원 저

콜레스테롤 산화생성물에 의해 유발된 뇌 Synaptosome 기능이상에 미치는 Tyrphostin AG126의 억제 효과

서울 보훈병원 신경과, 중앙대학교 의과대학 약리학교실[a]

홍기무 한정호 김두응 송진호[a] 이정수[a]

Inhibitory Effect of Tyrphostin AG126 on Brain Synaptosomal Dysfunction Induced by Cholesterol Oxidation Products

Ki-Moo Hong, MD, Jeong-Ho Han, MD, Doo-Eung Kim, MD,
Jin-Ho Song, PhD[a], Chung-Soo Lee, MD[a]

Department of Neurology, Seoul Veterans Hospital, Seoul, Korea
Department of Pharmacology[a], College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Background: Formation of cholesterol oxidation products is a suggested mechanism of neurodegenerative disorders. Neuronal cell death is mediated by an increased release of excitotoxic glutamate from the presynaptic nerve endings. Tyrosine-specific protein kinases modulate neurotransmitter release at the nerve terminals. Tyrphostin AG126 has anti-inflammatory and cytoprotective effects. However, it remains uncertain whether tyrphostin AG126 has a preventive effect on the alteration of nerve terminal function induced by cholesterol oxidation products.
Methods: The present study was performed to assess the effect of cholesterol oxidation products against nerve terminal function using synaptosomes isolated from rat cerebrum. We determined the preventive effect of tyrphostin AG126 against oxysterol toxicity by measuring the effects on the glutamate release, depolarization of the membrane potential, changes in Ca^{2+} levels, and Na^+/K^+-ATPase activity.
Results: Synaptosomes treated with 7-ketocholesterol or 25-hydroxycholesterol exhibited a sustained release of glutamate, depolarization of membrane potential, early rapid increase in cellular Ca^{2+} levels and decrease in Na^+/K^+-ATPase activity. Those responses were concentration-dependent. Treatment of tyrphostin AG126 interfered with alteration of synaptosomal functions and decrease in Na^+/K^+-ATPase activity induced by 7-ketocholesterol or 25-hydroxycholesterol.
Conclusions: The results show that 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol seem to cause the release of glutamate by inducing depolarization of the membrane potential and early rapid increase in cellular Ca^{2+} levels and by inactivating Na^+/K^+-ATPase in the cerebral synaptosomes. Treatment of tyrphostin AG126 may prevent the oxysterol-induced nerve terminal dysfunction.
J Korean Neurol Assoc 26(3):231-238, 2008

Key Words: Synaptosomes, Oxysterols, Tyrphostin AG126, Glutamate, Ca^{2+}, Na^+/K^+-ATPase

서 론

콜레스테롤 대사이상과 콜레스테롤 산화생성물(oxysterol)의 생성이 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환의 발병에 관여한다.[1,2] 뇌 조직의 산화적 손상에 따라 지질단백 입자의 산화가 이루어질 수 있다. 신경퇴행성 질환에서 저밀도지질단백(low density lipoprotein, LDL)을 산화시킬 수 있는 활

Received April 7, 2008 Revised June 30, 2008
Accepted May 26, 2008
* **Chung-Soo Lee, MD**
Department of Pharmacology, College of Medicine, Chung-Ang University, 221 Heuksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul, 156-756, Korea
Tel: +82-2-820-5659 Fax: +82-2-815-3856
E-mail: leecs@cau.ac.kr

www.kci.go.kr

성산소와 금속이온 농도의 증가가 관찰되며,[3] 산화된 LDL이 신경세포의 사멸을 일으킬 수 있다.[4,5] LDL이 산화되면 lipid hydroperoxide, aldehydes, 콜레스테롤 산화 생성물(7-keto-cholesterol, 25-hydroxycholesterol)이 생성된다.[6,7] 7-Keto-cholesterol과 25-hydroxycholesterol 같은 콜레스테롤 산화 생성물은 지질친화성 물질로서 세포막을 쉽게 통과하고, 세포 내에서 급속하게 고농도를 이루어 세포사멸을 일으킨다.[1,8] 콜레스테롤 산화생성물은 사립체 기능이상과[9,10] 칼슘항상성 붕괴를 야기하여 세포사멸 효과를 나타낸다고 알려져 있다.[10,11]

중추신경 신경말단에서 유리되는 신경전달물질은 생체 기능 유지에 중요한 역할을 한다. 신경말단이 탈분극화되면 전압의존성 칼슘 통로의 활성화로 칼슘 유입이 이루어지고 신경전달물질이 신경말단에서 시냅스 틈새로 유리된다.[12,13] 시냅스전 신경말단에서 유리된 신경흥분 독성물질 glutamate가 신경퇴행성 질환에서 신경세포손상과 사멸에 관여한다고 알려져 있다.[3,14] 신경계 질환에서 glutamate는 *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), kainate 수용체 등에 작용하여 사립체 손상과 산화적 스트레스를 유발하여 사포사멸을 일으킨다.[14,15]

Tyrosine 특이적 protein kinase도 신경세포의 생존 및 사멸에 주요 역할을 한다고 알려져 있다.[16-18] 단백질 tyrosine kinase는 시냅스에서 신경전달물질 유리에 조절 효과를 나타낸다. 추출된 신경말단 synaptosome에서 Src family tyrosine kinase 억제제인 PP1은 탈분극 작용을 가진 4-aminopyrine에 의해 야기된 칼슘 의존성 glutamate 유리에 자극 효과를 보인다.[19] 이와 달리, Src family tyrosine kinase 억제제인 PP2는 4-aminopyrine, ionomycin에 의해 야기된 glutamate 유리를 억제한다.[20,21]

