

N-methyl-D-aspartate 수용기의 다양한 조절이 일차 배양된 정상사람구강각화세포의 증식에 미치는 영향; DNA 합성율 평가

김인수^{1,2} · 백기석¹ · 장미숙¹ · 이 원² · 이승표¹

¹서울대학교 치과대학 구강해부학교실, ²가톨릭대학교 의정부성모병원 치과 구강악안면외과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:124-130)

THE EFFECT OF DIFFERENTIAL MODULATION OF N-METHYL-D-ASPARTATE RECEPTOR ON THE PROLIFERATION OF PRIMARY CULTURED NORMAL HUMAN ORAL KERATINOCYTES: DNA SYNTHESIS RATE ANALYSIS

Insoo Kim^{1,2}, Ki-Suk Paik¹, Mi-Sook Chang¹, Won Lee² and Seung-Pyo Lee¹

¹Department of Oral Anatomy, College of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea

²Div. of Oral and Maxillofacial Surgery, Dept. of Dentistry, Uijeongbu St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, Gyeonggi-do, Korea

In the present study, I investigated the effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA), arachidonic acid (AA), and Nitric Oxide Synthase Inhibitor (NOS-I), alone or in combination, on the proliferation of cultured primary normal human oral keratinocytes (NHOK). The purpose of this study was therefore the preliminary study for the examination of the interaction between these agents and NHOK in order to elucidate the mechanisms by which epithelial growth and regeneration are regulated.

NHOK were obtained from gingival tissue of 20 individuals aged 20 to 29, and third passage (P3) cells were used for this study. The DNA synthesis was measured by the BrdU assay.

Addition of low concentration of AA (1 μM) and high concentration of AA with NMDA group (NMDA+AA 10 μM) made DNA synthesis rate increase significantly at the early stage. Adding NNA (10 μM) affected DNA synthesis rate to increase significantly in 4 hours. At the early stage, DNA synthesis was significantly active in the NOS-I with NMDA groups than in the control and the NMDA-only group, while it didn't become statistically meaningful in 24 hours.

AA 1 μM and NNA 10 μM may induce the proliferation of the NHOK independently and NOS-I may induce the proliferation of the NHOK with NMDA. These reactions might be related to the NMDA receptor in the cell and the change of the intracellular calcium ion concentration.

Key words: N-methyl-D-aspartate, proliferation, Normal Human Oral Keratinocyte, Arachidonic acid, Nitric Oxide Synthase Inhibitor

I. 서 론

잇몸은 구강점막의 일부로 이틀뼈 (alveolar bone)와 치아를 둘러싸고 있으며, 중층편평상피로 되어 있는 상피 조직과 아래쪽의 결합조직으로 구성되어있다. 구강상피조직은 털이 없고 땀샘이 없으며 항상 물에 젖어있는 등 일반적인 피부상피와는 차이를 보이며, 일반 피부와 장 점막의 중간적인 양상을

나타낸다. 만일 상처가 나 잇몸상피가 손상을 받은 경우 조직의 항상성 유지를 위해 fibrin, fibronectin, vitronectin 등으로 구성된 세포외 기질 (ECM)의 생성과 상처의 경계에서부터 상피 세포의 이주 등이 잘 조절된 연속 반응으로 일어나게 된다¹⁾. 상피 세포의 증식과 분화는 이주과정에서 중요한 의미를 가지며, 이러한 증식과 분화의 조절은 구강 내 상처 및 손상 (wound from trauma or defect due to pathology)으로부터의 치료 및 재건뿐만 아니라, 치과용 임플란트 시술 등의 경우에 유용하게 사용될 수 있다. 일반적인 상피의 손상이 있는 경우라면 상피가 빨리 자라 조직을 보호하는 것이 유리하겠으나, 일부 골 결손 부나 임플란트의 주위의 경우에는 상피의 빠른 증식이 골조직의 성장과 임플란트와 골 사이의 유착을 억제하여 골조직의 부족이나 임플란트와 골조직 사이 결합조직의 개재와 같은 불리한 결과를 가져오기도 한다.

지금까지 상피의 증식과 분화를 조절하는 데 관여하는 여러

김인수 · 이승표

480-717 경기도 의정부시 금오동 65-1

가톨릭대학교 의정부성모병원 치과 구강악안면외과

Insoo Kim, Seung-Pyo Lee

Div. of OMFS, Dept. of Dentistry, Uijeongbu St. Mary's Hospital, The Catholic Univ. of Korea

