

흰쥐 태아 중뇌 배양세포에서 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine의 독성: 2',7'-Dichlorofluorescin diacetate를 이용한 연구

김율아 · 조용준 · 송동근 · 김용식* · 김영희

한림대학교 의과대학 약리학교실
*서울대학교 의과대학 약리학교실

1-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE TOXICITY IN DISSOCIATED CULTURES FROM FETAL RAT MESENCEPHALON: A STUDY USING 2',7'-DICHLOROFLUORESCIN DIACETATE

Yul-A Kim, Yong-Jun Cho, Dong-Keun Song,
Yong-Sik Kim* and Yung-Hi Kim

Department of Pharmacology, Hallym University, Chunchon, 200-702,
*Department of Pharmacology, Seoul National University, Seoul, 110-799

(Received July 5, 1993)
(Accepted August 14, 1993)

ABSTRACT: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is a well-known dopamine neuron-specific toxin. But the involvement of oxidative damage in the pathogenesis of MPTP-induced parkinsonism is still uncertain. In this study, by using 2',7'-dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA) that detects intracellular oxidative processes, the effect of MPTP on dichlorofluorescein fluorescence in dissociated cells from fetal rat mesencephalon in culture was investigated. At 7th day in culture, cells were loaded with DCFH-DA, and exposed to 1 mM MPTP or MPP⁺. MPTP induced dichlorofluorescein-fluorescence which was peaked at 3 min and mostly faded away 30 min after MPTP treatment. One and half hour after MPTP exposure, swelling of cell bodies and marked loss of neurites were noted. However, MPP⁺-induced dichlorofluorescein-fluorescence and cytotoxicity were much less marked. MPTP-induced dichlorofluorescein fluorescence and cytotoxicity were effectively reduced by the pretreatment of cells with pargyline, a monoamine oxidase inhibitor. From these results, it is concluded that MPTP and MPP induced an inc-

rease in reactive oxygen and this MPTP-induced response was resulted largely from the process of oxidation of MPTP by a monoamine oxidase.

Key Words: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), 2',7'-Dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA), Fetal rat mesencephalon, Culture.

서 론

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)는 흑질(substantia nigra)의 dopamine 신경세포를 선택적으로 파괴함으로써 실험적으로 Parkinson병의 유용한 모델을 유발시켜 왔다(Burns *et al.*, 1983; Hallman *et al.*, 1984; Heikkila *et al.*, 1984a; Langston *et al.*, 1984a). Monoamine oxidase B의 억제제인 deprenyl을 전처치한 동물에서는 MPTP의 신경독성이 나타나지 않았으므로 MPTP는 체내에서 monoamine oxidase B에 의하여 중간산물인 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium ion(MPDP⁺)으로 대사되고, 결국 최종 대사산물인 1-methyl-4-phenylpyridinium ion(MPP⁺)이 주로 신경독성을 나타낼 것이라고 보고되고 있다(Chiba *et al.*, 1984; Heikkila *et al.*, 1984b; Langston *et al.*, 1984b).

MPTP의 세포독성 기전으로는 MPP⁺가 mitochondria의 전자전달계를 억제하여 adenosine triphosphate(ATP) 생성을 감소시킨다는 것이 가장 유력시 되고있으나(Nicklas *et al.*, 1985; Ramsey *et al.*, 1986; Vyas *et al.*, 1986), 많은 독성물질들의 작용기전으로서 알려져 있는 반응성 산소 대사물의 생성(Trush *et al.*, 1982)이 MPTP의 세포독성에 어느 정도 관여하는지에 대하여는 아직 확실하지 않다. 산소 대사물이 MPTP의 세포독성에 관여할 가능성을 시사하는 증거들로서는 銅을 chelate하여 superoxide dismutase를 억제하는 dithiocarbamate를 생쥐에 전처치하면 MPTP의 신경독성이 증가하였고(Corsini *et al.*, 1985), MPTP 및 MPP⁺에 의한 glutathione의 소실과 산화형 glutathione의 증가(Johannessen *et al.*, 1986)가 보고된 바 있다. 또한 MPTP가 monoamine oxidase에 의하여 대사되는 과정에서 과산화수소(H₂O₂)와 MPDP⁺가 생성되었으며(Castagnoli *et al.*, 1985; Lewin, 1984), MPTP가 mitochondria와 함께 반응하거나, MPDP⁺와 MPP⁺를 혼합하여 반응하여도 라디칼이 생성되었다(Rossett *et al.*, 1988).