Tyrosine kinase 억제제인 tyrphostin AG126는 HT-22 해마 세포주에서 glutamate에 의해 유발된 세포사멸을 억제한다.[16] Tyrphostin AG126은 항염증 및 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 생각된다.[22,23] 그러나 콜레스테롤 산화생성물 노출에 의해 야기되는 신경말단 기능이상에서 tyrphostin AG126의 효과는 밝혀지지 않고 있다. 이 연구의 목표는 대뇌 synaptosome을 이용하여 콜레스테롤 산화생성물(7-ketocholesterol, 25-hydroxycholesterol)이 신경말단 기능에 미치는 효과를 조사하고, 산화생성물 독성에 대한 tyrphostin AG126의 효과를 규명하는 데 있다. 또한 본 연구를 통하여 tyrphostin AG126이 콜레스테롤 산화생성물의 신경독성 작용을 효과적으로 방어하는 물질임을 밝히고자 하였다.

대상과 방법

1. 재료

Tyrphostin AG126 [(3-hydroxy-4-nitrobenzylidene) malononitrile], 7-ketocholesterol, 25-hydroxycholesterol, glutamate dehydrogenase, safranine O, fura-2-acetoxy-methyl ester, tris-ATP, Percoll과 기타 시약을 Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. Synaptosome 추출

수컷 Sprague Dawley 흰쥐(무게 약 150 g) 대뇌로부터 synaptosome을 추출하였다.[24,25] 추출 과정은 4℃의 실험 조건에서 이루어졌다. 적출한 대뇌를 9배의 320 mM sucrose, pH 7.4 용액에 넣고, 조직을 유리 균질화 기구로 균질화 한 다음, 균질액을 3000 g에서 2분 원심 분리하였다. 상청액을 14,500 g에서 12분 원심 분리하고, 얻어진 침전물을 8 ml의 320 mM sucrose, pH 7.4에 현탁시켰다. 현탁액을 3%, 10%, 23%의 Percoll로 구성된 분리 용액(3 ml: Percoll, 320 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.25 mM DL-dithiothreitol, pH 7.4) 위에 조심스럽게 쌓고 32,500 g에서 7분 원심 분리하였다. 10% Percoll과 23% Percoll band 사이에서 synaptosome을 얻고, HEPES 완충액(140 mM $NaHCO_3$, 1 mM $MgCl_2$, 1.2 mM NaH_2PO_4, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4)과 섞고 30 ml가 되게 한 다음 27,000 g에서 10분 원심 분리하였다. 침전물을 약 3 ml의 HEPES 완충액에 현탁하고, Bio-Rad 시약(Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다.

흰쥐는 Japan SLC, Inc. (Haruno Production Facility, Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 흰쥐의 관리, 사용 및 취급은 미국 NIH 기준(No. 80-23)과 대한의학회제정 동물실험지침(2000년)에 준하여 시행하였다. 흰쥐는 적정한 온도가 유지(25±1℃)되고 12시간 간격으로 낮과 밤이 조절되는 동물실에서 물과 사료를 공급하여 관리하였다.

3. Synaptosome에서 glutamate 유리의 측정

Synaptosome에서 유리된 glutamate가 glutamate dehydrogenase에 의해 산화적 탈아미노화 됨에 따라 $NADP^+$로부터 NADPH가 생성되는 것을 이용하여 형광광도계하에서 측정하였다.[25] Synaptosome 분획(0.5 mg 단백질 양/ml)을 16 μM

www.kci.go.kr

bovine serum albumin이 들어 있는 HEPES 완충액(140 mM $NaHCO_3$, 1 mM $MgCl_2$, 1.2 mM NaH_2PO_4, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4)에 현탁하고 이어서 tyrphostin AG126를 첨가하여 20분 전처리 후 7-ketocholesterol을 첨가하였다. 반응액에 2 mM $NADP^+$, 50 units/ml glutamate dehydrogenase, 1 mM $CaCl_2$를 연이어 첨가하고 fluorescence microplate reader (SPECTRAFLUOR, TECAN, Salzburg, Austria)에서 형광의 변화를 여기 파장 340 nm, 방출 파장 460 nm에서 측정하였다.

4. Synaptosome 막전위의 측정

Synaptosome 분획(0.5 mg 단백질 양/ml)을 16 μM bovine serum albumin이 들어 있는 HEPES 완충액(140 mM $NaHCO_3$, 1 mM $MgCl_2$, 1.2 mM NaH_2PO_4, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4)에 현탁하고 이어서 tyrphostin AG126를 첨가하여 20분 전처리 후 7-ketocholesterol을 첨가하였다. 반응액에 50 μM safranine O를 넣고 4분 반응시킨 후 1 mM $CaCl_2$를 넣고 다시 3분간 반응시켰다. 막전위의 변화에 따른 형광의 변화를 여기 파장 485 nm, 방출 파장 535 nm에서 측정하였다.[26]

5. Synaptosome Ca^{2+} 농도 변화의 측정

Synaptosome 분획(0.5 mg 단백질 양/ml)을 5 μM fura-2/AM, 16 μM bovine serum albumin이 들어 있는 HEPES 완충액(140 mM $NaHCO_3$, 1 mM $MgCl_2$, 1.2 mM NaH_2PO_4, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4)에 넣고 37℃에서 30분 반응시켜 fura-2를 부하시켰다. 이어서 tyrphostin AG126를 첨가하여 20분 전처리 후 7-ketocholesterol을 첨가하였다. Fura-2가 부하된 synaptosome 분획이 들어 있는 HEPES 완충액에 1 mM $CaCl_2$를 넣고 칼슘 농도 변화에 따른 형광의 변화를 여기 파장 360 nm, 방출 파장 505 nm에서 측정하였다.[25] 형광의 변화는 magnetic stirrer가 장착되어 있는 luminescence spectrophotometer (Aminco-Bowman Series 2, Aminco-Bowman, Rochester, NY, USA)에서 측정하였다.

