

MPTP와 대사물인 MPP⁺의 도파민 신경세포에 대한 독성효과에 관한 연구

서울대학교 의과대학 약리학교실

김용식 · 박찬웅 · 윤영란 · 윤용하

= Abstract =

Studies on the Dopaminergic Neuronal Toxicity of MPTP and its Pyridium Metabolite, MPP⁺

Yong Sik Kim, Chan Woong Park, Young Ran Yoon and Yong Ha Yoon

College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

Dissociated cell cultures from rat embryonic ventral mesencephalon were used to evaluate the mechanisms of MPP⁺ neurotoxicity. The cells were treated with MPTP or MPP⁺ and the viability of the cells was assessed biochemically; tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity, protein, intracellular ATP and lactate content and lipid peroxidation. Also the generation of the intracellular oxidants was measured after loading 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate to the cells.

When cultures were exposed to 0.1 mM MPP⁺, at 2 hour incubation lactate was significantly accumulated in the cells and then the intracellular ATP content and TH immunoreactivity were decreased dose- and time-dependently. But, malondialdehyde as an index for lipid peroxidation was not changed even though the generation of the intracellular oxidants was stimulated by the addition of MPP⁺.

On the other hand, 1 mM MPTP significantly reduced the TH immunoreactivity at 24 hour exposure without any change in the intracellular ATP, lactate and MDA content until 6 hour exposure. And also MPTP inhibited the generation of the intracellular oxidants from control cells and MPP⁺ exposed cells.

These results indicate that cytotoxicity of MPP⁺ is mediated by inhibiting the mitochondrial energy metabolism rather than generating the intracellular oxidants. And MPTP would have direct action in addition to converting to the toxic metabolite, MPP⁺ to exert the toxicity on the dopaminergic neurons.

Key Words: Parkinson씨 병, MPTP, 도파민 신경세포

서 론

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

*이 논문은 1990년 교육부 기초의학 학술연구 조성비와 1993년도 서울대학교 병원 임상연구비의 지원으로 이루어 졌음.

(MPTP)는 meperidine 유도체의 마약인 1-methyl-4-phenyl-4-propinoxy-piperidine의 합성과정에서 부산물로 생성되는 화합물로서, 최근 사람과 원숭이 및 생쥐에게 장기간 투여되면 흑질(substantia nigra)이 선택적으로 손상을 받게되고 뇌조직내 dopamine 및 dopamine의 주 대사물인 dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid가 현

저하게 감소되므로 Parkinson씨 병과 유사한 증세를 유발함이 보고되면서 부터 이 화합물을 사용하여 실험적으로 Parkinson씨 병을 유발시켜 이 질병에 대한 연구에 유용하게 이용되고 있으며 아울러 MPTP의 신경독성에 대한 연구가 다방면으로 진행되고 있다(Bannon 등, 1984; Heikkila 등, 1985; Jarvis와 Wagner, 1985; Snyder와 D'Amato, 1986).

MPTP에 의한 dopaminergic neuron의 손상기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 지금까지의 연구결과를 크게 분류해 보면 하나는 뇌 mitochondria에서의 NADH와 관련된 산화반응과 NADH dehydrogenase 활성도가 MPP⁺ 뿐만 아니라 MPTP에 의해서 억제되어 그 결과 세포내 ATP 결핍을 초래하게 되므로 독성을 나타낸다는 보고(Nicklas 등, 1985; Ramsay 등, 1986)가 있으며, 다른 하나는 MPTP 또는 MPTP의 대사물이 반응성이 높은 electrophilic intermediate로 생체의 각종 중요한 거대분자와 작용을 갖게되거나(Corsini 등, 1986) 또는 생체내에서 반응성 산소대사물의 생성을 초래하여 세포내 지질을 포함한 중요 거대분자에 손상을 주게됨으로(Demopolous 등, 1980; Trush 등, 1982) MPTP의 독성을 나타낸다는 것이다.

그러나 최근의 연구성적에서 MPTP는 생체내에서 지질과산화 반응을 초래하지 못하고(Corongiu 등, 1987), 쥐 간세포를 이용하여 MPP⁺의 세포독성을 검토한 결과 MPP⁺가 간세포 손상 및 세포내 glutathione 농도의 감소 그리고 지질과산화 반응을 촉진시키나, 항산화제인 N,N-diphenyl-1-phenylenediamine(DPPD)와 iron chelator인 desferroxamine에 의해 세포독성이 감소되지 못하고(Monte 등, 1986), MPTP도 쥐 간세포에 대해 직접 세포독성효과를 보이나 이들 MPP⁺ 및 MPTP에 의한 세포독성은 반응성 산소대사물을 매개한다기 보다는 MPTP가 MPP⁺로 대사되어 mitochondria에 결합된 후 전자전달계를 억제함으로써 세포내 ATP 생성을 급격히 감소시켜 체내 중요한 대사과정의 에너지를 줄임으로써 나타나는

현상이라고 주장하고 있다(Smith 등, 1987).

