# 사람 망막아세포종 세포에 발현된 니코틴성 수용체의 특성

김대란 $^1 \cdot$  차승규 $^1 \cdot$  공인덕 $^1 \cdot$  정세환 $^2 \cdot$  라상훈 $^2$ 

연세대학교 원주의과대학 생리학교실 연세대학교 원주의과대학 안과학교실 2

**목적** : 사람의 망막아세포종 세포에 발현되어 있을 것으로 예상되는 니코틴성 수용체의 특성과 그 생리적 기능의 일부를 규명하고자 하였다.

**대상과 방법** : 니코틴성 수용체의 활성화를 확인하기 위해 망막아세포종 세포주의 하나인 WERI-Rb-1 세포를 대상으로 칼슘 이미징(imaging) 기법을 이용하여 세포내 칼슘농도( $(Ca^{2+})_i$ )를 측정하였으며, patch clamp 기법으로 세포 막을 통한 이온전류를 측정하였다.

**결과** : 1) 니코틴에 의한  $(Ca^{2+})_i$  증가는 모두 세포막을 통한  $Ca^{2+}$  유입에 의한 것으로 나타났다. 2) 니코틴 투여시 내향성 전류를 유발하였으며, 막전압의 뚜렷한 탈분극(대조군: -56.6±3.7 mV, 니코틴 투여군: -29.6±3.6 mV, n=4)을 초래하였다. 이와 같은 변화는 니코틴 수용체 차단제(hexamethoniun, 100  $\mu$ M)에 의해 완전히 억제되었다. 3) 니코틴 투여가 망막아세포종 세포에 이미 발현되어 있는 T-형 칼슘 전류에는 직접적인 영향을 주지 않았다.

**결론**: 망막아세포종 세포에는 니코틴성 수용체가 발현되어 있으며, 세포막에 발현된 니코틴성 수용체를 통한 Ca<sup>2+</sup> 유입 및 탈분극에 따른 세포내 칼슘유입은 세포분화, 증식, 세포사멸 등의 조절기전에 관여하리라 사료된다. 〈한안지 46(6):1060-1067, 2005〉

콜린성 신호전달은 신경 및 비신경성 조직에서 유사하게 전형적인 콜린성 수용체에 의해 매개되며, 무스카린 및 니코틴성 수용체는 성숙한 신경 및 비신경 세포에서 광범위한 생리적 기능에 관여할 뿐만 아니라 여러발생 단계(developmental stage)에서 다양하게 발현되고 있다. 무스카린 및 니코틴성 수용체의 활성화에따른 신호전달은 guanine nucleotide binding protein(G-단백)을 매개로 활성화되거나 직접적으로이온채널에 영향을 줌으로써 이루어지는데, 여기에는여러 가지 다양한 기전이 보고되고 있다.

니코틴성 아세틸콜린 수용체(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)는 GABA<sub>A</sub>, Glycine 및 5-HT<sub>3</sub> 수용체들과 마찬가지로 5개의 아단위(subunit)로 이루어진 오합체(pentamer) 구조의 이온통로로.<sup>1,2,4</sup>

〈접수일: 2004년 11월 10일, 심사통과일: 2005년 6월 2일〉

통신저자 : 라 상 훈

강원도 원주시 일산동 162 연세대학교 원주대학 원주기독병원 안과 Tel: 033-741-0633, Fax: 033-745-2965 E-mail: shrah@wonju.yonsei.ac.kr Na<sup>+</sup>이나 K<sup>+</sup>과 같은 단가 양이온 혹은 Ca<sup>2+</sup> 등이 통 과하는 비선택적 양이온 통로를 빠르게, 그리고 일과성 으로 열어 막전압을 탈분극시킨다. 척추동물에서 지금 까지 모두 17개의 서브유닛 유전자(a1-10, 11-4, v. ⑤, €)가 클로닝되어 있으며, 5 각 서브유닛들의 조합에 따라 조직 분포 양상 및 여러 특성상의 차이점을 나타 낸다. 특히. 활성제 및 길항제의 선택성. 이온전류의 활 성화 및 비활성화 역학(kinetics) 등이 서브유닛의 조 성에 따라 현저히 달라진다고 보고되었다. 6 한편 니코 틴 수용체의 활성화로 인해 나타나는 양이온 이동은 주 로  $Na^+$ 의 유입과  $K^+$ 의 유출이지만  $Ca^{2+}$ 의 유입도 적 지 않은 것으로 보고되어<sup>7.8</sup> 막전압의 탈분극 변화에 따 른 세포내 칼슘이온농도의 조절을 통해 다양한 신호전 달이 이루어지는 것으로 알려져 있다.<sup>9</sup> 이를 통해 nAChR 는 신경성 성장(neuritic growth) 촉진. 10-13 시냅스 간 흥분전달 및 조절<sup>9</sup>에 관여하며, 특히 눈의 조직 중 망막 및 시각중추 경로의 발달에 중요한 것으로 알려져 있다. 15

