

## Glutamate에 의한 세포내 칼슘농도변화와 세포독성과의 관계

황인영 · 신임철 · 송연숙 · 성민제 · 박혜지 · 이육모 · 박철범 · 이명구 · 오기완 · 심영용\* · 홍진태<sup>#</sup>  
충북대학교 약학대학, \*한남대학교 이과대학

## Intracellular Calcium Concentration in the Glutamate-induced Cytotoxicity in PC12 Cell

In Young Hwang, Shin Im Cheol, Yeon Sook Song, Min Jae Seoung, Hye Ji Park,  
Yuk Mo Lee, Cheol Beom Park, Myeng Koo Lee, Ki Wan Oh,  
Young Yong Sim\* and Jin Tae Hong<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Chungbuk National University,

\*College of Natural Science, Hannam University

(Received October 9, 2002)

(Accepted November 12, 2002)

**ABSTRACT :** Pathophysiological elevation of intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in the neuron has been considered as an important responsible factor in the neuronal cell damages. However, the mechanism of increase of  $[Ca^{2+}]_i$  and the relationship between  $[Ca^{2+}]_i$  level and cytotoxicity have not been fully demonstrated. In the present study, real-time alteration of  $[Ca^{2+}]_i$  and cellular response (cell damages) in the pheochromocytoma cells (PC12) stimulated by glutamate were investigated. Glutamate dose dependently decreased cell viability determined propidium iodide fluorescence method and morphology change. Conversely related with cell damages, glutamate dose dependently increased the level of  $[Ca^{2+}]_i$ . To investigate the mechanism of glutamate-induced increase of  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Ca^{2+}]_i$  was first measured in the cells cultured in calcium free media and in the presence of dantrolene, an inhibitor of calcium release from ryanodine receptor located in endoplasmic reticulum (ER). Similar to the increase  $[Ca^{2+}]_i$  in the calcium-containing media, glutamate dose dependently increased  $[Ca^{2+}]_i$  in the cells cultured in free calcium media. However, pretreatment (2 hr) with 20~50  $\mu M$  dantrolene substantial lowered glutamate-induced increase of  $[Ca^{2+}]_i$ , suggesting that release of calcium from ER may be major source of increase of  $[Ca^{2+}]_i$  in PC12 cells. Dantrolene-induced inhibition of  $[Ca^{2+}]_i$  resulted in recovery of cytotoxicity by glutamate. Relevance of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, a type of glutamate receptor on glutamate-induced increase of  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[Ca^{2+}]_i$  was also determined in the cells pretreated (2 hr) with NMDA receptor antagonist MK-801. Glutamate-induced increase of  $[Ca^{2+}]_i$  was reduced by MK-801 dose dependently. Furthermore, glutamate-induced cytotoxicity was also prevented by MK-801. These results demonstrate that glutamate increase  $[Ca^{2+}]_i$  dose dependently and thereby cause cytotoxicity. The increase of  $[Ca^{2+}]_i$  may release from ER, especially through ryanodine receptor and/or through NMDA receptor. Alteration of calcium homeostasis through disturbance of ER system and/or calcium influx through NMDA receptor could contribute glutamate-induced cell damages.

**Key Words :** Glutamate acid, Cytotoxicity, Intracellular calcium. PC12 cell

### I. 서 론

$Ca^{2+}$  농도는 신경세포 (neuron)에서 매우 예민하게 조절 되며 신경 신호전달과 세포막 전위 조절과정에  $Ca^{2+}$ 의 역할

은 매우 중요하다(Berridge, 1993; Carafoli, 1987). Neuron에서의  $Ca^{2+}$  homeostasis의 파괴는 허혈(ischemia), 저혈당증 (hypoglycemia), Alzheimer's disease 등의 다양한 병리학적인 문제를 일으키는데 관련되는데(Choi, 1990, 1995; Orenius and Nicotera, 1994; Paschen and Doutheil, 1999; Siesjo and Bengtsson, 1989; Tymianski and Tator, 1996).

\*To whom correspondence should be addressed

최근에, 여러 연구들은 신경세포의 손상이  $[Ca^{2+}]$  증가에 의해서 일어난다는 것을 제시했다(Choi, 1990; Kristian and Siesjo, 1998; Siesjo *et al.*, 1999). 하지만, 반대로 몇몇 조직에서  $[Ca^{2+}]$  감소는 독성을 나타내고 약간의 증가는 반대로 neuron를 보호할 수도 있다고 보고 되어지고 있다.

