

Characteristics of Purinergic Receptor Expressed in Human Retinoblastoma Cells

Dae-Ran Kim¹ and In Deok Kong^{2†}

¹Department of Basic Nursing Science, Keimyung University. College of Nursing

²Department of Physiology, Yonsei University. Wonju College of Medicine

Recently, much attention has been paid to human retinoblastoma since it provide a good model system for studying mechanisms underlying cell growth, differentiation, proliferation, and apoptosis, and for developing cancer therapy. However, until now it is unclear whether purinergic receptors are involved in the calcium mobilization in the retinoblastoma cells. In this regard, we measured possible purinergic signaling in WERI-Rb-1 cells using Ca^{2+} imaging technique and RT-PCR method. ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients was maintained to about $90.7 \pm 1.0\%$ of the control ($n=48$) even in the absence of extracellular calcium. The ATP-induced intracellular calcium response was only attained to $10.4 \pm 1.8\%$ ($n=55$) of peak amplitude of the control after preincubation of $1 \mu\text{M}$ U-73122, a PLC inhibitor, but it was not affected by $1 \mu\text{M}$ U-73343, a inactive form of U-73122. And also ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise was almost attenuated by $20 \mu\text{M}$ 2-APB, a putative IP_3 receptor inhibitor. Two subtypes of IP_3 receptor ($\text{IP}_{3,1}\text{R}$, $\text{IP}_{3,2}\text{R}$) were identified by a RT-PCR method. These findings suggest that purinergic stimuli can cause calcium mobilization via PLC- IP_3 pathway after the activation of P_2Y receptors in the retinoblastoma cells, which may play important roles in cell proliferation, differentiation, growth, and cell death.

Key Words: Retinoblastoma, Purinergic receptor, Intracellular calcium

서 론

세포외액의 ATP와 같은 adenine 뉴클레오티드 및 adenosine의 작용은 세포외막에 존재하는 수용체를 매개로 이루어지는데, 이러한 수용체를 퓨린수용체 (purinergic receptor)라 하며, 이는 여러 가지 효현제 (agonist)의 효과 및 길항제 (antagonist)의 선택성 등을 기준으로 크게 P_1 과 P_2 수용체로 구분한다. 특히, P_2 퓨린성 수용체는 다양한 세포에 광범위하게 분포하고 있는 세포의 뉴클레오티드의 작용을 매개하며, 여기에는 리간드-연결 (ligand-gated) P_2X 수용체와 G-단백 연결 P_2Y 수용체가 포함된다. 수용체 활성화에 따른 신호전달은 직접적으로 이온채널에 영향을 주거나 (P_2X) guanine nucleotide binding protein (G-단백)을 매개로 (P_2Y) 하여 중추신경 및 말초신경계에서의 신경전달 (Ralevic and Burnstock, 1998;

Newman, 2003), 근육수축 및 이완 (Burnstock and Meghji, 1983; Kong, 1993), 호르몬, 신경전달물질 및 사이토카인 (cytokine) 분비 (Fries et al., 2004) 등과 같은 생리적 기능을 조절한다. 뿐만 아니라 세포내 신호전달 조절을 통한 세포의 성장, 분화, 증식, 사멸 등의 기전을 매개하고, 면역계 질환, 염증, 통증, 신경퇴행성 질환, 골다공증 등과 같은 다양한 병리적 기전에도 관련되며 (Fries et al., 2004), 암이나 허혈성 손상, 스트레스 및 출혈성 쇼크 등과 같은 병태생리적 상황에서는 보호기전을 활성화시키는데도 관여하는 것으로 (Abbracchio and Burnstock, 1998) 알려져 있다.

현재까지 눈의 구조 및 기능에 관련된 여러 세포나 조직에서 퓨린성 수용체가 널리 분포되어 있음이 확인되었고, 그 분포양상은 종 (species)과 부위에 따라 다양한 것으로 보고되었다 (Cowlen et al., 2003). 또한 안과영역에서의 퓨린성 수용체의 임상적용 가능성에 대해서도 많은 연구가 이루어져, 현재 안구건조증이나 일부 망막박리 치료제로서의 그 효용성도 입증되고 있다 (Peterson et al., 1997; Mundasat et al., 2001; Cowlen et al., 2003). 그러나 정상 눈 조직에서 일부 퓨린성 수용체 아형의 발현특성 및

*논문 접수: 2007년 11월 23일

수정재접수: 2007년 12월 3일

†교신저자: 공인덕, (우) 220-701, 강원도 원주시 일산동 162, 연세대학교 원주의과대학 생리학교실

Tel: 033-741-0292, e-mail: kong@yonsei.ac.kr

기능적 특성에 관해서만 잘 알려져 있을 뿐이며, 망막아세포종과 같은 질병의 병태생리적 기전에 관련된 퓨린성 수용체의 조절특성에 대해서는 충분한 연구가 이루어지지 않아 지속적인 연구의 필요성이 제기되고 있다.

