

과산화수소에 의한 산화적스트레스때 사립체 탈공액단백질 2(UCP2)의 발현변화

류은혜, 한경애

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《첨단과학기술분야에서 세계적경쟁력을 가진 기술들을 개발하기 위한 투쟁을 힘있게 벌려야 합니다.》(《조선로동당 제7차대회에서 한 중앙위원회사업총화보고》 단행본 39페이지)

갈색지방조직에서 사립체내막의 전기화학적포텐셜에너지를 ATP합성과 공액시키지 않고 열로 발산시키는 사립체탈공액단백질 1(UCP1)과 달리 UCP2는 여러 형태의 조직들에 널리 분포되어있으며 그 생리적기능은 아직 논의중에 있다. 그러나 현재 많은 연구결과들은 UCP2를 뇌졸중과 뇌빈혈, 뇌타박, 전간, 파킨슨병과 같은 질병들에서 뇌신경보호적기능과 연관시키고있으며 그 주되는 작용물질은 사립체에서 활성산소의 발생을 조절하는데 있다고 보고있다.[1]

UCP2와 활성산소발생사이의 연관성을 밝히기 위한 실험은 주로 UCP2결손흰생쥐와 정상흰생쥐에서의 차이를 분석하는 방법으로 진행되였다.[3]

우리는 신경세포배양물에 직접 과산화수소(H_2O_2)를 처리하여 산화적스트레스를 일으킬 때 사립체에서 UCP2의 발현변화를 단백질수준에서 정량함으로써 UCP2와 산화적스트레스와의 연관성을 밝히기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

흰생쥐신경아종세포계열 N18TG2에 대한 H_2O_2 처리는 세포를 DMEM배지(2mmol/L 글루타민, 2mmol/L 피루빈산, 2% B27 포함)를 리용하여 6공판에서 2일간 배양(5% CO_2 , 37°C)한 후 각이한 농도의 H_2O_2 용액을 배양용액에 직접 넣어주는 방법으로 진행하였다.

웨스턴블로팅분석은 선행연구[1, 2]의 방법에 준하여 다음과 같이 진행하였다.

배양세포로부터 단백질추출은 프로테아제저해제 P8340(《Sigma-Aldrich》)을 포함한 용균완충액(50mmol/L 트리스, 150mmol/L NaCl, 1% 데옥시콜산나트륨, 1mmol/L EDTA, 1% 트리톤 X-100, 0.1% SDS, pH 7.4)속에서 3s×2회 초음파처리(《SonoplusBandelin GM70》)한 후 1 000×g에서 10min동안 원심분리(《Hettichrotina 380R》)하는 방법으로 진행하였다. 15% SDS-폴리아크릴아미드전기영동(시료주입량 20μg)후 웨스턴블로팅분석에는 니트로섬유소막(《Whatman GmbH PROTRAN》)을 리용하였다. 2% 소혈청알부민-트리스완충액(0.05% 트윈 20, 0.02% 티메로잘 포함)속에서 48h동안 진탕방치(4°C)하는 방법으로 막의 비결합성부위를 차단하였다. 해당 단백질들은 《PINEDA》, 《Abcam》, 《Sigma》, 《Covance》에서 구입한 1차항체들과 페록시다제와 결합한 2차항체(《GE Healthcare》), H_2O_2 -루미놀발광키트(《GE Healthcare》)와 웨스턴블로팅검출장치(《UVP》)를 리용하여 정량하였다.

실험에 리용한 모든 시약들은 《Roche》, 《Sigma-Aldrich》, 《Biorad》, 《Cayman》에서 구입한 제품들이었다.

모든 실험값들은 세번의 독립적인 배양실험에서 얻은 평균값과 그것의 표준오차(SEM)로 표시하였다.