#65-1 Geumo-dong, Uijeongbu-si, Gyeonggi-do, 480-717, Republic of Korea

Tel: +82-31-820-3184 Fax: +82-31-847-2894

E-mail: omskim@catholic.ac.kr; omskim@gmail.com

종류의 물질이 연구되어 왔으며, 최근 상피층에 분포하는 감각신경이 신경전달물질 (neurotransmitter)을 이용하여 각화세포의 증식에 관여한다는 보고²⁾와 기저세포에 위치하는 glutamate 수용기가 상피의 증식과 분화에 관여한다는 연구가 있었다^{3,4)}. Glutamate는 excitatory amino acid (EAA) 중 하나로 중추신경계에서 대표적인 신경 전달 물질로서 다양한 수용기를 통하여 기능을 수행하며, 현재 중추신경 외에 말초 부위에 작용하는 glutamate의 기능에 대한 연구가 다양하게 진행 중이다^{3,5,7)}. Glutamate 수용기에는 여러 종류가 있는데 크게 ionotropic 수용기 (ligand-gated ion channels)와 metabotropic 수용기 (G protein-coupled receptor) 두 가지로 나뉜다. Genever 등은 glutamate의 다양한 수용기 중 ionotropic glutamate receptor의 일종인 N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)이 상피세포의 분화와 증식에 관여하며, 이 수용기의 억제물질을 투여하여 상피 성장의 억제를 관찰할 수 있다고 하였다⁸⁾. 한편 상피 손상에 대한 반응에 대해 BrdU (bromodeoxyuridine)를 사용하여 상피의 증식에 대한 평가를 해본 결과 NMDA 수용기나 유사한 수용기들이 상피 증식에 중요한 역할을 하였다⁹⁾. NMDA는 배양된 사람의 각화세포에서 세포 내 칼슘이온을 증가시키고 이러한 증가는 NMDA의 길항제인 MK-801에 의하여 억제될 수 있다고 하며⁸⁾, 특히 황성립 등⁷⁾은 정상사람구강각화세포의 증식과 분화 대한 NMDA와 그 antagonist인 MK-801의 영향에 대하여 발표한 바 있다.

NMDA를 신경세포에 적용한 경우 tissue transglutaminase (tTG)를 증가시켜 신경 세포에 치명적인 손상을 준다는 실험 결과¹⁰⁾와 NMDA 억제제를 상피에 적용한 경우 상피 증식을 억제할 수 있었다는 실험 결과³⁾ 모두 NMDA에 의한 칼슘 이온의 세포 내 이동의 결과로 알려져 있다. 칼슘 이온은 각화 세포를 포함한 광범위한 세포에서 가장 흔한 신호 변환 요소이고 세포의 증식에 필요하다. 그러나 생리적 수준의 칼슘 이온이 들어있는 배양액은 1차 배양된 사람각화세포의 급속한 분화를 유도하고 결국 apoptosis를 유발한다고 알려져 왔다. 한편, Richalrds 등¹⁰⁾은 신경세포에서 시행한 실험을 통하여 세포 내 칼슘 이온 농도가 증가하면 nitric oxide의 합성이 촉진되고 이것은 NMDA의 반응에 의한 칼슘 이온 농도 증가의 억제를 유도하는데, 이러한 feedback 현상은 nitric oxide (NO) 합성 억제제인 L-nitroarginine (NNA)를 신경 세포에 투여하여 억제할 수 있다고 하였으며, 칼슘 이온 농도의 증가에 의하여 활성화된 이 NO가 NMDA의 칼슘이온에 대한 반응을 억제시키는 반면, arachidonic acid (AA)는 NMDA의 칼슘이온에 대한 반응을 증가시킨다고 하였다. Geneve 등³⁾은 기저각화세포의 NMDA 수용기의 활동성은 증식과 분화의 운명의 결정에 중요한 역할을 할 것이라 제시하였으며, 또한 NMDA 신호가 미분화된 기저세포 표현형의 유지에 기여할 것이라 하였다. NO는 Glutamate의 방출을 유발하여 세포 외 독성에 의한 세포의 죽음을 유도하는 한편 세포 사멸(apoptosis)과 관련된 caspase라는 효소의 활성화를 막아서 세포의 죽음을 세포사멸에서 괴사(necrosis)로 변환시킨다³⁾.

Kawasaki 등¹¹⁾은 AA가 glutamate의 신경독성으로부터 retinal ganglial cells (RGCs)을 보호할 수 있는가에 대하여 실험하여,

낮은 농도의 AA가 non-NMDA ionotropic 수용기를 통한 칼슘의 유입을 줄여서 glutamate에 의하여 유도된 RGC의 죽음을 억제한다는 것을 발표하였다. 독성 농도보다 저 농도의 peroxynitrite는 다양한 세포 형태에서 mitochondrial permeability transition (MPT) 의존성 독성을 촉진시키고, 이러한 과정은 외인성 AA에 의하여 억제된다. 이 경우 AA 의존성 보호 신호가 존재하지 않는다면 세포의 괴사가 발생한다¹²⁾.

신경세포에서 glutamate-NO 경로가 약물 의존성과 같은 여러 중요한 생리적 과정을 조절하는 것은 잘 알려져 있고, NO는 glutamate의 작용에 있어서 매개물로도 작용한다. NMDA 수용기의 활성화는 질후섬유 신경세포의 세포 내 칼슘 농도를 증가시키고 칼슘은 calmodulin과 결합하며 NO의 형성을 자극하는 nitric oxide synthase (NOS)를 활성화시킨다. NOS는 세가지 형태의 isoform을 가지고 있는데, 혈관내피세포성 (endothelial)과 신경세포성 (neuronal) 그리고 유도성 (inducible)의 NOS가 그것이다. 혈관내피세포와 신경조직은 구조적으로 발현되는 칼슘/calmodulin에 의존하는 NOS 형태를 포함하는 반면, 유도성의 NOS는 대식세포들과 다른 세포 형태에서 발현되는 isoform으로 칼슘에 독립적이다¹³⁾. 이에, 칼슘 의존적인 NOS 억제제와 칼슘에 독립적인 NOS 억제제를 NMDA와 함께 또는 단독으로 사용하고 비교함으로써, NO의 합성을 통한 세포 내 칼슘 이온 농도에 대한 NMDA의 feedback 현상이 정상사람구강각화세포에서도 나타나는가와 함께 그러한 현상이 과연 칼슘이온과 관계가 있는가를 알아볼 수 있을 것이다.