망막아세포종 (retinoblastoma)은 소아들에게서 가장 흔히 발병하는 안구내 악성 종양으로, 다능성 망막전구세포 (multipotent retinal precursor)에서 기원하며 (Hirooka et al., 2001), 배아 (germ)나 체세포 (somatic cell)에서 염색체 13번의 q14번 영역 (region)의 돌연변이에 의해 (Sparkes et al., 1983) 줄기세포로부터 신경세포와 신경교 전조세포 (neuronal and glial progenies)로 분화하는 대신 악성 표현형 (malignant phenotype)을 획득하게 되면서 종양세포로 발달하게 된다 (Perentes et al., 1987). 다양한 포유동물 세포에서 일반적으로 세포내 칼슘이온농도의 변화는 세포의 발달적 주기 (orderly progression of the cell cycle)와 증식 및 성장을 조절하는데 중요하며 (Berridge et al., 1998; Pearson et al., 2002), 망막아세포종 세포내 칼슘조절 역시 세포의 분화와 관련하여 매우 중요한 기전으로 탐색되어 왔다. 지금까지 알려진 망막아세포종 세포내 칼슘조절은 대부분 낮은 전압 의존성 (low voltage activated) 이온채널을 통한 칼슘유입에 의한 기전으로 (Hirooka et al., 2001; Bertolesi et al., 2003) 알려져 왔다. 그러나 다른 포유류의 망막세포들에서 규명된 바와 같이 미분화된 망막아세포종 세포에서 퓨린성 수용체를 매개한 구체적인 칼슘조절특성이나 신호전달 기전에 관한 연구는 보고되어 있지 않다.

재료 및 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% 우 태아혈청 (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 갈아주었고 7일을 주기로 계대배양하였다.

2. 실험용액 및 약물

1) 실험용액

칼슘 이미징 실험을 위한 세포외 관류액 (external solution; PSS)의 조성 (mM)은 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 5 HEPES 그리고 10 glucose (pH 7.4)이었다. 실험 시에는 모든 약물을 약 2 ml/min의 속도로 도립현미경 위에 설치된 챔버에 관류시켜 실험하였다.

2) 약물

우 태아혈청 (FBS) 및 antimycotic-antibiotics는 Gibco BRL로부터, Fluo-3/AM은 Molecular probes (Eugene, OR, USA)로부터 각각 구입하였고, RPMI는 CAMBREX로부터 구입하였다. 또한 adenosine 5'-triphosphate (ATP), 2-APB는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터, U-73122는 Tocris (Ellisville, MO, USA)사로부터, U-73343은 Calbiochem (Darmstadt, Germany, Cat. No 662041)사로부터 구입하였다. Fluo-3/AM과 U-73122, U-73343은 DMSO에 녹여 사용하였고 그 외의 모든 시약은 삼차증류수에 녹여 사용하였다.

3. 세포내 칼슘이온농도($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 측정

세포내 칼슘이온농도 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)의 변화를 측정하기 위해 형광이미지 시스템 (fluorescence imaging system)을 사용하였으며 그 방법은 동일한 세포에서 칼슘이온농도를 측정한 Rah (2004)의 방법을 참조하였다. 먼저 세포배양액 1 ml에 Fluo-3/AM 5 μM 농도를 첨가한 후 1분간 초음파 처리 (sonication) 후 여기에 망막아세포종 세포가 붙어 있는 coverslip을 넣은 다음 37°C 세포배양기 (humidified CO_2 incubator, 95% air 5% CO_2)에서 1시간 부하시킨다. 부하가 끝나면 세포외 관류액으로 2회 세척하여 세포외액의 잔여 Fluo-3/AM을 충분히 제거한 다음 도립현미경 (IX51, Olympus, Japan)위의 관류 챔버 (Warner Instrument, Hamden, CT, USA)에 올려놓고 관류액 (normal PSS)을 중력에 의해 2 ml/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_{488}) 파장으로 여기 (excitation)시켰을 때 530 nm의 파장에서 방출 (emission)되는 형광 세기를 CCD 카메라 (cooled charge-coupled device camera, Cascade, Roper, USA)가 증폭시켜 이미지로 나타내었는데, 이때 얻어지는 형광이미지는 약물 투여시는 0.1 Hz의 빈도로 30초간 측정하였으며 세척 동

