

해마 신경원세포의 손상에 대한 2-methylaminochroman 화합물의 보호효과

전남대학교 의과대학 신경과학교실, 병리학교실*

김명규 · 이민철* · 김세종

Neuroprotective Effect of 2-Methylaminochroman Compound in Human Hippocampal Neuron Cultures

Myeong Kyu Kim, M.D., Min Cheol Lee*, M.D.,
Sei Jong Kim, M.D.

Department of Neurology and Pathology College of Medicine, Chonnam National University*

—Abstract—

It is known that excitotoxicity and oxygen radicals were two major pathogenic events related to mesial temporal sclerosis (MTS), which was the most common histopathologic features in intractable temporal lobe epilepsy. The experiment was designed to investigate the neuroprotective effect of 2-methylaminochroman U-78517F, a second generation series of nonsteroidal lazaroid compounds, against excitotoxic and oxygen radical injuries on the human fetal hippocampal neurons in vitro. Neuron-enriched cultures were seeded on both 96 well multichamber plates and poly-L-lysine coated Aclar cover slips to determine cytotoxicity by MTT(3-4, 5-dimethylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) assay and cytopathologic features respectively.

Dose-dependent neuronal injuries were developed by treatment of 100, 200, and 500 μ M glutamate(p<0.01), and 100 μ M hypoxanthine plus 10 to 20 mU xanthine oxidase(p<0.01). The glutamate-induced cytotoxicity was completely blocked by pretreatment of 20 μ M MK-801(p<0.01), however, U-78517F did not attenuate the glutamate toxicity. The fetal hippocampal neurons were protected from oxygen radical injuries by pretreatment of 2 to 16 μ M U-78517F(p<0.01).

The cytopathologic changes observed by phase-contrast inverted microscope, neurofilament protein(NF) immunocytochemistry, and MTT stain correlated well with the degree of neuronal injuries in experimental groups. Considerably

swollen neurons with disintegrated neurites were noted by the excitotoxic and oxygen radical injuries, however, there was no characteristic cytologic difference between them.

These data indicated that U-78517F had only a significant protective effect from oxygen radical injury on fetal hippocampal neurons in culture, and it was suggested that the early treatment of both glutamate-antagonists and antioxidants would be beneficial to reduce MTS following epileptic seizures.

서 론

간질이란 발작 즉 갑작스러운 대뇌의 방전이 자발적이고도 반복적으로 나타나는 신경계 질환으로서 그 원인이나 임상양상이 매우 다양하다. 발작은 중추신경계의 조직학적 변화 뿐만 아니라 화학적, 생리학적 과정에도 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Meldrum, 1986; Folbergrova 등, 1981; Meldrum 등, 1976; Plum 등, 1974; Corsellis와 Meldrum, 1976). 난치성 간질의 조직병리학적 변화로서는 내측두엽 경화증이 가장 흔하며 (DeGiorgio 등, 1992; Duchowny 등, 1992; Wolf 등, 1993) 전체 종래의 약 65%를 점유한다(Babb과 Brown, 1987). 복합성 부분발작을 보이는 간질 환자에서 해마의 CA1 부위에 선택적으로 추체세포의 손상이 있다는 보고이래(Sommer, 1990), 이 병변이 반복되는 발작의 직접적인 원인으로 작용하는지 또는 단순히 발작에 의한 흥분독성 또는 저산소성 손상의 결과로써 나타나는 하나의 현상인지에 대한 논란이 있었으나 그 인과관계는 아직도 분명치 않다. 그러나 일반적으로 유소야기의 반복적인 열성경련의 결과로써 내측두엽 경화증이 유발되는 것으로 알려져 있다(Meldrum, 1993).

기초과학 분야의 연구 및 임상적인 노력의 결과로 흥분독성 아미노산의 비정상적인 세포의 축적으로 인한 과도한 신경활동이 내측두엽 경화증의 병인이 될 뿐만 아니라 Alzheimer씨 병, Parkinson씨 병, Huntington씨 병 및 일파성 대뇌 허혈증 등의 신경계 질환의 병인으로서도 어떤 역할을 하고 있음이 밝혀 졌다(Schwarzc와 Meldrum, 1986; Spencer 등, 1987). 또한 산소 유리기에 의한 손상이 발작 현상과 관련이 있다는 보고가 있었으며

(Forno 등, 1986), 발작중 대뇌의 과산화물 음이온(superoxide anion)의 생성, arachidonate 대사 산물(metabolites) 및 자유지방산(free fatty acid)의 축적이 관찰되었다는 보고들은(Armstead 등, 1989; Bazan 등, 1986; Siesjo 등, 1982) 측두엽 경화증이 자유 산소 유리기에 의한 손상에 의해 초래됨을 시사해 주고 있다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 간질에 있어서 흥분독성 아미노산 및 산소 유리기가 신경원세포 손상을 야기하며 두 물질 간에 상호작용이 있음을 알 수 있다.