본 연구는 NMDA 수용기의 다양한 조절이 정상사람구강각화상피 세포의 성장과 분화 등에 미치는 영향을 조사하여 이를 통한 구강상피의 성장 및 재생을 조절하기 위한 기반을 제공하고자 하는 실험의 예비실험으로서, NMDA와 NOS의 억제제인 NOS-I [비선택적 NOS 억제제인 NAME (L-nitroarginine methyl ester)와 신경세포성 및 혈관내피세포성 NOS의 억제제인 NNA], 그리고 AA가 사람의 정상구강각화상피의 증식에 어떠한 영향을 미치는지를 BrdU분석에 의한 DNA 합성 정도를 정량적으로 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사람구강각화세포의 분리 및 배양

외과적 수술을 이용한 사랑니 발치를 위하여 치과병원의 구강악안면외과에 내원한 20-29세의 환자 중 경미한 수준 이하의 치주 질환이 있는 건전한 잇몸 상태의 환자를 20명을 대상으로, 사전에 동의를 얻고 발치 수술 중 잇몸 조직을 채취하여 항생제가 포함된 calcium-and magnesium-free Hank's balanced salt solution (CMF-HBSS; GIBCO/BRL, Grand Island, NY) 용액에 저장하였다. 모아진 조직에서 가능한 결합조직을 제거하고 수세한 뒤 상피를 상피 하 조직과 분리하기 위하여 collagenase (Type II, 1.0 mg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)와 dispase (grade II, 2.4mg/ml; Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN)가 포함된

CFM-HBSS에서 95%의 공기와 5%의 CO₂, 그리고 37°C의 상태로 약 45-60분간 배양하였다. 상피조직과 결합조직을 분리한 후 배양접시에서 가능한 잘게 자른 뒤 Trypsin 0.25% in HBSS와 함께 교반시킨 후 상층액을 10% Fetal bovine serum (FBS) in HBSS에 섞어 원심 분리하였다. 용액부분을 제거한 뒤 침전물을 0.15mM의 칼슘을 포함하는 저칼슘배양액인 keratinocyte growth medium (KGM; Clonetics, Cambrex, Walkersville, MD, USA)에서 배양하였다. 실험에는 3차 계대배양 (P3; tertiary passage)된 세포를 사용하였다.

2. 약물의 투여

대조군과 실험군으로 구분하였고, 대조군은 정상 배지를 이용하여 배양하였고 실험군은 NMDA와 AA 및 NOS-I 단독 투여군과 NMDA와 AA를 함께 투여하는 군, 그리고 NMDA와 NOS-I을 함께 투여하는 군들로 구성하였다. 실험에 사용한 NOS-I는 비선택적 NOS 억제제인 L-NAME와 신경세포성과 혈관내피세포성 NOS의 억제제인 L-NNA 이다. 2차 계대 배양된 세포 (P2 cell)를 3차 계대 배양으로 분주할 때 96 well plate를 사용하였으며, 세포가 plate 바닥에 잘 붙은 2일 후 배지 교환 시부터 실험을 시작하여 약물을 첨가하거나 첨가하지 않았다. 첨가하는 약물 농도는 선생연구들에서 사용한 농도를 기준으로 예비실험을 하여 의미가 있다고 생각되는 농도를 결정하여 사용하였다^{7,8,10,11}.

3. BrdU 분석 의한 DNA 합성 평가

DNA 합성을 평가하기 위하여 BrdU cell proliferation Assay kit (Oncogenre Reaearch Products, Cambridge, MA)를 사용하였다. 각 화세포를 96 well plate에 1 × 10⁵ 개/well (5 × 10⁵ 개/ml × 200 μl)씩 분주하였고, 각 실험군 및 대조군 당 10 개의 well을 사용하였다. 100 μl의 배지 혹은 약물을 첨가한 배지를 사용하여 배지를

교환한 직 후 BrdU label을 20 μl씩 각 well에 첨가하고 4시간과 24시간 후에 편입된 BrdU를 인지하여 DNA 합성에 대한 정량 분석을 실시하였다. 배지를 제거한 후 Fixative/Denaturing Soln.을 200 μl씩 각 well에 첨가하여 30분간 실온에서 배양하고 제거한다. Anti-BrdU Antibody를 100 μl씩 각 well에 첨가하여 1시간 실온에서 배양하고 수세한다. Peroxidase Goat Anti-Mouse IgG HRP conjugate를 100 μl씩 각 well에 첨가하고 30분간 실온에서 배양하고 수세한다. Substrate soln.을 100 μl씩 각 well에 첨가하고 실온은 암실에서 15분간 배양한 후, stop soln.을 100 μl씩 각 well에 첨가하고 30분 이내에 microplate reader 에서 450-540nm의 두 파장으로 흡광도를 측정하였다.

4. 통계적 분석

각각의 실험군과 대조군이나 NMDA 단독 투여군과의 비교는 SPSS 10.0 프로그램을 사용한 Mann-Whitney U-test를 이용하여 통계적 유의성을 검정하였고, 유의 수준은 0.05로 하였다.

III. 결 과

모든 실험군에서 4시간 후에 비하여 24시간 후에 유의미하게 흡광도가 줄어들었다. 따라서, 약물에 의한 DNA 합성에 증가나 변화는 배지 교환 직후에 일어나며 24시간이 되기 전에 줄어든다는 것을 알 수 있다. 초기에 많이 증가한 실험군들이 24시간 후에 더 많이 감소하는 경향을 보였으며, 특히 AA 10μM 를 NMDA와 같이 첨가한 실험군에서 시간 경과에 따른 DNA 합성의 변화가 크게 나타난 것을 확인할 수 있다.