Table 1. Primer sequences for RT-PCR of IP₃ receptor subtypes

IP ₃ Rs subtypes	Gene Accession Numbers	Sequences	Product sizes (bp)
IP ₃₋₁	NM_002563	F 5'-CCA CGT ATC AGG TGA CAA GA-3' R 5'-TGA GGG TCA TGT CTT CAC TC-3'	168
IP ₃₋₂	BC012104	F 5'-GCT CTA CTT TGT CAC CAC CA-3' R 5'-GAG CAC GTA ACA GAC AAG GA-3'	157
IP ₃₋₃	NM_17687	F 5'-GTA AGA ACG AGG GGT GTA GG-3' R 5'-AGC AGT GCA GTC AAA GAC AT-3'	156

F: Forward; R: Reverse

안에는 0.03 Hz의 빈도로 측정하여 광원으로 인한 세포 손상을 최소화하였다. 세포내 칼슘이온농도는 자극을 주기 전 Fluo-3/AM 부하로 인한 기본 형광값 (F_0)에서 약물을 투여하였을 때 변화되는 형광값 (F)의 비율로 측정하였으며 F/F_0 값이 세포내 칼슘이온농도의 변화를 반영하도록 하였다. 세포마다 Fluo-3에 부하되는 정도에 차이가 있어, 본 연구에서는 F_0 값이 1,000 이상으로 충분히 잘 부하된 세포에서 얻은 값만을 포함시켰다.

측정한 형광이미지는 소프트웨어 패키지인 MetaFluor 6.1 (Universal Imaging Corporation, USA)로 기록한 뒤, 단일세포의 F/F_0 값을 평균내어 자료를 분석하였으며, 이들 형광 (F/F_0)값의 최대 (peak)치를 비교하여 분석하였다.

4. 역전사 연쇄 중합반응 (RT-PCR)

먼저 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법을 사용하여 WERI-Rb-1 세포들로부터 전체 RNA를 분리하였다. 즉, 세포를 guanidinium thiocyanate buffer로 lysis시킨 다음 phenol 및 chloroform을 가하여 얼음 위에서 15분 이상 보관하였다. 이를 4°C에서 10,000 ×g로 20분간 원심 분리하여 상층액을 조심스럽게 취하였다. 이 상층액을 동량의 isopropanol과 섞은 다음 -70°C에서 1시간 이상 RNA를 침전시켰다. 다시 4°C에서 10,000 ×g로 20분간 원심 분리하여 RNA pellet을 얻었으며, 이를 다시 75% ethanol로 씻어낸 후 원심 분리하여 RNA 시료를 얻었다.

cDNA의 합성은 2 µg RNA와 0.5 µg random hexamer를 먼저 70°C에서 5분간 반응시키고, reverse transcriptase 200 units, dNTP 25 nmoles, RNase inhibitor 20 units 등이 포함되게 하여 37°C에서 1시간 반응시킴으로써 이루어졌다. 이어 PCR은 IP₃ 수용체에 대한 시발체 (primer)를 이용하여 이루어졌으며, 이들의 염기서열은 Table 1에 요약하였다. PCR 반응액에는 합성된 cDNA 0.05 µg, 각각의 primer pair (10 pmoles), 1.25 units의 AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-