따라서 본 연구의 목적은 인태아 해마 신경원세포의 배양법을 이용하여 이들 물질에 의한 세포손상을 측정하는 실험적 모델을 만들고, 강력한 lipid peroxidation 억제 작용을 보이는 비스테로이드성 lazaroid 화합물의 일종인 2-methylaminochroman U-78517F가 배양된 인태아 해마 신경원세포의 흥분독성 및 산소 유리기에 의한 손상에 대하여 어떻게 작용하는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

법적 또는 치료적인 목적으로 유산시킨 배태기간 28주 내지 38주 사이의 신선한 태아 대뇌의 측두엽 부위에서 해마를 절취하였다. 해마 조직은 무균상태에서 조심스럽게 절제하여 calcium 및 magnesium이 첨가되지 않은 phosphate 완충 식염수(PBS)가 담긴 무균 petri dish에 안치하였다. 안치된 조직을 작은 절편으로 나눈다음 PBS로 세척하고 0.25% trypsin 및 0.004% DNase를 첨가한 PBS 내에서 37°C에 15분간 방치하였다. 마취침을 사용하여 trypsin의 활성을 정지시킨 후 조심스러운 pipette 조작을 통해 신경원 세포들을 단일 세포들

로 분리하였다. 분리된 세포들을 10% 우태아 혈청(FBS), 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin이 첨가된 Eagle 기초 필수 배양액(MEM, Gibco Lab., Grand Island, NY)에 넣고 밀도의 밀도가 75cm² 배양 플라스크에 배양액 1ml당 106개의 세포밀도가 유지되도록 얇게 편 후 5% CO₂/95% air가 공급되는 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. 배양후 2-4주가 지나면 배양 플라스크의 기저에 평평한 성장세포가 융합된 층이 형성되고 이 기저층의 표면에 작은 원형 또는 양극성의 신경원 세포 및 소수의 회돌기교세포가 배양된다. 이때 성장세포, 신경원세포 및 회돌기교세포의 구성비는 각각 40-60%, 30-50%, 5-10% 정도이다. 이들은 PBS로 2회 세척한 후 0.125% trypsin을 첨가한 PBS내에서 말치하였다가 조심스러운 pipette 조작을 통해 단일 세포로 분리하였다. 분리된 세포들을 10 ug/ml poly-L-lysine(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)으로 전처치한 직경 9mm의 Aclar plastic coverslip 및 직경 7mm의 96 well multichamber plate에 각각 3×10^5 및 1×10^5 의 세포밀도가 유지되도록 분배하였다. Coverslip은 직경 30mm의 배양접시에 넣어 조직학적 검사에 이용하였고 모든 세포는 실험기간 동안 5% CO₂/95% air가 공급되는 37°C 세포 배양기에서 7-10일간 배양하였다. 배양기간 동안 1주에 두 번씩 배양액의 2/3를 신선한 배양액으로 교체하였다.

2. Glutamate 노출 및 산소 유리기의 생성

흥분독성 및 산소 유리기에 의한 신경 손상 실험에 필요한 sodium L-glutamate, hypoxanthine(HX) 및 xanthine oxidase(XO)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였고, 2-methylaminochroman 증합체인 U-78517F [2-[(4-(2,6-di-(1-pyrrolidinyl)-4-pyrimidinyl)-1-piperazinyl) methyl]-3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2h-1-benzopyran-6-OL, dihydrochloride]는(Hall 등, 1991) Upjohn Co. (Calamazoo, MD)에서 기증받아 사용하였다.

본 연구에 사용된 실험용 배양액(Kikuchi와 Kim, 1993)의 구성은 다음과 같다(단위 mM): CaCl₂(2.50), KCl(5.00), NaCl(137.0), KH₂PO₄(0.3), NaHCO₃(4.0), NA₂HPO₄(0.3), glucose(5.6),

glycine(0.01), HEPES(10.0, pH 7.4). 또한 실험용 배양액의 pH가 7.2 이하인 상황에서는 glutamate와 수용체의 결합이 억제되므로(Takadera 등, 1992) 배양기간 동안 노출용액의 pH를 7.3 이상으로 유지하였다.

Glutamate 투여군은 MK-801을 각각 5, 10, 20μM씩 전처치한 군과 2-methylaminochroman U-78517F를 각각 2, 4, 8, 16μM씩 전처치한 군, 그리고 아무런 조작도 가하지 않은 군으로 나누어 37°C에서 glutamate 100, 200, 500μM에 각각 10분 동안 노출시킨 다음 coverslip 및 well 속의 세포를 조심스럽게 3차례 세척한 후 정상 배양액을 공급하여 24시간 동안 배양기내에서 배양하였다.

HX+XO 투여군은 실험용 배양액에 2-methylaminochroman U-78517F를 각각 2, 4, 8, 16μM씩 전처치한 군과 아무런 조작도 가하지 않은 군으로 나누어 100μM HX에 XO 1, 5, 10, 20μM씩을 섞은 용액을 각각 첨가하여 산소 유리기의 생성을 유도한 후 4시간 동안 노출시킨 다음 glutamate 투여군과 같은 방법으로 처리하였다.

