J. Exp. Biomed. Sci. 2011, 17(3): 267~271

■ Brief Communication ■

Role of Cannabinoid on Neuronal Differentiation of P19 Cells

Hyunhee Ju and Sungho Ghil†

Department of Life Science, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

P19 cells are pluripotent embryonal carcinoma cells and can be differentiated into neuronal cell type by treatment with retinoic acid (RA) and aggregation culture. Cannabinoids are the active components of *Cannabis sativa* and they have diverse pharmacologic activities, such as pain control, anti-inflammatory effects, neuro-protection effects and tumor regression. Cannabinoids also involved in neuronal proliferation, migration, differentiation and survival in developing brain. Here, we studied the role of cannabinoids on neuronal differentiation of P19 cells. Treatment with cannabinoids increased the neuronal differentiation induced by RA and also promoted transcriptional activity of neurogenin 1, key transcription factor for neuronal differentiation of P19 cells. These results suggest that the cannabinoids can accelerate neuronal differentiation of P19 cells.

Key Words: Cannabinoids, P19 cells, Neurogenin 1, Neuronal differentiation, Retinoic acid

P19 세포는 생쥐 배자에서 유래한 세포로서 세 개의 배엽으로 분화 가능한 다분화능을 가지고 있다 (McBurney et al., 1982). 이 세포는 배양 조건 및 분화 유도물질의 종류에 따라 배자밖내배엽, 신경세포, 근육세포, 상피세포, 연골세포 등 다양한 세포로 분화시킬 수 있기 때문에 세포분화 및 발생 연구에 많이 이용되고 있다 (Hu et al., 2010; Teets et al., 2011). P19 세포를 신경세포로 분화시키기 위해서는 RA의 처리와 함께 aggregation 배양을 이용하는 방법이 오래 전부터 이용되어 왔으며 (Bain et al., 1994), 많은 연구들을 통해 신경세포 및 신경교세포 등으로 분화 가능하다는 것이 입증되었다 (Rujano et al., 2004).

대마 (*Cannabis sativa*)는 통증이나 구토, 근육경련, 불면증 등에 관련된 60여종의 생리활성 물질을 함유하고 있고, 카나비노이드 (cannabinoid)는 대마의 핵심성분이다. 최근 동물의 뇌조직에서 식물의 카나비노이드 성분과 유사한 5종류의 내인성카나비노이드 (endogenous cannabinoid)가 분리된 바 있다 (Bisogno et al., 2005).

카나비노이드 수용체는 세포막을 7번 통과하는 G-단백질과 연결되어 있는 수용체 (G-protein coulpled receptor, GPCR)이며, 현재까지 두 종류의 isoform이 존재하고 있는 것으로 알려져 있다. 카나비노이드 수용체-1 (CB1)은 최초로 클로닝된 카나비노이드 수용체로서 주로 신경조직에 발현된다 (Matsuda et al., 1990). 또한 카나비노이드 수용체-2 (CB2)는 면역조직에서 발현된다. 신경계에서 카나비노이드 수용체의 역할은 통증제어 기전에 대해 잘 연구되어 있다. CB1은 시냅스전 세포에 발현되고 통증신호에 의해 생성된 카나비노이드가 CB1과 결합하여 Gi/o 단백질을 경유하여 칼슘채널의 활성을 억제함으로서, 활동전위의 전파를 억제하거나, 신경전달물질의 분비를 방해하여 통증제어가 일어난다 (Schlicker and Kathmann, 2001; Pan et al., 2008). 내인성 카나비노이드는 모두 arachidonic acid로부터 유래하였으며, 생리적 또는 병리적인 상황 하에서 생체 내에서 필요에 의해 합성·분비되고 fatty acid amide hydrolase와 N-acylethanol-amine-hydrolyzing acid amidase라는 효소에 의해 생분해된다. 최근에 이러한 생분해작용을 억제하여 체내 내인성 카나비노이드의 발현량을 증가시키기 위한 연구 또한 활발히 진행되고 있다. 즉 내인성 카나비노이드 생분해 효소들의 활성분석 시스템 개발 또는 활성억제제 개발 등의 연구가 그것이다 (Kim et al., 2010).