지금까지의 많은 연구가 실험동물에 직접 MPTP 또는 MPP⁺를 투여하거나 세포와 조직을 이용하여 얻어진 결과로 이들 독물이 생체내에서 대사되고 분포되는 양상에 따라 세포 독성이 영향을 받는 등 아직도 MPTP의 선택적인 세포독성의 기전을 제대로 설명할 수 없는 상태이며 수년전부터 신경세포 배양이 실험에 사용되면서 뇌의 특정 부위를 취하여 특정세포의 신경배양이 가능해짐에 따라 dopamine 신경세포를 직접 배양하여 특정 신경세포에 대한 MPTP 또는 MPP⁺의 독성효과 및 기전을 활발히 검토하고 있다(Michel 등, 1988; Mytilineous와 Cohen, 1984; Sanchez-Ramos 등, 1986). 그러므로 본 연구에서도 dopamine 신경세포를 함유한 MPTP 및 MPP⁺의 독성기전을 알아보고자 특정 뇌부위를 배양하여, 대사나 분포에 영향을 받지 않고 직접 신경세포에 대한 독성을 관찰함으로써, 독성기전을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1) 실험재료

(1) 실험동물: 일반적으로 흰쥐(rat)는 다른 동물에 비해 생체내 MPTP 투여에 의한 dopamine 신경세포의 손상이 잘 일어나지 않으나(Chiuch 등, 1984), 이러한 결과는 여러 개체간의 MPTP 대사정도 및 분포 양상의 차이에 의한 현상이며(Johannessen 등, 1986; Kalaria 등, 1987) 흰쥐 태아의 mesencephalon으로 부터 배양된 dopamine 신경세포는 MPP⁺에 의해 선택적으로 파괴된다는 보고가 있는 바(Mytilineou와 Cohen, 1984; Mytilineous 등, 1985; Sanchez-Ramos 등, 1986) 본 연구에서도 흰쥐를 사용하여 태아로부터 신경세포배양을 시행하였다.

(2) 시약 및 재료: 실험에 사용한 DMEM/F12, poly-l-lysine, antimyotic-antibiotics, diamino-benzidine, LDH, NAD⁺, NADH 등은 Sigma 제품이었고 fetal bovine serum은 Hyclone, BCA pro-

tein reagent는 Pierce, 2',7' dichlorofluorescein diacetate(DCFDA)는 Eastman-Kodak, luciferin, luciferase는 Boehringer Mannheim 제품이었고 배양용기는 Falcon 제품을 썼다. 기타 시약은 특급시약용이었다.

2) 실험방법

(1) 신경세포배양: 동일 조건에서 사육된 임신 15일 Sprague-Dawley 흰쥐를 경부 탈골시켜 치사시키고 복부를 절제하여 무균 조작하에 태아를 분리하였다. 분리된 태아의 뇌로부터 흑질 (substantia nigra)를 포함한 ventral mesencephalon을 절제하여 Mytilineous and Friedman(1988)의 방법을 변형하여 신경 세포배양을 하였다. 뇌막을 완전히 제거한 뇌조직을 DMEM/F12(1:1) 배양액으로 세척하여 혈액을 제거한 후 소구경의 pasteur pipette을 사용하여 단리세포를 얻은 후 원심관에 옮겨 700 rpm으로 8분간 원심분리한 후 침전된 세포는 배양액으로 다시 부유시켰다. 동일 조작을 2회 반복한 후 10% 우태아 혈청 및 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 ug/ml streptomycin이 함유된 DMEM/F12(1:1) 배양액으로 부유한 후 광학 현미경하에서 세포수를 측정하고 60 mm 세포배양 plate에 6×10^6 세포를, 96 well plate에는 각 well당 6×10^4 세포를 배양하였다. 순수 신경세포의 배양을 위해 혈청을 함유하지 않은 defined media를 사용하였다. 배양시작 18~20시간 후 우태아 혈청대신 20 μ g/ml insulin, 100 μ g/ml transferrin, 30 nM selenium, 20 nM progesterone, 0.1 M putrescin, 1 mM pyruvate, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 ug/ml streptomycin 0.5% glucose가 첨가된 DMEM/F12(1:1) 배양액으로 교환하고 37°C, 5% CO₂, 95% air의 incubator에서 배양하였다. 배양용기는 poly-l-lysine(10 μ g/ml)로 coating하고 증류수로 3번 세척한 뒤 수분을 없앤 후 사용하였다.