선행연구에서 니코틴 및 니코틴 수용체는 다양한 선천적 및 후천적 질병과 관련되며, 특히 선천성 근무력증<sup>15</sup>과 간질, <sup>16</sup> 파킨슨병, <sup>17</sup> 알츠하이머, <sup>18,19</sup> 정신분열병, <sup>20,21</sup> 기타 다양한 암종<sup>22</sup> 등의 병적기전에 관련되는 것으로 알려져 있다. 그러나 소아들에게서가장 흔히 발병하는 안구내 악성 종양인 망막아세포

<sup>\*</sup> 본 연구는 2003년도 연세대학교 원주의과대학 교수 연구비 보조에 의해 이루어졌음.

종과 니코틴 수용체의 활성화에 관한 연구는 아직 보고 되어 있지 않다.

한편, 망막아세포종 세포는 망막 전구세포(retinal precursor cell)의 성장과 분화를 규명하기 위한 모델 로 널리 이용되어져 왔다. 23-28 다양한 포유동물 세포에 서 일반적으로 세포내 칼슘이온농도의 변화는 세포의 발달적 주기(orderly progression of the cell cycle)와 증식 및 성장을 조절하는데 중요하며. <sup>29-32</sup> 망 막아세포종 세포내 칼슘조절 역시 세포의 분화와 관련 하여 매우 중요한 기전으로 탐색되어 왔다. 지금까지 알려진 망막아세포종 세포내 칼슘조절은 대부분 낮은 전압 의존성(low voltage activated) 이온채널을 통 한 칼슘유입에 의한 기전으로. <sup>12,25,27,28</sup> 특히 **a**1G와 **a** 1H 아형의 T-형 칼슘 채널의 발현이 중요한 것으로 알 려져 왔다.<sup>27,28</sup> 그러나 다른 포유류의 망막세포들에서 규명된 바와 같이 수용체를 매개한 구체적인 칼슘조절 특성이나 신호전달 기전에 관한 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 망막아세포종 세포는 망막세포와 동일한 줄기배아세포로부터 기원되며<sup>33,34</sup> 사람 망막에서 콜린 성 수용체가 규명된 점, 35 그리고 미분화된 세포로서의 망막아세포종 세포의 특성을 고려해 볼 때 망막아세포 종 세포에도 칼슘조절을 매개하는 니코틴성 수용체가 발현되어 있을 것으로 추측된다. 그러나 지금까지 망막 아세포종 세포에서 니코틴성 수용체의 발현여부 및 그 기능적 특이성은 확인된 바 없다. 따라서 본 연구에서 는 망막아세포종 세포를 대상으로 여기에 발현되어 있 을 것으로 예상되는 니코틴성 수용체의 특성을 규명하 고 이를 통하여 미분화된 망막세포에서 니코틴성 신호 전달의 기전을 세포내 칼슘이온 농도의 변화와 관련지 어 탐색해 보고자 하였다.

### 대상과 방법

# 1. 모델 세포주 및 배양

본 연구에서 사용한 망막아세포종 세포는 백인 여성 (Caucasian female)의 눈에서 분리한 WERI-Rb-1 세포를 ATCC (American Type Culture Collection, HTB-169)로부터 분양받아 사용하였다. WERI-Rb-1 세포는 Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (Cambrex, Walkersville, MD, USA)에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 100,000 unit/L penicillin, 100 mg/L streptomycin (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 배지에서 배양하였다. 세포주는 ATCC의 프로토콜에 따라 3~4일 간격으로 배지를 갈아주었

고 7일을 주기로 계대배양 하였다.