1) 배지에 NMDA 단독 첨가 (N)하거나 AA 단독 첨가 (A)한, 또는 NMDA와 AA를 같이 첨가 (A+N)한 실험군들을 대조군 (C)와 비교 (Table 1, Fig. 1)

Table 1. BrdU absorbance at 450 and 540 nm in control, NMDA, AA and NMDA + AA groups

	hours	
	4	24
	M ± SD	M ± SD
Control	0.948 ± 0.108	0.652 ± 0.138
NMDA (100 μM)	1.011 ± 0.118	0.611 ± 0.066
AA (1 μM)	1.055 ± 0.023*	0.597 ± 0.055
N + AA (1 μM)	0.958 ± 0.027	0.668 ± 0.099
AA (10 μM)	1.032 ± 0.091	0.467 ± 0.098
N + AA (10 μM)	1.304 ± 0.065*	0.405 ± 0.052

M: Mean, SD: Standard Deviation

* P<0.05, Significant difference from the control group of the same hour.

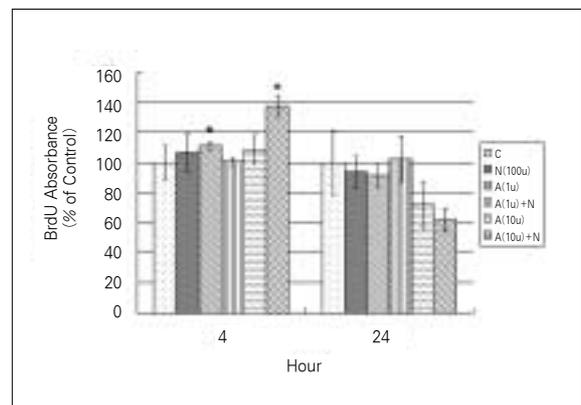


Fig. 1. Effect of NMDA, AA & NMDA+AA on the DNA synthesis rate of NHOK.

BrdU absorbance values were converted to % of control. * P<0.05: Significantly different from the control group of the same hour.

배지교환 4시간 후, 모든 실험군에서 대조군보다 DNA 합성이 활성화되었다. 특히, 저농도의 AA를 첨가한 실험군(AA 1 μ M)과 고농도의 AA를 NMDA와 같이 첨가한 실험군(N+AA 10 μ M)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 24시간 후에는 대부분 대조군 보다 낮은 DNA 합성율을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

(1) 대조군 (C)과 NMDA단독 첨가군 (N)의 비교: NHOK의 DNA합성에 미치는 NMDA의 효과

100 μ M의 NMDA 첨가가 NHOK의 DNA 합성을 4시간 후에 증가시키고 24시간 후에 감소시키고 있었지만 통계적으로 유의하지는 않았다.

(2) 대조군 (C)과 AA단독 첨가군 (A)의 비교: NHOK의 DNA 합성에 미치는 AA의 효과

저농도 (1 μ M)의 AA의 첨가가 NHOK의 DNA 합성을 4시간 후에 통계적으로 유의할 정도로 증가시켰으나 24시간 후까지 지속되지는 못하였고 오히려 통계적으로 유의할 정도는 아니지만 감소시킨 것을 알 수 있었다. 고농도 (10 μ M)의 AA의 첨가가 NHOK의 DNA 합성을 4시간 후에 증가시키고 24시간 후에 감소시키고 있었지만 통계적으로 유의하지는 않았다.

(3) AA단독 첨가군 (A)과 NMDA와 AA를 같이 첨가 (A+N)한 실험군들의 비교: NHOK의 DNA합성에 미치는 AA에 대한 NMDA의 효과

저농도의 AA에 의한 DNA 합성의 자극은 NMDA를 같이 첨가하면서 억제된 반면, 고농도의 AA에 대한 DNA 합성의 자극은 NMDA를 같이 첨가하면서 증가하였다.

2) NMDA와 AA를 같이 첨가 (A+N)한 실험군과 NMDA 단독 첨가 (N)한 실험군을 비교: NHOK의 DNA합성에 미치는 NMDA에 대한 AA의 효과 (Table 2, Fig. 2)

고농도 AA를 NMDA와 같이 첨가한 경우는 초기에 NMDA 단독 첨가한 경우보다 유의하게 NHOK의 DNA 합성을 증가시켰으며 그 이외는 통계적으로 유의미한 변화는 없었다.

3) 배지에 NMDA 단독 첨가 (N)하거나 nitric oxide synthase inhibitor를 첨가한 실험군 (NNA, NAME)을 대조군 (C)과 비교 (Table 3, Fig. 3)

NMDA 단독 첨가 시, 초기 (4hrs 후)에는 NHOK의 DNA 합성이 대조군 보다 증가하였고 24 hrs 후에는 대조군 보다 합성이 덜 이루어지는 것을 알 수 있었으나 통계적으로 유의미하지는 않았다.

NOS 억제제를 투여한 것이 DNA 합성에 어떠한 영향을 주는데 대한 실험에서는, 초기 (4 hrs 후)에는 대조군 보다 대부분 유의하게 합성이 증가하였으나 24 hrs 후에는 유의하지는 않지만 모든 경우에서 대조군 보다 합성이 덜 이루어지는 것을 알 수 있었다. 특히 NNA 10 μ M를 투여한 실험군이 NAME 10 μ M를 투여한 실험군보다 시간 경과에 따른 DNA 합성의 변화가 크게 나타났고, NOS 억제제만 투여한 실험군 보다는 NMDA를 같이 투여한 실험군에서 통계적으로 유의한 정도는 아니지만 DNA 합성이 더 활발이 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

4) 배지에 NOS inhibitor와 NMDA를 함께 첨가한 실험군 (N+NNA, N+NAME)과 NMDA 단독 첨가군 (N)을 비교 (Table 4, Fig. 4)

초기에 NOS-I를 같이 투여한 실험군이 NMDA 단독 투여군 보다 유의하게 DNA 합성을 증가시키고 24시간 후에는 유의한 차이가 없는 것으로 관찰 되었다.