한편, 2',7'-dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA)가 최근 개발되어 살아있는 세포내에서 반응성 산소 대사물의 생성 반응을 측정하는데 매우 유용하게 사용되고 있다(Lebel *et al.*, 1990). DCFH-DA는 안정한 비 형광성 물질로서 세포막을 잘 통과하며 세포내 esterase에 의하여 2',7'-dichlorofluorescin(DCFH)으로 된다(Bass *et al.*, 1983). 비 형광성 물질인 DCFH는 반응성 산소 대사물의 존재 하에서 형광성이 큰 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)으로 신속히 산화된다. MPTP에 의하여 반응성 산소 대사물이 생성되는지에 대하여 DCFH-DA를 이용한 보고는 현재까지 없는 실정이다.

따라서 본 실험에서는 dopamine 신경세포가 밀집되어있는 흰쥐 태아 중뇌 배양세포에서 MPTP에 의하여 반응성 산소 대사물의 생성 여부를 DCFH-DA를 이용하여 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

동일 조건하에서 사육한 생후 16주 이상된 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 임신 14.5~15일 후에 흰쥐의 자궁을 적출하여 배양액(Dulbacco's modified Eagle, DMEM)에 옮긴 후

무균상자 안에서 태아를 분리하여 입체 해부현미경 하에서 수술용 메스(No. 10)를 사용하여 중뇌 부위를 잘라내었다.

시약

DMEM과 소 태아혈청(fetal bovine serum)은 Gibco 제품을 사용하였고, Poly-L-lysine hydrobromide(mol. wt>300,000), pargyline, MPP⁺, MPTP, 그리고 tert-butyl hydroperoxide 등은 Sigma 제품을, DCFH-DA는 Eastman-Kodak 제품을 사용하였으며, 기타 모든 시약은 특급 시약을 사용하였다.

뇌세포의 분리

10~15마리의 태아 중뇌를 얻어 뇌막을 완전히 제거한 후 배부(dorsal part; 중뇌의 약 1/3)를 제외한 나머지 부분을 gentamicin(20 µg/ml)을 함유한 DMEM로 세척하여 혈액을 제거하였다. 이어서 기계적인 조작으로 각각의 세포로 분리시키고, DMEM에 부유시켜 멸균된 15 ml 원심관(Corning)에 옮겨 500~1000 rpm으로 2분간 원심분리 하였다. 상등액을 버리고 새 DMEM 10 ml로 다시 세포를 부유시키고 원심후에 상등액을 제거하였다. 세포를 소 태아 혈청(10%)이 함유된 DMEM로 다시 부유시켜 사용하였다.

세포배양

35 ml 배양접시를 poly-L-lysine(10 µg/ml)으로 도포하고 실온에서 30 분 간 정치시킨 후, 잔여 poly-lysine을 제거하고 무균 증류수로 2회 세척한 다음 각 배양접시 당 중뇌 부유액을 1 ml씩(1 마리의 태/배양접시) 담아 5% CO₂ 및 포화 습도 하의 항온기(37°C)에서 배양하였다. 배양된 세포는 Zeiss Axiovert 35형 역상 위상차현미경으로 관찰하였다. 일정기간 배양한 다음 배양액을 제거하고 HBSS로 세척한 후, 실험에 사용하였다.