결과 및 논의

1) H_2O_2 처리시간에 따르는 UCP2의 발현변화

우리는 6공판에서 2일간 배양한 흰생쥐신경아종세포계열 N18TG2에 $50\mu\text{mol/L}$ 의 H_2O_2 를 각각 2, 24h동안 처리한 다음 세포를 포집하고 단백질을 추출하여 웨스턴블로팅법으로 UCP2의 발현변화를 검토하여보았다.(그림 1의 ㄱ))

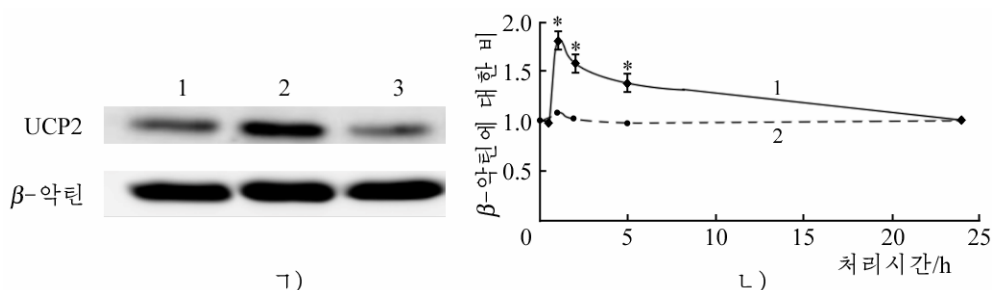


그림 1. H_2O_2 처리시간에 따르는 UCP2의 발현변화

ㄱ) UCP2발현량: 1-처리전, 2-처리시간 2h, 3-처리시간 24h;

ㄴ) β -악틴에 대한 비: 1-UCP2/ β -악틴, 2-VDAC/ β -악틴

그림 1에서 보는바와 같이 세포질단백질인 β -악틴량이 같은 조건에서 UCP2의 발현량은 H_2O_2 처리 2h만에 현저히 증가하였으며 24h후에는 다시 정상상태로 돌아왔다.

처리시간을 보다 세분화하여 검토하여본 결과 $50\mu\text{mol/L}$ 의 H_2O_2 처리때 UCP2의 발현량은 1h안에 최대로 증가되었다가 점차적으로 감소하였다.(그림 1의 ㄴ)) β -악틴에 대한 UCP2의 비는 H_2O_2 처리시간에 따라 명백히 변화되었으나 같은 사립체막단백질인 전압의존성음이온통로단백질(VDAC)에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

2) H_2O_2 처리농도에 따르는 UCP2의 발현변화

N18TG2세포에 각각 $50, 100\mu\text{mol/L}$ 의 H_2O_2 를 2h동안 처리할 때 UCP2의 발현변화를 본 결과는 그림 2와 같다.

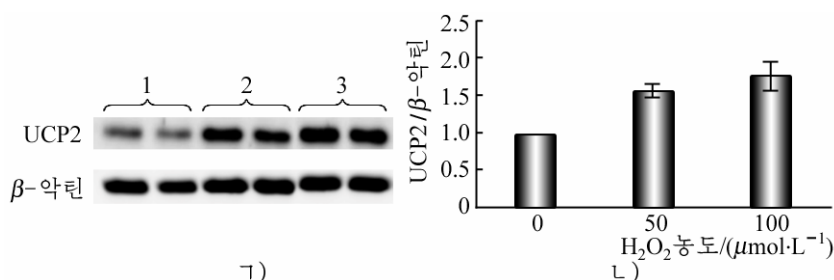


그림 2. H_2O_2 처리농도에 따르는 UCP2의 발현변화

ㄱ) UCP2발현량: 1-처리전($0\mu\text{mol/L}$ H_2O_2), 2- $50\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 처리,

3- $100\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 처리; ㄴ) UCP2/ β -악틴

그림 2에서 보는바와 같이 UCP2의 증가비는 H_2O_2 처리농도가 높을 때 높아지는 경향을 보여주었다.

