고신대학교 의과대학 학술지 제24권 제1호
Kosin Medical Journal
Vol. 24. No. 1, pp. 28~32, 2009

합성 카나비노이드 수용체 작용 물질인 WIN이 만성 저산소 환경에서 배양한 대뇌겉질 신경세포의 Caspase 3 활성화를 억제한다.

김호찬

고신대학교 의과대학 정신과학교실

Synthetic Cannabinoid Receptor Agonist, WIN55.212.2 Inhibits the Activation of Caspase 3 in Primary Cortical Neurons by Chronic Hypoxia.

Ho-Chan Kim

Department of Neuropsychiatry, Kosin University, College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Synthetic cannabinoid receptor agonist, WIN55.212.2 may provide neuroprotection in damages of central nervous system, including hypoxia and ischemic diseases. Here I investigated the neuroprotective function of synthetic cannabinoid receptor agonist (WIN55.212.2) on death induced by chronic hypoxic damages in the primary cultured cortical neurons and tested the hypothesis that WIN55.212.2 modulates the caspase 3 activation, as key features induced by chronic hypoxia. WIN55.212.2 inhibits hypoxia-induced the activation of caspase 3 expression. Also it induces AKT phosphorylation in chronic hypoxia but not ERK phosphorylation. These data support that WIN would have a neuroprotective function in chronic hypoxia through the AKT intracellular signaling pathway. Also it suggested that WIN55.212.2 may be candidate for treatment of chronic hypoxia.

Key words : cannabinoids, cortical neuron, hypoxia, cleaved caspase 3

서 론

카나비노이드는 식물인 Cannabis sativa L에서부터 추출한 활성 물질로서 마약의 일종인 마리화나의 주요 성분이다.[1] 카나비노이드는 세포내의 cAMP의 생산을 증가시키고 포타슘 채널을 조절하고 voltage-dependent calcium channel을 억제함으로써 신경세포의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다.[2] 이 물질은 다행증 (euphoria), 이완증(relaxation), 그리고 운동부조화 (impairment of motor coordination), 시간감각장애, 단기 기억장애 등 정신계에 작용을 하는 물질이다.[3,4]

카나비노이드의 주된 작용은 카나비노이드 수용체 (CB)에 의해 이루어 진다. 카나비노이드 수용체는 두 가지 종류가 발견되었는데 각각 CB[5]1 receptor 그리고 CB2 receptor라고 한다.[6] 수용체는 7개의 transmembrane G-protein이 쌍으로 구성되어 있다.[7] 이들 수용체는 중추신경계 뿐만 아니라 혈관망이나 면역세포 등에서 발견된다.[8,9] CB1은 주로 중추신경계 특히 대뇌에서 발견되며, CB2의 경우는 면역세포에서 발견된다.[10] 그러나 최근에는 미세아교세포나 말초신경신경 말단부위 등에서 소량으로 발견되고 있다.[2] CB1이 활성화되면 dopamine이나 GABA와 같은 신경전달물질의 분비를 감소시켜 운동과 기억과정에 영향을 미치게 된다.[11]

이와 같은 신경작용의 조절에 관한 보고들과 함께 최근 신경세포의 방어 작용에 관한 연구가 있어 왔다.[12] 카나비노이드는 흥분성신경독성(neuronal excitotoxicity)나 외상성 뇌손상, 허혈성 손상과 같은 신경세포 파괴

교신**저**자 : 김 호 찬
주소 : 602-702 부산시 서구 암남동 34
고신대학교 의과대학 정신과학교실
TEL : 051-990-6628 FAX : 051-241-5832
E-mail : fjdz@naver.com

상태에 대해 방어할 수 있는 기능을 가지고 있다고 알려져 있다.[13,14] 신경방어작용은 다양한 기전을 통해 이루어 진다. 글루타메이트 신경전달 과정을 억제하거나, 항산화작용을 억제하고, 또는 아교세포의 기능을 조절하거나 미세혈관을 조절하는 과정을 통해 신경세포 방어작용을 하게 된다.[5,13]