(내인성) 카나비노이드는 항암작용, 통증제어, 뇌발생 과정, 뇌손상 복구작용, 감염억제작용 등의 다양한 약리학적 효과를 보이는 것으로 알려져 있으며 (Hohmann et al., 2006), 특히 다음과 같은 연구들을 통해 뇌신경발생 과정에서도 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 보고되

*접수일: 2011년 8월 3일 / 수정일: 2011년 9월 24일
채택일: 2011년 9월 24일
†교신저자: 길성호, (우) 443-760 경기도 수원시 영통구 이의동, 경기대학교 생명과학과
Tel: 031-249-9646, Fax: 031-249-9646
e-mail: shghil@kgu.ac.kr

었다. 발생중인 뇌조직의 신경전구세포에서 카나비노이드 시스템의 발현이 확인되었으며, 신경전구세포의 증식·분화·이동·생존 등에 관여하였다 (Jin et al., 2004; Aguado et al., 2005). 카나비노이드 수용체가 결여된 생쥐에서 신경전구세포의 증식, 자기재생 (self-renewal), neurosphere의 형성이 현저히 저하되었고, 신경발생과정의 오류에 따른 신경학적 결함을 보였다 (jiang et al., 2005). 또한 신경세포주 및 순수분리된 신경세포에 카나비노이드를 처리하면 신경돌기의 성장, 축삭돌기의 신장, 시냅스 형성 등이 유도되었다 (Ruede et al., 2002; Jordan et al., 2005; Palazuelos et al., 2006). 본 연구에서는 신경계의 발생과정에서 카나비노이드의 역할을 조사하기 위해, P19 세포의 신경분화과정에 카나비노이드를 처리하여 그 효과를 조사하였다.

본 연구에 사용된 P19 세포는 10% 우태혈청과 1% penicillin, 100 μg/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였으며, 2~3일에 한 번씩 세포를 Hank's buffered salt solution으로 수세한 후, 0.25% trypsin-EDTA 용액을 사용하여 세포를 배양용기의 바닥으로부터 분리시킨 후, 계대배양 하였다. P19 세포를 신경세포로 분화 유도하기 위해서 +2/-2 RA 방법을 사용하였다 (Kim et al., 2004). 이 방법을 간략히 설명하면, 1×10^5개의 세포를 박테리아용 페트리 배양접시에 분주하고, 0.5 μM RA를 처리하였다. 48 시간 배양한 후, RA가 포함되지 않은 성장배지로 교환하고 48시간 동안 추가 배양하였다. 형성된 배자모양체 (embryoid body)를 분리하기 위해 배양액을 수거하고 원심분리한 후, 0.05% Trypsin-EDTA 용액을 처리하였다. 분리된 세포들을 poly-D-lysin과 콜라겐 type I이 코팅된 세포배양용기에 옮겨 배양하였다. 24시간 후, 0.5% 우태혈청이 포함된 배양액으로 교환하고 100 nM CP55,940 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO)을 처리하여 24, 48, 72시간 간격으로 세포를 수거한 후 다음 실험에 이용하였다. P19 세포에 유전자를 발현시키기 위해, 세포를 6-well 배양용기에 1×10^4 세포수로 분주한 후 Lipofectamine 2000을 사용하여 transfection 하였다.

