 세포주에서 lipopolysaccharide (LPS)가 유도하는 iNOS의 발현을 증가시킨다고 보고 하였으며, 망간이 JNK-ERK MAPK의 인산화를 증가시킨다고 보고하였는데, 이러한 결과는 이번 연구 결과와 동일하였다. 망간에 의해 I κ B- α 의 인산화가 증가되며, LPS에 의한 I κ B- α 의 인산화의 증가는 2시간에서 최대를 보이며, 망간과 LPS에 의한 I κ B- α 의 인산화가 LPS 단독 처리 시 보다 더 많은 증가를 초래한다고 보고 하였다. 이번 연구에서는 망간에 의한 I κ B- α 의 인산화 및 분해는 일어나지 않았다.

Shinoda 등³⁷⁾은 C6 신경아교종 세포에 LPS, TNF- α , LPS와 TNF- α 를 처리하여 NO 생성을 본 결과 TNF- α 만 처리 하였을 때는 NO 생성을 볼 수 없으며, LPS, LPS와 TNF- α 를 처리 하였을 때 iNOS mRNA 발현이 증가 한다고 보고 하였다.

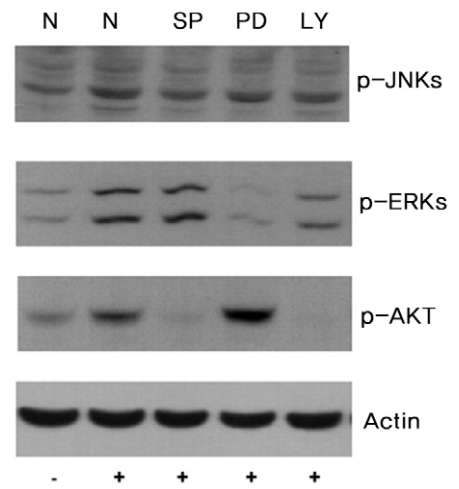


Fig. 4. Effects of SP600125, PD98059 or LY294002 on activation of JNK, ERK or Akt by MnCl₂ in C6 glioma cells. C6 glioma cells pretreated for 1 hr with SP600125 (20 μM), PD98059 (50 μM) or LY294002 (20 μM) were treated with MnCl₂ for 4 hr. Whole cell lysates prepared were analyzed by immunoblot to detect p-JNKs, p-ERKs, p-Akt or actin.

신경세포에 독성작용을 일으키는 NO는 NOS의 저해제에 의한 억제작용으로 NO의 분비를 감소하여 망간 신경독성 치료제로 활용할 수 있을 것으로 생각된다. iNOS 단백질과 JNK-ERK MAPK와 PI3K/Akt 신호 단백질에서 JNK 저해제, ERK 저해제, PI3K/Akt 저해제에 의한 억제 작용을 본 결과 PI3K/Akt 저해제가 iNOS 발현을 강하게 억제하는 것으로 나타났으며, JNK 저해제, ERK 저해제에서도 iNOS 발현을 억제하였다. JNK-ERK MAPK와 PI3K/Akt 신호 단백질에서 P-JNKs는 JNK 저해제와 PI3K/Akt 저해제에서, P-ERKs는 ERK 저해제와 PI3K/Akt 저해제에서, P-Akt는 JNK 저해제와 PI3K/Akt 저해제에서 강한 억제 작용을 볼 수 있었다. 이 결과에서 PI3K/Akt 저해제가 망간에 의한 iNOS의 발현과 신호 전달 단백질의 인산화 증가에 강한 억제를 한다는 것을 알 수 있다.

Bae 등³²⁾의 연구보고에 의하면 BV2 미세교 세포주에서 망간에 의해 발현된 iNOS mRNA와 단백질이 JNK 저해제, ERK 저해제, PI3K/Akt 저해제에 의해 JNK 저해제, ERK 저해제, PI3K/Akt 저해제 모두에서 억제 작용을 나타낸다고 보고하고 있으며, 이 연구의 결과와 비슷한 기전을 나타낸다는 것을 알 수 있다. 이러한 연구 결과는 망간이 신경세포를 지지해주고 도와주는 역할을 하는 교세포인 미세교세포 뿐 만 아니라 신경아교종세포의 활성화를 통하여 신경독성 물질인 NO를 매개로 하여 신경독성을 일으킨다는 것을 알 수 있었다. 그러나 쥐의 뇌 교세포 일차배양에서는 망간이 iNOS 발현을 유도하지 않았다는 연구보고³³⁾는 이번 연구와는 상반된 결과로서 망간은 모든 교세포에서 iNOS를 통하여 독성효과를 나타내는 것이 아니며, 망간은 다양한 경로를 통해 교세포 염증작용을 조절하는 것으로 생각된다.

이 실험의 결과를 요약하면 망간은 C6 신경아교종 세포주에서 iNOS mRNA와 단백질의 발현을 유도하며, JNK-ERK MAPK와 PI3K/Akt 신호 경로의 인산화를 활성화 하였다. 그러나 JNK 저해제, ERK 저해제, Akt 저해제는 망간에 의한 iNOS 발현을 억제 하였다. 흥미로운 점은 PI3K/Akt의 저해제 LY 처리에 따른 망간에 의한 iNOS mRNA와 단백질의 발현 억제 및 여러 신호전달 단백질의 활성 억제 작용이 나타난 것이다.