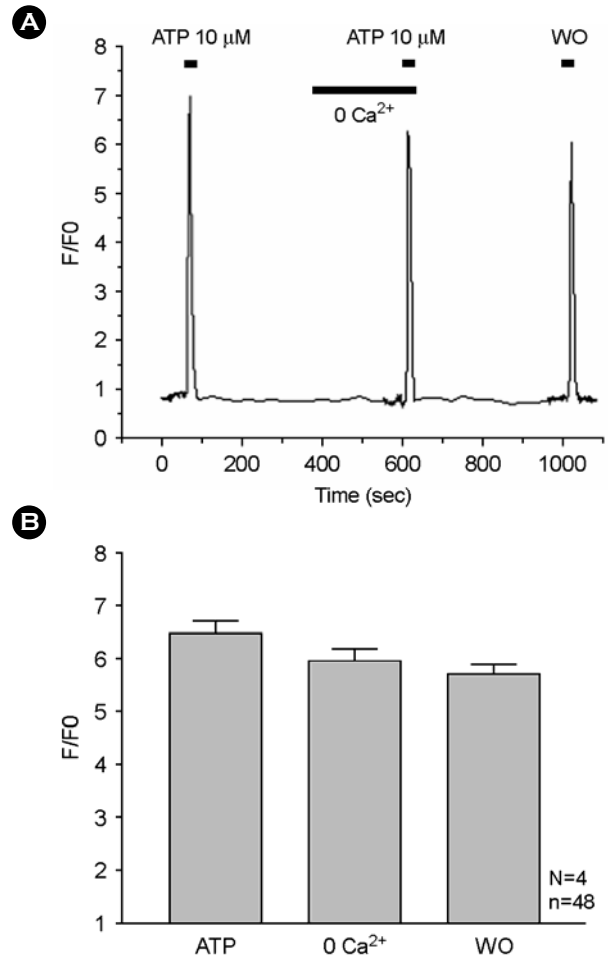


Fig. 1. Effects of extracellular Ca²⁺ on ATP-induced [Ca²⁺]_i increase in WERI-Rb-1 cells. ATP (10 µM) increased intracellular free calcium ion level ($F/F_0=7.1\pm0.2$), which response was slightly reduced in the absence of extracellular Ca²⁺ concentration (A), but there were not significant differences in the peak amplitude of [Ca²⁺]_i responses among 3 repeated ATP application (B). F_0 =basal fluorescence value loaded by Fluo-3/AM, F =fluorescence changed after introducing ATP, WO=wash out, n=total cell number, N=experimental number, solid bar=the duration for applying ATP.

Elmer, Norwalk, CT, USA), 10 nmoles의 dNTP 등이 포함되게 하여, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분으로 35 cycle 동

안 반응시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.1% agarose gel에 전기영동하여 U.V하에서 관찰하였다.

5. 결과 및 자료분석

결과는 평균 (Mean)과 표준오차 (SEM)로 나타내었으며, 통계적인 의의는 unpaired t-검정과 분산분석 (one-way ANOVA)으로 검증하여, P 값이 0.05 이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다. 결과에서 제시한 그림에서 실험횟수는 N 으로, 세포 수는 n 으로 표기하였다.

결 과

1. ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 변화

Fluo-3/AM으로 부하된 WERI-Rb-1 세포들은 ATP (10 μ M) 투여시 대부분의 세포들 (80% 이상)에서 일시적인 세포내 칼슘이온농도의 증가가 뚜렷이 관찰되었으며 평

균 F/F_0 의 값은 7.1 ± 0.2 ($N=5$, $n=52$)이었다. ATP에 의한 세포내 칼슘이온은 일정한 시간 간격으로 ATP를 반복 투여했을 때 그 효과가 일부 감소하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의할 만한 수준은 아니어서, 동일 세포들에 대한 ATP 투여의 효과가 탈감작 (desensitization)없이 반복적으로 재현됨을 알 수 있었다 (결과에 나타내지 않았음). ATP 투여 후 일시적 세포내 칼슘이온농도 증가가 세포의 칼슘유입 때문인지, 세포내 칼슘저장소로부터의 유리인지를 알아보기 위하여 세포의 칼슘을 제거한 Ca^{2+} -free 관류액을 3분간 전처리한 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰하였다 (Fig. 1A). 실험 결과 세포의 칼슘이 제거된 조건에서도 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 증가는 대조군의 $90.7 \pm 1.0\%$ 이상 유지되었으며 ($n=48$), 약간의 형광값이 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 1B). 이는 선행연구를 통해 확인한 (Kim et al., 2007) ATP 반복 투여에 의한 자연적인 반응감