(2) MPTP 또는 MPP⁺ 처리: 배양 7일 후 세포를 Hank's balanced salt solution(HBSS)으

로 한 번 세척한 후 HBSS 용액에 일정농도의 MPTP 또는 MPP⁺(0.1-100 uM)를 첨가하고 2, 4, 6, 24시간 동안 반응시킨 후 이들 독성물질에 의한 효과를 검토하였다.

한편 MPTP 또는 MPP⁺의 세포독성효과를 감소시킬 수 있는 물질을 검색하기 위해 산소대사물인 superoxide dismutase(SOD), catalase 그리고 항산화제(Vit. E, glutathione) monoamine oxidase B 억제제인 deprenyl, 그리고 Ca⁺⁺ channel 억제제의 하나인 diltiazem을 배양액에 20분간 전처리한 후 MPTP 및 MPP⁺를 처리하여 동일 실험을 시행하였다.

(3) MPTP 및 MPP⁺에 의한 신경세포 독성 효과 측정: Dopamine 신경세포에 대한 선택적인 세포 손상은 tyrosine hydroxylase(TH) immunocytochemistry 방법 및 면역반응도를 측정하여 알아보았다.

① **TH immunocytochemistry;** Coverslip에 배양된 세포를 MPTP 및 MPP⁺를 처리하고 나서 일정시간 후에 phosphate buffered saline(PBS)로 2번 세척한 후 4% para formaldehyde/PBS 용액으로 30분간 고정시킨 후 PBS로 2번 세척하고 5% sucrose, 5% bovine serum albumin과 0.1% Triton X-100이 함유된 PBS로 1:1000 희석한 rabbit anti-TH 항혈청을 사용하여 4°C에서 밤새 반응시킨 후 PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG(1:100)를 40분내지 1시간 처리한 후 다시 세척 후 avidin-biotin conjugate of peroxidase(Vectastatin)으로 상온에서 30분간 반응시켰다. 염색 반응은 diaminobenzidine과 H₂O₂로 유도하였다. 그 후 광학 현미경하에서 TH 양성세포를 측정 검토하였다.

② **TH 면역반응도 측정;** TH 면역반응도는 dopamine 신경세포의 marker로 사용되는 TH에 대한 면역반응정도를 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader(MR 7000 microplate reader)를 이용하여 측정하였다.

7일 배양된 세포에 MPTP 및 MPP⁺를 처리하고 일정시간 후 96-well plate를 HBSS로 1번 세

적하고 4% paraformaldehyde/PBS로 30분간 고정한 후 다시 3번 세척하고, 2% HS 및 2% BSA, 0.1% Triton-100이 함유된 HBSS 용액으로 비특이적인 반응을 줄이기 위해 blocking을 한 후 1:1500 희석 rabbit anti-TH 항체를 처치하고 4°C에서 밤새 반응시킨다. 반응시킨 후 HBSS로 3번 세척하고 1:1500 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG를 실온에서 40분간 반응시켰다. 그 후 2번 세척하고 50 μ l의 O-phenylenediamine (OPD), H₂O₂가 든 phosphate citrate buffer를 첨가하여 발색반응을 유도하고 40분 후 50 μ l의 2 N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중단시키고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(Wolters 등, 1976). 이때 각 well 간의 차이를 보정하고자 dual wavelength를 이용하였고 reference filter는 630 nm이었다.

한편 MPTP 및 MPP⁺에 의해 dopamine 신경 세포에 선택적인 독성효과 이외에도 비특이적으로 나타날 수 있는 세포독성을 정량화하기 위해서 단백질의 변화를 단백질염색방법으로 측정하였다. TH 면역반응도 측정 후 96 well을 HBSS로 충분히 세척한 후 단백질 염색을 위하여 0.04% Coomassie brilliant Blue-250, 25% ethanol, 12% acetic acid 용액으로 처리하여 1시간 이상 염색을 시키고, 10% ethanol, 5% acetic acid 용액으로 탈염색시킨 다음, 완전히 말린 후에, 1 M K-acetate /70% ethanol 용액을 처치하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다(이때 reference filter는 490 nm였다).

(4) MPTP 및 MPP⁺의 mitochondria 전자전달계에 대한 효과 및 lipid peroxidation 측정: MPTP 및 MPP⁺의 전자전달계에 대한 효과는 세포내 ATP와 lactate 함량을 측정하여 간접적으로 검토하였다.