6. Na^+/K^+ ATPase 활성 측정

Synaptosome 분획(0.1 mg 단백질 양/ml)을 반응액(100 mM NaCl, 20 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4)에 현탁시켰다. Synaptosome 분획에 tyrphostin AG126을 넣어 37℃에서 20분간 전처리 후 7-ketocholesterol를 첨가하고 30분 반응시켰다. 반응액에 tris-ATP(최종 농도 2 mM)를 첨가하여 반응액의 전량을 1 ml이 되게 한 후 37℃에서 10분 반응시켰다. 1 ml의 차가운 15% trichloroacetic acid를 넣어 반응을 종료시키고 반응액을 1000 g에서 10분 원심분리하였다. 상청액(1 ml)을 취하여 유리된 무기인(Pi)의 양을 측정하였다.[27,28] Na^+/K^+ ATPase 활성도는 nmol Pi liberated/mg protein/min으로 표시하였다.

7. 통계 분석

얻어진 자료를 일원배치 분산분석 처리하여 통계적 유의성을 검정하였다. 유의성이 검정되면 사후 검정으로 다자간 비교를 위한 Duncan's test를 하여 집단 간 유의성 비교를 하였다. 자료는 평균±표준오차로 표기하였다.

결 과

1. 대뇌 synaptosome에서 glutamate의 유리

콜레스테롤 산화생성물(7-ketocholesterol과 25-hydroxycholesterol)이 신경말단 기능에 나타내는 독성 효과를 추출된 신경말단 분획 synaptosome을 이용하여 분석하였다. Synaptosome에서 glutamate 기초 유리가 반응 시간에 따라 늘어나는 경향을 보였으며, 7-ketocholesterol로 처리하였을 때 신경흥분 독성 물질인 glutamate의 유리가 투여 농도, 노출 시간에 따라 증가하였다(Fig. 1). 100 μM 7-ketocholesterol로 60분간 처리하였을 때 glutamate 유리가 대조에 비하여 약 39% 증가하였다. 다른 콜레스테롤 산화생성물인 25-hydroxycholesterol도 synaptosome에서 glutamate 유리를 증가시켰다.

단백질 tyrosine kinase 억제제가 신경말단에서 콜레스테롤 산화생성물에 의해 유발된 glutamate 유리에 미치는 영향을 조사하였다. Tyrphostin AG126 (1-5 μM)은 100 μM 7-ketocholesterol과 25-hydroxycholesterol에 의해 유발된 glutamate 유리를 억제하였다(Fig. 2). 이러한 반응에서 tyrphostin AG126는 25-hydroxycholesterol 보다 7-ketocholesterol의 작용에 더 큰 억제 효과를 보였다. Tyrphostin AG126 (1-5 μM) 자체는 synaptosome에서 glutamate 유리를 증가시키지 않았으며, 기초 유리 농도 변화와 비슷하였다(Fig. 2).

2. Synaptosome 막전위의 변화

www.kci.go.kr

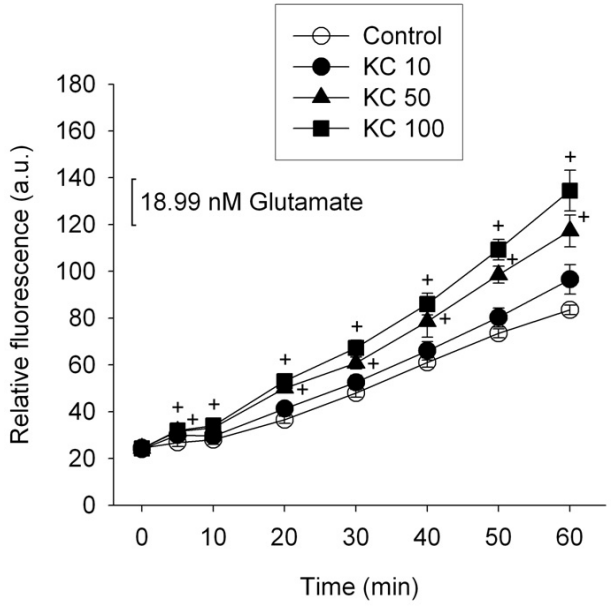

Figure 1. 7-Ketocholesterol (KC) induces glutamate release from synaptosomes. Cerebral synaptosomes (0.5 mg protein/ml) were treated with 10-100 μM KC for 60 minutes and the amount of glutamate released was measured. The arbitrary unit 20 in relative fluorescence represents the 18.99 nano-mole of glutamate. Data are mean±SEM (n=4). ^{+}p<0.05 compared to control.