UCP2와 활성산소발생과의 연관성은 UCP2결손(-/-)흰생쥐에서 분리된 마크로파쥐가 정상흰생쥐에서 분리된 마크로파쥐에서보다 많은 량의 활성산소를 산생시킨다는것이 발견되면서 처음으로 제안되었다.[4] 그 이후 면역계세포뿐만아니라 뇌신경, 간장, 취장, 혈관내피 등 여러 조직세포들에서 UCP2의 결손이 활성산소의 생성량을 증가시킨다는 실험자료들이 발표되면서 많은 연구자들은 UCP2의 생리적기능을 사립체막포텐살을 통하여 활성산소생성을 조절하는것[3]이라고 보고있다.

H_2O_2 처리시간에 따르는 N18TG2세포에서 UCP2의 발현변화를 검토한 우리의 실험결과는 그러한 가설을 지지해준다. 신경세포를 H_2O_2 로 직접 처리하였을 때 UCP2의 발현량은 1h라는 짧은 시간동안에 단백질수준에서 명백하게 증가되었다가 24h만에 정상상태로 돌아온다. H_2O_2 과 같은 활성산소가 세포내에 많아지게 되면 세포는 활성산소생성의 기본원천인 사립체에서 그 발생량을 줄이기 위하여 막포텐살을 조절하는 UCP2를 짧은 시간동안에 량적으로 증가시킨다고 볼수 있다. 또한 세포안에는 페록시다제와 같은 항산화효소계가 존재하므로 일정한 시간이 지나 활성산소가 제거되면 UCP2의 량은 정상상태로 돌아오게 된다. UCP2의 합성은 번역수준에서 기본적으로 조절되고 사립체에 존재하는 다른 내막단백질에 비해 반감기(1h이하)가 드물게 매우 짧다.[5, 6] 따라서 활성산소농도를 미세하게 조절할수 있도록 급속하게 합성 및 분해될수 있다.

UCP2에 의한 활성산소산생의 조절은 뇌신경세포들의 산화적손상을 방지하고 막포텐살변화에 의한 칼시움이온의 농도변화와 막투과성전이, 시토크롬 C와 같은 아포토시스유발인자들의 방출, 더 나아가서 세포죽음경로의 활성화를 방지함으로써 뇌신경보호작용에서 중요한 조절점으로 될수 있다.

맺 는 말

1) 흰생쥐신경아중세포계렬 N18TG2를 $50\mu\text{mol/L}$ 의 과산화수소로 처리할 때 사립체탈공액단백질 2(UCP2)의 발현량은 단백질수준에서 1h내에 최대로 되었다가 점차 감소하여 24h만에 정상상태로 돌아왔다.

2) 과산화수소는 $100\mu\text{mol/L}$ 까지의 농도범위내에서 농도의존적으로 UCP2의 발현량을 증가시켰다.

참 고 문 헌

- [1] Anne Rupprecht et al.; PLoS ONE, 7, 8, 1, 2012.
- [2] Alina Smorodchenko et al.; Biochimica et Biophysica Acta, 1788, 2309, 2009.
- [3] Suresh L. Mehta et al.; Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 29, 1069, 2009.
- [4] Denis Arsenijevic et al.; Nature Genetics, 26, 12, 435, 2000.
- [5] Rousset Sophie et al.; FEBS Letters, 581, 479, 2007.
- [6] Emre Yalin et al.; FEBS Letters, 584, 1437, 2010.

주체105(2016)년 5월 5일 원고접수

The Change in the Expression of Mitochondrial Uncoupling Protein 2(UCP2) during Oxidative Stress by H₂O₂

Ryu Un Hye, Han Kyong Ae

Using Western blot analysis, we quantified the change in the expression of UCP2 in mitochondria during the oxidative stress when the cultured neurons were directly treated by hydrogen peroxide(H₂O₂), in order to investigate the relationship between UCP2 and oxidative stress. In N18TG2 cells treated with 50 μ mol/L of H₂O₂, protein expression of UCP2 was maximized in 1h and decreased back to normal level within 24h. H₂O₂ increased protein expression of UCP2 in the concentration-dependent manner in the range of concentration to 100 μ mol/L.

Key words: mitochondria, uncoupling protein 2(UCP2), mouse neuroblastoma cell line N18TG2, Western blot analysis, hydrogen peroxide, oxidative stress