그리고 지질과산화 반응은 thiobarbituric acid 방법을 이용하여 생성된 malondialdehyde (MDA)를 측정하였다.

① **세포내 ATP 및 lactate 추출;** 7일간 배양된 세포에 MPTP 및 MPP⁺를 2, 4, 6시간 동

안 처치한 후 HBSS로 배양세포를 1번 세척한 후 1 N perchloric acid(PCA)를 사용하여 세포를 모았다. 그 후 cell dismembrator를 사용하여 세포 부유액을 얻고, 4°C 이하에서 15~20분간 추출하였다. 그 후 1 M KOH, 0.3 M KCl, 0.4 M imidazole 용액으로 중화시키고 0°C에서 13000 rpm, 7분간 원심분리하여 상층액을 얻어 -70°C로 보관하고 ATP 및 lactate 측정에 사용하였다.

② **세포내 ATP 함량 측정;** ATP는 "Lumat, LB 9501" (Berthold)를 이용하여 측정하였다 (Strehler와 Totter, 1952). 추출액은 luciferin/luciferase가 제외된 ATP 측정용액(50 mM Tris acetate pH 7.75, 2 mM EDTA, 6 mM DTT, 0.075% BSA, 10 mM Mg-Acetate, 0.04 mM d-Luciferin, 2 μ g/ml luciferase)으로 40배 희석한 후 50 μ l를 사용하고 100 μ l의 ATP 측정용액과 반응하여 나타나는 luminiscence를 10초간 측정하여, ATP 함량 계산에 사용하였다.

③ **세포내 lactate 측정;** 세포내 축적된 lactate는 fluorospectrometer를 이용하여 측정하였다. 0.25 M glycine-0.1 M hydrazine buffer(pH 9.2), 0.4 mM NAD⁺, 0.004 mg/ml LDH(from rabbit muscle)이 함유된 측정용액에 세포추출 상층액 50 μ l를 첨가하여 30°C에서 20분간 반응시켜 생성된 NADH를 fluorescence spectrophotometer (Kontron)을 사용하여 340 nm excitation, 460 nm emission에서 측정하였다.

④ **지질과산화 반응 측정;** 1 N PCA로 모은 세포를 sonication한 후 100 μ l의 세포 부유액에 30% TCA 용액, 0.375% thiobarbituric acid (TBA, 0.02% butylated hydroxytoluene이 함유된)을 첨가하고 90°C에서 1 시간 발색반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 충분히 식히고 0.5 ml butanol을 첨가하여 진탕 혼합시키고 원심분리하여 butanol 분획으로 이동된 MDA-TBA complex를 spectrophotometer(Camspec)을 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 발색된 MDA의 흡광계수 $1.53 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 을 이용하여 MDA 생성량을 산출하였다. 단백질량은 PCA처리된 세포 부

유액으로 부터 BCA 단백측정시약을 사용하였다.

(5) 세포내 반응성 산화물 생성측정: 산소대사 물의 생성여부는 생성된 산소대사물에 의해 세포 내에서 2',7'-dichlorofluorescein의 산화에 의해 나타나는 형광을 이용하여 측정하였다. DCF의 염은 세포막을 통과할 수 있으나 세포내로 들어간 후 esterase에 의해 염이 분해된 후 세포막을 자유롭게 통과할 수 없으므로 세포내에 계속 존재하며 형광을 나타내지 않으나, 산화반응에 의해 fluorescein으로 산화되며 형광을 나타낸다(Salz 등, 1987).

배양된 세포를 trypsin을 처리하여 단일 세포로 분리한 후 glucose를 첨가한 PBS에 50 μ M DCF diacetate를 37°C에서 20분간 처리하여 loading시켰고, 여분의 DCF diacetate는 glucose를 함유한 PBS로 2번 세척하여 제거하였다. Glucose가 함유된 PBS에 다시 부유시킨 세포는 cuvette에 3×10^5 cell/ml 되게 넣고 계속 진탕하면서 MPTP 또는 MPP⁺를 첨가하고 이들에 의해 나타나는 형광의 변화를 fluorescence spectrophotometer를 이용하여 450 nm excitation, 550 nm emission 파장에서 측정 기록하였다. 한편 세포내 반응성 산화물의 생성에 대한 억제효과를 알아보기 위해 SOD, catalase, Vit. E, deprenyl, diltiazem, indomethacin등을 40분간 전처리한 후 MPTP 또는 MPP⁺를 투여하고 같은 방법으로 형광을 측정하였다.