Dichlorofluorescin 염색

배양세포에 DCFH-DA(10 µM)를 혈청이 없는 HBSS에서 1시간 부하시킨 후, 5분 간격으로 3회 씻어내고 세포의 상태를 확인하고 각각의 처리군에 해당 약물(0.38 mM t-butyl hydroperoxide, 100 µM pargyline)을 첨가하였다. 15분 후, 1 mM MPP⁺ 또는 1 mM MPTP를 넣어 Zeiss Axiovert 35형 역상 현미경을 이용하여 형광(50W xenon lamp; excitation wavelength 450~490 nm, emission wavelength 520 nm)을 관찰하고, 1시간 30분 후 위상차 현미경으로 관찰하여 약물처리 이전의 세포군과 비교하였다.

결 과

정상군에서의 관찰

정상군에 DCFH-DA를 부하하였을 때, 일부 세포에서 경미한 형광이 관찰되었으며(그림 1A, B), DCFH-DA로 부하한 세포에 t-butyl hydroperoxide를 첨가하였을 때 형광의 정도는 신경 세포 전체에서 현저히 높게 관찰되었다(그림 2A, B).

MPTP와 MPP⁺ 처리 시 형광의 관찰

1 mM MPTP를 처리한 세포의 경우, MPTP 첨가 후 약 3분 정도 경과되었을 때 가장 선명한 형광을 관찰하였으며, 30분 경과시 형광이 대부분 소실되었다. 1시간 30분 경과되었을 때 세포체의 팽대 현상(swelling)과 아울러 신경섬유의 현저한 소실이 위상차 상으로 관찰되었다(그림 3A, B, C).

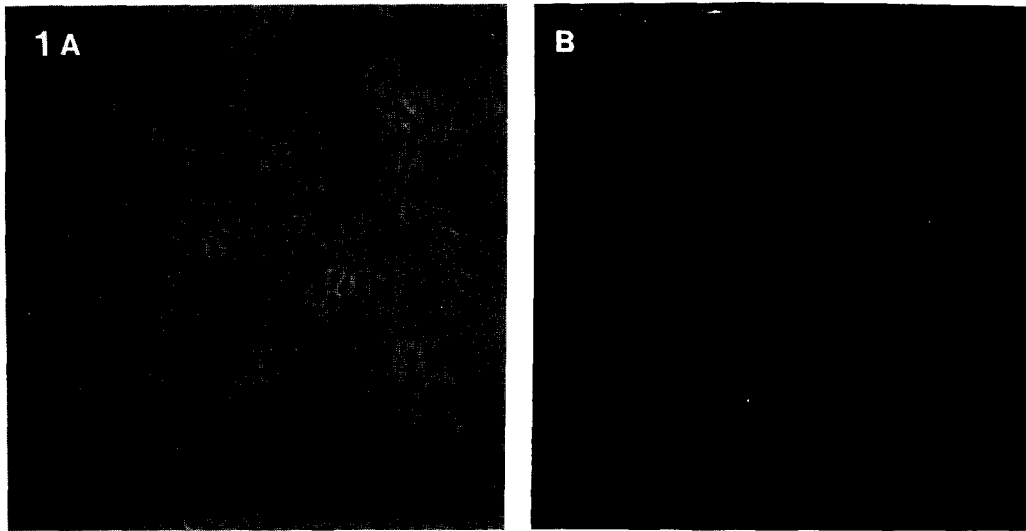


Figure 1. Phase-contrast micrograph (A) and fluorescence micrograph (B) of control (untreated) cells cultured from fetal rat mesencephalon. At 7th day *in vitro*, cells were loaded with DCFH-DA($10\ \mu\text{M}$) for one hour at 37°C .