3. 세포독성(Cytotoxicity) 측정

해마 신경원세포군에 대한 일반적인 세포독성을 알아보기 위해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide;Sigma Chemical Co, St. Louis, MO)를 가하여 Mosmann(1983)법으로 측정하였다. MTT를 PBS에 5mg/ml의 비율로 용해시켜 45μm의 micropore로 여과, 무균처리 후 광선에 노출되는 것을 방지하기 위해 알루미늄 용지로 밀봉한 시험관에 보관하였다. 이 MTT 용액을 glutamate 및 산소 유리기에 노출시킨 후 정상 배양액내에서 24시간 동안 배양된 세포가 들어 있는 모든 well에 배양액 100μL당 10μL의 비율로 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 여기에 acid-isopropanol(100μL of 0.04 N HCl in isopropanol)을 추가한 후 파장 570nm에서 micro-ELISA 판독기로 측정하였다.

4. 배양세포의 형태학적 고찰

Aclar coverslip 위에 배양된 세포를 실험군에 따라 위상차 현미경으로 관찰하였고, 68 및 200KDa의 신경계사 단백질에 대한 면역세포화학적

염색을 시행하였다. 먼저 coverslip위의 배양세포를 PBS로 3번 세척하고 4% paraformaldehyde 용액에 5분간 고정시킨 후 0.2% Triton X-100이 첨가된 PBS로 2회 세척하였다. 그 다음 신경세포사 단백질 특이적 1차 항체 (Zymed, South San Francisco, CA)를 1시간 동안 도포하였고 avidin-biotin-peroxidase (Research Genetics, Huntsville, AL) 검출 시스템 (Hue 등, 1981)을 30분간 적용시킨 후 3,3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB)로 발색시켰다.

MTT 용액을 첨가한 96 microchamber plate도 역시 acid-isopropanol을 첨가하기 직전에 실험군에 따른 형태학적 변화를 위상차 현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. Glutamate의 해마 신경세포독성에 대한 U-78517F의 효과

Glutamate에 노출된 태아 해마 신경원세포에서는 세포학적인 변화와 함께 상당한 세포사가 관찰되었다. 이러한 glutamate에 의한 세포손상은 MTT 분석법으로 측정된 결과 용량의존적 (dose-dependent)인 경향을 보였는데 glutamate의 용량이 100, 200, 500 μ M로 증가함에 따라 신경원세포의 생존율이 정상 대조군과 비교했을 때 각각 48.5 \pm 5.36%, 36.7 \pm 4.34%, 25.3 \pm 6.02%이었다 (Fig. 1). MK-801을 각각 5, 10, 20 μ M씩 전처리한 경우에는 100 μ M glutamate에 의한 세포독성이 용량의존적으로 억제되었고 특히 MK-801 20 μ M을 전처리한 경우 glutamate에 의한 세포독성이 완전히 억제되었다 (Fig. 1).

2-methylaminochroman U-78517F를 각각 2, 4, 8, 16 μ M씩 전처리한 경우에는 4군 모두 100 μ M glutamate에 의한 세포손상을 억제하지 못하였다 (Fig. 2). 즉 glutamate만을 처리한 군과 glutamate 및 U-78517F를 함께 처리한 실험군 간의 신경세포 생존율에는 유의한 차이가 없었다.

2. 산소 유리기에 의한 유도된 해마 신경세포독성에 대한 U-78517F의 효과

100 μ M HX에 각각 1, 5, 10, 20mU/ml의 XO를 첨가하여 4시간 동안 배양세포에 작용시켰을 때

정상 대조군과 비교한 신경원 세포의 생존율은 각각 98.5 \pm 7.10%, 94.1 \pm 6.87%, 59.4 \pm 7.23%, 50.0 \pm 6.34%로 역시 용량의존적인 신경원세포사를 보였다 (Fig. 3).

U-78517F의 효과는 100 μ M HX+20mU/ml XO가 첨가된 배양세포군을 기준으로 측정하였다. U-78517F 2, 4, 8 μ M씩을 전처리한 세가지 실험군에

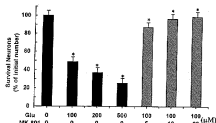


Fig. 1. Glutamate-mediated hippocampal neuronal cell death in culture. Human fetal hippocampal neurons (28 to 38 weeks) were treated with 100 to 500 μ M glutamate for 10 min at 37 $^{\circ}$ C in 95%air/5%CO₂ incubator and percentage of survival neurons was determined at 24 hr later by MTT assay. The glutamate toxicity was blocked by pretreatment of MK-801 in dose-dependent manner. Columns and vertical bars represent means \pm SEM of 10 experiments. **p*<0.01, Glu:glutamate

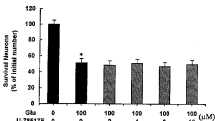


Fig. 2. Effect of U-78517F on glutamate toxicity. The pretreatment of 2 to 16 μ M U-78517F did not block 100 μ M glutamate toxicity. Columns and vertical bars represent means \pm SEM for 10 experiments. **p*<0.01, Glu:glutamate