Western blot 분석을 위해 세포를 수집하여 4℃에서 1시간 동안 1% TritonX-100이 포함된 PBS 용액을 이용하

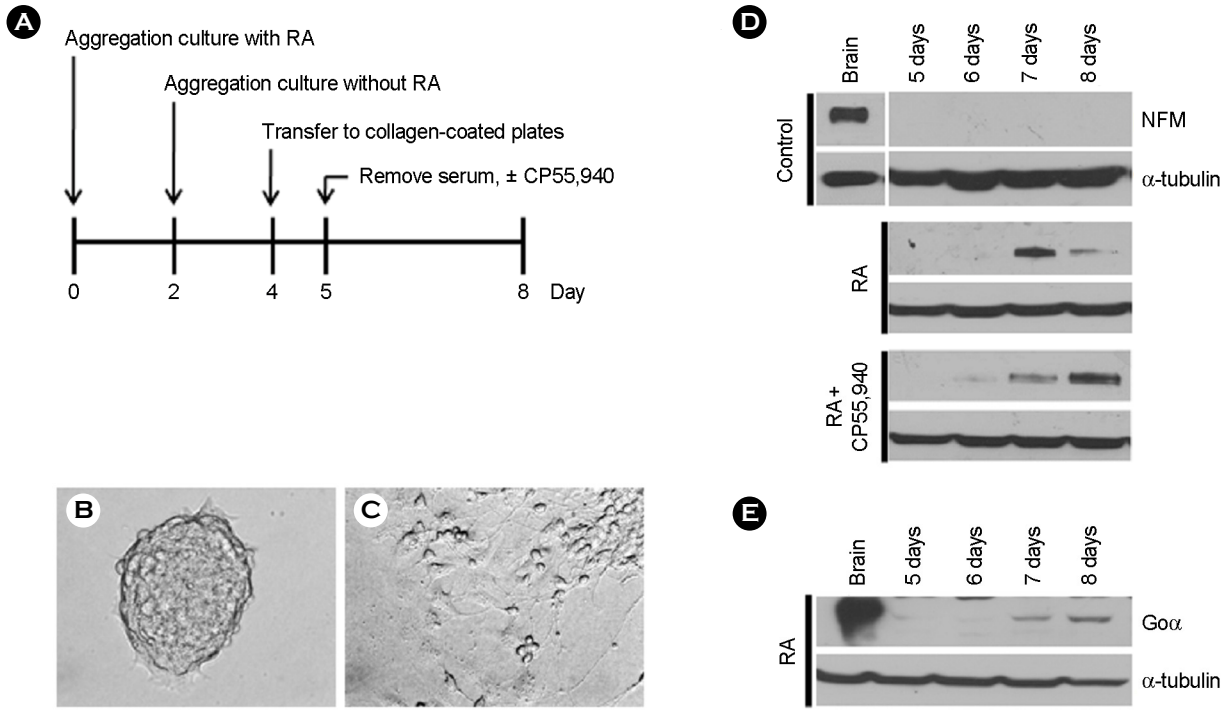

Fig. 1. Effect of cannabinoid on NFM expression in RA-induced P19 cells. (A) Cells were cultured as aggregates by the +2/-2 RA method and plated onto collagen-coated plates. Cells were cultured following 4 days in the presence and absence of cannabinoids. (B) After 4 days culture, the cells formed embryoid body. (C) After plate onto collagen-coated plates, the cells were differentiated into neuron-like cells. (D) Cells extracts harvested from indicated days were subjected into Western blot analysis using antibodies against NFM and α-tubulin, used as an internal control. Mouse brain homogenate was used as a positive control. (E) Goα expression were detected by Western blot analysis using anti-Goα antibodies during P19 cell differentiation.

여 세포를 용해하였다. 용해된 세포의 추출액을 확보하기 위해 4℃, 12,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 50 μg의 추출액을 이용하여 10% SDS-PAGE를 수행하고 PVDF membrane (Westran S, Watman, Florham Park, NJ)에 단백질을 옮겨 일차항체 [Neurofilament-M (NFM, Sigma, St. Louis, MO); anti-Goα (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA); anti-α-tubulin (Sigma)] 및 이차항체 [Goat anti-Mouse IgG HRP conjugate (ZYMED, Carlsbad, CA) 1:5,000와 Goat anti-Rabbit IgG HRP conjugate (ZYMED) 1:25,000)]를 반응시킨 후 West-Zol® (Intron Biotechonolgy, Sungnam, Korea)을 사용하여 X-ray 필름 (Agfa, Mortsel, Belgium)에 감광시킨 후 현상하였다.

Neurogenin 1의 전사활성 능력을 측정하기 위해 luciferase 분석을 수행하였다. P19 세포를 6-well 배양용기에 1×10^4 세포수가 되도록 분주하고, 18~20시간 후에 reporter gene인 pRIPE3(3+)-Luc과 neurogenin 발현벡터인 pcDNA3.1-neurogenin 1을 함께 발현시켰다. 모든 transfection 실험에 유전자들의 발현차이를 보정하기 위해 β-galactosidase를 발현하는 pCMV-βgal을 함께 발현시켰다. 24시간 후, 100 nM CP55,940, 0.5 μM RA, 30 ng/ml pertussis toxin (PTX, Calbiochem, San Diego, CA)를 각각 또는 함께 처리하고, 48시간 후에 GloMax®-96 Microplate Luminometer (Promega, Sweden)를 이용하여 luciferase 활성분석을 실시하였고, β-galactosidase 활성분석을 수행하여 luciferase 측정값을 보정하였다.