결론적으로 C6 신경아교종 세포주에서 망간에 의해 유도되는 iNOS 발현은 JNK-ERK MAPK와 PI3K/Akt 신호 경로에 의해서 이루어지며, 망간 자극에 의한 iNOS 발현은 전사의 준위로 조절된다. 앞으로 iNOS 발현을 억제하는 저해제에 대한 실험이 더 필요하며 과발현된 iNOS의 저해가 망간 신경독성의 치료에 중요한 치료법의 표적이 될 것으로 생각된다.

이 연구에서는 신경아교종 세포에 망간을 2~4시간 처

리함으로써 망간의 만성독성효과인 신경독성을 설명하는데 제한점이 될 수 있으므로 망간의 농도를 저 농도로 장시간 처리함으로써, 망간의 만성독성에 대한 효과를 밝혀야 하며, 또한 NO를 직접 측정하여 망간의 세포독성효과와 작용기전을 설명하여야 할 것으로 생각된다.

요 약

목적: 망간 신경독성은 파킨슨병의 임상 증상이 유사하다고 알려져 있다. 최근 연구에 따르면 망간의 노출은 iNOS 전사의 상향조절과 MAPKs와 PI3K/Akt 신호경로의 활성화에 의해 BV2 미세교 세포주에서 iNOS 생성을 유도한다는 보고가 있다. 이 연구에서는 신경아교종 세포주에서 iNOS의 발현에 망간의 세포독성효과와 작용 기전에 대해 조사하였다.

방법: C6 신경아교종 세포주에 망간 처리 2시간과 4시간 후 iNOS 단백질과 mRNA의 발현을 측정하였다.

결과: C6 신경아교종 세포주에 망간을 처리하여 신호 전달 단백질의 활성화를 본 결과 JNKs, ERKs, the PI3-kinase (PI3K) downstream effector Akt의 강한 인산화를 볼 수 있었다. 반면 망간 처리 시간에 따른 $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ 분해는 보이지 않았다. JNK 저해제, ERK 저해제, PI3K/Akt 저해제를 전 처리 후 iNOS 단백질의 발현과 JNK-ERK MAPK와 PI3K/Akt 신호 단백질의 활성화 억제 작용을 본 결과 PI3K/Akt 저해제가 iNOS 발현을 강하게 억제하는 것으로 나타났으며, JNK 저해제, ERK 저해제에서도 약한 iNOS 발현의 억제작용을 볼 수 있었다. JNK-ERK MAPK와 PI3K/Akt 신호 단백질에서 p-JNKs는 JNK 저해제와 PI3K/Akt 저해제에서 억제작용을 나타냈으며, p-ERKs는 ERK 저해제와 PI3K/Akt 저해제에서 나타났으며, p-Akt는 JNK 저해제와 PI3K/Akt 저해제에서 강한 억제작용을 볼 수 있었다. 이 결과에서 PI3K/Akt 저해제가 망간에 의한 iNOS의 발현과 여러 신호 전달 단백질의 활성화에 강한 억제작용을 한다는 것을 알 수 있다.

결론: 이 실험의 결과로 미루어 보아 C6 신경아교종 세포주에서 망간에 의해 유도되는 iNOS 발현은 JNK-ERK MAPK와 PI3K/Akt 신호 경로에 의해서 이루어지는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Barhoumi R, Faske J, Liu X, Tjalken RB. Manganese potentiates lipopolysaccharide-induced expression of NOS2 in C6 glioma cells through mitochondrial-dependent activation of nuclear factor kappaB. Mol Brain Res