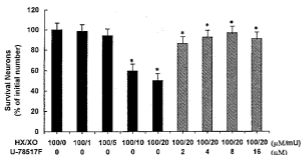


Fig. 3. Effect of U-78517F on oxygen radical injury induced by HX/XO system. Significant reduction of survival neurons were noted in addition of 100/10 to 100/20 HX/XO ($\mu\text{M}/\text{mU}$). The pretreatment U-78517F considerably reduced oxygen radical injury, and showed dose-dependent attenuation of hippocampal neuronal cell death at concentration of 2, 4 and 8 μM U-78517F. Columns and bars represent mean \pm SEM for 10 experiments. * $p < 0.01$, HX/XO: hypoxanthine/xanthine oxidase

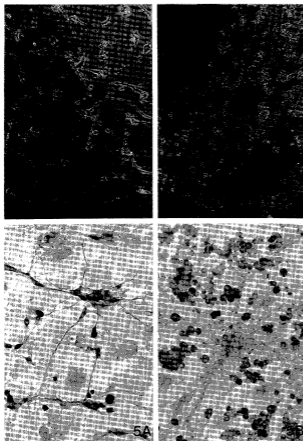


Fig. 4. Phase-contrast inverted microscopic findings of hippocampal neurons. Healthy, viable neurons have smooth, round to ovoid cell body, 20-30 μM in diameter, and slender neurites (A). Prominent neuronal damages showing coarsely swollen cell body, karyolysis and irregular fragmentation of neurites (B).

서 정상 대조군과 비교한 세포생존율이 각각 $86.2 \pm 6.72\%$, $92.4 \pm 6.9\%$, $96.5 \pm 7.03\%$ 로 나타나 HX/XO 시스템의 산소 유리기에 의한 세포독성을 효과적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 3).

3. 배양 해마 신경원세포의 세포학적 소견

형태학적인 관찰은 주로 poly-L-lysine으로 전처리한 Aclar coverslip상에서 배양된 세포를 대상으로 하였다. 위상차 현미경하에서 정상 신경원세포는 직경 20-30 μm 정도의 원형 또는 장방형의 매끄러운 세포체와 가느다란 세포질 돌기를 지닌 것으로 관찰되었다(Fig. 4A). 배양액에 glutamate 및 산소

유리기를 처리한 경우에는 두 군 모두에서 현저한 세포손상이 초래되어 세포체의 부종, 핵융해(karyolysis) 및 세포질 풀기의 분절 등이 관찰되었으나 두 군간의 뚜렷한 세포학적 차이는 없었다(Fig. 4B). MK-801을 전처리한 군에서는 glutamate에 의한 세포독성이 억제되어 신경원 세포구조가 보존되었으나 U-78517F 전처리한 군에서는 glutamate에 의한 세포독성으로 부티의 보호 효과를 관찰할 수 없었다.

신경세포 단백질에 대한 면역세포화학 염색후 배양세포에 대한 광학 현미경적 관찰도 역시 위에 기술한 조건들을 뒷받침하였다. 정상 해마신경원 세포

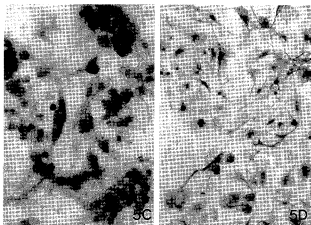


Fig. 5. Light microscopic examination of NF immunocytochemistry. NF was well expressed in neurites and cell body of control neurons (A). Severely swollen cell bodies with prominent loss of neurites by 500 μM glutamate treatment (B). Considerable loss with hazy staining of NF by treatment of 100 μM HX plus 5mU XO (C). Protective effect of U-78517F against 100 μM HX plus 100mU XO (D).

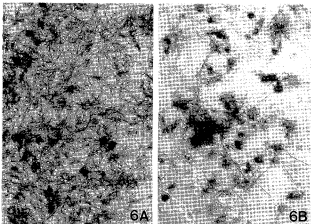


Fig. 6. Light microscopic findings of neurons with MTT staining. Bluish purple precipitation of formazan pigment in cell body and processes of viable neurons (A). Many ghost cells with decreased precipitation of formazan pigment by addition of 100 μM HX plus 10mU XO (B).

의 세포체 및 세포질 돌기에서는 신경세포 단백질이 잘 발현되었으나 (Fig. 5A), 500 μ M glutamate 처리군에서는 극심한 세포체 부종 및 현저한 세포질 돌기의 상실이 관찰되었다 (Fig. 5B). 또한 산소 유리기에 의한 손상에도 매우 취약해서 100 μ M HX+5mU/ml XO를 처리한 군에서는 신경세포 단백질 발현양상이 매우 경감되거나 상당부분 발현되지 않았다 (Fig. 5C). 그러나 U-78517F의 전처리 HX/XO 시스템의 산소 유리기에 의한 세포손상을 효과적으로 억제하여 세포체 및 세포질 돌기의 신경세포 단백질 발현이 뚜렷하였다 (Fig. 5D).