P19 세포를 신경세포로 분화시키기 위해 +2/-2RA 방법을 이용하였다. 먼저 P19 세포를 세포가 바닥에 붙지 않는 박테리아용 페트리 배양접시에 분주하고 RA가 존재하는 조건에서 2일간 배양하였다. 그 후, RA가 존재하지 않는 배양액에 다시 2일간 배양하였다. 세포의 모습은 Fig. 1B와 같이 100~1,000개의 세포로 이루어진 배자모양체를 형성하였다. 이 후, 세포를 콜라겐이 코팅된 배양접시에 옮겨 추가 배양한 후, 혈청을 제거하여 Fig. 1C와 같이 신경세포로 분화시켰다. 이들이 신경세포로 적절히 분화되었는지 확인하기 위해, 세포를 수거하여 NFM 항체를 사용하여 Western blot을 실시하였다 [Fig. 1D]. RA가 존재하지 않는 조건에서 배양된 P19 세포는 분화시간이 증가하여도 NFM의 발현을 관찰할 수 없었다. 그러나 RA가 존재할 경우, NFM의 발현을 확인할 수 있었으며, 7일째 그 발현량이 가장 높았다. 카나비노이드 수용체의 작용약 (agonist)인 CP55,940을 배양 5일째, 혈청을 제거해 주면서 처리한 경우 [Fig. 1A], RA만 존재할 때 보다 NFM의 발현이 이른 시기에 보였으며 더 지속되었다 [Fig. 1D]. 이러한 결과는 RA에 의한 P19 세포의 신경분화 유도효과를 카나비노이드가 상승시키는 작용을 할 수 있음을 시사한다. 카나비노이드 수용체는 세포막을 7번 통과하는 단백질 구조로 이루어져 있고 그 하위에 G-단백질이 결합하고 있어 수용체의 신호가 세포내부로 전달된다. RA에 의한 P19 세포의 분화과정 동안 Go의 α 소단위체 (Goα) 발현을 조사해본 결과 6일째 발현이 시작되어 8일째로 갈수록 발현량이 증가함을 관찰하였다 [Fig. 1D]. 이 결과는 P19 세포가 분화되면서 Goα의 발현량이 증가되어 카나비노이드의 신호를 세포내부로 매개할 수 하게 되고 그로 인해 카나비노이드의 효과가 나타났다는 것을 의미한다.

이전 보고에서 neurogenin 1은 P19 세포의 신경분화를 유도하는 단백질로 알려졌다 (Kim et al., 2004). P19 세포에서 neurogenin 1에 의한 신경분화 유도과정에 카나비노이드의 처리가 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위해

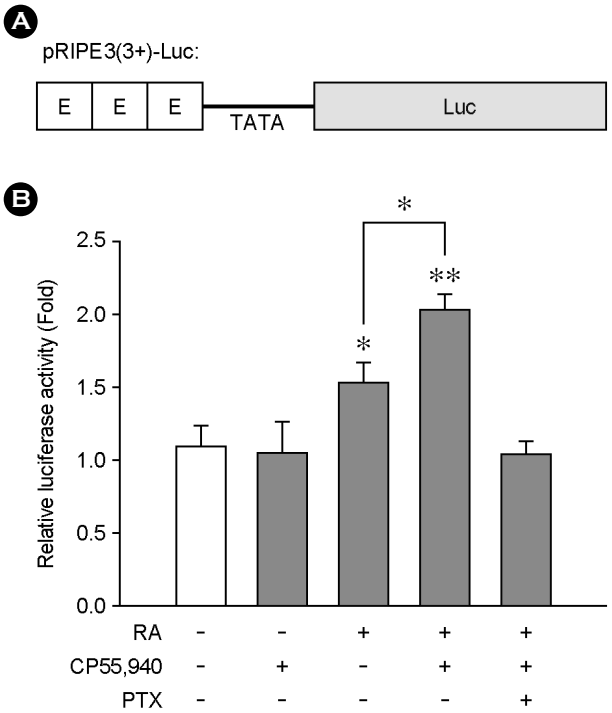

Fig. 2. Effect of cannabinoids on transcription activity of neurogenin 1 in P19 cells. (A) Schematic diagram of reporter gene construct, pRIPE3(3+)-Luc containing 3 copies of E-box at promoter region of luciferase gene (B) P19 Cells were transfected with expression plasmids for reporter gene (0.3 μg), pcDNA3.1-neurogenin 1 (0.3 μg) and pCMV-βgal (0.3 μg), and treated with indicated chemicals. Cell extract were subjected into luciferase and β-galactosidase assay. Data are presencted as the average ± S.E. of at least three independent experiments. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ compared to control level.