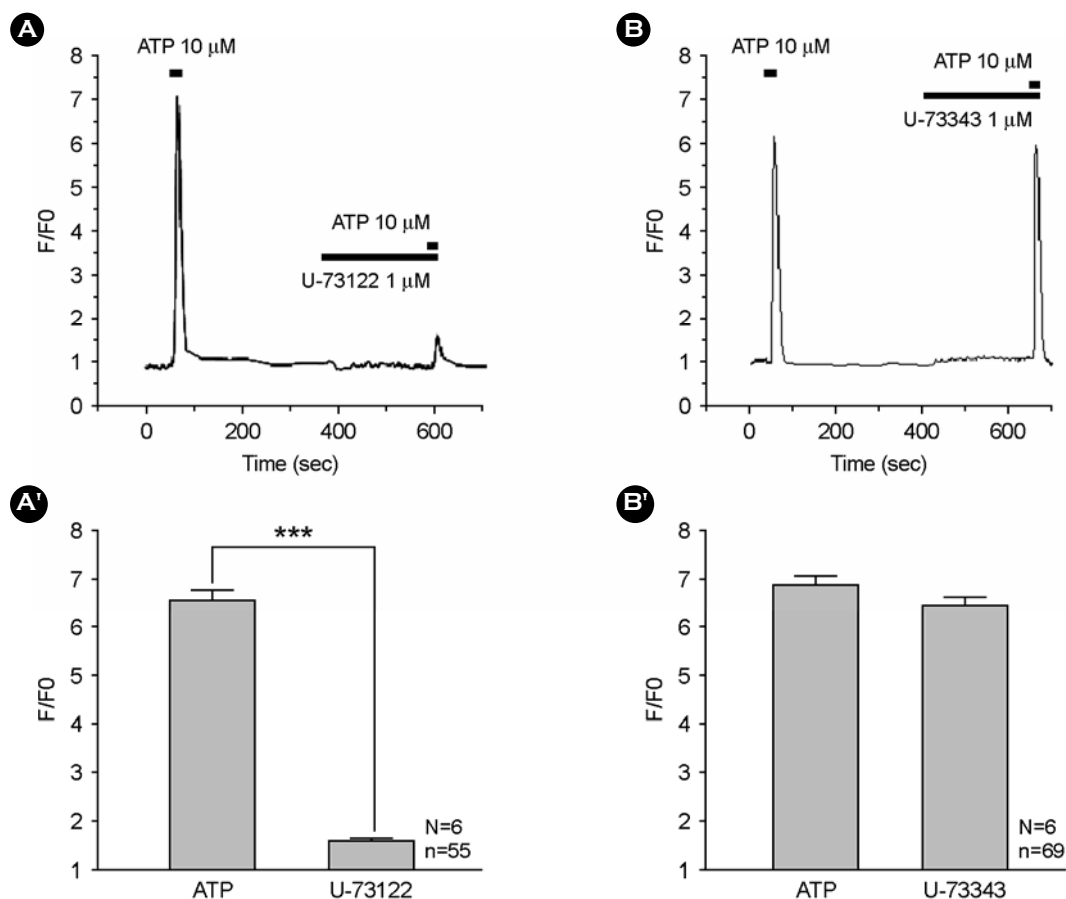


Fig. 2. Differential effect of U-73122 and U-73343 on ATP-induced calcium transient in WERI-Rb-1 cells. Original traces (A and B) and histograms (A' and B') showing a strong suppression of maximal amplitude of 10 μ M ATP-induced calcium transient after pretreatment with 1 μ M U-73122, a PLC inhibitor, but not after pretreatment with 1 μ M U-73343, the succinimide analog of U-73122. Drugs were applied for 30 s or for 3 min as indicated by thick bars. *** indicates $P < 0.001$.

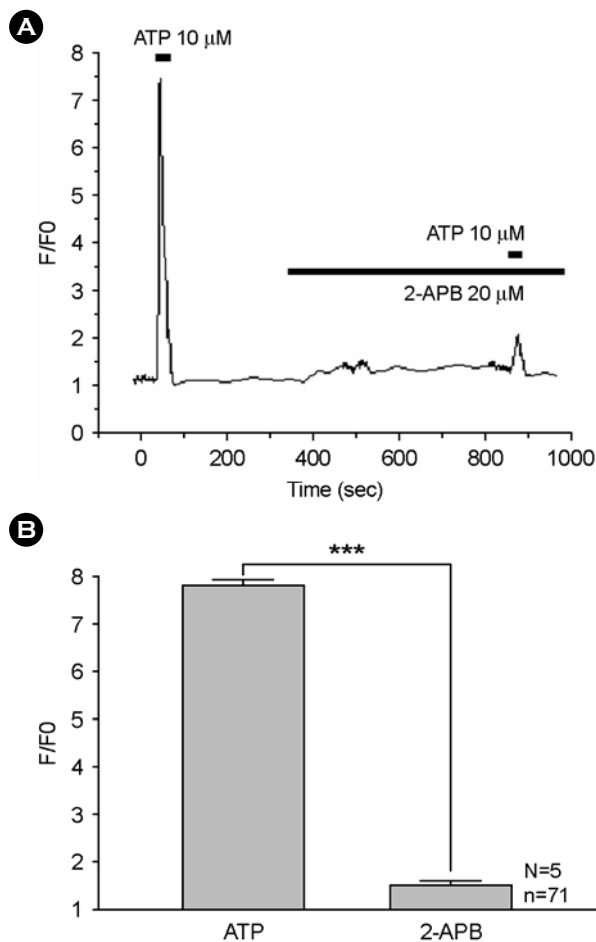


Fig. 3. Involvement of IP_3 receptor in the ATP-induced calcium transient in WERI-Rb-1 cells. Original trace (A) and histogram (B) showing a strong suppression of maximal amplitude of 10 μ M ATP-induced calcium transient after pre-treatment with 20 μ M 2-APB, a membrane permeable IP_3 receptor blocker. *** indicates $P < 0.001$.