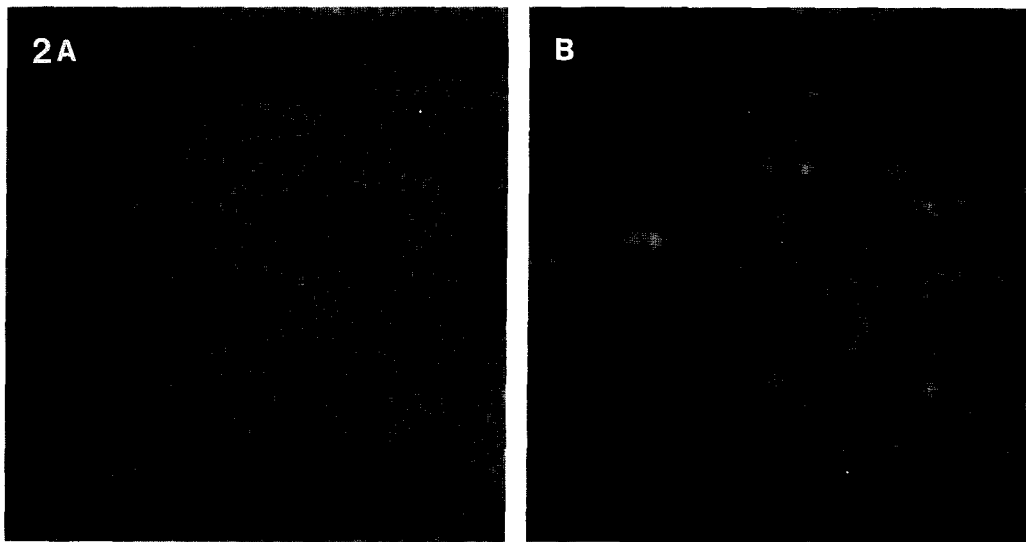


Figure 2. Effect of *t*-butylhydroperoxide on DCF-fluorescence as a positive control. After loading cells with DCFH-DA, $0.38\ \text{mM}$ *t*-butylhydroperoxide was added into the medium. Phase-contrast micrograph (A) and fluorescence micrograph (B) of cells cultured from fetal rat mesencephalon.

$1\ \text{mM}$ MPP^+ 를 처리한 세포의 경우, MPP^+ 첨가 후 약 3분 정도에 가장 선명한 형광을 나타내었으나 MPTP에 비하여 형광의 세기가 약하게 관찰되었으며, 30분 경과시 형광이 대부분 소실되었다. 세포는 1시간 30분 후 매우 경미한 정도의 손상만이 관찰되었다(그림 4A, B, C).

MPTP에 대한 pargyline의 효과

DCFH-DA를 부하시킨 다음 pargyline을 처리하고 이어서 15분 후에 MPTP를 처리하면,

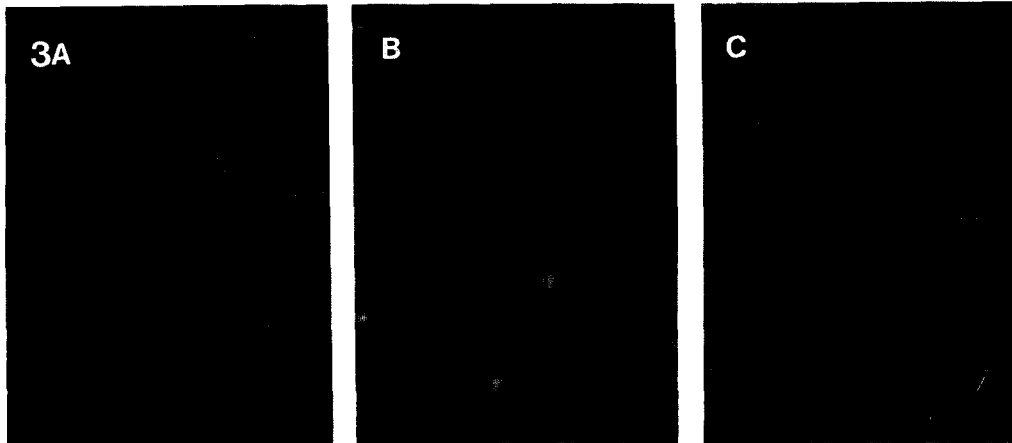


Figure 3. Effect of MPTP on DCF-fluorescence. Phase-contrast micrograph before addition of 1 mM MPTP (A). Five minutes (B: fluorescence micrograph) and one and half hour (C: phase-contrast micrograph) after addition of MPTP.