신생아에 있어 출산 중 오랫동안 산도에 머무르는 난산의 경우 만성저산소 환경에 노출될 수 있다. 이때 정신지체(mental retardation), 인식 기능(cognitive function) 저하와 간질성 발작(epileptic seizures)등의 운동 장애 등이 흔히 나타난다.[15] 저산소증에 의한 세포 사멸은 복합적인 기전을 통해 나타나는데, 흥분성 아미노산 분비, 세포자멸사(apoptosis)의 시작 등의 과정들이 포함된다.[16] 이러한 다양한 과정들은 성인에 있어 나타나는 허혈성 뇌손상과 유사한 형태를 보여 준다. 뇌세포의 손상은 나이에 따라 다르게 나타난다. 특히 성인의 뇌조직에 비해 신생아의 경우 그 손상이 훨씬 심하게 나타난다.[17]

최근 저산소 환경에서 일으나는 신경독성을 방어하는 방법으로 카나비노이드 합성물질을 이용하는 연구가 이루어지고 있다. 그러나 대부분의 연구는 저산소-허혈성 뇌손상을 대상으로 이루어 져왔다. 이에 저자는 만성저산소 환경에서 카나비노이드 합성 물질이 신경독성을 막을 수 있다는 가설을 확인하고자 한다. 나아가 그 caspase의 활성을 연구하여 세포내 신호전달 과정을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 대뇌 피질 신경 세포의 일차배양 (primary cortical neuronal cultures)

임신 15일 된 생쥐의 자궁에서 배자를 추출하고, 배자의 종뇌(telencephalon)로 부터Sestan 등(1999)[18]이 서술한 방법에 의해 신경세포를 분리하였다. 분리된 세포들을 poly-L-ornithine과 laminin(이상 Sigma Co., USA)으로 코팅된plastic petri dish에서 배양을 시작하였다. 배양액은 neurobasal media에 sodium pyrovate solution, Fetal Bovine Serum, L-glutamine solution, B-27 supplement, Pen/strep solution(이상 GIBCO Co., USA)를 조합하여 제조하였다. 세포들은 7일 간 저산소 환경에 노출시켰다. 이때 완전히 밀폐된 저산소통(hypoxic chamber)에서 배양하였으며, 저산소 가스의 조성은 N_2 93%, O_2 5% CO_2 2%로 하였다. 저산소 환경에서 배양한 세포들은 synthetic cannabinoid receptor agonist인 WIN(Sigma Co., USA)을 50mM의 농도로 투여하여 24시간 동안 배양하였다.

2. Western blotting

배양된 신경세포를 ice-cold PBS에 세척하고 단백질을 추출하여 immunoblotting분석을 시행하였다. Lysate를 위한 buffer로는 modified RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1g/ml Aprotinin, leupeptin, 1mM Na_3VO_4, 1mM NaF)를 사용하였다.

일차항체로는 anti-cleaved caspase-3, anti-pERK, anti-AKT, anti-pAKT (이상 Cell signaling technology, USA, 1:1000), anti-ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, USA, 1:10,000)를 사용하였다. 면역 반응을 감지하기 위하여 Supersignal detection reagent (Pierce Co.)를 사용하였으며, Hyperfilm (Kodak, USA)에 노출시킨 후, 평판스캐너를 이용하여, 현상된 film의 디지털 영상을 얻었다. 스캔한 밴드의 농도를 정량적으로 분석하기 위하여, BioMax program을 사용하였다.

결 과

WIN은 활성화된 caspase 3의 발현을 억제한다.

만성저산소 환경에서 WIN의 투여가 만성저산소 환경에서 배양된 신경신경세포의 자멸사를 억제한다는 것은 확인하였다. WIN이 신경세포의 자멸사 억제에 관여하는 경로와 기전을 확인하기 위하여 caspase 3의 발현을 관찰하였다.

Western blotting 분석에서 만성 저산소 환경에서 배양된 신경세포에서 활성화된 caspase 3의 발현이 증가하였다. 이는 미토콘드리아 파괴에 의한 자멸사가 증가하였다는 것을 보여주는 것이다. 그러나 WIN을 투여한 신경세포에서 capase 3의 발현이 감소하였다 (Fig. 1).

이러한 결과는 만성 저산소 환경에 의한 세포 자멸사는 caspase 3가 관여하는 미토콘드리아 경로를 통하여 이루어 지며, WIN은 신경세포에서 caspase 3의 활성화를 감소시키면서 세포의 자멸사를 억제하는 것이라고 생각한다.