소 수준과 유사하였으므로 세포의 칼슘이 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도에는 영향을 미치지 않은 것으로 보인다.

ATP에 의한 세포내 칼슘동원 기전을 확인하고자 PLC (phospholipase C) 경로 차단제인 U-73122 (1 μ M)를 사용하여 대조군과 비교하였다. Fig. 2A와 A'에서 볼 수 있듯이 U-73122를 3분 동안 전처리 후 ATP에 의한 세포내 칼슘반응은 대조군의 $10.4 \pm 1.8\%$ 에 지나지 않아 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 증가가 U-73122에 의해 대부분 억제됨을 알 수 있었다 ($P < 0.001$, $n=55$). 반면, U-73122의 isoform인 U-73343 (1 μ M)을 동일시간 전처리한 후 ATP를 투여한 후에는 세포내 칼슘이온농도는 대조군과 유사하게 증가하여 (Fig. 2B), ATP에 의한 칼슘반응과 U-73343 전처리 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도

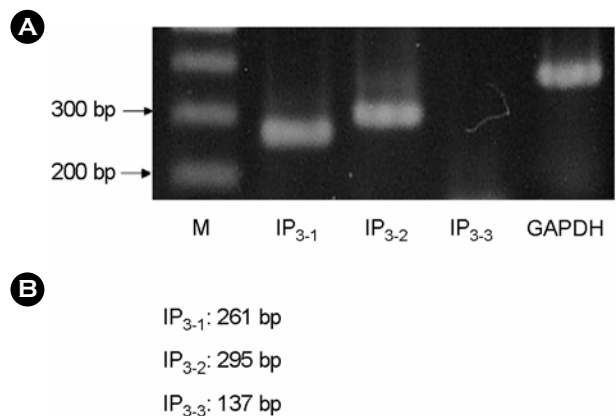


Fig. 4. RT-PCR analysis of mRNA encoding the subtypes of IP_3 receptors expressed in WERI-Rb-1 cells. Total RNA isolated from WERI-Rb-1 cells were reverse transcribed and amplified by PCR with specific primers to the subtypes of IP_3 receptors. The resultant PCR products were visualized on agarose gel, containing ethidium bromide. As an internal control, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was also amplified. Estimated product size for each subtype is shown in parenthesis. M=DNA size marker.

형광 평균값 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Fig. 2B'). 또한 세포질내 소포체 (ER, endoplasmic reticulum) 막에 존재하는 세포막 투과성 IP_3 수용체 차단제인 2-APB (20 μ M)를 5분 동안 전처리한 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도의 변화를 관찰한 결과, 2-APB는 ATP에 의한 세포내 칼슘농도의 대부분 ($92.5 \pm 1.3\%$)을 억제하였고 (Fig. 3A), ATP에 의한 칼슘반응과 2-APB 전처리 후 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도 형광 평균값 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (Fig. 3B). 따라서 이와 같은 결과들을 종합해 볼 때 ATP에 의한 퓨린성 수용체 활성화의 주요 기전은 PLC 경로의 활성화를 통한 세포내 칼슘저장소로부터의 칼슘동원임을 시사한다 하겠다.