Table 2. BrdU absorbance at 450 and 540 nm in NMDA and NMDA + AA groups

	hours	4	24
		M \pm SD	M \pm SD
NMDA (100 μ M)		1.011 \pm 0.118	0.611 \pm 0.066
N + AA (1 μ M)		0.958 \pm 0.027	0.668 \pm 0.099
N + AA (10 μ M)		1.304 \pm 0.065*	0.405 \pm 0.052

M: Mean, SD: Standard Deviation

* P<0.05, Significant difference from the NMDA group of the same hour.

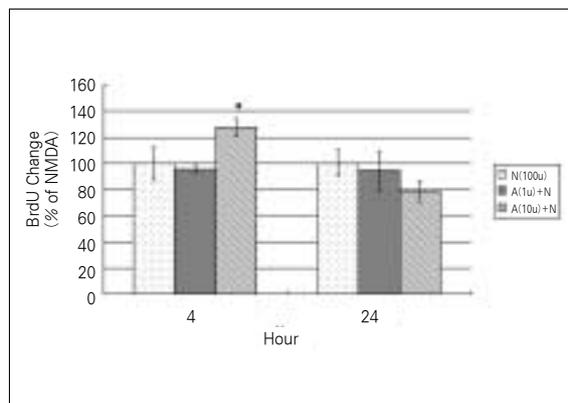


Fig. 2. Effect of NMDA and NMDA+AA on the DNA synthesis rate of NHOK.

BrdU absorbance values were converted to % of NMDA. * P<0.05: Significantly different from the NMDA group of the same hour.

Table 3. BrdU absorbance at 450 and 540 nm in control, NMDA, NOS-I and NMDA+NOS-I groups

hours	4	24
	M±SD	M±SD
Control	0.613±0.106	0.338±0.129
NMDA (100 μM)	0.660±0.087	0.267±0.049
NNA (10 μM)	0.933±0.101*	0.227±0.047
N + NNA (10 μM)	0.960±0.157*	0.253±0.069
NAME (10 μM)	0.744±0.354	0.306±0.110
N + NAME (10 μM)	0.826±0.024*	0.303±0.119

M: Mean, SD: Standard Deviation

* P<0.05, Significant difference from the control group of the same hour.

Table 4. BrdU absorbance at 450 and 540 nm in NMDA and NMDA+NOS-I groups

hours	4	24
	M±SD	M±SD
NMDA	0.660±0.087	0.267±0.049
N+NNA (10 μM)	0.960±0.157*	0.253±0.069
N+NAME (10 μM)	0.826±0.024*	0.303±0.119

M: Mean, SD: Standard Deviation

* P<0.05, Significant difference from the NMDA group of same hour.

IV. 총괄 및 고찰

신경세포에서 발견되는 다양한 수용기들이 각화세포에서 발견되고 있다. Ndoye 등¹⁴⁾은 각각의 muscarinic acetylcholine receptor subtype이 사람의 상피에서 위치에 따라 다르게 존재하는 것을 보였으며, 이 외에도 Benzodiazepine 수용기¹⁵⁾와 vanilloid receptor subtype 1 (VR1)^{16,17)}이 사람의 각화세포에서 발현되고 기능하는 것이 보고되었고 외배엽에서 유래된 각화세포와 신경세포는 이러한 수용기들이 비슷하게 발현되는 것을 보였다⁸⁾. 또 다른 연구에서는 각화세포의 nicotinic cholinergic receptor가 세포내 칼슘의 유입과 관계 있다고 하였다¹⁸⁾.

잇몸 상피는 각화중층편평상피로 형성되어 있으며, 일반 피부의 상피와 마찬가지로 주로 최하층에 있는 기저세포의 세포분열에 의해 전체적인 증식이 이루어진다. 상피 증식의 기전과 관여하는 물질에 대해서는 몇몇 의견들이 제시되었으며, 최근에는 상피층에 분포하는 감각신경이 신경전달물질을 이용하여 각화세포의 증식에 관여한다는 주장²⁾과 기저 세포에 위치하는 glutamate 수용기가 상피의 증식과 분화에 관여한다는 실험 결과가 발표되었다^{3,19)}. 특히 Genever 등³⁾에 따르면 피부

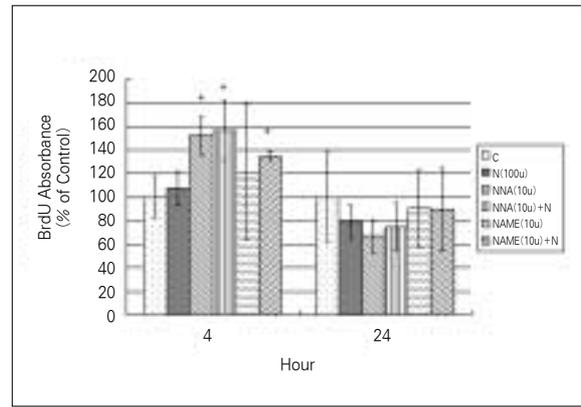


Fig. 3. Effect of NMDA, NOS-I and NMDA+NOS-I on the DNA synthesis rate of NHOK. BrdU absorbance values were converted to % of control. * P<0.05: Significantly different from the control group of the same hour.