pRIPE3(3+)-Luc 플라스미드를 이용하여 reporter gene 분석을 실시하였다 [Fig. 2A]. 이 플라스미드는 luciferase 유전자 앞 프로모터 부위에 3개의 E-box (CANNTG)를 가지고 있다. E-box는 neurogenin 1과 같은 basic helix loop helix (bHLH)의 단백질 구조를 갖는 단백질들이 결합할 수 있는 프로모터 부분이며, neurogenin 1은 bHLH A class에 속하는 E-단백질과 heterodimer를 이뤄 E-box에 결합한다 (Cho et al., 2001). P19 세포에 reporter gene과 neurogenin 1을 발현시키고, RA, CP,55940 또는 Gi 및 Go의 활성 억제제인 PTX를 각각 또는 함께 처리하였다. RA 단독 처리에 의해 reporter gene의 발현이 증가하였으며, CP55,940 동반 처리에 의해 증가폭이 현저히 상승되었다. 이러한 상승폭은 PTX에 의해 감소하였다 [Fig. 2B]. 이러한 결과는 P19 세포에서 RA의 처리에 의해 neurogenin 1의 전사 활성이 증가되며, 카나비노이드는 Gi 및 Go 단백질을 경유하여 증가된 활성을 더욱 상승시킨다는 것을 암시한다.

카나비노이드 수용체는 Gi 및 Go 단백질과 연결되고 그 중 Go 단백질은 신경분화과정에 매우 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. Goα의 발현은 신경세포의 돌기의 개수를 증가시키고, PKA 및 CREB의 활성을 조절하여 신경분화를 유도하는 역할을 수행한다 (Ghil et al., 2000; Ghil et al., 2006). 또한 그 하위에 Rit (Ras-like protein in all tissues)을 하위 신호전달자로 사용하고 있어 ERK의 활성을 조절하여 신경분화를 조절한다 (Kim et al., 2008). 본 연구에서 카나비노이드 수용체의 활성화에 의해 Goα의 활성이 증가하였을 것이며, 이는 그 하위에 존재하는, 앞서 언급한 것과 같은, 신경분화와 관련된 다양한 신호분자들을 활성화 시켜 RA에 위해 분화 유도된 P19 세포의 신경분화를 더욱 촉진시켰을 것으로 사료된다.

bHLH 전자조절인자는 조직-특이적으로 발현되며, 신경분화과정에 매우 중요한 단백질이다. bHLH 단백질은 어떤 조직에도 존재하는 E-단백질과 heterodimer를 이루어 표적유전자의 E-box에 결합하여 전사를 유도시킨다 (Murre et al., 1989). Neurogenin은 중추 및 말초신경계에서 분열중인 세포에 우세하게 발현되며, 신경세포로의 운명을 결정짓게 해주는 역할을 수행한다 (Ma et al., 1997). 한편 신경분화를 유도하는 bHLH의 다른 종류인 NeuroD는 분열이 끝난 세포 또는 신경분화가 진행중인 세포에서 우세하게 발현된다 (Lee et al., 1995). Neurogenin1의 지속적인 발현은 RA가 존재하지 않는 상황 하에서도 P19 세포의 성공적인 신경분화를 유도하였다 (Kim et al., 2004). 따라서 P19 세포의 신경분화에 있어서 neurogenin 1은 핵심적인 역할을 수행하며, 본 연구에서 RA와 카나비노이드의 동반처리시 RA 단독처리시 보다 neurogenin 1의 활성이 증가했다는 것은 더 많은 세포들이 신경세포로 분화가 이루어졌음을 의미한다.

본 연구를 통해, 카나비노이드는 RA에 의한 P19 세포의 신경분화를 지속 및 가속화 시키고 신경분화의 핵심적인 유전자의 활성을 증가시키는 등 신경발생에 중요한 역할을 수행한다는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임 (2010-0008522).