실 험 결 과

1) MPTP 및 MPP⁺의 dopamine 신경세포에 대한 독성효과

임신 14~15일 랫드로 부터 태아를 사용하여 흑질(substantia nigra) 포함된 복측 중뇌부위(ventral mesencephalon)를 절제하여 신경세포 배양을 시도하고, 배양 일주일 후 일정농도의 MPTP 또는 MPP⁺(0.01-1 mM)를 1, 2, 4, 18, 24시간 동안 처리한 후 dopamine 신경세포의 손상을 면역세포화학적으로 TH 양성세포수의 변화

Table 1. Cytotoxic effect of MPTP and MPP⁺ on the on the dopaminergic neurons from rat mesencephalon cultures.*

Reaction condition	TH(+) neurons/coverslip at 24h exposure	
	Exp. 1.	Exp. 2.
No addition	157	153
1 mM MPTP	88	130
0.01 mM MPP ⁺	100	136
0.1 mM MPP ⁺	21	102
1 mM MPP ⁺	3	4

* Rat mesencephalone neuronal culture were prepared and maintained as described in Materials and Methods. After one week of growth the cultures were treated with MPTP or MPP⁺ for 24h. Culture coverslips were processed for throsine hydroxylase(TH) immunocytochemistry and T H(+) neurons in whole area of the coverslips.

로 관찰한 결과 대조군에서 TH 양성 신경세포는 coverslip당 150±60개로 전체 배양세포의 0.5~1.0%를 차지하였고, 대부분의 TH 양성세포가 잘 발달된 neurite를 갖고 있었으나 배양세포에 MPTP 또는 MPP⁺를 24시간 처리한 경우 1 mM MPTP 및 0.1 mM MPP⁺ 이하의 농도에서는 TH 양성세포 및 전체세포수의 유의한 변화를 볼 수 없었으나, 1 mM MPTP 또는 0.1 mM MPP⁺ 이상의 농도에서는 TH 양성세포의 수가 현저하게 감소됨을 볼 수 있었다(Table 1, Fig. 1).

MPTP 및 MPP⁺에 의해 dopamine 신경세포가 선택적으로 손상을 받는다면 dopamine 신경세포의 marker인 TH 활성도 또는 양적 변화를 초래하게 됨으로 미루어 tyrosine hydroxylase에 대한 항체를 사용하여 TH 면역반응정도를 정량적으로 검토하고 비특이적인 세포독성을 세포 단백을 염색하여 정량함으로 검토하였다.

0.10~0.1 mM MPTP를 배양세포에 처리한 경우 MPTP 처리 24 시간 후 TH 면역반응이 대조군에 비해 0.01 mM에서 79.2±7.6%(mean±S.E.M), 0.1 mM에서 70.8±6.7%, 1.0 mM에서는 47.2