#### 2. 실험용액 및 약물

#### 2.1 실험용액

칼슘 이미징 실험을 위한 세포외 관류액(external solution: PSS)의 조성(mM)은 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES 그리고 10 glucose (pH 7.4)이었다. 전기생리적 실험에서 칼슘 전류 측정을 위한 전극내 용액(internal solution)의 조성(mM)은 120 N-methyle-D-glucamine (NMG) methanesulfonate (MS), 20 tetraethylammonium (TEA)-MS, 20 HCl, 11 ethyleneglycol-bis-( aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 10 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>, 4 MgATP, 0.3 Na<sub>2</sub>GTP, 14 Tris-phosphocreatine (pH 7.4, 318 mosm/kg H<sub>2</sub>O)이었으며, 세포외 관류액의 조성은 140 MS, 145 TEA-OH, 10 HEPES, 15 glucose, 10 CaCl<sub>2</sub>, 0.001 tetrodotoxin (TTX) (pH 7.4 with TEA-OH, 310 mosm/kg H<sub>2</sub>O)으로 실험하 였다.

Nicotine에 의한 막전압의 변화 및 전류 활성화는 gramicidin-perforated patch를 사용하여 기록하였으며, 이를 위한 전극내 용액(internal solution)의 조성은 140 KCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 5 NaCl (pH 7.2)으로 하였으며, 세포외 관류액은 정상 영양액(normal physiological salt solution, PSS)을 사용하였다. 전극내 용액에는 최종 농도가 50  $\mu$ g/ml의 gramicidin을 포함시켜 perforated whole-cell mode를 만들었다. Gramicidin은 DMSO에 녹여 사용하였다. 전기생리 실험시 모든 약물은 polyethylene관과 연결된 gas chromatography용 모세관(capillary tube) 끝을 신경세포의 100  $\mu$ m 이내에 위치하도록 하여 이를 통해 약물이 중력에 의해세포에 가해지도록 하였다. 칼슘 이미징 실험시에는 모든 약물을 챔버에 관류시켜 실험하였다.

#### 2.2 약물

우태아혈청(FBS) 및 antimycotic-antibiotics는 GibcoBRL로부터, Fluo-3/AM은 Molecular probes (Eugene, OR, USA)로부터 각각 구입하였고, RPMI 1640은 CAMBREX사로부터 구입하였다. 또한 nicotine과 hexamethonium은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Fluo-3/AM은 DMSO에 녹여 사용하였고 그 외의 모든 시약은 삼차증류수에 녹여 사용하였다.

# 3. 세포내 칼슘이온농도([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 측정

세포내 칼슘이온농도([Ca²+]<sub>i</sub>)의 변화를 측정하기 위해 형광이미지 시스템(fluorescence imaging system)을 사용하였다. 먼저 세포배양액 1㎡에 칼슘의 농도를 반영하는 형광염료(fluorescence dye)인 Fluo-3/AM 5 μM 농도를 첨가한 후 1분간 초음파 처리(sonication)후 여기에 망막아세포종 세포가 붙어있는 coverslip을 넣은 다음 37℃ 세포 배양기(humidified CO₂ incubator, 95% air 5% CO₂)에서 1시간 부하시켰다. 부하가 끝나면 세포외 관류액으로 2회 세척하여 세포외액의 잔여 Fluo-3/AM을 충분히 제거한 다음 도립현미경(IX51, Olympus, Japan)위의 관류챔버(Warner Instrument, Hamden, CT, USA)에 올려놓고 관류액(normal PSS)을 중력에 의해 2 ㎡/min 속도로 20분 이상 관류시켜 충분한 탈에스테르화(deesterification)가 되도록 하였다.

형광이미지는 75-W Xenon lamp로부터 나오는 광원(light source) 중 Fluo-3AM에 적합한 488 nm (F<sub>488</sub>) 과장으로 여기(excitation)시켰을 때 530 nm 의 과장에서 방출(emission)되는 형광 세기를 CCD 카메라(cooled charge-coupled device camera, Cascade, Roper, USA)가 증폭시켜 이미지로 나타내었는데, 이때 얻어지는 형광이미지는 약물투여시는 0.1 Hz의 빈도로 30초간 측정하였으며 세척동안에는 0.03 Hz의 빈도로 측정하여 광원으로 인한 세포손상을 최소화하였다. 세포내 칼슘이온농도는 자극을 주기전 Fluo-3/AM 부하로 인한 기본 형광값(F)에서 약물을 투여하였을 때 변화되는 형광값(DF)의 비율로 측정하였으며 DF/F값이 세포내 칼슘이온농도의 변화를 반영하도록 하였다.

측정한 형광이미지는 소프트웨어 패키지인 MetaFluor 6.1 (Universal Imaging Corporation, USA)로 기록한 뒤, 단일세포의 DF/F값을 평균내어 자료를 분석하였으며, 이들 형광(DF/F)값의 최대(peak)치를 비교하여 분석하였다. 실험 례 수는 N으로, 대상 세포수는 n으로 표기하였다.