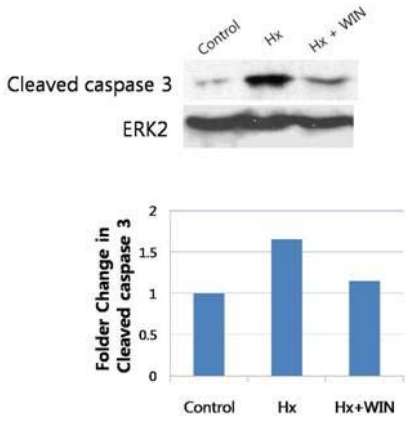

Fig. 1. **WIN inhibits hypoxia-induced activation of caspase 3.** Upper panel: Representative Western blots for cleaved caspase 3 in lysates of primary cerebral neuronal cultures in the presence or absence of WIN (normalized for ERK2 expression). Lower panel: Quantitation of cleaved caspase3 expression in primary cerebral neurons as described above. Note that there are changes in cleaved caspase 3 expressions on in hypoxic cultures with administration of WIN.

WIN은 AKT 경로를 통해 활성화된 caspase 3의 발현을 억제한다.

WIN의 투여에 의한 PARP 발현의 감소한 것을 통해 만성 **저**산소증에 노출된 겉질신경세포를 세포자멸사로부터 막아주는 것을 확인하였다 이에 그 기전 및 세포내 신호전달 과정을 확인하기 위하여 ERK와 AKT의 인산화의 변화를 western blot analysis를 통해 관찰하였다. 먼**저** AKT의 인산화 정도를 확인한 결과 **저**산소 환경이 신경세포에서의 AKT의 인산화를 감소시켰다. 그러나 WIN를 투여한 경우 pAKT의 발현이 현**저**하게 증가하였다 (Fig. 2).

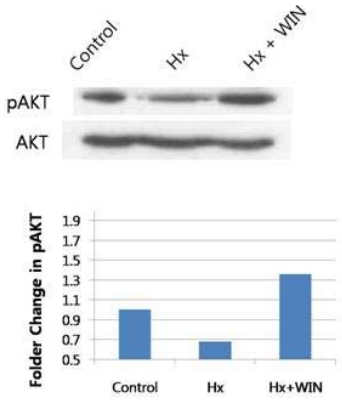

Fig. 2. WIN induces AKT phosphorylation in primary cultured neurons. Upper panel: Representative Western blots for pAKT in lysates of primary cerebral neuronalcultures in the presence or absence of WIN (normalized for AKT expression). Lower panel: Quantitation of pAKT expression in primary cerebral neurons as described above. Note that there are changes in pAKT expressions on in hypoxic cultures with administration of WIN.

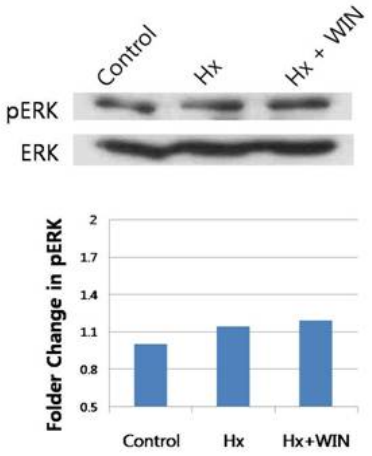

Fig. 3. WIN induces ERK phosphorylation in primary cultured neurons. Upper panel: Representative Western blots for pERK in lysates of primary cerebral neuronalcultures in the presence or absence of WIN (normalized for ERK2 expression). Lower panel: Quantitation of pERK expression in primary cerebral neurons as described above. Note that there are no changes in pERK expressions on in hypoxic cultures with administration of WIN.

또한 ERK의 인산화를 확인하기 위하여 pERK 발현을 확인하였으나, 모든 실험군에서 pERK의 발현을 뚜렷하게 관찰할 수 없었다. pERK의 발현은 각 실험군 사이에서도 차이가 없었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 만성 **저**산소 환경에 의한 세포자멸사에 대한 WIN의 신경세포 방어는 ERK의 인산화에 의한 것 보다 AKT 인산화에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

고 찰

저자의 실험을 통해 카나비노이드는 만성 **저**산소 환경에 의해 활성화된 caspase 3를 억제 하였다. Caspase 3의 활성화를 억제하는 경로를 확인하기 위하여 ERK pathway와 AKT pathway 모두 실험한 결과, 주로 AKT의 인산화를 유도 함으로써 caspase 3를 활성화는 것으로 생각된다. 결과적으로 caspase 3의 활성화를 통해 세포의 자멸사(apoptosis)를 억제하는 것으로 생각된다.