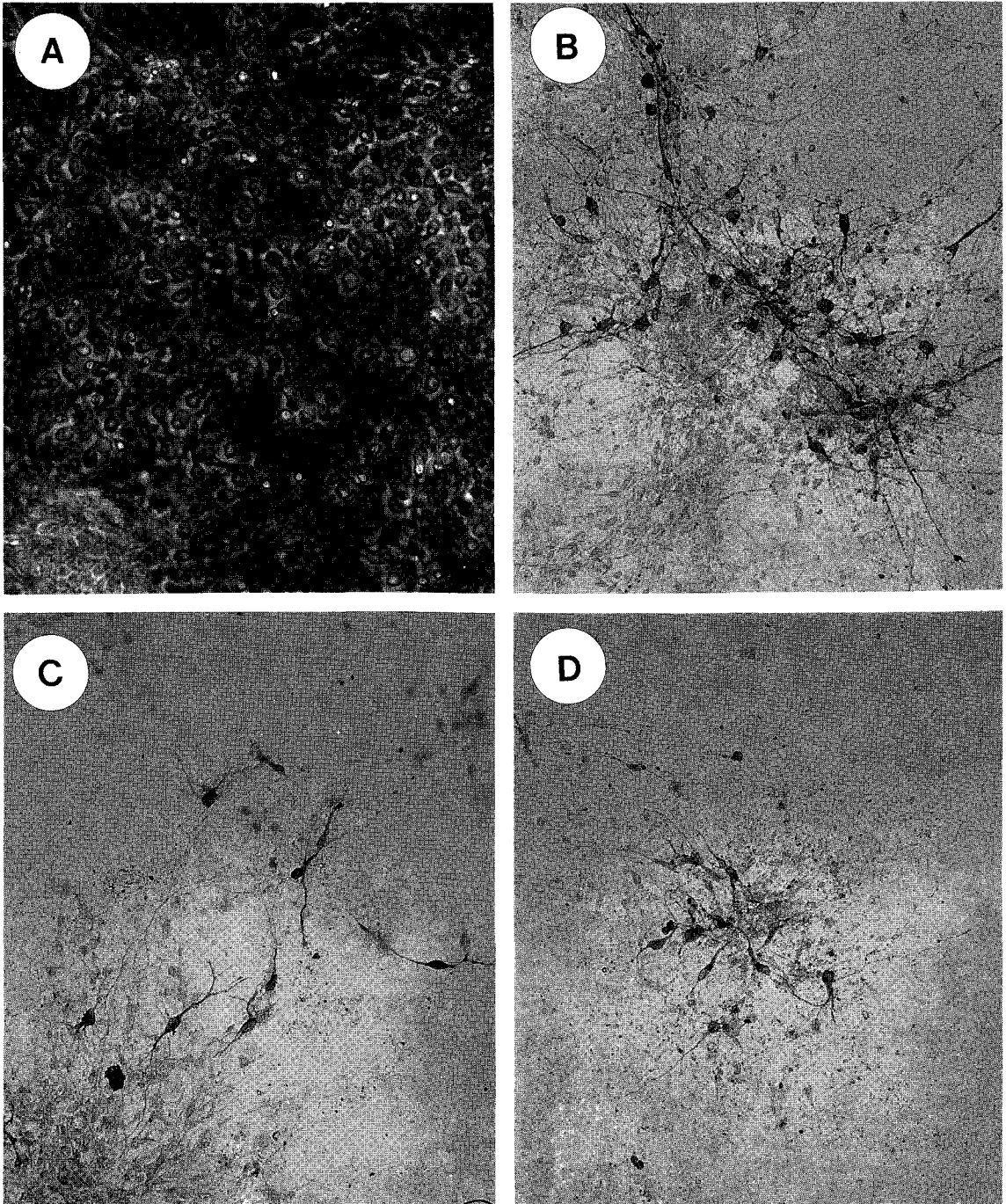


Fig. 1. Photomicrographs of neuronal cultures prepared from ventral mesencephalon of rat embryos and grown for one week. The cultures were incubated with MPTP or MPP⁺ for 24 hr, and then processed for tyrosine hydroxylase (TH) immunocytochemistry. A; Phase-contrast photomicrograph of control cultures. B; TH(+) neurons from control cultures, C; Surviving TH(+) neurons after exposure to 1.0 mM MPTP. Note that background cells are also dead. D; Surviving TH(+) neurons after exposure to MPP⁺.

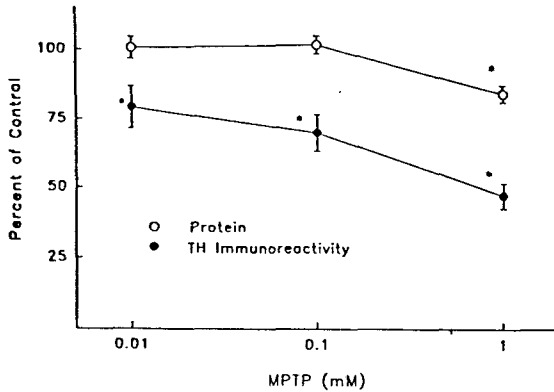


Fig. 2. Toxic effect of MPTP on dopaminergic neurons in rat mesencephalon cultures. Cultures maintained for one week were incubated with 0.01-1 mM MPTP for 24 hours. After washed the cells, processed for TH immunoreactivity and protein assay using ELISA carried out directly on fixed cells as described in Materials and Methods. Vertical bars indicate standard error of mean(S.E.M.) of 4-10 triplicate experiments. *: P<0.05, compared with control.

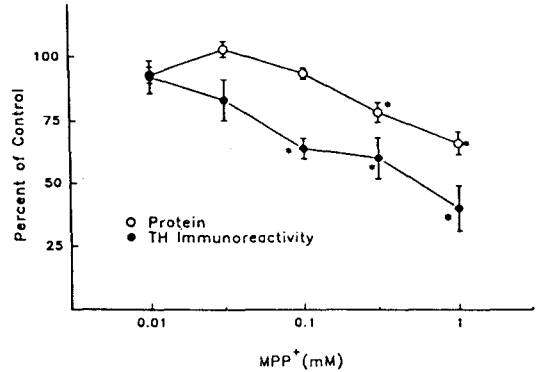


Fig. 3. Toxic effect of MPP⁺ on dopaminergic neurons in rat mesencephalon cultures. The condition is same as described in Fig. 2. But the cultures were exposed with 0.01-1 mM MPP⁺ for 24 hours. Vertical bars indicate S.E.M. of 4-10 triplicate experiments. *: P<0.05, compared with control.