#### 4. 전기생리학적 실험

이온전류는 patch clamp amplifier (EPC9, Instrutech Corp., NY, USA)를 사용하여 전형적인 whole-cell 및 gramicidin-perforated patch clamp 방법으로 측정하였다. <sup>36</sup> 측정 전극은 borosilicate glass capillary (외경: 1.65 mm, 내경: 1.2 mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont,

CA, USA)를 사용하였다. 모든 전극은 P-97 Flaming-Brown micropipette puller (Sutter Instrument Co.)로 뽑아 제작하였다. 전극은 Sylgard 184 (Dow Corning, Midland, MI, USA)로 코팅하였으며, whole-cell 전류 측정에는 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1.5~2.5 MQ이 되는 것을 사용하였다. 세포 가 붙어있는 cover glass를 도립현미경(inverted microscope) 위에 올려놓고, 세포외액은 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류시켰다. 막전압 고정법 (voltage clamp) 기록을 위해서 세포막의 capacitance 와 series resistance는 80%로 보정하였으며, 실험 시 sampling rate은 1 kb, low-pass filter는 2 kb (-3 dB; 8-pole Bessel filter)로 하여 기록하였다. 막전류 고정법을 사용한 막전압 측정시에는 sampling rate을 2 씺, low-pass filter는 2 씺(-3dB)로 하였 다. 실험결과는 Pulse/Pulsefit (v8.50) software (Heka Elektronik, Lambrecht, Germany)를 통 해 컴퓨터에 저장하여 분석하였으며, 실험대상 세포 수 는 n으로 표기하였다. 모든 실험은 실온(21~24℃)에 서 시행하였다.

#### 5. 자료분석

결과는 평균(Mean)과 표준오차(SEM)로 나타내었으며, 통계적인 의의는 unpaired t-검정과 분산분석 (one-way ANOVA)으로 검증하여, p값이 0.05 이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

#### 결 과

#### 1. 니코틴에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화

Fluo-3/AM으로 부하된 WERI-Rb-1 세포들은 니코틴(nicotine, 100 μM) 투여시 세포내 칼슘이온 농도의 증가가 관찰되었으며, 니코틴에 의한 세포내 칼슘이온농도의 증가는 세포외액에 칼슘을 제거하였을 때는 전혀 나타나지 않았다. 또한 니코틴에 의한 효과는 칼슘이온이 포함된 세포외액을 재관류 하였을 때 회복되었으며(Fig. 1), 이는 세포외부로부터의 칼슘 유입이니코틴 수용체 활성을 통한 칼슘 증가의 기전임을 의미한다(p⟨0.001, n=49, N=7).

#### 2. 니코틴에 의한 막전류 및 막전압 변화

니코틴성 수용체 활성화 관련 여부를 막전압 및 막 전류 고정법 하에서 니코틴성 수용체의 선택적 활성

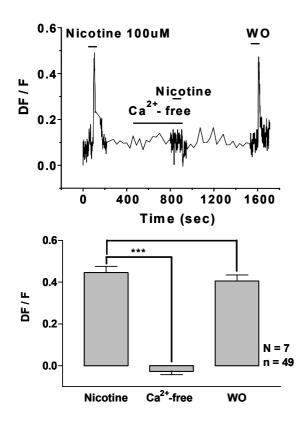


Figure 1. Nicotine-induced [Ca²+]<sub>i</sub> response in WERI-Rb-1 cells. 100 

µM nicotine increased intracellular calcium level (DF/F=0.30±0.40), which response was completely abolished in the absence of extracellular Ca²+ concentration. The nicotine-induced calcium response was recovered by reintroducing to Ca²+ PSS. F=basal fluorescence value loaded by Fluo-3/AM, DF=fluorescence changed after introducing nicotine, n=total cell number, N=experiment number, solid line=the duration for applying nicotine, WO=wash out, \*\*\*\* p<.001.

제 및 차단제를 사용하여 직접 확인하였다. 전압-고정 법(voltage-clamp method)하에서 막전압을 -80 mV에 고정한 후  $100 \mu$ M의 니코틴을 가하여 유발된 내향성 전류(평균 최대치:  $33.8\pm6.8 pA$ , n=8)는 비 선택적 니코틴성 수용체 차단제인 hexamethonium ( $100 \mu$ M)에 의해 완전 차단되어 니코틴에 의해 활성화되는 내향성 전류가 니코틴성 아세틸콜린 수용체 활성화에 따른 전류임을 알 수 있었다(Fig. 2).