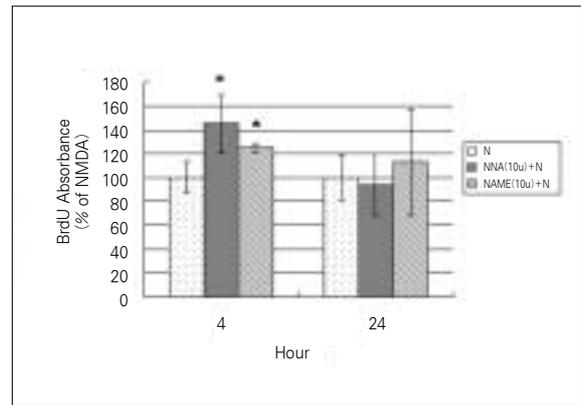


Fig. 4. Effect of NMDA and NMDA + NOS-I on the DNA synthesis rate of NHOK. BrdU absorbance values were converted to % of NMDA. * P<0.05: Significantly different from the NMDA group of the same hour.

의 denervation시 각화 세포의 증식이 유의하게 억제되고, 감각 신경에서 분비되는 glutamate가 다양한 수용기 중 NMDAR에 작용하여 상피 세포의 분화와 증식에 관여하며 이 수용기의 억제물질을 투여하여 상피 성장의 억제를 관찰할 수 있다고 하였다.

Glutamate 수용기는 중추신경계의 흥분성 신경 전달 작용에서 중요한 역할을 하며, 현재 중추신경 외에 말초 부위에 작용하는 glutamate의 기능에 대한 연구가 다양하게 진행 중이다.

후지기 상피에서 NMDAR은 기저 세포에 제한되어 발현되는데, 상피에서 glutamate는 특이한 국재성 (localization)과 역학 (dynamic)을 보인다. 보통의 피부에서 glutamate는 상피의 최상층에 국재되어 존재하고 있으나 손상을 받으면 이러한 국재성이 사라지고 일부의 glutamate가 상피의 기저층에 존재하게 된다. 이로 인하여 상피의 손상은 상피의 기저층에서 DNA 합성

을 유도하게 되며^{20,21}), glutamate는 상피의 손상에 의해 유도되는 증식에서 신호역할을 하게 된다. 그러나 이러한 현상을 설명할 수 있는 기전은 아직 명백하게 밝혀져 있지 않다. 다만 신경 전달방식에서처럼, 손상된 상피에서 glutamate의 국제화와 방출에 있어서 glutamate 수용자가 중요한 역할을 할 것이라 생각되고 있으며, 이와 함께 다양한 형태의 glutamate 수용기들이 피부 방어막의 항상성 유지와 함께 상피의 대사 체계를 조절할 것으로 생각되고 있다⁸).

많은 실험에서 세포의 증식 정도를 평가하는데 MTT분석만을 시행하였다. 그러나, 이 분석법으로 실험 당시 생존세포에 대한 정보를 얻을 수는 있어도 DNA 합성의 활성화 정도 등과 같은 세포 증식의 결정적인 정보를 얻기는 어렵다. 이 연구에서는 세포 증식을 측정하는 여러 방법 중에서 DNA 합성량을 지표로 하여 간접적으로 세포 증식을 측정하는 방법을 선택하여 첨가 약물에 의한 DNA 합성 변화에 관한 정보를 같이 얻고자 하였다. 과거에는 일반적으로 [3H] thymidine을 이용하였으나 이 물질은 RI (Radioisotope; 방사선 동위원소)이므로 취급이나 안정성, 폐기에 있어서 문제가 있어, thymidine과 마찬가지로 분열중인 세포의 DNA로 유입되는 thymidine analog 인 bromodeoxyuridine (BrdU)를 사용하였다. 세포에 유입된 BrdU는 anti-BrdU monoclonal antibody를 이용하여 ELISA로 측정할 수 있으며, 이 방법은 RI를 이용하지 않으므로 보다 안전한 방법이다.

이번 실험에서, DNA의 합성은 배지 교환 4시간 후에 대부분 증가하였으나 24시간 후에는 감소하였다. 초기에 DNA 합성이 많이 증가한 실험군들이 24시간 후에 많이 감소하는 것을 알 수 있었다. NMDA 100 μ M과 AA. 10 μ M을 같이 첨가한 실험군에서 시간에 따른 변화량이 가장 컸다. 저농도의 AA가 DNA 합성을 증가시켜 NHOK의 증식을 유도할 것을 추정해 볼 수 있다.

NOS 억제제만 투여한 실험군 보다는 NMDA를 같이 투여한 실험군에서 통계적으로 유의한 정도는 아니지만 DNA 합성이 더 활발이 이루어져, NOS 억제제와 NMDA가 같은 수용기에 작용하여 투약 초기 NHOK의 DNA 합성율을 증가시키는데 서로 도움을 주거나 또는 다른 수용기에 작용하여 같은 효과를 나타내는 것을 생각해 볼 수 있었다. NOS 억제제의 초기 DNA 합성 촉진 효과는, NMDA첨가와 관계없이 거의 일정하게 나타나 NMDA의 작용에 경쟁이나 상승 작용을 하는 것이 아니라 상가 작용 (additive effect)를 하는 것이라 생각할 수 있었다. 만약 NOS 억제제가 단독으로 NMDA와 경쟁하며 NMDA 수용기에 작용하여 DNA 합성을 증가시킨다면 NMDA 단독 첨가군과 NOS-I + NMDA 첨가군을 비교한 것에 비하여 대조군과 NOS-I 단독 첨가군을 비교한 것이 더 큰 차이를 보여야 할 것이고, NOS 억제제가 NMDA와 함께 NMDA 수용기에 대하여 상승작용을 한다면 그 반대의 결과를 나타내야 할 것이다. 또한, N과 NOS-I + N을 비교한 차이 (Table 4, Fig. 4)와 C와 NOS-I를 비교한 차이 (Table 3, Fig. 3)가 거의 비슷하고, 더군다나 NMDA를 첨가하지 않은 각각의 실험군들 (C, NOS-Is)을