- 2004;122(2):167-79.
- 2) Wedler FC, Denman RB. Glutamine synthetase: The major Mn(II) enzyme in mammalian brain. *Curr Top Cell Regul* 1984;24:153-69.
 - 3) Wingrove DE, Gunter TE. Kinetics of mitochondrial calcium transport. I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria. *J Biol Chem* 1986;261(32):15159-65.
 - 4) Hearn AS, Stroupe ME, Cabelli DE, Ramilo CA, Luba JP, Tainer JA, Nick HS, Silverman DN. Catalytic and structure effects of amino acid substitution at histidine 30 in human manganese superoxide dismutase: insertion of valine C gamma into the substrate access channel. *Biochem* 2003;42(10):2781-9.
 - 5) Ivins JK, Yurchenco PD, Ladder AD. Regulation of neurite out-growth by integrin activation. *J Neurosci* 2000; 20(17):6551-60.
 - 6) Roels H, Lauwerys R, Genet P, Sarhan MJ, de Fays M, Hanotiau I, Buchet JP. Relationship between external and internal parameters of exposure to manganese in workers from a manganese oxide and salt producing plant. *Am J Ind Med* 1987;11(3):297-305.
 - 7) Sjögren B, Iregren A, Frech W, Hagman M, Johansson L, Tesarz M, Wennberg A. Effects on the nervous system among welders exposed to aluminum and manganese. *Occup Environ Med* 1996;53(1):32-40.
 - 8) Pal PK, Samii A, Calne DB. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology* 1999;20(2-3):227-38.
 - 9) Graham DG. Catecholamine toxicity: a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and parkinson's disease. *Neurotoxicol* 1984;5:83-96.
 - 10) Chang JY, Liu LZ. Manganese potentiates nitric oxide production by microglia. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;68(1-2):22-8.
 - 11) Spranger M, Schwab S, Desiderato S, Bonmann E, Krieger D, Fandrey J. Manganese augments nitric oxide synthesis in murine astrocytes: a new pathogenetic mechanism in manganese? *Exp Neurol* 1998;149(1):277-83.
 - 12) Barron KD. The microglial cell: A historical review. *J Neurol Sci* 1995;134 Suppl:57-68.
 - 13) Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxide mediate neuronal cell death. *Brain Res* 1992;587(2):250-6.
 - 14) Aschner M. Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environ Health Perspect* 2000;108(Suppl 3):429-32.
 - 15) Aschner M, Aschner JL. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport. *Neurosci Biobehav* 1991;Rev.15(3):333-40.
 - 16) Verity MA. Manganese neurotoxicity: a mechanistic hypothesis. *Neurotoxicology* 1999;20(2-3):489-97.
 - 17) Breneman KA, Cattilley RC, Ali SF, Dorman DC. Manganese-induced development neurotoxicity in the CD rat: Is oxidative damage a mechanism of action? *Neurotoxicology* 1999;20(2-3):477-87.
 - 18) Desole MS, Sciola L, Delogu MR, Sircana S, Migheli R. Manganese and 1-methyl-4-(2-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine induce apoptosis in PC12 cells. *Neurosci Lett* 1996;209(3):193-6.
 - 19) Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996;12(4):274-7.
 - 20) Dawson TM, Zhang J, Dawson VL, Snyder SH. Nitric oxide: cellular regulation and neuronal injury. *Prog Brain Res* 1994;103:365-9.
 - 21) Suk K, Lee J, Hur J, Kim YS, Lee M, Cha S, Yeou Kim S, Kim H. Activation-induced cell death of rat astrocyte. *Brain Res* 2001;900(2):342-7.
 - 22) Kader A, Frazzini VI. Nitric oxide Production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993;24(11):1709-16.
 - 23) Galea E, Feinstein DL, Reis DJ. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(22):10945-9.
 - 24) Hu S, Sheng WS, Peterson PK, Chao CC. Differential regulation by cytokines of human astrocyte nitric oxide production. *Glia* 1995;15(4):491-4.
 - 25) Pahan K, Namboodiri AM, Sheikh FG, Smith BT, Singh I. Increasing cAMP attenuates induction of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes. *J Biol Chem* 1997;272(12):7786-91.
 - 26) Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophage. *J Clin Invest* 1997;100(11):2671-9.
 - 27) Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. Inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A differentially regulate the expression of inducible nitric-oxide synthase in rat astrocytes and macrophage. *J Biol Chem* 1998; 273(20): 12219-26.
 - 28) Irvani MM, Kashefi K, Mander P, Rose S, Jenner P. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience* 2002;110:49-58.
 - 29) Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A, Czlonkowska A. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP). *Immunopharmacology* 1998;39:167-180.
 - 30) Shere TB, Betarbet R, Kim JH, Greenamyre JT. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2003;341:87-90.
 - 31) Bentle LA, Lardy HA. Interaction of anions and man-

- ganese with PEP carboxylase. *J Biol Chem* 1976;251(10): 2916-21.
- 32) Bae JH, Jang BC, Suh SI, Ha EY, Baik HH, Kim SS, Lee MY, Shin DH. Manganese induces inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via activation of both MAP kinase and PI3K/Akt pathways in BV2 microglial cells. *Neuroscience Letters* 2006;398(1-2):151-4.
- 33) Cardenas MA, Moro O, Hurtado JC, Leza P, Lorenzo A, Castrillo OG, Bodelon L, Bosca L, Lizasoain I. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem* 2000;74(5):2041-8.
- 34) Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci* 1999;19(9):3440-7.
- 35) Brouillet EP, Shinobu L, McGarvey U, Hochberg F, Beal MF. Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp Neurol* 1993;120(1):89-94.
- 36) Zwingmann C, Leibfritz D, Hazell AS. Energy metabolism in astrocytes and neurons treated with manganese: relation among cell-specific energy failure, glucose metabolism, and intercellular trafficking using multinuclear NMR-spectroscopic analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(6):756-71.
- 37) Shinoda J, Mclaughlin KE, Helen S. Bell HS, Swaroop GR, Yamaguchi SI, Holmes MC, Whittle IR. Molecular mechanism underlying dexamethasone inhibition of iNOS expression and activity in C6 glioma cells. *Glia* 2003;42(1):68-76.
- 38) Chen CJ, Ou YC, Lin SY, Liao SL, Chen SY, Chen JH. Manganese modulates pro-inflammatory gene expression in activated glia. *Neurochem International* 2006;49:62-71.