Gramicidin-perforated patch를 시행한 후 전류 -고정법(current-clamp method) 하에서 니코틴에 의한 세포막 전압 변화를 니코틴성 수용체 차단제인 hexamethonium을 가하여 비교하였다. 니코틴은 세포막의 탈분극을 유발하였으며(Fig. 3A), 이는 니코틴 성 수용체 차단제인 hexamethonium에 의해 완전 차단되었다(Fig. 3B). 망막아세포종 세포의 안정막전압은 -56.6±3.7 mV로 측정되었으며 100  $\mu$ M nicotine 투여시 -29.6±3.6 mV로 증가하였으며, 이 와같은 효과는 가역적이었다.

한편, 니코틴이 직접 탈분극을 유발할 수 있으므로, T-형 칼슘전류에 미치는 영향을 알아보았다. 우선 막전 압을 -100 mV에 고정한 상태에서 200 ms 동안 -80 mV에서 +60 mV까지 10 mV씩 증가시키는 탈분극 자극을 가하여 칼슘전류를 구하였는데, Fig. 4A 및 B의 전류-전압관계에서 볼 수 있듯이 전형적인 낮은 전압에 의해 활성화되는 칼슘전류(low voltage-activated Ca<sup>2+</sup> current)는 확인되었다. 이들 T-형 칼슘전류는 -30 mV 근처에서 최대로 활성화되므로, 막전압을 -100 mV에 고정한 후 -30 mV까지 탈분극시켜 T-형 칼슘전류를 기록하였으며, 니코틴을 가하였을 때 그 효과를 관찰하였다.

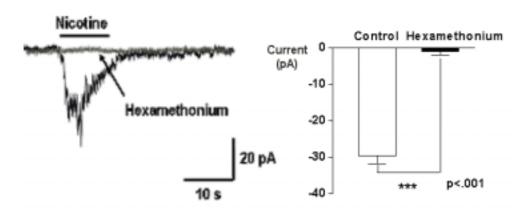


Figure 2. Effect of nicotine on membrane current. Nicotine (100 µM) induced transient inward currents under voltage-clamp method at -80mV holding potential (mean currents: 33.8±6.8 pA, n=8). Nicotine-induce inward currents were completely blocked by hexamethonium 100 µM, a nicotinic receptor antagonist, pA=pico ampere, \*\*\*\* p<.001.

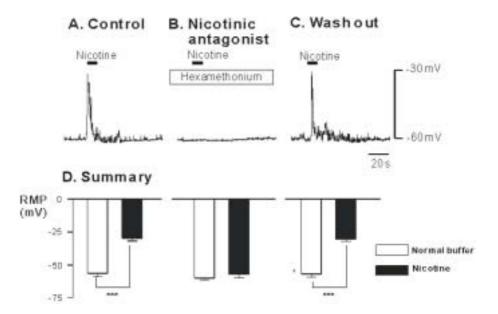
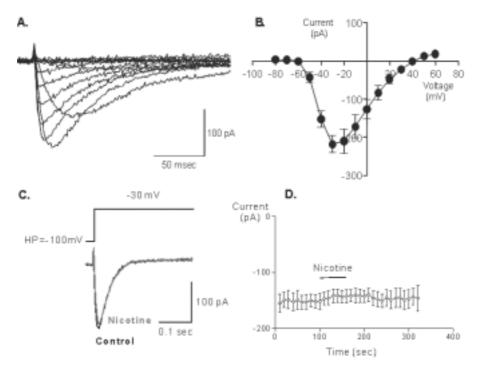


Figure 3. Effect of nicotine on membrane potential. Nicotine induced transient membrane depolarizations under gramicidin-perforated patch (A), and these were totally abolished by 100 µM hexamethonium, a nicotinic receptor antagonist (B). The nicotine-induced depolarization was completely recovered after hexamethonium was washed out (C). The changes in the membrane potentials induced by nicotine in the presence or absence of hexamethonium were summarized by comparison to control (D). normal buffer=normal PSS \*\*\* p<.001.



**Figure 4.** Effect of nicotine on T-type calcium current. T-type calcium currents were elicited to depolarization stimuli for 200ms with 10mV increments from -80mV to +60mV under -100mV holding membrane potential in retinoblastoma cells (A), and B showed current-voltage relationship. T-type calcium currents were not affected by the application of 100 µM nicotine (C, D).

Fig. 4D에서 볼 수 있듯이 예상과 달리 니코틴은 T-형 칼슘전류에는 아무런 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다.