NMDA가 첨가된 각각의 실험군들과 비교하면 거의 비슷한 결과 (특히 4시간 후)를 보이는 것으로 보아, NOS-I 첨가에 의한 초기 (4시간 후)의 DNA 합성률 증가는 NMDA 수용기에 NMDA와 상가 작용을 할 것으로 추정된다. 현재 NO의 생성과 DNA의 파괴에 관한 연구^{22,23})와 NO가 DNA의 결합효소 (ligase)의 활성을 떨어뜨린다는 연구²⁴)에 대하여 NO가 성장 인자에 의해 유도된 NDA 합성을 촉진한다는 연구²⁵)가 보고 되는 등 NO와 DNA에 관한 다양한 연구가 진행 중에 있으나 이로 인한 세포 합성의 증가나 감소에 대한 보다 자세한 연구는 별로 시행되지 않고 있다.

NO 자극에 의한 apoptosis는 NMDA 수용기의 활성화에 의한 칼슘 신호가 필요하다. NO는 평활근의 이완이나 혈소판의 억제, 신경전달, 면역조절, 세포분화, 조직의 형태형성과 세포독성 등에 관여하는 등 생물학적 조직에서 매우 다양한 신호 전달 역할을 하며, 수많은 종류의 생리병리적 현상에 관련되어 있다. 또한 NO는 소수성이며 확산성의 자유기 (free radical)로 NO synthases (NOS)에 의하여 L-arginine이 L-citrulline로 산화되면서 생성된다. 이러한 NO는 단백질의 S-nitrosylation이나 nitration을 통하여 세포의 소멸을 자극하거나 억제하여 세포의 죽음을 조절하는 능력을 가지고 있으며 apoptosis-necrosis 전환을 조절할 수 있다²⁶). NMDA 수용기의 S-nitrosylation은 흥분독성 (excitotoxicity)에 의한 신경의 소멸을 억제한다고 알려져 있으며²⁶), nicotine의 행동 감각 표현 또한 NMDA 수용기의 활성화에 의하여 매개된다고 하는데, NO가 칼슘의 세포내 이동과 칼슘/calmodulin 의존성 NOS의 자극에 따른 NMDA 수용기의 활성화의 결과로 형성된다고 알려져 있으므로, 니코틴에 의한 장기적인 행동변화 또한 NO 형성에 따른 NMDA 수용기의 활성화에 의하여 매개될 수 있다¹⁹). 신경세포에서 glutamate-NO 경로가 약물 의존성과 같은 여러 중요한 생리적 과정을 조절하는 것은 잘 알려져 있는데, 구조적인 형태와 유도성의 형태인 NOS는 약물의존의 생리적 과정을 매개하는데 있어서 다른 역할을 한다고 제시되어왔다. 구조적으로 발생된 NO는 nicotine 유도성 행동 효과의 발달에 중요한 역할을 할 것이라고 하며, NO는 역행성의 신경전달물질이며 시냅스후막에서 시냅스전막으로 확산될 것이라고 생각된다¹⁹). 한편, Zhu 등²⁷)은 쥐의 뇌 절편의 시상하핵 (STN; subthalamic nucleus) 신경에서 NMDA에 의하여 유도된 폭발성 점화 (burst firing)의 이온 의존성에 관하여 연구하여 NMDA는 single-spike firing을 burst firing으로 변화시키는 반면 NMDA의 길항제인 AP5는 이러한 NMDA에 의하여 유도된 bursting을 억제한다는 것을 발표하였다. 또한 이러한 NMDA에 의하여 유도된 폭발적 점화는 칼슘 이온이 포함되지 않은 관류액이나 저농도의 나트륨 이온은 포함한 관류액을 사용함으로써 완벽하게 억제된다고 하였다²⁷). 따라서 이들 NMDA와 NOS-I 등의 NHOK에 대한 작용과 칼슘과의 관계에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

이 실험은 N-methyl-D-aspartate 수용기의 다양한 조절이 정상 사람구각각화세포의 성장과 분화에 미치는 영향에 대한 예비 실험으로, 앞으로 이들 약물에 대한 정상사람구각각화세포의

세포 독성이나 생존을 검사가 시행되어야 할 것이다. 또한, 정상사람구각각화세포의 성장과 분화에는 세포 내 칼슘 이온 농도가 중요한 역할을 하며 NMDA와 AA, 그리고 NO의 feedback 또한 이러한 칼슘 이온 농도를 조절을 통하여 이루어진다고 알려져 있는 바, 이에 대한 보다 자세한 연구가 시행되어야 하겠다.

V. 결 론

NMDA와 AA 그리고 NOS-I가 일차 배양된 NHOK의 세포 수와 DNA합성에 미치는 효과에 대하여 실험한 결과 다음과 같은 결론은 얻을 수 있었다.

1. 저농도의 AA (1 μ M)나 NMDA (100 μ M)와 함께 투여된 고농도의 AA (10 μ M)는 초기에 DNA 합성율을 유의하게 증가시켰다 (P<0.05).
2. NNA (10 μ M)는 단독 또는 NMDA (100 μ M)와 함께 투여되어 초기 DNA 합성율을 유의하게 증가시켰다 (P<0.05).
3. NAME (10 μ M)는 NMDA (100 μ M)와 함께 투여되어 초기 DNA 합성율을 유의하게 증가시켰다 (P<0.05).
4. NNA (10 μ M)와 NAME (10 μ M)는 NMDA (100 μ M)와 함께 투여되어 NMDA (100 μ M) 단독 투여한 경우에 비하여 초기 DNA 합성율을 유의하게 증가시켰다 (P<0.05).