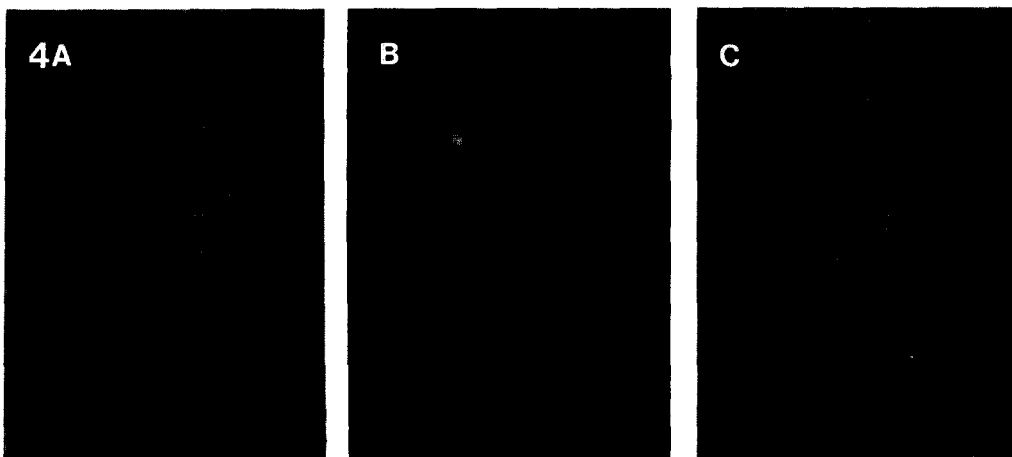


Figure 4. Effect of MPP^+ on DCF-fluorescence. Phase-contrast micrograph before addition of 1 mM MPP^+ (A). Five minutes (B: fluorescence micrograph) and one and half hour (C: phase-contrast micrograph) after addition of MPP^+ .

세포의 형광은 MPTP만 처리한 실험군(그림 3)에 비하여 현저히 감소되었으며, 위상차 현미경으로 관찰한 세포형태 또한 MPTP만 처리한 실험군에 비하여 덜 손상되었다(그림 5A, B, C).

고 찰

MPTP의 세포독성의 기전을 설명하는데 있어서 지금까지 두가지의 중요한 가설로서는 MPTP의 대사산물인 MPP^+ 가 직접 mitochondria의 전자전달계를 억제하여 ATP 생성을 급속히 감소시킨다는 것과, 다른 하나는 반응성 산소 대사물의 생성을 증가시켜 세포 독성을 나타낸다는 것이다(Kopin and Markey, 1988). 그러나 이상의 두 기전은 MPP^+ 가 mitochondria의 전자전달계를 억제함으로써 ATP생성을 억제할 뿐 아니라 정상적인 전자전달도 차단됨