비치명적 만성 **저**산소증 (Chronic sublethal hypoxia)는 흡연 등 일반적으로 접할 수 있는 환경에서 일어날 수 있다. 뇌허혈 등과 같은 급성**저**산소증에 비해 그 증상이 뚜렷하게 나타나지 않으나, 만성적으로 노출되면 다양한 증상이 나타날 수 있다. 만성**저**산소증은 신경세포의 죽음과 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. 그동안 **저**산소증 환경이 세포사멸을 유발하는 기전에 대해

많은 연구가 있었다. **저**산소 환경은 hypoxic-inducible factor(HIF)를 통하여 다양한 세포 내 신호 전달과정을 활성화하고 apoptosis를 유도한다.[19)]

그 동안 만성 **저**산소환경이 apoptosis를 유발하는 세포 내 기전으로 caspase 경로를 통하여 이루어 진다는 사실이 보고되었다.[20,21)] 그 capsase 3를 활성화하는 경로로서 ERK pathway와 AKT pathway가 알려져 있으며, 만성 **저**산소 환경에서는 AKT pathway가주로 관여한다고 알려져 있다.[19)] **저**자의 실험에서도 AKT pathway를 통해 자멸사가 이루어지는 것으로 확인되었다. 또한 이번 실험에서 WIN을 투여하였을 때 caspase 3의 활성화가 억제되고 AKT의 인산화가 증가한 것은WIN에 의한 신경세포 방어기전이 AKT 경로를 통해 일어난다는 것을 제시하는 것이다.

카나비노이드의 장기간 사용은 뇌 기능의 전반적인 장애가 일어난다고 알려져 있다. 많은 역학 연구에 의하면 마리화나의 빈번한 사용은 인식장애를 일으키며, 주의력 장애, 기억 장애 등이 나타난다.[22-24)] 심지어 대량 사용자의 경우 뇌혈관성 질환의 위험까지 증가한다고 하였다. 이러한 역학 연구와 같이 동물 실험 결과도 유사하게 나타났다.[24-26)] 마리화나의 정신계 성분인 tetra-hypocannabinol을 장기간 투여한 쥐에서 학습 장애가 나타났다.[27)] 카나비노이드의 장기 투여가 쥐의 해마에 손상시키고 심지어 형태학적인 변화까지 초래한다고 보고하였다.[28)] 이때 해마의 신경세포의 사멸이 증가하고 피라미드 신경세포의 연접밀도가 감소하거나, 돌기의 길이가 감소하는 등의 변화가 일어난다고 하였다.[29)] 배양한 해마 신경세포에서도 세포 사멸이 증가한다고 하였다.[30)]

그러나 이와 반대로 WIN과 같은 합성 카나비노이드의 투여는 신경세포 방어를 유도하는 것으로 알려져 있다. 특히 허혈성 실험에서 신경세포 방어에 대한 증거는 매우 뚜렷하다. 해마에서도 신경세포 방어가 관찰되었다고 보고되었다.[31)] 또한 경색 실험에서도 이들 합성 카나비노이드를 투여한 경우 뇌경색 부위의 크기가 감소했다고 보고되었다.[13)]

아직 카나비노이드의 투여에 의한 자멸사 감소에 있어 그 세포내 신호 전달에 관한 연구는 매우 부족하다. **저**자의 연구를 통해 카나비노이드가 신경 방어 기전이 있음을 세포내 신호 전달 체계를 통해 확인할 수 있었다. **저**자의 실험 결과는 카나비노이드가 만성 **저**산소 환경에 의한 뇌손상에 있어 치료제의 하나가 될 수 있음을 제시하는 것이다.