$[Ca^{2+}]$ 의 증가는 여러 가지 기전에 의해서 일어난다. Ligand-gate channel, voltage-gate channel, cell membrane의 통과 그리고 endoplasmic reticulum(ER)과 mitochondria의 calcium store에서의 유리동이 intracellular에서 calcium ion의 증가를 일으킬 수가 있다. 최근에, Paschen과 Doutheil은 신경 손상의 중요한 요인중의 하나가 ER로부터  $Ca^{2+}$ 의 지속적인 유리 때문이라고 제시하고 있다(Paschen and Doutheil, 1999). ER은  $Ca^{2+}$ 의 저장과 signaling을 주관하는 기본적인 조직이며 또한, ER 내부의  $Ca^{2+}$  농도는 sraco endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase(SERCA)로 알려진  $Ca^{2+}$ -ATPase에 의해 균형을 유지하고 있고 ryanodine receptor와 IP<sub>3</sub> receptor라는 두가지 유형의 receptor를 통해 유리된다[1]. 그리고, ER에서의  $Ca^{2+}$ 의 지속적인 감소는 다양하고 중요한 여러 결과를 초래한다. ER  $Ca^{2+}$ 의 재흡수와 유리를 조절하는 세포막 단백질들은  $Ca^{2+}$ 에 의해 조절되기 때문에 ER  $Ca^{2+}$ 의 감소는 그러한 변수들을 정상적으로 조절하는데 영향을 미치게 된다(Meldolesi and Pozzan, 1998). ER  $Ca^{2+}$ 의 감소는 ER과 Golgi 복합체간의 정상적인 소통을 방해하는데 ER의 기본적인 기능은 세포벽과 주요 단백질을 synthesis, folding 및 export하는 것인데 그러한 과정은 수많은 calcium 의존적인 단백질에 의해 조절된다(Brostrom and Brostrom, 1998). 하지만, ER  $Ca^{2+}$ 의 유리에 의한 단백질 합성 억제는 다양하고 특이한 gene을 생산하는 등의 ER stress를 일으킨다(Grudt *et al.*, 1996; Mackrill *et al.*, 1997; MaGinnis *et al.*, 1999; Nath *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 1991).

Glutamate는 중추신경계에서 주요한 흥분성 전달물질로 NMDA와 non-NMDA 수용체에 작용하는 아미노산이다. NMDA 수용체에 작용하는 어떤 약물들은 정신질환 증후를 나타내며 glutamate 신경계의 손상이 정신질환의 원인이 되는 경우도 있다. 최근 NMDA 수용체 복합체에 길항작용하는 약물이 발작, strokes 및 기전이 다른 저산소증의 치료제로서 연구되고 있다. 그러나, glutamate에 의한 신경세포의 손상에 대한 정확한 기전은 알려지지 않고 있으나 세포내 칼슘 농도의 상승과 관련성이 있는 것으로 추측하고 있다.

따라서 본 연구에서는 PC12 cell에서 calcium의 증가가 세포손상(cell damage)에 직접적인 원인으로 작용하는지를 연구하고 glutamate에 의한 calcium 증가가 어떻게 이루어지는지와 세포 손상과의 관련성을 밝히고자 한다.

## II. 실험 방법

### 1. Materials and reagents

L-gutamate, digitonin, propidium iodide, dantrolene, 그리고 MK-801은 Sigma에서 구입하여 사용하였다. Fura-2 AM은 TEFLABS 제품을 사용 하였다. KRH buffer에는 NaCl(121 mM), KCl(4.7 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1.2 mM), MgSO<sub>4</sub>(1.2 mM), CaCl<sub>2</sub>(2.0 mM), NaHCO<sub>3</sub>(5.0 mM), Glucose(10 mM), BSA(0.2%)가 포함한다. Calcium free buffer는 KRH buffer에서 CaCl<sub>2</sub>만 제외하고 제조하였다.

### 2. Cell culture

PC12 세포주는 rat의 pheochromocytoma cell line에서 얻었다. 배지는 Dolbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, penicillin(100 units/ml), streptomycin(100 units/ml)을 첨가한 것을 사용하였다. Cell은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였고 배지는 일주일에 세번 교체하였다.

### 2. Intracellular $Ca^{2+}$ measurement

PC12 cell은 fura-2 AM을 dye로 이용하여 측정하였다. Fura-2 AM를 5  $\mu$ M loading 시키고 37°C에서 30분간 incubation 시킨다. 이때, 빛이 들어가지 않도록 투브의 걸을 호일로 봉하여 차단한다. 또한, 각각의 inhibitor도 fura-2 AM 처리시에 같이 넣어준다. 배양이 끝나면 spindown 시킨 후 buffer로 washing한다. 이 실험에는 Delta Scan System(Photon Technology International, Princeton, NJ, USA)을 사용하였으며 이 기기는 340 nm와 380 nm에서 측정하여 이 두 value의 비율, 즉 Ratio = [F340/F380]로 실험결과를 나타낸다. 이때, 340 nm는 fura-2 AM과 calcium의 binding된 것의 value이며 380 nm fura-2 AM만의 value를 나타낸다.

### 3. Cytotoxic assay

Cell viability는 Niemien에 의해 고안된 PI(propidium iodide) fluorescence를 이용하여 측정하였다. 실험방법으로는, culture media를 버리고 새로운 배지 1 ml를 넣은 다음, PI를 30  $\mu$ M이 되게 처리한다. 37°C에서 30분간 incubation후에 각 well의 initial 값을 측정한다. 이 실험에 사용한 기기는 FLUO Star(BMG Lab Technologies, Durham, NC, USA)이며 이 기기에 560 nm excitation과 645 nm emission filter를 사용하여 측정하였다. Glutamate

처리 후에는 24시간, 48시간, 72시간대별로 각각 측정한다. Plate는 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 보관하였다. 72시간 측정후 각 well에 350 μM digitonin을 처리하고 측정하였다. Viability(V)는 아래 공식에 의해 구한다.

$$V(\%) = 100 \times \frac{X - A}{B - A}$$

A는 initial 값, B는 digitonin 처리후의 값, 그리고 X는 각 시간별 측정값이다.