REFERENCES

Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. FASEB J. 2005. 19: 1704-1706.

Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI. From embryonal carcinoma cells to neurons: the P19 pathway. Bioessays. 1994. 16: 343-348.

Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. Pharmacol Biochem Behav. 2005. 81: 224-238.

Cho JH, Kwon IS, Kim S, Ghil SH, Tsai MJ, Kim YS, Lee YD, Suh-Kim H. Overexpression of BETA2/NeuroD induces neurite outgrowth in F11 neuroblastoma cells. J Neurochem. 2001. 77: 103-109.

Ghil S, Choi JM, Kim SS, Lee YD, Liao Y, Birnbaumer L, Suh-Kim H. Compartmentalization of protein kinase A signaling by the heterotrimeric G protein Go. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. 103: 19158-19163.

Ghil SH, Kim BJ, Lee YD, Suh-Kim H. Neurite outgrowth induced by cyclic AMP can be modulated by the alpha subunit of Go. J Neurochem. 2000. 74: 151-158.

Hohmann AG, Suplita RL 2nd. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. AAPS J. 2006. 17: E693-708.

Hu DL, Chen FK, Liu YQ, Sheng YH, Yang R, Kong XQ, Cao KJ, Gu HT, Qian LM. GATA-4 promotes the differentiation

of P19 cells into cardiac myocytes. Int J Mol Med. 2010. 26: 365-372.

Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. J Clin Invest. 2005. 115: 3104-3116.

Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, Childs J, Greenberg DA. Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. Mol Pharmacol. 2004. 66: 204-208.

Jordan JD, He JC, Eungdamrong NJ, Gomes I, Ali W, Nguyen T, Bivona TG, Philips MR, Devi LA, Iyengar R. Cannabinoid receptor-induced neurite outgrowth is mediated by Rap1 activation through G(alpha)o/i-triggered proteasomal degradation of Rap1GAPII. J Biol Chem. 2005. 280: 11413-11421.

Kim D-W, Kim G-J, Kim H-J, Ghil S-H. Fluorescence-based Assay System for Endocannabinoid Degradation Enzyme, Fatty Acid Amide Hydrolase J. Exp. Biomed. Sci. 2010. 16: 279-285.

Kim S, Yoon YS, Kim JW, Jung M, Kim SU, Lee YD, Suh-Kim H. Neurogenin1 is sufficient to induce neuronal differentiation of embryonal carcinoma P19 cells in the absence of retinoic acid. Cell Mol Neurobiol. 2004. 24: 343-356.

Kim SH, Kim S, Ghil SH. Rit contributes to neurite outgrowth triggered by the alpha subunit of Go. Neuroreport. 2008. 19: 521-525.

Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H. Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. Science. 1995. 268: 836-844.

Ma Q, Sommer L, Cserjesi P, Anderson DJ. Mash1 and neurogenin 1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing notch ligands. J Neurosci. 1997. 17: 3644-3652.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 1990. 346: 561-564.

McBurney MW, Jones-Villeneuve EM, Edwards MK, Anderson PJ. Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. Nature 1982. 299: 165-167.

Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. Cell 1989. 58: 537-544.

Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. FASEB J. 2006. 20: 2405-2407.

Pan B, Hillard CJ, Liu QS. D2 dopamine receptor activation facilitates endocannabinoid-mediated long-term synaptic depression of GABAergic synaptic transmission in midbrain dopamine neurons via cAMP-protein kinase A signaling. J Neurosci. 2008. 28: 14018-14030.

Rueda D, Navarro B, Martinez-Serrano A, Guzman M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. J Biol Chem. 2002 277: 46645 -46650.

Rujano MA, Pina P, Servitja JM, Ahumada AM, Picatoste F, Farrés J, Sabrià J. Retinoic acid-induced differentiation into astrocytes and glutamatergic neurons is associated with expression of functional and activable phospholipase D. Biochem Biophys Res Commun. 2004. 316: 387-392.

Schlicker E, Kathmann. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. Trends Pharmacol Sci. 2001. 22: 565-572.

Teets BW, Soprano KJ, Soprano DR. Role of SF-1 and DAX-1 during differentiation of P19 cells by retinoic acid. J Cell Physiol. 2011. [Epub ahead of print]