±4.5%로 농도의존적으로 감소함을 보였으며 0.1 mM MPP⁺를 24시간 처리하면 대조군에 비해 64.0±4.1%, 1.0 mM MPP⁺의 경우에는 40.2±9.1%로 TH 면역반응이 현저하게 감소됨을 보였다(Fig. 2, Fig. 3).

한편 배양세포에 0.1 mM MPP⁺를 6시간 처리한 경우 대조군에 비해 TH 면역반응정도가 89.5±5.6%로 현저한 감소를 보이지 못했으나 1.0 mM MPTP 처리시에는 73.2 mM±4.1%로 유의한 TH 면역반응의 감소를 보였다. 그러나 MPTP, MPP⁺를 24시간 배양세포에 처리한 경우 1.0 mM MPTP 이상, 그리고 0.3 mM MPP⁺ 이상의 농도에서만 단백질이 유의하게 감소됨을 보였다.

이상의 결과는 MPTP 또는 MPP⁺ 치료로 인해 나타나는 신경세포에 대한 독성효과는 배양세포에서 단백질의 감소에 비해 TH 면역반응정도가 더욱 현저하게 감소됨을 보이는 것으로 MPTP와 MPP⁺가 dopamine 신경세포에 보다 선택적인 독

성효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

2) MPTP 및 MPP⁺치리에 의한 세포내 ATP, lactate 함량변화

앞서 기술한 MPTP 또는 MPP⁺의 독성이 나타나기 전에 세포내 생화학적 변화를 알아보기 위해서 세포내 ATP 그리고 lactate 함량을 검토함으로 MPTP 및 MPP⁺의 mitochondria에 대한 효과를 알아보고자 하였다.

대조군, 1 mM MPTP, 그리고 0.1 mM MPP⁺를 6시간 동안 처치한 결과 대조군 및 1.0 mM MPTP 처리군에서는 6 시간까지 세포내 ATP 및 lactate 함량에 유의한 변화가 없었으나 0.1 mM MPP⁺ 처치시 처치 2시간에서 ATP 함량의 감소는 보이지 않았으나 세포내 lactate 함량이 75.7±14.2 nmol/mg prot(대조군 34.5±5.8)으로 2배이상 증가되었고 4시간 처리시 세포내 ATP 함량도 유의한 수준으로 감소되고, lactate량이 증가됨을 보이고, 6시간에서도 같은 양상으로 ATP 및 lactate 함량이 변화됨을 보였다(Fig. 4, Fig. 5).

이상의 결과는 MPP⁺가 배양세포에 작용하여

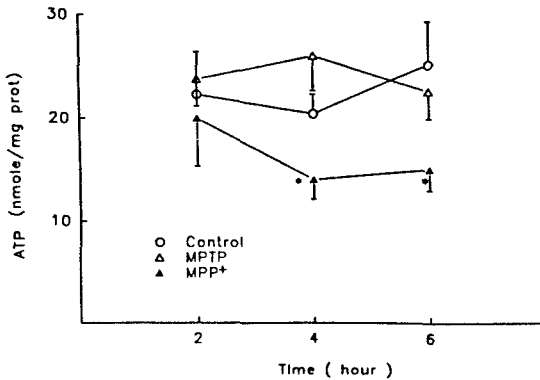


Fig. 4. Effect of MPTP and MPP⁺ on the content of ATP in cultured neuronal cells. After one week of growth cells were washed and incubated with 1 mM MPTP or 0.1 mM MPP⁺ for 6 h. At fixed time as shown cells were prepared and determined the intracellular ATP contents by luminometric methods as described in Materials and Methods. Vertical bars indicate S.E.M. of 5-9 experiments. *P < 0.05, compared with control.

일차적으로 mitochondria를 통한 당 대사에 영향을 미침으로서 혐기성 해당작용이 증가되어 세포 내 lactate 농도가 증가하고 그 결과 ATP의 감소를 나타내는 현상임을 알 수 있었으며, MPTP는 동일 반응시간에서 MPP⁺와 달리 직접 mitochondria를 통한 에너지 대사에 영향을 나타내지 못함을 알 수 있었다.