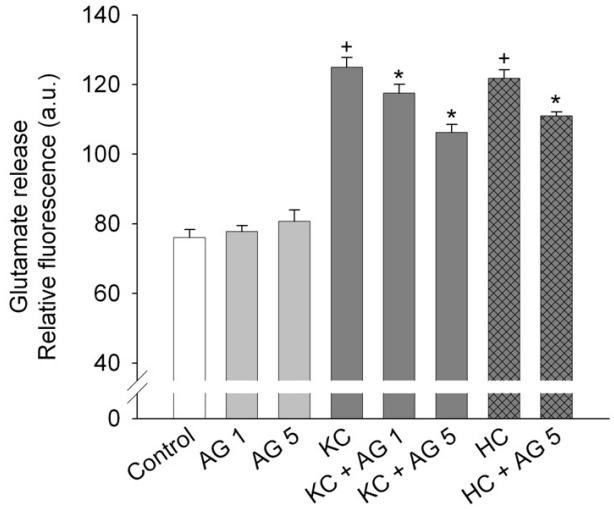

Figure 2. Effect of tyrphostin AG126 (AG) on 7-ketocholesterol-induced glutamate release. Cerebral synaptosomes (0.5 mg protein/ml) were pre-treated with 1-5 μM AG for 30 minutes, exposed to 100 μM 7-ketocholesterol (KC) or 25-hydroxy-cholesterol (HC) for 60 minutes, and the amount of glutamate released was measured. Data represent mean±SEM (n=5). ^{+}p<0.05 compared to control; and *p<0.05 compared to KC or HC alone.

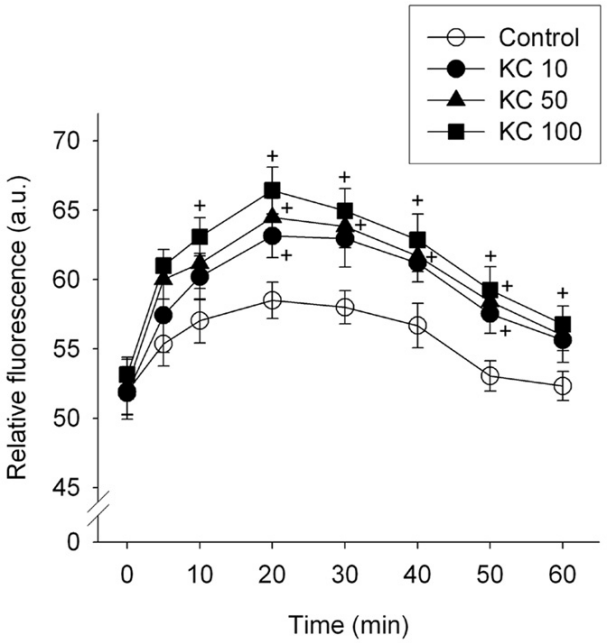

Figure 3. 7-Ketocholesterol (KC) changes the synaptosomal membrane potential. Cerebral synaptosomes (0.5 mg protein/ml) were treated with 10-100 μM KC for 60 minutes and changes in synaptosomal membrane potential were measured. Data re-present mean±SEM (n=4). ^{+}p<0.05 compared to control.

7-Ketocholesterol을 처리한 synaptosome에서 막전위 변화를 조사하였다. Synaptosome에 K^{+} 통로 차단제인 3 mM 4-aminopyrine을 처리하였을 때 막전위 탈분극이 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 10-100 μM 7-ketocholesterol을 synaptosome에 처리하였을 때 막전위가 탈분극되었으며, 첨가 20분에 최대 변화가 관찰되었고 이후 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3).

7-Ketocholesterol에 의한 glutamate 유리에 미치는 tyr-phostin AG126의 억제 효과가 synaptosome 막전위에 대한 억제 효과에서 비롯되었는지 조사하였다. 100 μM 7-ketocholesterol 처리에 따른 synaptosome 막전위 변화는 tyrphostin AG126 (1-5 μM)에 의해 억제되었다(Fig. 4). Tyrphostin AG126 (1-5 μM)을 단독 처리한 synaptosome에서의 막전위 변화는 대조와 비슷하였다.

3. Synaptosome에서 Ca^{2+} 농도 변화

7-Ketocholesterol을 처리한 synaptosome에서 Ca^{2+} 농도 변화를 조사하였다. Synaptosome에 7-ketocholesterol를 처리하였을 때 synaptosome 내 칼슘 농도가 증가하였으며, 7-ketocholesterol 첨가 후 5분경에 최대 농도에 도달하였다

www.kci.go.kr

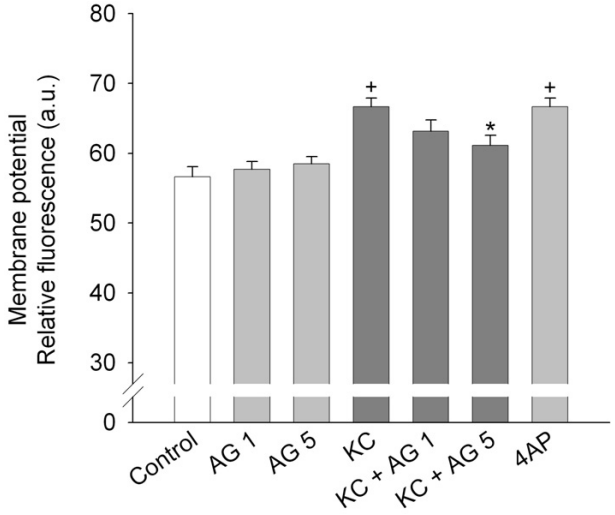

Figure 4. Effect of tyrphostin AG126 (AG) on 7-ketocholesterol-induced synaptosomal membrane potential changes. Cerebral synaptosomes (0.5 mg protein/ml) were pre-treated with 1-5 μM AG or 3 mM 4-aminopyrine (4AP) for 30 minutes, exposed to 100 μM 7-ketocholesterol (KC) for 20 minutes, and changes in synaptosomal membrane potential were measured. Data represent mean±SEM (n=5). ^{+}p<0.05 compared to control; and *p<0.05 compared to KC alone.