#### 4. Morphology observation

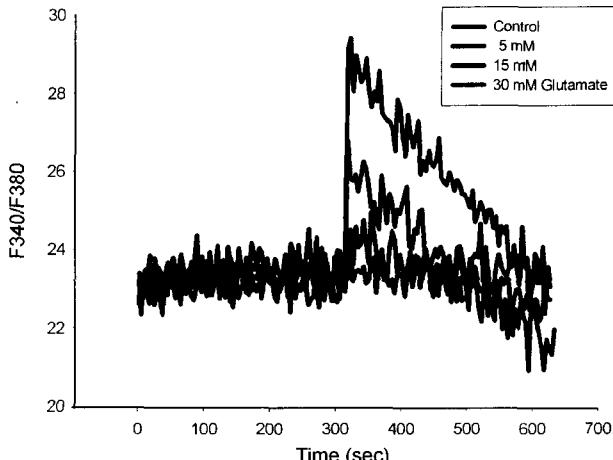
Morphology는 6 well에 1×10<sup>5</sup>개의 cell을 분주하고 24시간 후 약물을 처리하고 그로부터 24시간, 48시간, 72시간 후에 사진 촬영을 한다. 이 실험에 사용한 기기는 DSA Microscope(LEICA DAR)이며 배율은 ×40로 촬영하였다. 이 실험에는 각각의 inhibitor는 glutamate처리 2시간 전에 처리하였다.

### III. 결 과

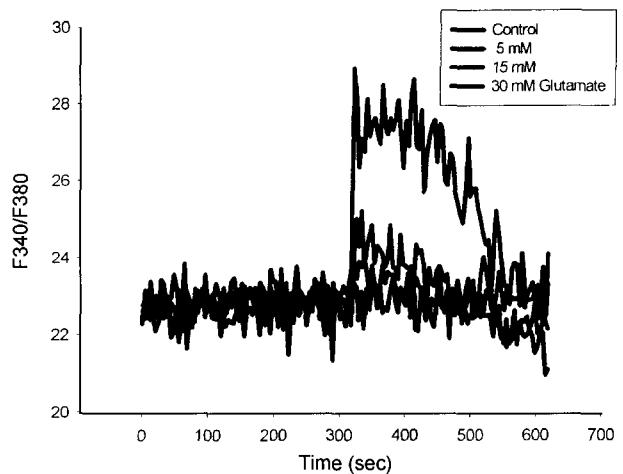
#### 1. Glutamate에 의한 [Ca<sup>2+</sup>]의 변화

1) KRH buffer에 있어서 glutamate가 [Ca<sup>2+</sup>]에 미치는 영향

Glutamate의 [Ca<sup>2+</sup>]에 대한 영향을 알아보기 위해 세포



**Fig. 1.** Changes in [Ca<sup>2+</sup>]i with glutamate in KRH buffer. Cells were incubated with 5 μM fura-2 AM for 30 min. After washing, fluorescence was measured at the ratio between an excitation wavelength of 340 nm and 380 nm. The response represents concentration-dependence of glutamate. Similar change of [Ca<sup>2+</sup>]i was seen in three experiments.



**Fig. 2.** Changes in [Ca<sup>2+</sup>]i with glutamate in Ca<sup>2+</sup> free buffer. Cells were incubated with 5 μM fura-2 AM for 30 min. After washing, fluorescence was measured at the ratio between an excitation wavelength of 340 nm and 380 nm. The response to 30 mM represents the same with Fig. 1, but any other responses were decreased. Similar change of [Ca<sup>2+</sup>]i was seen in three experiments.

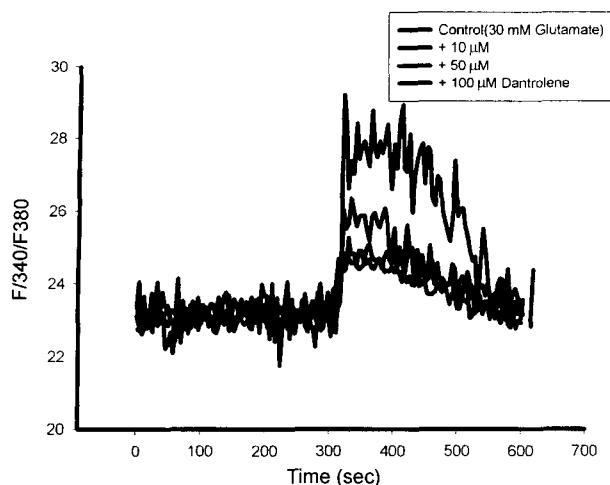
밖에 칼슘이 존재하는 KRH buffer를 사용하여 실험하였다. 이때 glutamate의 농도는 5 mM부터 30 mM까지 변화를 주었으며 [Ca<sup>2+</sup>]i는 glutamate의 농도에 의존적으로 증가하였다(Fig. 1).