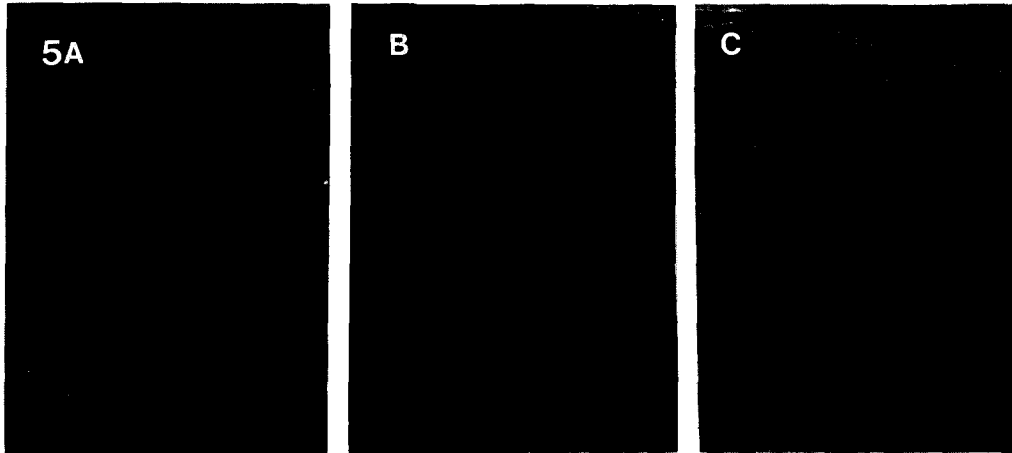


Figure 5. Pretreatment of cells with pargyline prevents MPTP-induced fluorescence and cytotoxicity. Phase-contrast (A) before addition of 1 mM MPTP, and fluorescence(B) and phase-contrast(C) micrographs after addition of 1 mM MPTP. Pargyline(100 μ M) was added into the medium 15 min before addition of MPTP.

으로써 mitochondria로부터 반응성 산소대사물의 생성도 증가시킬 수 있으므로 이들 두 가설은 상호 연관성이 있을 수 있다(Rossett *et al.*, 1988).

본 실험에서는 MPP^+ 및 MPTP에 의하여 DCF 형광이 증가하였고 특히 MPTP에서는 그 형광의 증가 및 세포독성이 현저하였다. MPTP에 의한 DCF 형광 및 세포독성은 pargyline의 전처리로 현저히 감소하였다. 따라서 MPP^+ 는 반응성 산소 대사물의 생성을 촉진하는 것으로 사료된다. Monoamine oxidase의 억제제인 pargyline의 전처리로 MPTP의 형광이 현저히 억제되는 점으로 보아 MPTP에 의하여 생성된 반응성 산소 대사물의 대부분은 MPTP 자체에 의한 것이 아니라 monoamine oxidase에 의한 MPTP의 대사과정에서 생성되는 과산화수소에 의한 것이거나 혹은 monoamine oxidase에 의한 MPTP의 대사물인 $MPDP^+$ 및 MPP^+ 의 작용인 것으로 추론된다. 본 실험에서 MPTP가 MPP^+ 보다 현저한 반응성 산소 대사물의 증가와 아울러 현저한 세포 독성을 보인 점은 MPTP의 독성기전에는 MPP^+ 를 통한 독작용 이외에 반응성 산소대사물의 증가를 통한 독작용이 존재함을 시사한다. 그러나 MPTP가 MPP^+ 보다 지질용해성이 현저히 크기 때문에 세포막을 보다 신속히 통과할 수 있는 점도 간과할 수는 없다고 사료된다(di Monte *et al.*, 1986, 1987).

MPTP에 의한 반응성 산소대사물의 증가가 주로 monoamine oxidase B에 의해 MPTP가 MPP^+ 로 대사되는 주요 부위라고 알려진 신경교세포 뿐만아니라(Chiva *et al.*, 1984) 신경세포에서도 보인 것은 상당 수의 신경세포에서도 MPTP의 활성화가 일어남을 시사하는 증거라고 하겠다.

결 론

흰쥐 태아 중뇌 배양세포에서 DCFH-DA를 이용하여 MPTP 및 MPP^+ 에 의한 반응성 산소 대사물의 생성여부를 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MPTP 및 MPP^+ 는 정상 대조군보다 DCF의 형광을 증가시켰으며, MPTP는 MPP^+ 보다 DCF 형광의 증가와 세포독성이 더 현저하였다.
2. MPTP에 의한 DCF 형광 및 세포독성은 pargyline의 전처리로 현저히 감소하였다.