96 well plate에 배양세포를 MTT로 염색한 후 광학현미경으로 관찰한 결과 살아있는 신경세포는 세포체 및 세포질 돌기에 짙은 청색의 formazan 색소가 선명하게 침착되어 있었으나 손상세포는 무염색상을 보였다. 8 μ M의 U-78517F를 전처리한 경우 100 μ M HX+20mU/ml XO 부위에 의한 산소 유리기로부터의 손상이 억제되어 청색으로 염색된 신경세포 돌기가 관찰되었으나 (Fig. 6A), U-78517F 전처리를 하지 않은 경우에는 무염색성 세포체 및 세포질 돌기의 현저한 소실이 관찰되었다 (Fig. 6B).

고 찰

간질발작 및 간질 중첩 발작후 특징적으로 발생하는 해마 신경원세포의 선택적인 소실은 흥분독성에 의해 초래되는 것으로 알려져 있다 (Sloviter, 1985; Olney, 1985). 해마에 선택적인 병변을 일으키는 원인은 특정 glutamate 수용체의 밀도가 상대적으로 높다거나, calbindin D28, parvalbumin, calretinin과 같은 특이한 calcium 완충 단백질 존재하기 때문이라고 하며 (Sloviter, 1989; sloviter 등, 1991; Freund 등, 1992), 또한 신경세포의 상호연결 정도와 직접적인 neurotrophin 또는 세포외액의 이온 및 신경전달물질 함량과 같은 주변 환경도 중요한 역할을 한다고 한다 (Kapur와 Lothman, 1990). 특히 GluR2 subunit가 결여된 NMDA 수용체 및 AMPA 수용체가 과도한 Ca⁺⁺의 유입을 초래함으로써 세포손상을 일으키는 것으로 미루어 일반적으로 해마 CA1야의 주체세포내에 NMDA 수용체 및 AMP 수용체가 매우 높은 밀도로 존재함으로써 해마가 특히 간질 중첩 발작이나 일과성 대뇌 허혈중에 취약함을

보이는 것으로 생각된다.

흥분독성에 의한 불가역적인 신경원세포의 손상이 있어서 glutamate 수용체의 활성화와 관련된 가장 중요한 인자는 세포질내 Ca⁺⁺의 증가이다 (Choi, 1992; Meldrum과 Garthwaite, 1990; Meldrum, 1993). Ca⁺⁺은 서로 다른 많은 Ca⁺⁺ 의존성 효소들인 proteases, protein kinase C, calmodulin-dependent kinases, phospholipase A₂, nitric oxide synthetase 및 endonuclease 등을 활성화시켜 이렇게 활성화된 많은 효소들이 구조 단백질에 직접적인 영향을 미치기도 하고 효소, 수용체 또는 ion channel의 기능을 변화시키기도 하며 lipoygenase나 cyclo-oxygenase가 관련된 arachidonic acid cascade 및 peroxynitrite를 통한 nitric oxide cascade 등에 의해 유독한 자유 유리기 (toxic free radical)를 생성하기도 한다. 따라서 수용체의 활성화에서 시작하여 불가역적인 세포 손상에 이르는 이들 각 경로를 차단함으로써 세포 손상을 미연에 방지하고자 하는 치료방법이 연구되고 있다 (Choi, 1992; Dawson 등, 1991).

산소는 호기성 생명체의 생존에 기본적인 요소이지만 또한 해로운 산소 유리기를 형성하는 전구물질이기도 하다 (Pacifi와 Daries, 1991; Freeman과 Crapo, 1982; Halliwell과 Chance, 1973). 산소 유리기란 외핵의 전자를 가지고 있는 oxygen-centered radical로서 superoxide anion (O₂⁻), hydroxyl radical (OH[•]), hydrogen peroxide (H₂O₂) 등이 이에 속한다. 이러한 산소 유리기는 Parkinson씨 병 (Barbeau, 1984; Kalra 등, 1992), Alzheimer씨 병 (Richardson 등, 1990), 중추신경계의 허혈 및 부종 (Demopoulos 등, 1982; Chan 등, 1984), 노화현상 (Evans 등, 1993; Choi, 1988), 간질 (Armstead 등, 1989; Bazan 등, 1986; Siesjo 등, 1982; Michaels와 Rothman, 1990), 정신분열증 (Domenico 등, 1990) 등 다양한 퇴행성 신경질환과 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 이같은 사실은 많은 신경계 질환들이 신경원세포의 흥분과 산화과정의 두가지 작용이 서로 관련되어 있음을 시사하는 데, 이는 glutamate 독성이 cystine 운송체계의 억제로 인한 oxygen radical의 과도한 생성에 의해 유발된다거나 (Choi, 1992) 허혈후 해마조직내 lipid peroxidation의 증가가 NMDA 수용체의 활

성과 관련이 있다는 사실(Chan 등, 1984)에서도 뒷받침된다.