2) Ca<sup>2+</sup> free buffer에 있어서 glutamate가 [Ca<sup>2+</sup>]i에 미치는 영향

[Ca<sup>2+</sup>]i 증가가 세포밖의 Ca<sup>2+</sup>의 유입에 의한 것인지를 알아보기 위하여 Ca<sup>2+</sup> free buffer를 사용하였다. glutamate의 농도는 위의 실험과 마찬가지로 5 mM부터 30 mM까지 하였으며 실험결과 calcium 포함 배지에서와 마찬가지로 glutamate에 의한 세포내 calcium 증가에 별다른 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

3) Glutamate에 의한 [Ca<sup>2+</sup>]i 증가에 있어서 Dantrolene의 억제 효과

위의 실험결과로부터 세포 내 칼슘 농도의 증가가 intracellular에서 오는 것임을 확인하였으며 칼슘 농도의 증가가 ER의 Ca<sup>2+</sup> store에서 오는 것인지 를 확인하기 위해 ER Calcium release antagonist인 dantrolene를 처리하였다. 이 실험에서 glutamate의 농도는 30 mM를 사용하였으며 이에 대하여 dantrolene의 농도를 10 μM부터 100 μM 까지 변화를 주었다. 이 때 [Ca<sup>2+</sup>]i는 glutamate 단독 처리 시보다 현저히 떨어짐은 볼 수 있었으며 dantrolene 100 μM 처리시는 50 μM과 비교해 큰 차이를 보이지 않았으며 dantrolene이 [Ca<sup>2+</sup>]i의 증가를 완전히 blocking 하지는

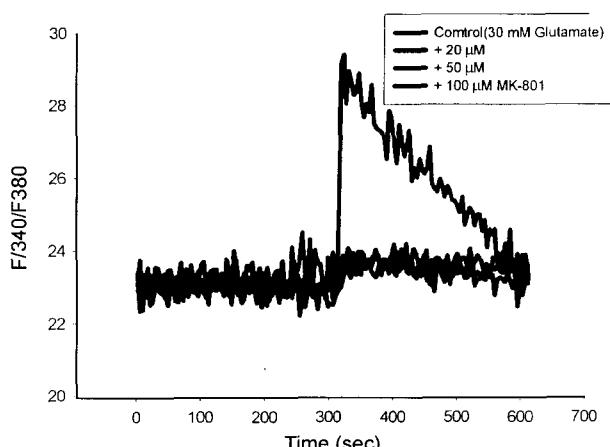


**Fig. 3.** Changes of glutamate-induced increase of  $[Ca^{2+}]_i$  by ER  $Ca^{2+}$  release inhibitor in  $Ca^{2+}$  free buffer. Cells were incubated with 5  $\mu M$  fura-2 AM for 30 min with addition of dantrolene (10~100  $\mu M$ ). After washing, fluorescence was measured at the ratio between an excitation wavelength of 340 nm and 380 nm. The response represents concentration-dependence of dantrolene (10~100  $\mu M$ ). Similar change of  $[Ca^{2+}]_i$  was seen in three experiments.

못하였다(Fig. 3).

#### 4) Glutamate에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가에 있어서 MK-801의 억제 효과

Glutamate가 NMDA receptor에 작용하여  $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가를 일으키는지를 확인하기 위하여 NMDA antagonist로 알려진 MK-801을 처리하였다. 이 실험에서도 glutamate



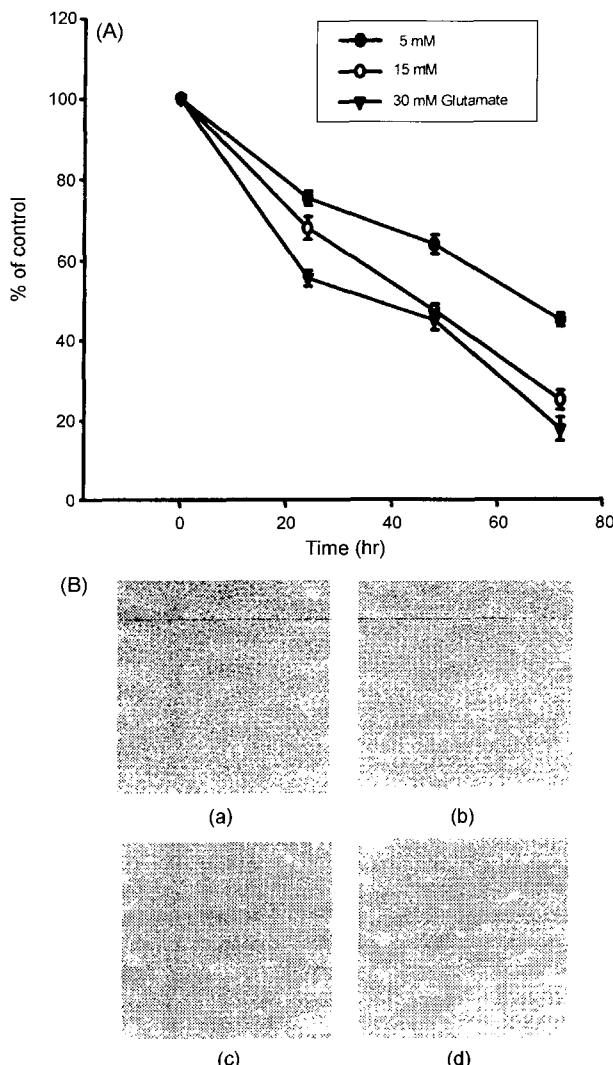
**Fig. 4.** Changes of glutamate-induced increase of  $[Ca^{2+}]_i$  with NMDA receptor antagonist in KRH buffer. Cells were incubated with 5  $\mu M$  fura-2 AM for 30 min with addition of MK-801 (20~100  $\mu M$ ). After washing, fluorescence was measured at the ratio between an excitation wavelength of 340 nm and 380 nm. All concentration of MK-801 was decreased  $[Ca^{2+}]_i$  to be clear. Similar change of  $[Ca^{2+}]_i$  was seen in three experiments.