2. RT-PCR 방법을 이용한 IP_3 수용체의 분자생물학적 규명

망막아세포종 세포의 소포체 막에서 발현되는 IP_3 수용체 아형 (subtype)을 확인하기 위해 망막아세포종 세포로부터 RNA를 분리한 다음, 특정 아형에 선택적인 primer를 이용하여 역전사 연쇄중합반응 (RT-PCR)을 실시하였다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이, IP_3 수용체 아형들 중 IP_{3-1} , IP_{3-2} 수용체 mRNA가 망막아세포종 세포에 발현되어 있음을 알 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 세포내 칼슘이온 측정법과 분자 생물학적 방법을 이용하여 망막아세포종 세포주의 하나인 WERI-Rb-1 세포에 발현된 퓨린성 수용체의 조절특성을 확인하였다. 먼저 약리학적 방법을 이용한 칼슘 이미징 실험 결과 미분화된 망막아세포종 세포에서 ATP 투여에 따른 일시적인 세포내 칼슘이온농도의 증가가 관찰되었는데, 이러한 칼슘증가는 세포외 칼슘이온을 제거한 상태에서도 유사하게 관찰되어, 퓨린성 수용체에 의한 칼슘이온 조절은 주로 G-단백을 매개로 세포내 신호전달에 관여하는 P2Y 수용체에 의한 것임을 알 수 있었다. 왜냐하면 P2X 수용체는 10 ms 이내의 신속한 시간내 세포막을 통과하여 이동하는 비선택적 양이온들 (Na^+ , K^+ , Ca^{2+})을 매개로 세포내 신호전달에 관여하는 기전을 갖고 있기 때문에 세포외 칼슘을 제거한 상태에서도 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도가 증가하였다는 것은 이것이 세포밖에서 유입된 칼슘이 아니라는 의미가 된다.

한편, P2Y 수용체는 heterotrimeric G-단백과의 상호작용에 의해 다양한 세포내 신호전달을 활성화시키는 seven-transmembrane receptors의 상과 (superfamily)에 속한다 (Ralevic and Burnstock, 1998; Fries et al., 2004). P2Y 수용체 아형들 중 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ 수용체는 사람에게서 클로닝되어 왔고 기능적으로 활성화된 형태라고 알려져 있다 (Abbracchio et al., 2003). P2Y 퓨린성 수용체에 의한 세포내 신호전달 기전은 크게 2가지 경로가 알려져 있다. 가장 일반적인 기전은 퓨린수용체가 세포질에 인접한 내부 세포막에 위치하는 G-단백의 일종인 G_q 단백질과 상호작용하여 phospholipase C (PLC)를 활성화시키고 이 효소는 inositol 1,4,5 - triphosphate (IP₃)를 생성하여 세포내 소포체로부터 칼슘을 동원하게 되고 (Schachter et al., 1996), 이렇게 동원된 세포내 칼슘에 의해 직접적으로 다양한 세포기능이 조절된다 (Kügelgen and Wetter, 2000). 또 다른 경로는 G_s 혹은 G_i 단백질과의 상호작용에 의해 adenylyl cyclase를 활성화시키는 기전이 알려져 있다 (Ralevic and Burnstock, 1998). 현재 기능적으로 활성화된 형태로 알려진 P2Y 수용체들 중 P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ 수용체 아형들은 PLC 경로를 활성화 - IP₃ 생성 과정을 통하여 세포내 칼슘저장소로부터 칼슘을 동원하는 기전에 관여하고 (Chen et al., 1995), P2Y₁₁은 PLC 경로와 adenylyl cyclase 기전을 모두 활성화시키는 것으로 알려져 있다 (Communi

et al., 1997). 본 연구에서는 퓨린성 수용체의 세포내 칼슘동원 기전과 관련하여, 세포외 칼슘이온을 제거한 상태에서도 ATP에 의한 세포내 칼슘반응이 감소하지 않았고 선택적인 phospholipase C 경로 차단제인 U-73122를 전처리 하였을 때 대부분의 ATP에 의한 세포내 칼슘농도가 감소한 반면, U-73133의 유사체인 U-73343을 투여하였을 때는 세포내 칼슘반응이 변화가 없었다. 뿐만 아니라 IP₃ 수용체 차단제인 2-APB를 전처리한 후에도 ATP에 의한 세포내 칼슘이온농도를 현저하게 억제하였으며, 역전사 연쇄증합반응을 통하여 세포내 소포체막에 IP₃ 수용체 아형인 IP_{3.1}과 IP_{3.2}의 mRNA의 발현도 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 망막아세포종 세포에 발현된 P2Y 수용체는 전형적인 PLC-IP₃ 경로를 통해 세포내 칼슘을 동원하는 것으로 볼 수 있다.

이와 같은 결과는 동일 세포주에서 콜린성 수용체에 의한 칼슘조절 기전과는 다소 차이를 보이는데, Rah (2004)는 망막아세포종 세포에서의 칼슘조절은 세포내 칼슘저장소로부터 동원될 뿐만 아니라 세포막을 통한 세포외 칼슘유입 기전에 의해서도 일부 조절된다고 보고하였다. 이처럼 동일한 칼슘조절 기능에 관여하고 있을지라도 수용체마다 조절 메커니즘이 약간씩 차이가 있음을 알 수 있고, 이러한 차이로 인해 세포 고유기능에 특징적인 방식으로 신호전달 과정이 전개되는 것으로 보인다.