본 실험결과 100 μ M glutamate에 10분간 노출된 태아 해마 신경세포군은 그 수에 있어서 노출전의 50% 수준으로 감소하였으며 이러한 glutamate 독성은 NMDA 수용체의 길항제인 MK-801에 의해 억제되었다. 이같은 결과는 glutamate의 신경독성이 NMDA 수용체와 Ca⁺⁺ channel의 연계 작용에 의한 것임을 시사한다(Choi, 1988; Michaels와 Rothman, 1990). 그러나 2-methylaminochroman U-78517F는 glutamate 신경독성을 억제하지 못하는 것으로 나타났다.

Methylprednisolone이 대뇌 및 척수 손상에 대해 항산화 효과(antioxidant effect)를 나타내기 위해서는 고용량(30mg/kg)을 정주해야 한다거나 그 효과가 복잡한 양극성의 용량의존적인 경향을 보이는 등의 비전형적 약물학적 특성을 보여주는데 이같은 사실은 methylprednisolone의 신경보호 효과가 glucocorticoid receptor의 작용으로 인한 것이 아님을 시사한다. 21-aminosteroids(lazaroid)는 methyl prednisolone의 nonglucocorticoid계 스테로이드의 제 1세대 복합체로서 흔히 U-74006F와 U-74500F 두 가지가 알려져 있다. U-74500F는 철분의 촉매 작용에 의한 지방 과산화 과정에 있어서 U-74006F보다 훨씬 더 강력한 억제작용을 보이지만 화학적으로 불안정하고 배설이 빠르기 때문에 실험적인 용도나 약물로서의 사용이 어렵다. 최근에는 비스테로이드계 lazaroid 복합체의 제 2세대이며 lipid peroxidation에 대해 강력한 억제작용을 지닌 2-methylaminochroman이 개발되었다. 이 복합체 중의 하나인 U-78517F는 α -tocopherol의 antioxidant ring과 21-aminosteroid의 amine기를 결합시켜 합성한 것으로 oxygen radical에 의한 세포손상을 강력히 억제한다. 또한 iron에 의한 blood-brain barrier의 손상을 억제하며 동물실험에서 허혈후에 발생하는 퍼질 신경원세포의 피사를 감소시키는 것으로 밝혀졌다(Hall 등, 1991).

본 실험에서 100 μ M HX와 20mU/ml XO에 4시간 동안 노출된 해마 신경세포의 수가 부어전의 50% 정도로 감소하였는데 이같은 현상은 2 μ M에서 16 μ M까지 U-78517F를 전처치함으로써 억제할 수 있었다. 위상차 현미경, 신경세포 사 단백질에 대한 면

역세포화학 염색법, 그리고 MTT 염색법 등을 통해 관찰한 세포학적인 변화는 실험군의 생존세포의 핵 분출과 높은 연관성을 보였다. 그러나 glutamate 독성과 자유 산소 유리기에 의한 세포학적 변화 간에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

Glutamate 등에 의해 NMDA 수용체가 활성화 되면 원형질막을 사이에 둔 calcium 농도구배의 파괴나 세포내 사립체 및 내형질망에 위치되어 있던 calcium이 방출되어 세포질내 free calcium이 증가한다. 이렇게 해서 증가된 calcium은 phospholipase A2를 자극하여 결국 arachidonic acid cascade를 통해 arachidonic acid의 방출을 유도한다. Arachidonic acid는 cyclooxygenase나 lipooxygenase와 같이 대사과정에서 산소분자를 직접적으로 이용하는 효소에 의해 prostaglandin, leukotrienes, thromboxanes 등으로 전환되면서 상당량의 산소 유리기를 생성한다. 위와 같은 과정을 통해 흥분독성이 일어날 때 산소 유리기의 과도한 생성을 촉진시키는 것으로 생각된다. Phospholipase A2에 의한 산화작용은 또한 GABA receptor gated channel의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있다. Calcium 역시 다형태성 백혈구의 호흡작용을 활성화시켜 superoxide anion을 생성하거나 세포외로의 유출을 초래할 수 있으며 xanthine dehydrogenase가 xanthine oxidase로 전환되는 과정을 활성화 시킨다. 이러한 사실들로 미루어 흥분독성과 함께 자유 산소 유리기에 의한 손상이 일어남을 알 수 있다.

반면에 자유산소 유리기가 glutamate나 aspartate와 같은 흥분독성 아미노산의 방출을 촉진시킨다는 보고도 있다(Domenico 등, 1990). 실제로 자유 산소 유리기의 생성을 유도하는 xanthine과 xanthine oxidase와 같은 효소나 arachidonic acid 및 prostaglandin과 같은 물질을 해마 조직 절편과 함께 배양했을 때 배양액내의 흥분독성 아미노산 농도가 의외로 증가하였다. 또한 mannitol과 같은 radical scavenger나 indomethacin, corticosteroid 등 자유 산소 유리기의 형성을 억제하는 약물과 함께 배양한 경우에는 흥분독성 아미노산 농도가 의외로 감소하였다.