의 농도는 30 mM을 사용하였으며 KRH buffer를 사용하였다. 이에 대하여 MK-801의 농도는 20  $\mu M$ 부터 100  $\mu M$  까지 변화를 주었으며 MK-801은 모든 농도에서 glutamate의 작용을 완전히 blocking 하는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

## 2. Glutamate에 의한 세포손상

### 1) Glutamate가 cell viability에 미치는 영향

Glutamate가 cell viability에 어떠한 영향을 미치는지 알



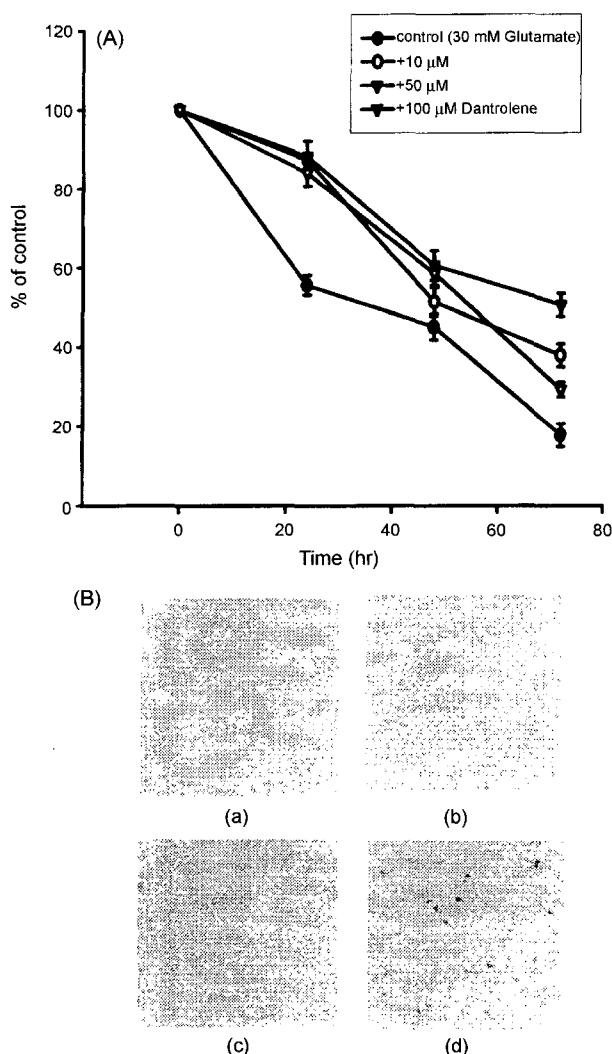
**Fig. 5.** A) Effect of glutamate on viability of PC 12 cells. PC 12 cells were incubated with glutamate (5~30 mM) 24, 48 and 72 hr. Viability was determined by PI assay as described in material and methods. Values are from three experiments with duplicates of each experiment. B) Morphological observation after glutamate treatment. Cells were incubated with glutamate (5~30 mM) 48 hr. (a), control; (b), 5 mM; (c), 15 mM; (d), 30 mM.

아보기 위하여 24 well plate에 분주하고 분주 후 24시간 후에 약물을 처리하였다. 그로부터 24시간, 48시간, 72시간 주기로 viability를 측정하였으며 이에 따른 cell morphology도 관찰하였다. Viability는 0 time을 기준으로 하여 그에 따른 각 시간대 별로 %로 나타내었다. Viability는 glutamate의 농도가 증가할수록 감소하였으며 기준점으로부터 24시간까지 크게 감소하였으며 또한 48시간부터 72시간 사이에 더 많이 감소하였다. 그리고, morphology와 비교하여 볼 때 cell death가 일어났음을 확인하