## 고 찰

본 연구에서는 세포내 칼슘이온 측정법, 전기생리학적 방법 및 분자 생물학적 방법을 이용하여 망막아세포 종 세포주의 하나인 WERI-Rb-1 세포에 발현된 니코틴성 수용체의 특성을 확인하였다.

먼저 약리학적 방법을 이용한 칼슘 이미징 실험 결과 미분화된 망막아세포종 세포에서 니코틴 투여에 따른 일시적인 세포내 칼슘이온농도의 증가가 관찰되었는데, 이러한 칼슘증가는  $Ca^{2+}$ -free 조건에서는 나타나지 않았다. 비록 그 크기는 작지만, 직접 니코틴 수용체를 통해 세포외 칼슘이 유입된다는 사실은  $Ca^{2+}$ -투과성 통로  $(Ca^{2+}$ -permeable channel)인 니코틴 수용체가세포내 칼슘농도 증가에 직접 관여된다는 것을 의미한다. 한편 일부 아형의 니코틴 수용체는 세포내 칼슘동원에도 직접 관여하는 것으로 보고된 바 있는데, 37 본실험에서  $Ca^{2+}$ -free 조건에서는 니코틴에 의한 칼슘증가가 전혀 이루어지지 않았으므로, 이와 같은 가능성은 없는 것으로 판단된다.

사람의 망막아세포종 세포에는 낮은 전압 의존성(T-형) 칼슘 채널이 발현되어 있어 세포내 칼슘조절에 일 부 관여하는 것으로 보고되어 있는데. 27,28,38 본 실험에 사용된 WERI-Rb-1 세포주에서도 이를 확인할 수 있 었다. 낮은 전압에 의해 활성화되는 T-형 칼슘채널은 신경전달물질이나 호르몬 분비, 신경세포의 흥분성, 세 포의 성장과 분화, 생식 등의 다양한 생리적 과정에 중 심역할을 담당하며.<sup>3</sup> T-형 칼슘채널의 비정상적인 발현 또는 조절은 암이나 간질, 통증 등과 같은 여러 병태생 리적 상황을 초래하기도 한다. 한편, 미분화된 망막세 포, 혹은 망막아세포종 세포에서 L-type이나 N-type 채널은 발현되어 있지 않다는 것이 우세한 견해이 다. <sup>38,39</sup> 그러나 최근 재생과정 중의 newt의 progenitor 세포와 미성숙 신경절 세포에서 L-type 채널을 통한 칼슘유입을 확인한 연구도 보고되어<sup>40</sup> 막전압 의존성 칼슘채널의 발현양상은 발달시기에 따라 다를 뿐 아니 라<sup>27,28,38</sup> 세포의 종에 따라서도 다양한 차이를 나타내 는 것을 알 수 있다. 따라서 미분화 망막아세포종 세포 의 세포내 다양한 신호전달 기전들을 규명하기 위해서 는 추후 망막아세포종 세포를 대상으로 T-형 채널 이외 의 막전압 의존성 칼슘채널의 발현여부와 그 조절기능 에 대한 탐색이 필요할 것으로 생각된다.

알려진 바와 같이 니코틴은 Ca<sup>2+</sup>-투과성 통로를 직

접 개방시킬 뿐만 아니라. 2차적으로 막전압을 탈분극 시키고 이는 다시 막전압 의존성 칼슘 통로를 활성화시 킨다. 9 본 실험을 통해 망막아세포종 세포에서 니코틴 성 수용체의 활성화가 T-형 칼슘 채널에 미치는 영향을 관찰해 본 결과, 니코틴의 투여는 현저한 탈분극을 유도하였다. 이때 유입되는 칼슘이온은 Na+-Ca2+ exchanger 등과 같은 운반체가 아니라<sup>41</sup> 니코틴 수용 체를 통해 직접 칼슘이 유입되며, <sup>9</sup> 이로 인해 증가된 세 포내 칼슘이온 농도가 이차적인 변화들을 초래하는 것 으로 보인다. 그러나 막전압의 탈분극에 의한 칼슘통로 의 활성화는 크지 않을 것으로 생각되는데, 그 이유는 WERI-Rb-1 세포에서 측정된 안정막 전압인 -56.6± 3.7 mV에서는 이미 T-형 칼슘 통로가 상당히 비활성 화 되어있을 것이기 때문이다. 또한. T-형 칼슘 통로에 대한 니코틴의 직접적인 영향을 관찰하여 보았는데 (Fig. 4C, 4D), 뚜렷한 조절현상을 발견할 수 없었다. 이는 니코틴이 비선택적 양이온 통로를 통한 Ca<sup>2+</sup>의 투과도를 증가시켜 막전압을 탈분극 시키지만 T-형 칼 슘통로에는 직접적인 영향을 미치지 않음을 의미한다.