참고문헌

1) Guzman M: Neurons on cannabinoids: dead or alive? Br J Pharmacol 140: 439-440, 2003
2) Howlett AC: Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. Br J Pharmacol 142: 1209-1218, 2004
3) Ameri A: The effects of cannabinoids on the brain. Prog Neurobiol 58: 315-348, 1999
4) Chaperon F, Thiebot MH: Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. Crit Rev Neurobiol 13: 243-281, 1999
5) Mechoulam R, Panikashvili D, Shohami E: Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. Trends Mol Med 8: 58-61, 2002
6) Amaya F, Shimosato G, Kawasaki Y, Hashimoto S, Tanaka Y, Ji RR, Tanaka M: Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. Pain 124: 175-183, 2006
7) Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O,Lai Y, Ma AL, Mitchell RL: Comparison of the pharmacology and signal transduction of thehuman cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Mol Pharmacol 48: 443-450, 1995
8) Mechoulam R, Hanus L, Fride E: Towards cannabinoid drugs--revisited. Prog Med Chem 35: 199-243, 1998
9) Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR: In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. Trends Pharmacol Sci 27: 1-4, 2006
10) Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR: Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. Brain Res 1071: 10-23, 2006
11) Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodriguez de Fonseca F: The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. Trends Pharmacol Sci 21: 218-224, 2000
12) Guzman M, Sanchez C, Galve-Roperh I: Cannabinoids and cell fate. Pharmacol Ther 95: 175-184, 2002
13) van der Stelt M, Veldhuis WB, Bar PR, Veldink GA, Vliegenthart JF, Nicolay K: Neuroprotection by Delta9-tetrahydrocannabinol, the main active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. J Neurosci 21: 6475-6479, 2001
14) Mechoulam R, Spatz M, Shohami E: Endocannabinoids and neuroprotection. Sci STKE 2002: RE5, 2002
15) Hack M, Friedman H, Fanaroff AA: Outcomes of extremely low birth weight infants. Pediatrics 98: 931-937, 1996
16) Vannucci RC, Christensen MA, Stein DT: Regional cerebral glucose utilization in the immature rat: effect of hypoxia-ischemia. Pediatr Res 26: 208-214, 1989
17) Yager JY, Thornhill JA: The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. Neurosci Biobehav Rev 21: 167-174, 1997

18) Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P: Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. Science 286: 741-746, 1999
19) Ogunshola OO, Antic A, Donoghue MJ, Fan SY, Kim H, Stewart WB, Madri JA, Ment LR: Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. J Biol Chem 277: 11410-11415, 2002
20) Kim H, Li Q, Hempstead BL, MadriJA: Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. J Biol Chem 279: 33538-33546, 2004
21) Kang K, Baek J, Kim G, Kim H: EPO rescues cultured cortical neuron from chronic sublethal hypoxia. Korean J Phys Anthrop 16: 583-590, 2005
22) Block RI: Does heavy marijuana use impair human cognition and brain function? Jama 275: 560-561, 1996
23) Ehrenreich H, Rinn T, Kunert HJ, Moeller MR, Poser W, Schilling L, Gigerenzer G, Hoehe MR: Specific attentional dysfunction in adults following early start of cannabis use. Psychopharmacology (Berl) 142: 295-301, 1999
24) Pope HG, Jr., Yurgelun-Todd D: The residual cognitive effects of heavy marijuana use in college students. Jama 275: 521-527, 1996
25) Herning RI, Better WE, Tate K, Cadet JL: Marijuana abusers are at increased risk for stroke. Preliminary evidence from cerebrovascular perfusion data. Ann N Y Acad Sci 939: 413-415, 2001
26) Mouzak A, Agathos P, Kerezoudi E, Mantas A, Vourdeli-Yiannakoura E: Transient ischemic attack in heavy cannabis smokers--how 'safe' is it? Eur Neurol 44: 42-44, 2000
27) Stiglick A, Llewellyn ME, Kalant H: Residual effects of prolonged cannabis treatment on shuttle-box avoidance in the rat. Psychopharmacology (Berl) 84: 476-479, 1984
28) Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J: Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature 297: 681-683, 1982
29) Lawston J, Borella A, Robinson JK, Whitaker-Azmitia PM: Changes in hippocampalmorphology following chronic treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2. Brain Res 877: 407-410, 2000
30) Chan GC, Hinds TR, Impey S, Storm DR: Hippocampal neurotoxicity of Delta9-tetrahydrocannabinol. J Neurosci 18: 5322-5332, 1998
31) Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA: Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. J Neurosci 19: 2987-2995, 1999