이렇듯 간질 발작에 의한 해마의 손상은 흥분과정과 산화과정이 긴밀하게 연관되어 초래되지만 본 실험

험 결과 U-78517F의 신경원세포보호 작용은 그 중 oxidative process 즉 oxygen radical injury에 제한되어 있었다. 이는 해마 신경원세포에 생화학적 손상이나 형태학적 손상을 일으키는 다른 과정들이 존재하며 상호간에 양방향적인 협조작용을 하고 있음을 시사한다. 따라서 간질발작에 의한 해마 신경원세포의 손상을 감소시키기 위해서는 glutamate 길항제와 항산화제를 병용하는 치료방법이 연구되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

본 실험은 인태아 해마 신경원세포를 배양하여 흥분독성 및 산소 유리기에 의한 신경원세포 손상의 실험적 모델을 만들고, 또한 비스테로이드성 lazaroid 복합체의 제 2세대 약물인 2-methylaminochroman U-78517F가 이들의 손상에 미치는 영향을 알아보기 위해 시도되었다.

신경원세포의 손상 정도는 광학 현미경적 관찰과 MTT법을 측정하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 배양세포에 각각 100, 200, 500 μ M의 glutamate를 노출시킨 군(p<0.01)과 100 μ M hypoxanthine에 10 내지 20mU xanthine oxidase를 혼합하여 노출시킨 군에서는 용량의존적인 신경원세포 손상이 관찰되었다(p<0.01).

2. Glutamate 부위에 의한 신경원세포 손상은 20 μ M의 MK-801을 전처치함으로써 완전히 억제되었으나 U-78517F의 전처치에 의해서는 억제되지 않았다.

3. 산소 유리기에 의한 신경원세포의 손상은 2 내지 16 μ M의 U-78517F를 전처치함으로써 억제되었다(p<0.01).

4. 위상차 현미경, 신경세포 단백질에 대한 면역세포화학적 염색 및 MTT 염색을 이용한 세포병리학적 관찰 결과 세포화학적 변화가 각 실험군의 신경원세포 손상 정도와 부합된 소견을 보였다. 그러나 흥분독성과 산소 유리기에 의한 손상군 간의 유의한 세포화학적 차이는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로써 인태아 해마 신경원세포 배양을 이용한 실험적 모델은 흥분독성과 산소 유리기에 의한 세포손상 정도의 정량적 측정을 가능하게 하였고, 본 실험에서 U-78517F는 단지 산소 유리기에

의한 신경원세포 손상에 대해서만 보존능을 나타낼 수 있었다.

REFERENCES

- Armstead WM, Mirro R, Leffler CW, Busy DW(1989) : Cerebral superoxide anion generation during seizures in newborn pigs. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:175-179.
- Babb TL, Brown WJ(1987) : Pathological findings in epilepsy. In: Engel J Jr, ed. *Surgical treatment of the epilepsies*. New York, Raven Press pp.511-540.
- Barbeau A(1984) : Etiology of parkinson's disease: A research strategy. *Can J Neuron Sci* 11:24-28.
- Bazan NG, Birkle DL, Tang W, Reddy TS (1986) : The accumulation of free arachidonic acid, diacylglycerols, prostaglandins, and lipoxygenase reaction products in the brain during experimental epilepsy. In: Antonio VD-E, Arthur AW, Dixon MW, Roger JP, eds. *Advances in neurology*, vol 44, New York, Raven Press, pp.879-902.
- Chan PK, Schmidley JW, Fishman RA, et al(1984) : Brain injury edema and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology* 34:315-320.
- Choi DW(1992) : Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.
- Choi DW(1988) : Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
- Corsellis JAN, Meldrum BS(1976) : The pathology of epilepsy. In: Blackwood W, Corsellis JAN, eds. *Greenfields Neuropathology*, London:Arnold, pp.771-795.
- Dawson VL, Dawson TM, London Ed, Brett DS, Snyder SH(1991) : Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6368-6371.