AA 1 μ M과 NNA 10 μ M은 단독으로 일차 배양된 정상사람구각각화세포의 증식을 유도할 것이고, NOS 억제제(NNA 10 μ M와 NAME 10 μ M)는 NMDA와 함께 투여되어 정상사람구각각화세포의 증식을 유도할 것이며, 이들의 작용은 세포 내 존재하는 NMDA 수용기와 세포 내 칼슘 농도의 변화와 관계가 있을 것이다.

참고문헌

1. Hakkinen L, Uitto VJ, Larjava H: Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol* 2000;24:127-152.
2. Hsieh ST, Lin WM: Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation. *J Invest Dermatol* 1999;113:579-586.
3. Genever PG, Maxfield SJ, Kennovin GD, Maltman J, Bowgen CJ, Raxworthy MJ et al: Evidence for a novel glutamate-mediated signaling pathway in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999;112:337-342.
4. Morhenn VB, Waleh NS, Mansbridge JN, Unson D, Zolotorev A, Cline P et al: Evidence for an NMDA receptor subunit in human keratinocytes and rat cardiocytes. *Eur J Pharmacol* 1994;268:409-414.
5. 임영철, 백기석, 김인수, 이승표: 흰쥐 혀의 맛봉오리에서 나타나는 수종의 glutamate 수용기에 대한 면역조직화학적 연구. *대한구강해부학회지* 2003;27:39-46.
6. 임영철, 백기석, 장미숙, 이승표: 흰쥐 혀의 맛봉오리에서 kainite 수용기의 발현에 관한 면역조직화학적 연구. *대한구강해부학회지* 2003;27:211-225.
7. 황성립, 백기석, 장미숙, 이승표: 사람정상구각각화세포의 증식과 분화에 미치는 N-methyl-D-aspartate와 MK-801 영향에 관한 연구. *대한구강해부학회지* 2004;28:33-42.
8. Fuziwara S, Inoue K, Denda M: NMDA-type glutamate receptor is associated with cutaneous barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2003;120:1023-1029.

9. Ientile R, Caccamo D, Macaione V, Torre V, Macaione S: NMDA-evoked excitotoxicity increases tissue transglutaminase in cerebellar granule cells. *Neuroscience* 1002;115:723-729.
10. Richards DA, Bliss TV, Richards CD : Differential modulation of NMDA-induced calcium transients by arachidonic acid and nitric oxide in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 2003;17:2323-2328.
11. Kawasaki A, Han MH, Wei JY, Hirata K, Otori Y, Barnstable CJ: Protective effect of arachidonic acid on glutamate neurotoxicity in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1835-1842.
12. Tommasini I, Guidarelli A, Cerioni L, Cantoni O: The arachidonate-dependent cytoprotective signaling evoked by peroxynitrite is a general response of the monocyte/macrophage lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:1191-1195.
13. Shim I, Kim HT, Kim YH, Chun BG, Hahm DH, Lee EH et al: Role of nitric oxide synthase inhibitors and NMDA receptor antagonist in nicotine-induced behavioral sensitization in the rat. *Eur J Pharmacol* 2002;443:119-124.
14. Ndoye A., Buchli R, Greenberg B, Nguyen VT, Zia S, Rodriguez JG et al: Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1998;111:410-416.
15. Stoebner PE, Carayon P, Penarier G, Frechin N, Barneon G, Casellas P et al: The expression of peripheral benzodiazepine receptors in human skin: the relationship with epidermal cell differentiation. *Br J Dermatol* 1999;140:1010-1016.
16. Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A et al: Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:1250-1252.
17. Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Inoue K, Denda M: Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:124-129.
18. Grando SA, Horton RM, Mauro TM, Kist DA, Lee TX, Dahl MV: Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J Invest Dermatol* 1996;107:412-418.
19. Skerry TM, Genever PG: Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:174-181.
20. Proksch E, Feingold KR, Man MQ and Elias PM : Barrier function regulates epidermal DNA synthesis. *J Clin Invest* 1991;87:1668-73.
21. Denda M, Sato J, Tsuchiya T, Elias PM, Feingold KR: Low humidity stimulates epidermal DNA synthesis and amplifies the hyperproliferative response to barrier disruption: implication for seasonal exacerbations of inflammatory dermatoses. *J Invest Dermatol* 1998;111:873-878.
22. Hassoun EA, Stohs SJ: Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures. *Toxicology* 1996;112:219-226.
23. Spek EJ, Vuong LN, Matsuguchi T, Marinus MG, Engelward BP: Nitric oxide-induced homologous recombination in Escherichia coli is promoted by DNA glycosylases. *J Bacteriol* 2002;184:3501-3507.
24. Graziewicz M, Wink DA, Laval F: Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: potential mechanisms for NO-mediated DNA damage. *Carcinogenesis* 1996;17:2501-1505.
25. Dhaunsi GS, Ozand PT: Nitric oxide promotes mitogen-induced dna synthesis in human dermal fibroblasts through cGMP. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;31:46-49.
26. Nicotera P, Melino G: Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 2004;23:2757-2765.
27. Zhu ZT, Munhall A, Shen KZ, Johnson SW: Calcium-dependent sub-threshold oscillations determine bursting activity induced by N-methyl-D-aspartate in rat subthalamic neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 2004;19:1296-1304.