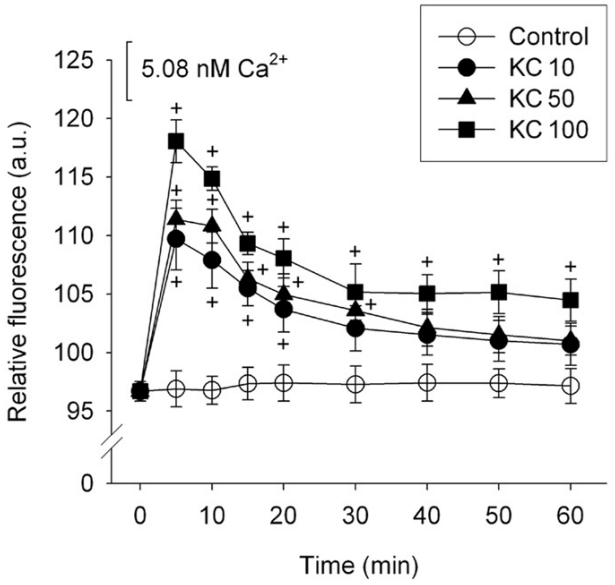

Figure 5. 7-Ketocholesterol (KC) induces changes in synaptosomal Ca^{2+} levels. Cerebral synaptosomes (0.5 mg protein/ml) were treated with 10-100 μM KC for 60 minutes and changes in synaptosomal Ca^{2+} levels were measured. The arbitrary unit 5 in relative fluorescence represents the 5.08 nanomole of Ca^{2+}. Data are mean±SEM (n=4). ^{+}p<0.05 compared to control.

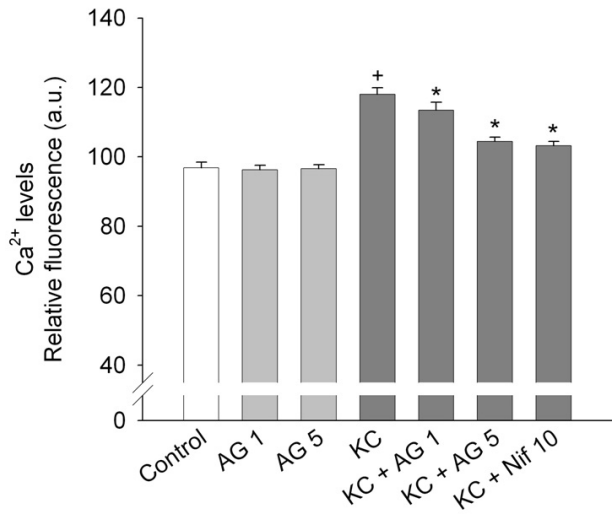

Figure 6. Effect of tyrphostin AG126 (AG) on 7-ketocholesterol-induced changes in synaptosomal Ca^{2+} levels. Cerebral synaptosomes (0.5 mg protein/ml) were pre-treated with 1-5 μM AG or 10 μM nifedipine (Nif) for 30 minutes, exposed to 100 μM 7-ketocholesterol (KC) for 5 minutes, and changes in synaptosomal Ca^{2+} levels were measured. Data represent mean±SEM (n=5). ^{+}p<0.05 compared to control; and *p<0.05 compared to KC alone.

(Fig. 5). 7-Ketocholesterol에 의한 synaptosome 칼슘 농도 증가는 칼슘통로 차단제인 10 μM nifedipine에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

7-Ketocholesterol에 의한 glutamate 유리에 미치는 tyrphostin AG126의 억제 효과가 synaptosome 칼슘 농도 증가에 대한 억제 효과에서 비롯되었는지 조사하였다. 100 μM 7-ketocholesterol 처리에 따른 synaptosome 칼슘 농도 증가는 tyrphostin AG126에 의해 억제되었다(Fig. 6). Tyrphostin AG126 (1-5 μM)을 단독 처리한 synaptosome에서의 칼슘 농도는 대조와 비슷하였다.

4. Synaptosome Na^{+}/K^{+}-ATPase의 활성화

콜레스테롤 산화생성물을 처리한 synaptosome에서 Na^{+}/K^{+}-ATPase 활성 변화를 관찰하였다. Synaptosome을 100 μM 7-ketocholesterol 또는 25-hydroxycholesterol로 30분 처리하였을 때 Na^{+}/K^{+}-ATPase 활성이 각각 34%, 30% 감소하였다(Fig. 7, 8).

7-Ketocholesterol에 의한 glutamate 유리에 미치는 AG126의 억제 효과를 Na^{+}/K^{+}-ATPase 활성에 연관지어 분석하고자 ATPase 활성 변화를 측정하였다. Na^{+}/K^{+}-ATPase 활성에 대한