본 연구의 결과를 통해 망막전구세포 (retinal precursor cell) 모델로 연구되어 온 망막아세포종 세포에서 이루어지는 신호전달 기전의 일부를 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 다양한 세포군으로 이루어진 망막의 정상 생리와 병태 생리 기전을 설명하는 기초지식이 될 수 있을 것이다. 또한 본 연구를 통해서 망막아세포종 세포에 발현된 퓨린수용체에 의해 칼슘이 동원되는 기전이 망막전구세포에서 망막아세포종 세포로의 발암과정에 관여하는지, 아니면 망막아세포종으로의 발암 후 암세포의 기능을 조절하는데 관여하는지는 알 수 없으나 현재 망막아세포종에 특이한 치료적 약물이 개발되어 있지 않다는 관점에서 추후 약물개발을 포함한 새로운 치료적 접근에 필요한 유용한 정보로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음.

REFERENCES

- Abbracchio MP, Burnstock G. Purinergic signaling: Pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol*. 1998. 78: 113-145.
- Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA, Burnstock G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci*. 2003. 24: 52-55.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium-a life and death signal [news]. *Nature* 1998. 395: 645-648.
- Bertolesi GE, Jollimore CAB, Shi C, Elbaum L, Denovan-Wright EM, Barnes S, Kelly MM. Regulation of α 1G T-type calcium channel gene (CACNA1G) expression during neuronal differentiation. *Eur J Neurosci*. 2003. 17: 1802-1810.
- Burnstock G, Meghji P. The effect of adenyly compounds on the rat heart. *Br J Pharmacol*. 1983. 79: 211-218.
- Chen ZP, Levy A, Lightman SL. Nucleotides as extracellular signalling molecules. *J Neuroendocrinol*. 1995. 7: 83-96.
- Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 1997. 272: 31969-31973.
- Cowlen MS, Zhang VZ, Warnock L, Moyer CF, Peterson WM, Yerxa BR. Localization of ocular P2Y₂ receptor gene expression by in situ hybridization. *Exp Eye Res*. 2003. 77: 77-84.
- Fries JE, Wheeler-Schilling TH, Kohler K, Guenther E. Distribution of metabotropic P2Y receptors in the rat retina: a single cell RT-PCR study. *Mol Brain Res*. 2004. 130: 1-6.
- Hirooka K, Bertolesi GE, Kelly ME, Denovan-Wright EM, Sun X, Hamid J, Zamponi GW, Juhasz AE, Haynes LW, Barnes S. T-type calcium channel α 1G and α 1H subunits in human retinoblastoma cells and their loss after differentiation. *J Neurophysiol*. 2001. 88: 196-205.
- Kim YH, Kim DR, Chun KI, Lee JH, Kong ID. Identification of P2Y₁₁ receptor expressed in human retinoblastoma cells. *J Korean Ophthalmol Soc*. 2007. 48: 1134-1141.
- Kong ID. Studies on the characteristics of purinoceptor in ureteral smooth muscle. 1993. Doctoral dissertation. Seoul, Yonsei University.
- Kügelgen IV, Wetter, A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn-Schmiedelberg's Arch Pharmacol*. 2000. 362: 310-323.
- Mundas MV, Novack GD, Allgood VE, Evans RM, Gorden JC, Yerxa BR. Ocular safety of INS365 ophthalmic solution, a P2Y₂ agonist, in healthy subjects. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2001. 17: 173-179.
- Newman EA. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci*. 2003. 23: 1659-1666.
- 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: 7569-7579.
- Perentes E, Herbort CP, Rubinstein LJ, Herman MM, Uffer S, Donoso LA, et al. Immunohistochemical characterization of human retinoblastomas in situ with multiple markers. *Am J Ophthalmol*. 1987. 103: 647-658.
- Peterson WM, Meggyesy C, Yu K, Miller SS. Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium. *J Neurosci*. 1997. 17: 2324-2337.
- Rah SH. Characteristics of cholinergic receptors expressed in human retinoblastoma. 2004. Doctoral dissertation. Seoul, Yonsei University.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998. 50: 413-492.
- Schachter JB, Li Q, Boyer JL, Nicholas RA, Harden TK. Second messenger cascade specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y₁-purinoceptor. *Br J Pharmacol*. 1996. 118: 167-173.
- Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, Sparkes MC, Field LL, Funderburk SJ, et al. Gene for hereditary retinoblastoma assigned to chromosome 13 by linkage to esterase D. *Science Wash DC*. 1983. 219: 971-973.