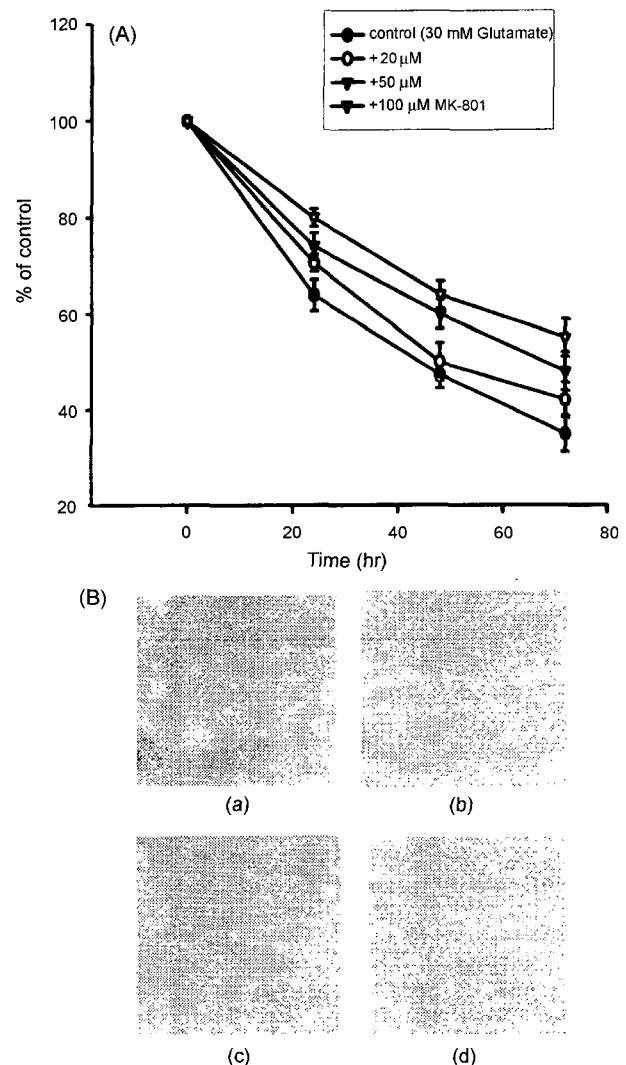
였다(Fig. 5).

## 2) DantroleneO| cell viability에 미치는 영향

이 실험은 위의 실험에서 glutamate 처리 2시간 전에 ER calcium release antagonist인 dantrolene을 처리하였으며 실험방법은 동일하게 하였다. glutamate의 양은 칼슘 측정시와 같은 30 mM을 처리하였다. dantrolene은 처음 24시간 동안은 glutamate 단독 처리와 비교해 매우 크게 cell death를 억제하였으나 48시간 후에는 그 효과가 줄어



**Fig. 6.** A) Effect of ER  $\text{Ca}^{2+}$  release inhibitor on viability of PC 12 cells. PC 12 cells were incubated with glutamate (30 mM) and dantrolene (10~100  $\mu\text{M}$ ) for 24, 48 and 72 hr. Viability was determined by PI assay as described in material and methods. Values are from three experiments with duplicates of each experiment. B) Morphological observation after treatment of ER  $\text{Ca}^{2+}$  release inhibitor. Cells were incubated with glutamate (30 mM) and dantrolene (10~100  $\mu\text{M}$ ) for 48 hr. (a), glutamate 30 mM only; (b), glutamate 30 mM plus dantrolene 10  $\mu\text{M}$ ; (c), glutamate 30 mM plus dantrolene 50  $\mu\text{M}$ ; (d), glutamate 30 mM plus dantrolene 100  $\mu\text{M}$ .



**Fig. 7.** A) Effect of NMDA receptor antagonist on viability of PC 12 cells. PC 12 cells were incubated with glutamate (30 mM) and MK-801 (20~100  $\mu\text{M}$ ) for 24, 48 and 72 hr. Viability was determined by PI assay as described in material and methods. Values are from three experiments with duplicates of each experiment. B) Morphological observation after treatment of NMDA receptor antagonist. Cells were incubated with glutamate (30 mM) and MK-801 (20~100  $\mu\text{M}$ ) for 48 hr. (a), glutamate 30 mM only; (b), glutamate 30 mM plus MK-801 20  $\mu\text{M}$ ; (c), glutamate 30 mM plus MK-801 50  $\mu\text{M}$ ; (d), glutamate 30 mM plus MK-801 100  $\mu\text{M}$ .

들었다. Dantrolene 100  $\mu\text{M}$ 은 그 효과가 감소하는 것으로 나타났다. 이는 dantrolene 자체가 고농도에서 toxic한 물질로 작용하는 것 같다(Fig. 6).

### 3) MK-801이 cell viability에 미치는 영향

실험방법은 위의 실험과 동일하게 하였으며 NMDA antagonist을 처리함으로써 cell viability에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기로 하였다. 하지만, MK-801은 cell viability에 아무런 효과를 나타내지는 못했다. 24시간까지는 glutamate와 비슷한 정도의 수준을 나타내었으나 24시간 후부터는 고농도에서 급격하게 viability가 감소하여 거의 zero 수준까지 떨어졌다. 이는 morphology 관찰했을 때도 확연하게 나타났으며 MK-801이 장기적인 처리 시에는 강한 독성을 나타내는 것 같다(Fig. 7).