www.kci.go.kr

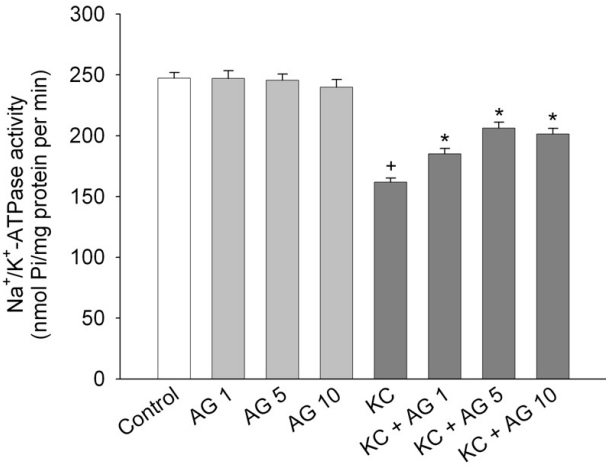

Figure 7. Effect of tyrphostin AG126 (AG) on 7-ketocholesterol-induced decrease in Na^+/K^+-ATPase activity. Cerebral synaptosomes (0.1 mg protein/ml) were pre-treated with 1-10 μM AG for 20 minutes, exposed to 100 μM 7-ketocholesterol (KC) for 30 minutes, and Na^+/K^+-ATPase activity was measured. Data represent mean±SEM (n=5). ^+p<0.05 compared to control; and *p<0.05 compared to KC alone.

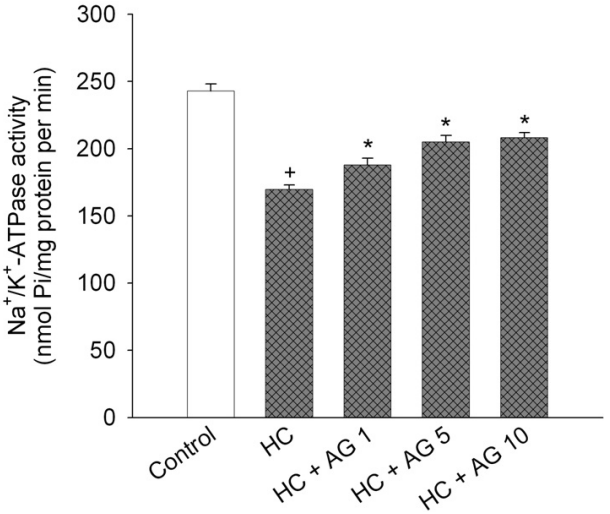

Figure 8. Effect of tyrphostin AG126 (AG) on 25-hydroxycholesterol-induced decrease in Na^+/K^+-ATPase activity. Cerebral synaptosomes (0.1 mg protein/ml) were pre-treated with 1-10 μM AG for 20 minutes, exposed to 100 μM 25-hydroxycholesterol (HC) for 30 min, and Na^+/K^+-ATPase activity was measured. Data represent mean±SEM (n=5). ^+p<0.05 compared to control; and *p<0.05 compared to HC alone.

100 μM 7-ketocholesterol 또는 25-hydroxycholesterol의 억제 효과는 1-10 μM tyrphostin AG126 첨가에 의해 저해되었으며, 5-10 μM 농도에서 52-53% 억제 효과가 관찰되었다 (Fig. 7,8). Tyrphostin AG126 단독이 10 μM에서 Na^+/K^+-ATPase 활성을 3% 억제하였으나 통계적인 유의성은 없었다.

고 찰

알츠하이머병 환자의 뇌에서 24-hydroxycholesterol, 7β-hydroxycholesterol과 같은 콜레스테롤 산화생성물의 농도가 증가되어 있음이 관찰된다.[8,29] 콜레스테롤 산화생성물은 뇌에서 β-amyloid 생성에 영향을 준다.[1] 역으로 β-amyloid는 콜레스테롤 산화를 촉진하여 7β-hydroxycholesterol를 생성하며, 생성된 7β-hydroxycholesterol이 알츠하이머병 증상 발현에 관여한다고 추정하고 있다.[8] 파킨슨병 환자의 뇌 흑색질에서 활성산소 생성과 철 이온 농도의 증가가 관찰되고, 이들이 도파민 신경세포 손상에 관여한다고 알려져 있다.[3,30] Synaptosome에 ferrous ion과 ascorbate를 처리하면 주로 7-ketocholesterol, 7-hydroxycholesterols이 생성되며, 생성물이 막 효소를 억제하고 막투과성을 변경시켜 뇌조직의 산화성 손상을 일으킨다고 보고되고 있다.[31]

콜레스테롤 산화생성물은 사립체 기능 변화를 야기하고 산화적 스트레스를 항진시켜 다양한 세포에 독성 효과를 나타낸다.[32,33] 그럼에도 불구하고 콜레스테롤 산화생성물이 신경말단 기능에 보이는 효과는 규명되지 않고 있다. 따라서 이러한 측면에서 본 연구를 수행하였다. 추출된 신경말단 synaptosome은 신경전달물질의 합성, 저장, 유리, 재흡수 기능과 영향 경로를 갖고 있다.[34] Synaptosome에 칼륨통로 차단제인 4-aminopyrine이나 고농도의 K^+을 처리하면 탈분극이 야기되고 칼슘 유입에 이어 신경전달물질이 유리된다.[13,35] 기존 논문에서와 같이 본 실험에서 4-aminopyrine은 대뇌 synaptosome의 탈분극을 야기하였다. 흰쥐 갈색세포종 세포주에서 7-ketocholesterol은 세포 내 칼슘 농도를 증가시키며, 이러한 반응은 L-형태 칼슘 통로 차단제인 nicardipine에 의해 억제됨이 보고되었다.[36] 세포주에서의 실험 결과와 비슷하게, 7-ketocholesterol에 의한 synaptosome Ca^{2+} 농도 증가는 L-형태 칼슘 통로 차단제인 nifedipine에 의해 저해되었다. 이러한 논문에 근거하여 볼 때,[13,35] 7-ketocholesterol 처리 후 synaptosome 막전위 탈분극과 함께 반응 초기에 급속한 Ca^{2+} 농도 증가가 이루어지며, 이러한 현상이 glutamate의 지속적인 유리를 일으킨다고 생각되었다.