이상의 결과에서 병태생리적 변화가 초래된 미분화 망막세포에 발현된 니코틴성 아세틸콜린 수용체는 세포 밖으로부터 칼슘유입을 일으켜 세포내 칼슘이온농도 조절에 관여하며, 이를 통해 세포의 증식과 분화를 촉진하고 세포의 발달과 성숙에 관여할 것으로 추측되는데이와 관련된 구체적인 연구는 앞으로 활발히 진행될 것으로 사료된다.

#### 참고문헌

- 1) Betz H. Ligand-gated ion channels in the brain: The amino acid receptor superfamily. Neuron 1990;5:383-92.
- Barnard E. Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. Trends Biol Sci 1992;17:368-74.
- 3) Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, et al. Calcium signaling-an overview. Semen Cell Biol 2001;12:3-10.
- 4) Lindstrom J. Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. Mol Neurobiol 1997;15:193-222.
- 5) Millar NS. Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. Biochem Society Trans 2003;31: 869-74
- Genzen JR, van Cleve W, McGehee DS. Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. J Neurophysiol 2001;86:1773-82.
- Castro NG, Albuquerque EX. a-bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. Biophys J 1995;68:516-24.
- 8) Dani JA, Mayer ML. Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. Curr Opin Neurobiol 1995;5:

- 310-7.
- Park J. Characterization of nicotinic acetylcholine receptors in male rat major pelvic ganglion neurons. Doctoral dissertation. Seoul: Yonsei Univ, 2003.
- Mattson MP, Dou P, Kater SB. Outgrowth-regulation actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. J Neurosci 1988;8:2087-100.
- Owen A, Bird M. Acetylcholine as a regulator of neuritic outgrowth and mobility in cultured embryonic mouse spinal cord. Neuroreport 1995;6:2269-72.
- Wong ROL. Cholinergic regulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> during cell division and differentiation in the mammalian retina. J Neurosci 1995;15:2696-706.
- 13) Coronas V, Durand M, Chabot JG, Jourdan F. Acetylcholine induces neuritic outgrowth in rat primary olfactory bulb cultures. Neurosci 2000;98:213-9.
- 14) Moretti M, Vailati S, Zoli M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor subtypes expression during rat retina development and their regulation by visual experience. Mol Pharmacol 2004; 66:85-96.
- Richman DP, Agius MA. Treatment of autoimmune myasthenia gravis. Neurology 2003;61:1652-61.
- Steinlein OK. Nicotinic receptor mutations in human epilepsy. Prog Brain Res 2004;145:275-85.
- 17) Quick M, Bordin T, Forno L, McIntosh JM. Loss of alpha-conotoxinMII-and a 85380- sensitive nicotinic receptors in Parkinson's disease striatum. J Neurochem 2004;88:668-79.
- 18) Mourin M, Ripoll N, Dailly E. Nicotinic receptors and Alzheimers disease. Curr Med Res Opin 2003;19:169-77.
- 19) Mousavi M, Hellsrom-Lindahl E, Guan ZZ, et al. Protein and mRNA levels of nicotinic receptors in brain of tabacco using controls and patients with Alzheimer disease. Neurosci 2003; 1202:515-20.
- Leonard S, Gault J, Adams C, et al. Nicotinic receptors, smoking and schizophrenia. Restor Neurol Neurosci 1998;12: 195-201.
- 21) Ripoll N, Bronnec M, Bourin M. Nicotinic receptors and schizophrenia. Curr Med Res Opin 2004;20:1057-74.
- 22) Ross JA, Swensen AR. Prenatal epidemiology of pediatric tumors. Curr Oncol Rep 2004;2:234-41.
- 23) Herman MM, Perentes E, Katsetos CD, et al. Neuroblastic differentiation potential of the human retinoblastoma cell lines Y-79 and WERI-Rb 1 maintained in an organ culture system. Am J Pathol 1989;134:115-32.
- 24) Tombran-Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 1989;30:1700-6.
- 25) Gomez MP, Waloga G, Nasi AE. Electrical properties of Y-79 cells, a multipotent line of human retinoblastoma. J Neurophysiol 1993;70:1476-86.