이상의 결과로 보아 MPTP 및 MPP⁺는 반응성 산소 대사물을 생성하였으며 MPTP에 의하여 생성된 반응성 산소 대사물의 대부분은 MAO에 의한 MPTP의 대사과정에서 유발된 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C. and Thomas, M. (1983): Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation, *J. Immunol.*, **130**, 1910-1917.
- Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobwitz, D.M. and Kopin, I.J. (1983): A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4546-4550.
- Castagnoli, N., Chiba, K. and Trevor, A.J. (1985): Potential bioactivation pathways for the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), *Life. Sci.*, **36**, 2503-2508.
- Chiba, K., Trevor, A. and Castagnoli, N. (1984): Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase, *Biochem. Res. Commun.*, **120**, 574-578.
- Corsini, G.U., Pintus, S., Chiueh, C.C., Weiss, J.F. and Kopin, I.J. (1985): 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) neurotoxicity in mice is enhanced by pretreatment with diethyldithiochromate, *Eur. J. Pharmacol.*, **119**, 127-128.
- di Monte, D., Jewell, S.A., Ekstrom, G., Saandy, M.S. and Smith, T.P. (1986): 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) causes rapid ATP depletion in isolated hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**, 310-315.
- di Monte, D., Ekstrom, G., Shinka, T., Smith, M.T., Trevor, A.J. and Castagnoli, N. (1987): Role of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion formation and accumulation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity to isolated hepatocytes, *Chem-Biol. Interactions*, **62**, 105-116.
- Hallman, H., Olson, L. and Jonsson, G. (1984): Neurotoxicity of meperidine analogue MPTP in brain catecholamine neuron in the mouse, *Eur. J. Pharmacol.*, **97**, 133-136.
- Heikkila, R.E., Cabbot, R.A., Manzino, L. and Duvoisin, R.C. (1984a): Effects of MPTP on nigrostriatal dopamine in mice, *Neuropharmacol.*, **23**, 711-713.
- Heikkila, R.E., Manzino, L., Cabbat, F.S. and Duvoisin, R.C. (1984b): Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors, *Nature.*, **311**, 467-469.
- Johannessen, J.N., Adams, J.D., Schuller, H.M., Bacon, J.P. and Markey, S.P. (1986): 1-Methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) induces oxidative stress in the rodent, *Life. Sci.*, **38**, 743-749.
- Kopin, I.J. and Markey, S.P. (1988): MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease, *Ann. Rev. Neurosci.*, **11**, 81-96.
- Langston, W.J., Forno, L.S., Rebert, C.S. and Irwin, I. (1984a): Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey, *Brain. Res.*, **292**, 390-394.
- Langston, W.J., Irwin, I., Langston, E.B. and Forno, L.S. (1984b): Pargyline prevents

- MPTP-induced parkinsonism in primates, *Science*, **225**, 1480-1482.
- Lebel, C.P., Ali, S.F., McKee, M. and Bondy, S.C. (1990): Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **104**, 17-24.
- Lewin, R. (1984): Trail of ironies to parkinson's disease, *Science.*, **224**, 1083-1085.
- Niklas, W.J., Vyas, I. and Heikkila, R.E. (1985): Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetra-hydropyridine, *Life Sci.*, **36**, 2503-2508.
- Ramsey, R.R., Salach, J.I. and Singer, T.P. (1986): Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine(MPP⁺) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD⁺-linked substrates by MPP⁺, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 743-748.
- Rossett, Z.L., Sotgiu, A., Sharp, D.E., Hajiconstantinou, M. and Neff, N.H. (1988): 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) and free radicals *in vitro*, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 4573-4574.
- Trush, M.A., Mimnaugh, E.G. and Gram, T.E. (1982): Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3335-3346.
- Vyas, I., Heikkila, R.E. and Nicklas, W.J. (1986): Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenyl-pyridinium, *J. Neurochem.*, **46**, 1501-1507.