Na^+/K^+-ATPase는 막전위 조절, 신경전달물질 유리, 흡수 과정 등 신경활동에 관여한다.[37,38] Ouabain에 의해 Na^+/K^+-ATPase가 억제되면 세포막 탈분극, 세포질 Na^+ 및 Ca^{2+} 농도 증가가 야기되고 신경전달물질이 유리된다.[37,39] 이러한 관점

www.kci.go.kr

에서 볼 때 7-ketocholesterol, 25-hydroxycholesterol은 synaptosome Na^+/K^+-ATPase 활성 억제를 통해 glutamate 유리에 자극 효과를 나타낼 것으로 시사되었다.

단백질 tyrosine kinase는 신경전달물질 유리 과정에 영향을 나타낸다. 그러나 Src family tyrosine kinase 억제제는 종류에 따라 탈분극성 synaptosome glutamate 유리에 각기 다른 효과, 즉 증가 또는 억제 효과를 나타낸다.[19,20] Tyrphostin AG126은 항염증 및 세포보호 효과를 갖고 있다고 알려져 있다. 예로써 tyrphostin AG126은 생쥐 아교세포에서 폐렴연쇄구균 세포벽 노출에 따른 시토카인 생성을 억제하고,[22] 흰쥐에서 허혈-재관류에 따른 장과 신장의 손상을 저해한다.[23,40] Tyrphostin AG126은 glutamate의 세포독성을 억제한다.[16] 그럼에도 불구하고 tyrphostin AG126이 콜레스테롤 산화생성물에 의한 신경말단 기능이상에 나타내는 효과는 밝혀지지 않고 있다. 이를 규명하고자 본 연구를 수행하였으며, 실험결과는 tyrphostin AG126이 synaptosome에서 7-ketocholesterol과 25-hydroxycholesterol에 의한 glutamate 유리, 세포막 탈분극, Ca^{2+} 농도 증가를 유의하게 억제할 수 있음을 보여주었다. 또한 tyrphostin AG126이 Na^+/K^+-ATPase 활성 감소를 반전시켜 콜레스테롤 산화생성물 노출에 의한 glutamate 유리를 저해할 수 있다고 추정되었다.

Glutamate는 사립체 기능이상과 활성산소 생성 증가를 야기하여 신경세포에 독성를 나타낸다고 알려져 있다.[14] 사립체 호흡사슬이 억제되면 활성산소와 질소종이 생성된다.[3,14] 활성산소는 사립체에 작용하여 사립체 막전위 붕괴와 아폽토시스 진행자인 cytochrome *c* 유리를 일으킨다. Synaptosome은 사립체와 신경전달물질 함유 소포를 갖고 있다.[34] 그러므로 콜레스테롤 산화생성물은 glutamate 매개성 사립체 손상과 활성산소 생성을 증가시켜 시냅스 손상을 야기할 수 있을 것으로 생각되었다. 또한 연구 결과로부터 tyrphostin AG126은 glutamate 유리를 억제하여 콜레스테롤 산화생성물에 의한 시냅스의 산화성 손상을 저해하는 것으로 추정되었다.

결론적으로 콜레스테롤 산화생성물(7-ketocholesterol, 25-hydroxycholesterol)이 synaptosome 막전위 탈분극과 함께 반응 초기에 급속한 Ca^{2+} 농도 증가를 유발하고, Na^+/K^+-ATPase 활성 억제를 통해 glutamate 유리에 자극 효과를 나타낼 것으로 생각된다. Tyrphostin AG126은 synaptosome에서 7-ketocholesterol과 25-hydroxycholesterol에 의한 세포막 탈분극과 Ca^{2+} 농도 증가를 억제하고 Na^+/K^+-ATPase 활성 감소를 반전시켜 콜레스테롤 산화생성물 노출에 의한 glutamate 유리를 저해하는 것으로 추정된다. 따라서 tyrphostin AG126은 콜레스테롤 산화생성물 매개성 신경손상에서 보호 효과를 나타낼 수 있을 것으로 예상한다.