- 26) Gomez MP, Waloga G, Nasi AE. Induction of voltagedependent sodium channels by in vitro differentiation of human retinoblastoma cells. J Physiol 1993;70:1487-96.
- 27) Hirooka K, Bertolesi GE, Kelly MEM, et al. T-type calcium channel @1G and @1H subunits in human retinoblastoma cells and their loss after differentiation. J Neurophysiol 2001;88: 196-205.
- 28) Bertolesi GE, Jollimore CAB, Shi C, et al. Regulation of alG T-type calcium channel gene (CACNA1G) expression during neuronal differentiation. European J Neurosci 2003;17: 1802-10.
- 29) Ciapa B, Pesando D, Wilding M, Whitaker M. Cell-cycle calcium transients driven by cyclic changes in inositol triphosphate levels. Nature 1994;368:875-8.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium-a life and death signal [news]. Nature 1998;395:645-8.
- 31) Guo W, Kamiya K, Kodama I, Toyama J. Cell cycle-related changes in the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> currents in cultured newborn rat ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol 1998;30:1095-103
- 32) Pearson R, Catsicas M, Becker D, Mobbs P. Purinergic and muscarinic modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. J Neurosci 2002;22: 7569-79.
- 33) Kyritsis AP, Tsokos M, Triche TJ, Chader GJ. Retinoblastoma -origin from a primitive neuroectodermal cell? Nature (Lond.) 1984;307:471-3.
- 34) Perentes E, Herbort CP, Rubinstein LJ, et al. Immunohistochemical characterization of human retinoblastomas in situ with multiple markers. Am J Opthalmol 1987;103:647-58.
- 35) Hutchins JB, Hollyfield JB. Acetylcholine receptors in the human retina. Invest Ophthalmol—Vis Sci 1985;26:1550-7.
- 36) Hamil OP, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch 1981;391:85-100.
- 37) Tsuneki H, Klink R, Lena C, et al. Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. Eur J Neurosci 2000;12:2475-85.
- 38) Barnes S, Haynes LW. Low-voltage-activated calcium channels in human retinoblastoma. Brain Res 1992;598:19-22.
- 39) Yamashita M, Yoshimoto Y, Fukuda Y. Muscarinic acetylcholine responses in the early embryonic chick retina. J Neurobiol 1994;25:1144-53.
- Ohmasa M, Saito T. Muscarinic calcium mobilization in the regenerating retina of adult newt. Dev Brain Res 2003;145: 61-9
- 41) Zhang J, Xiao Y, Abdrakhmanova G, et al. Activation and Ca<sup>2+</sup> permeation of stably transfected 43/1/4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Mol Pharmacol 1999;55:970-81.

#### **=ABSTRACT=**

# Characteristics of Nicotinic Receptor Expressed in Human Retinoblastoma

Dae-Ran Kim, Ph.D.<sup>1</sup>, Seung-Kyu Cha, Ph.D.<sup>1</sup>, In-Deok Kong, M.D.<sup>1</sup>, Se-Hwan Jung, M.D.<sup>2</sup> Sang Hoon Rah, M.D.<sup>2</sup>

Department of Physiology, Yonsei University, Wonju College of Medicine, Wonju, Korea Department of Ophthalmology, Yonsei University, Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

**Purpose:** To identify the characteristics and physiological function of the nicotinic receptor expressed in human retinoblastoma cells.

**Methods:** We measured possible nicotinic signaling in WERI-Rb-1 cells using the Ca<sup>2+</sup> imaging technique and the patch clamp method.

**Results:** 1) Nicotine-induced  $[Ca^{2+}]_i$  rise arose entirely through  $Ca^{2+}$  influx, which was completely abolished by hexamethonium (100  $\mu$ M). 2) Nicotine also induced remarkable depolarization from -56.6±3.7 mV to -29.6±3.6 mV (n=4) under current clamp mode, but it failed to directly activate the T-type  $Ca^{2+}$  channel expressed in retinoblastoma cells.

Conclusions: Nicotinic activation can increase the intracellular calcium level through calcium influx in the undifferentiated retinoblastoma cells, which may play important roles in cell proliferation, differentiation, and cell death.

J Korean Ophthalmol Soc 46(6):1060-1067, 2005

Key Words: Calcium, Nicotinic receptor, Retinoblastoma cell

Address reprint requests to Sang Hoon Rah, M.D.

Department of Ophthalmology, Wonju Christian Hospital, Yonsei University, Wonju College of Medicine #162 Ilsan-dong, Won-ju 220-701, Korea

Tel: 82-33-741-0633, Fax: 82-33-745-2965, E-mail: shrah@wonju.yonsei.ac.kr