## IV. 고 칠

$\text{Ca}^{2+}$  농도는 neuron에서 매우 예민하게 조절되며 신경 신호전달과 세포막 전위에서의  $\text{Ca}^{2+}$ 의 역할은 중요하다. Neuron에서의  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis의 파괴는 여러 가지 병리학적인 문제를 야기 시킨다. 최근에, 여러 연구들에서 신경 세포의 손상이  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 증가에 의해서 일어난다는 것을 제시하고 있다. 따라서 본 연구에서는 PC 12 cell을 사용하여 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 exitotoxicity를 유발시키는 기전이  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 증가에 의한 것인지와 glutamate에 의한 칼슘농도의 변화기전 및 칼슘농도 변화와 cytotoxicity와의 관련성을 관찰하고자 하였다.

첫 번째 실험에서는 glutamate가 intracellular의 calcium 농도를 증가시키는지를 알아보았다. 실험결과 glutamate는  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 농도를 용량의존적으로 증가시키며 cell viability의 감소와 세포 손상을 증가시켰다. 이는 다른 연구결과 일치하며 세포내 칼슘농도의 변화가 세포독성과 밀접한 관련이 있음을 다시 한번 확인 한 결과이며 세포내 칼슘농도증가가 glutamate의 exitotoxicity의 한 원인임을 증명한 것이다. 이는 신경세포에서 세포독성을 유발하는 다른 물질의 세포독성 메카니즘과도 일치하는 것이다(Nath *et al.*, 1997; Mackrill *et al.*, 1997; MaGinnis *et al.*, 1999).

Glutamate에 의한 세포내 칼슘농도의 증가원인이 무엇인가를 알아보기 위하여 우선  $\text{Ca}^{2+}$  free buffer에서 glutamate 처리 후 세포내 칼슘 증가를 측정한 결과  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 변화가 KRH  $\text{Ca}^{2+}$  포함배지의 경우와 유사하게 변화함을 관찰하였는데 이는 glutamate에 의한 세포내 칼슘 변화는 extracellular 칼슘의 농도에 의한 원인 보다는 intracellular 저장부위로부터 유리될 가능성이 더 많음을 짐작해 intracellular 요인에 의하여 일어나는 것임을 알 수 있었다. 즉 glutamate에 의한 칼슘의 증가는 세포막 calcium channel

의 직접적인 open과는 연관이 없음을 알 수 있다고 하겠다. 또한 glutamate가 NMDA receptor에 작용하는지를 확인하였는데 glutamate는 NMDA 수용체와 non-NMDA 수용체에 모두 작용하는 흥분성 아미노산으로 이러한 glutamate의 작용은 NMDA receptor antagonist인 MK-801에 의해 억제된다고 알려지고 있다. 따라서 본 연구에서는 칼슘포함 배지에서 NMDA 수용체 길항제를 처리하여 칼슘의 세포내 변화를 본 결과 MK-801은 glutamate에 의해 유도되는  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 증가를 완전히 차단하였으며 glutamate에 의한 cell viability의 감소도 억제하였는데 이는 glutamate의 작용기전이 NMDA receptor를 통하여 이루어짐을 간접적으로 증명한다고 하겠다.

세포내  $\text{Ca}^{2+}$  저장으로부터 intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ 의 증가 원인은 주로 mitochondria와 ER의  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase에 의한 저장능력의 상실이나 ER 및 mitochondria에서의 여러 channels를 통한 유리에 의하여 증가할 수 있는데 신경세포의 경우 ER에서의 유리가 주요 원인임이 제시되었다(Berridge, 1993). 따라서, 본 연구에서는 glutamate에 의한 세포내 칼슘 증가가 ER에서의 유리에 의한 것인지를 알아보기로 하고 그중 ER로부터의 칼슘 유리는 ryanodine receptor를 경우하는 것이 주요한 원인이 밝혀져(Mackrill *et al.*, 1997) ER calcium release inhibitor인 dantrolene을 처리하였다. Dantrolene은 glutamate에 의한 ER의 calcium store로부터 calcium의 release를 억제함이 관찰되었다. 또한 dantrolene은 glutamate에 의한 cell viability의 감소를 억제하였으며 cell death를 대부분 억제하는 효과도 나타났다. 이는  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 변화가 ER의 ryanodine receptor를 통하여 유리됨을 보여주는 것이며 세포내 칼슘증가가 세포 독성의 원인임을 다시 한번 증명하고 있다.