REFERENCES

1. Bjorkhem I, Heverin M, Leoni V, Meaney S, Diczfalusy U. Oxysetrols and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 2006;185:43-49.
2. Vaya J, Schipper HM. Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem* 2007;102:1727-1737.
3. Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:123-144.
4. Draczynska-Lusiak B, Doung A, Sun AY. Oxidized lipoproteins may play a role in neuronal cell death in Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 1998;33,139-148.
5. Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR. Oxidized low-density lipoprotein induces neuronal death: implications for calcium, reactive oxygen species, and caspases. *J Neurochem* 1999;72:2601-2609.
6. Smith LL, Teng JI, Lin YY, Seitz PK, McGehee MF. Sterol metabolism XLVII. Oxidized cholesterol esters in human tissues. *J Steroid Biochem* 1981;14:889-900.
7. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
8. Nelson TJ, Alkon DL. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and β-amyloid peptide. *J Biol Chem* 2005;280:7377-7387.
9. Sugawa M, Ikeda S, Kushima Y, Takashima Y, Cynshi O. Oxidized low density lipoprotein caused CNS neuron cell death. *Brain Res* 1997;27:165-172.
10. Berthier A, Lemaire-Ewing S, Prunet C, Monier S, Athias A, Bessede G, et al. Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. *Cell Death Differ* 2004;11:897-905.
11. Panini SR, Yang L, Rusinol AE, Sinensky MS, Bonventre JV, Leslie CC. Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol. *J Lipid Res* 2001;42:1678-1686.
12. Nicholls DG. Regulation of calcium in isolated nerve terminals (synaptosomes): relationship to neurotransmitter release. *Ann N Y Acad Sci* 1989;568:81-88.
13. Sanchez-Prieto J, Budd DC, Herrero I, Vazquez E, Nicholls DG. Presynaptic receptors and the control of glutamate exocytosis. *Trends Neurosci* 1996;19:235-239.
14. Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* 2001;497:1-5.
15. Dugan LL, Choi DW. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann Neurol* 1994;35 Suppl:17-21.
16. Sagara Y, Ishige K, Tsai C, Maher P. Tyrphostins protect neuronal cells from oxidative stress. *J Biol Chem* 2002;277:36204-36215.
17. Kaul S, Anantharam V, Yang Y, Choi CJ, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. Tyrosine phosphorylation regulates the proteolytic activation of protein kinase Cδ in dopaminergic neuronal cells. *J Biol Chem* 2005;280:28721-28730.
18. Hou XY, Liu Y, Zhang GY. PP2, a potent inhibitor of Src family kinases, protects against hippocampal CA1 pyramidal cell death after transient global brain ischemia. *Neurosci Lett* 2007;420:235-239.
19. Baldwin ML, Cammarota M, Sim AT, Rostas JA. Src family tyrosine

www.kci.go.kr

kinases differentially modulate exocytosis from rat brain nerve terminals. *Neurochem Int* 2006;49:80-86.
20. Wang SJ. A role for Src kinase in the regulation of glutamate release from rat cerebrocortical nerve terminals. *Neuroreport* 2003; 14:1519-1522.
21. Shyu KG, Jow GM, Lee YJ, Wang SJ. PP2 inhibits glutamate release from nerve endings by affecting vesicle mobilization. *Neuroreport* 2005;16:1969-1972.
22. Hanisch UK, Prinz M, Angstwurm K, Hausler KG, Kann O, Kettenmann H, et al. The protein tyrosine kinase inhibitor AG126 prevents the massive microglial cytokine induction by pneumococcal cell walls. *Eur J Immunol* 2001;31:2104-2115.
23. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Brown PA, Stewart KN, Britti D, et al. The tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG126 reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *Kidney Int* 2003; 64:1605-1619.
24. Sihra TS, Bogonez E, Nicholls DG. Localized Ca^{2+} entry preferentially effects protein dephosphorylation, phosphorylation, and glutamate release. *J Biol Chem* 1992;267:1983-1989.
25. Wang SJ, Wang KY, Wang WC, Sihra TS. Unexpected inhibitory regulation of glutamate release from rat cerebrocortical nerve terminals by presynaptic 5-hydroxytryptamine-2A receptors. *J Neurosci Res* 2006;84:1528-1542.
26. Huttunen MT, Akerman KE. Measurements of membrane potentials in Escherichia coli K-12 inner membrane vesicles with the safranine method. *Biochim Biophys Acta* 1980;597:274-284.
27. Horwitt BN. Determination of inorganic serum phosphate by means of stannous chloride. *J Biol Chem* 1952;199:537-541.
28. Silva VS, Nunes MA, Cordeiro JM, Calejo AI, Santos S, Neves P, et al. Comparative effects of aluminum and ouabain on synaptosomal choline uptake, acetylcholine release and (Na^+/K^+) ATPase. *Toxicology* 2007;236:158-177.
29. Kristofikova Z, Kopecky V Jr, Hofbauerova K, Hovorkova P, Ripova D. Complex of Amyloid β peptides with 24-hydroxycholesterol and its effect on hemicholinium-3 sensitive carriers. *Neurochem Res* 2008;33: 412-421.
30. Jellinger KA. The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging* 1999;14:115-140.
31. Vatassery GT, Quach HT, Smith WE, Ungar F. Oxidation of cholesterol in synaptosomes and mitochondria isolated from rat brains. *Lipids* 1997;32:879-886.
32. Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessede G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, et al. Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of the mitochondrial transmembrane potential during 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. *Biochem Pharmacol* 2002;64:527-541.
33. Yang L, Sinensky MS. 25-Hydroxycholesterol activates a cytochrome *c* release-mediated caspase cascade. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:557-563.
34. Whittaker VP. Thirty years of synaptosome research. *J Neurocytol* 1993;22:735-742.
35. Tibbs GR, Barrie AP, Van Mieghem FJ, McMahon HT, Nicholls DG. Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca^{2+} and glutamate release. *J Neurochem* 1989;53:1693-1699.
36. Lee CS, Park WJ, Han ES, Bang H. Differential modulation of 7-ketocholesterol toxicity against PC12 cells by calmodulin antagonists and Ca^{2+} channel blockers. *Neurochem Res* 2007;32:87-98.
37. Adam-Vizi V, Ligeti E. Release of acetylcholine from rat brain synaptosomes by various agents in the absence of external calcium ions. *J Physiol* 1984;353:505-521.
38. Stahl WL, Harris WE. Na^+, K^+-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. *Adv Neurol* 1986;44:681-693.
39. Meyer EM, Cooper JR. Correlations between Na^+- K^+ ATPase activity and acetylcholine release in rat cortical synaptosomes. *J Neurochem* 1981;36:467-475.
40. Marzocco S, Mazzon E, Pinto A, Autore G, Cuzzocrea S. Tyrphostin AG 126 reduces intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006;372:362-373.

www.kci.go.kr