- DeGiorgio CM, Tomiyasu U, Gott PS, Treiman DM(1992) : *Hippocampal pyramidal cell loss in human status epilepticus. Epilepsia* 33:23-27.
- Demopoulos HB, Flamm E, Selligman M(1982) : *Oxygen free radicals in the central nervous system in ischemia and trauma. In: Autor AP, ed. Pathology of Oxygen. New York, Academic Press, pp.127-155.*
- Domenico EP-G, Giovanna C, Marina A et al(1990) : *Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J Neurosci* 10(3):1035-1041.
- Duchowny M, Levin B, Jayakar P, Resnick T, Alvarez L, Morrison G, Dean P(1992) : *Temporal lobectomy in early childhood. Epilepsia* 33:298-303.
- Evans M, Griffiths T, Meldrum BS(1993) : *Early changes in the rat hippocampus following seizures induced by bicuculline or L-allylglycine. A light and electron microscope study. Neuropathol Appl Neurobiol* 9:39-52.
- Folbergrova J, Ingvar M, Siesjö BK(1981) : *Metabolic changes in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum during sustained bicuculline-induced seizures. J Neurochem* 37:1228-1238.
- Forno LS, Langston JW, Delaney LE(1986) : *Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusion in MPTP-treated monkeys. Ann Neurol* 20(4):449-454.
- Freeman B, Crapo JD(1982) : *Biology of disease: Free radicals and tissue injury. Lab. Invest* 47:412-426.
- Freund TF, Yinen A, Miettinen R, Pitkanen A, Lahtinen H, Baimbridge KG, Riekkinen PJ(1992) : *Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. Brain Res* 28:27-38.
- Hall ED, Braugher M, Yonkers PA, Smith SL, Linseman KL, Means ED, Scherch HE, Voigtlander PPV, Lahti RA, Jacobsen EJ (1991) : *U-78517F: A potent inhibitor of lipid peroxidation with activity in experimental brain injury and ischemia. J Pharma Exp Ther* 6:688-694.
- Halliwell B, Chance B(1973) : *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and the effect of hyperbaric oxygen. Biochem J* 134:707-716.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H(1981) : *Use of avidin-biotin peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures. J Histochem Cytochem*, 29:577-580.
- Kalra J, Rajput AH, Mantha SV, Chaudhary AK, Prasad K(1992) : *Oxygen free radical producing activity of polymorphonuclear leukocytes in patients with Parkinson's disease. Mol Cell Biochem*, 112:181-186.
- Kapur J, Lothman EW(1990) : *NMDA receptor activation mediates the loss of GABAergic inhibition induced by recurrent seizures. Epilepsy Res*, 5:103-111.
- Kikuchi S, Kim SU(1993) : *Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in culture. J Neuroscience Research*, 36:558-569.
- Meldrum B, Garthwaite J(1990) : *Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends Pharmacol. Sci* 11:379-387.
- Meldrum BS, Nilsson B(1976) : *Cerebral blood flow and metabolic rate early and late in prolonged epileptic seizures induced in rats by bicuculline. Brain*, 99:523-542.
- Meldrum BS(1993) : *Amino acids as dietary excitotoxins: A contribution to understanding neurodegenerative disorders. Brain Res Rev*,

- Meldrum BS(1986) : *Cell damage in epilepsy and the role of calcium in cytotoxicity. In: Delgado-Escueta AV, Ward AA, Woodbury DM, Porter RJ, eds. Advances in Neurology, vol 44, New York, Raven Press, pp. 849-855.*
- Meldrum BS(1993) : *Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. Brain Path, 3:405-412.*
- Michaels RL, Rothman SM(1990) : *Glutamate neurotoxicity in vitro: Antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. J Neurosci, 10:283-292.*
- Mosmann T(1983) : *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Method, 65:55-63.*
- Olney JW(1985) : *Excitatory transmitters and epilepsy-related brain damage. Int Rev Neuro-biol, 27:337-362.*
- Pacifici RE, Daries KJA(1991) : *Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: The free-radical theory of aging revisited. Gerontology, 37:166-180.*
- Plum F, Howse DC, Duffy TE(1974) : *Metabolic effects of seizures. In: Plum F, ed. Brain dysfunction in metabolic disorder. Res Publ Assoc Nerve Ment Dis, New York, Raven Press, vol 53, pp. 141-157.*
- Richardson JS, Subbarao KV(1990a) : *Biochemical indices of peroxidation in alzheimer's and control brain. Transactions of the american society for neurochemistry, 21:113.*
- Schwarzc R, Meldrum BS(1986) : *Excitatory aminoacid antagonists provide a therapeutic approach to neurological disorders. Lancet 2:140-143.*
- Siesjo BK, Ingvar M, Westerberg E(1982) : *The influence of bicuculline induced seizures on free fatty acid concentrations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. J Neurochem, 39:796-802.*
- Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD(1991) : *Calcium-binding protein(calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. J Camp Neurol, 308(3):381-396.*
- Sloviter RS(1989) : *Calcium-binding protein (Calbindin-D^{28k} and parvalbumin immunocytochemistry: Localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. J Comp Neurol, 280:183-196.*
- Sloviter RS(1985) : *On the role of seizure activity and endogenous excitatory aminoacids in mediating seizure-associated hippocampal damage. In: Schwarcz R, Ben-Ari Y, eds. Excitatory aminoacids and epilepsy. New York, Plenum, pp. 659-671.*
- Sommer W(1990) : *Erkrankung des ammonshornes als aetiologisches moment der epilepsie. Arch Psychiat Nerven Krankh, 10:631-675.*
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J(1987) : *Guan amyotrophic lateral sclerosis-Parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. Science, 237:517-522.*
- Takadera T, Shimada Y, Mohri T(1992) : *Extracellular pH modulates N-methyl-D-aspartate mediated neurotoxicity and calcium accumulation in rat cortical cultures. Brain Res, 572:126-131.*
- Wolf HK, Campos MG, Zentner J, Hufnagel A, Schramm J, Elger C, Wiestler OD(1993) : *Surgical pathology of temporal lobe epilepsy experience with 216 cases. J Neuropathology & Experimental Neurology, 52(5):499-506.*