이러한 결과들은 glutamate가 PC 12 cell에 있어서  $[\text{Ca}^{2+}]$ 를 증가시키며 이러한  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 증가는 cell viability를 감소시키고 cell death를 일으키는 등 cell damages를 증가시킨다는 것을 보여준다. Glutamate에 의한  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 증가는 ER system 특히 ryanodine receptor에 의한 것으로 생각된다[1]. 이 결과들은 최근 Henry와 Chen 등이 신경 손상의 중요한 요인을  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 증가 때문이라고 가정하고 이러한  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 증가는 ER system에서 오는 것으로 제시한 연구 결과와 일치하며 더구나 ER  $\text{Ca}^{2+}$  release inhibitor를 처리함으로써 부분적으로  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 증가와 cell viability의 감소는 PC 12 세포에서 glutamate에 의한  $[\text{Ca}^{2+}]$ 의 증가와 신경세포에 관련성이 깊음을 보여주고 있다. 따라서, glutamate는 ER system로부터의 칼슘유리가 calcium homeostasis의 변화를 유도하게 되며 이러한 변화는 cell damages를 증가시키는 주요 원인이라고 판단되며 NMDA receptor를 통한 calcium influx도 부분적으로 영향을 줄 것으로 판단된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2002-000644-0)지원으로 수행되었음. 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Babcock, D.J., Gottron, F.J. and Choi D.W. (1999): Raising intracellular calcium attenuates ischemia apoptosis *in vitro*. *Soc. Neurosci. Abst.*, **25**, 2103.
- Berridge, M.J. (1993): Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature*, **361**, 315-325.
- Brostrom, C.O. and Brostrom, M.A. (1998): Regulation of translational initiation during cellular responsees to stress. *Prog. Nucleic Acid Res.*, **58**, 79-125.
- Carafoli, E. (1987): Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 395-433.
- Choi, D.W. (1990): Cerebral hypoxia: some new approaches and unanswered questions. *J. Neurosci.*, **10**, 2493-2501.
- Choi, D.W. (1995): Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.*, **18**, 58-60.
- Franklin, J.L. and Johnson, E.M. Jr. (1992): Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci.*, **15**, 501-508.
- Grudt, T.J., Usowicz, M.M. and Henderson, G. (1996): Ca<sup>2+</sup> entry following store depletion in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **36**, 93-100.
- Hyrc, K., Handran, S.D., Rothman, S.M. and Goldberg, M.P. (1997): Ionized intracellular calcium concentration predicts excitotoxic neuronal death: observations with low-affinity fluorescent calcium indicators. *J. Neurosci.*, **17**, 6696-6677.
- Kang, J.J., Hsu, K.S. and Lin-Shiau, S.Y. (1994): Effects of bipyridylum compounds on calcium release from triadic vesicles isolated from rabbit skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 1216-1222.
- Kristian, T.Y. and Siesjo, B.Y. (1998): Calcium in ischemic cell death. *Stroke*, **29**, 705-718.
- Meldolesi, J. and Pozzan, T. (1998): The endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 10-14.
- Mackrill, J.J., Challiss, R.A.J., O'connell, D.A., Lai, F.A. and Nahorski, S.R. (1997): Differential expression and regulation of ryanodine receptor and myoinositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels in mammalian tissues and cell lines. *Biochem. J.*, **327**, 251-258.
- MaGinnis, K.M., Wang, K.K. and Gnagy, M.E. (1999): Alterations of extracellular calcium elicit selective modes of cell death and protease activation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.*, **72**, 1853-1863.
- Nath, R., Raser, K.J., Hajimohammadreza, I. and Wang, K.K. (1997): Thapsigargin induces apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells and cerebrocortical cultures. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **43**, 197-205.
- Orrenius, S. and Nicotera, P. (1994): The calcium ion and cell death. *J. Neural Transm. Suppl.*, **43**, 1-11.
- Paschen, W. and Doutheil, J. (1999): Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: a key mechanism underlying neuronal cell injury? *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **19**, 1-18.
- Pahl, F.L. and Baeuerle, P.A. (1997): Endoplasmic-reticulum-induced signal transduction and gene expression. *Trends Cell. Biol.*, **7**, 50-55.
- Pahl, F.L. (1999): Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiol. Rev.*, **79**, 683-701.
- Paschen, W., Doutheil, J., Gissel, C. and Treiman, M. (1996): Depletion of neuronal endoplasmic reticulum calcium stores by thapsigargin: effect on protein synthesis. *J. Neurochem.*, **67**, 1735-1743.
- Pozzan, T., Rizzito, R., Volpe, P. and Meldolesi, J. (1994): Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.*, **74**, 595-636.
- Reed, J.C., Meister, L., Tanaka, S., Cuddy, M., Yum, S., Geyer, C. and Pleasure, D. (1991): Differential expression of bcl-2 protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin. *Cancer Res.*, **51**, 6529-6538.
- Sattler, R., Charlton, M.P., Hafner, M. and Tymianski, M. (1998): Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J. Neurochem.*, **71**, 2349-2364.
- Siesjo, B.K. and Bengtsson, F. (1989): Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **9**, 127-140.
- Siesjo, B.K., Hu, B. and Kristian, T. (1999): Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? [comment]. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **19**, 19-26.
- Tymianski, M. and Tator, C.H. (1996): Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery*, **38**, 1176-1195.
- Ward, A., Chaffman, M.O. and Sorkin, E. M. (1986): Dantrolene. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle

- spasticity. *Drugs*, **32**, 130-168.
- Wei, H. and Perry, D.C. (1996): Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death. *J. Neurochem.*, **67**, 2390-2398.
- Wei, H. and Wei, W., Dredesen, D.E. and Perry, D.C. (1998): Bcl-2 protects against apoptosis in neuronal cell line caused by thapsigargin-induced depletion of intracellular calcium stores. *J. Neurochem.*, **70**, 2305-2314.