3) MPTP 및 MPP⁺가 지질과산화 반응에 미치는 효과

MPP⁺의 세포독성 기전으로 지질과산화 반응이 세포치사 이전에 나타나는 현상인지를 검토하기 위해 지질과산화 반응으로 생성되는 MDA를 측정 한 결과 1.0 mM MPTP 또는 0.1 mM MPP⁺를 처리한 경우 대조군에서는 0.81 ± 0.2 nmol/mg prot. 그리고 MPTP 처리시 0.77 ± 0.2 nmol/mg prot. MPP⁺에서는 0.92 ± 0.2 nmol/mg prot으로 유의한 차이를 볼 수 없었으며 이들 약물은 6시간 까지 처리한 경우에서도 증가양상을 볼 수 없었다

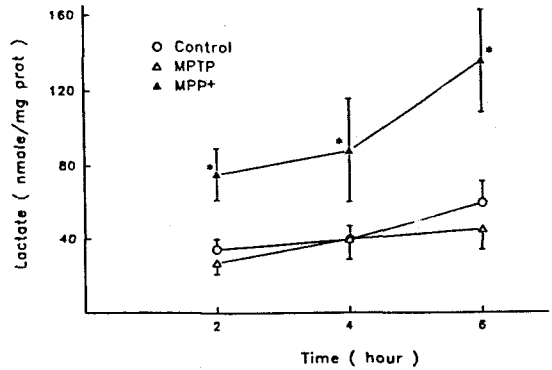


Fig. 5. Effect of MPTP and MPP⁺ on lactate contents of cultured neuronal cells. The condition is same as described in Fig. 4. Contents of intracellular lactate were measured enzymatically by using fluorospectrophotometer. Vertical bars indicate S.E.M. of 5-9 experiments. *P < 0.05, compared with control.

Table 2. Effect of MPTP and MPP⁺ on the production of Malondialdehyde from cultured neuronal cells.*

Incubation time(hour)	MDA (nmol/mg prot)		
	control	1.0 mM MPTP	0.1 mM MPP ⁺
2	0.81 ± 0.16	0.77 ± 0.15	0.92 ± 0.20
4	0.80 ± 0.10	0.8 ± 10.08	0.76 ± 0.09
6	0.81 ± 0.12	0.8 ± 50.08	0.78 ± 0.12

*The condition is same as described in Fig. 4. At fixed time as shown cultures were prepared and determined cellular MDA spectrophotometrically. Control indicates the experimental condition in the absence of MPTP or MPP⁺. The values are shown as Mean ± S.E.M. of 5~9 experiments.

(Table 2).

이러한 결과는 MPTP 또는 MPP⁺ 처리로 세포 내 지질과산화 반응이 촉진되지 않은 것으로, 지질과산화 반응이 이들 약물의 처리로 인해 나타나는 세포독성과는 직접적으로 관련되지 못함을 보

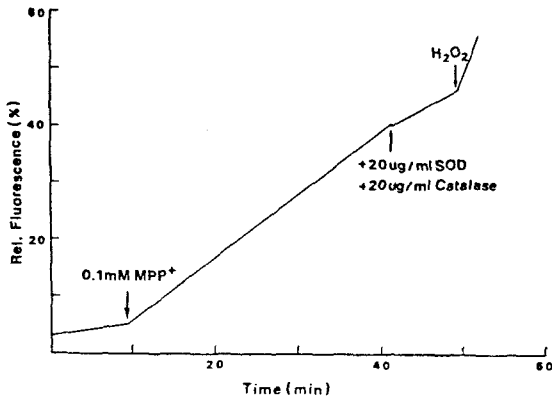


Fig. 6. Generation of the intracellular oxidants from cultured neuronal cells by MPP⁺. Cells grown for one week were dissociated and loaded with 50 M 2'7' dichlorofluorescin diacetate for 20 min at 37°C. After washing twice with PBS/glucose, after 10 min preincubation reaction was started by adding 0.1 mM MPP⁺ and the generation of the intracellular oxidants was monitored fluorospectrometrically by observing the increase in fluorescence at 450 nm excitation, 550 nm emission due to the oxidation to 2'7' dichlorofluorescein. 0.1 μM 2'7' dichlorofluorescein was calibrated as 50% relative fluorescence.

였다.

4) MPTP 및 MPP⁺에 의한 세포내 반응성 산화를 생성효과

MPTP 또는 MPP⁺에 의해 세포내 반응성 산소 대사물이 생성될 수 있는지를 알아보기 위해 배양 세포에 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate를 처리하여 이 비형광성 화합물이 세포내로 들어가서 세포내 esterase에 의해 대사되어 세포내에 축적되어 반응성 산화물에 의해 이 화합물이 2', 7'-dichlorofluorescein으로 산화됨을 형광성이 나타나는 것을 이용하여 검토한 결과 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate를 처리, 세척한 세포에서 서서히 형광이 생성됨을 보였으나, 이 세포에 0.1 mM MPP⁺를 첨가하면 형광이 생성되는 속도가

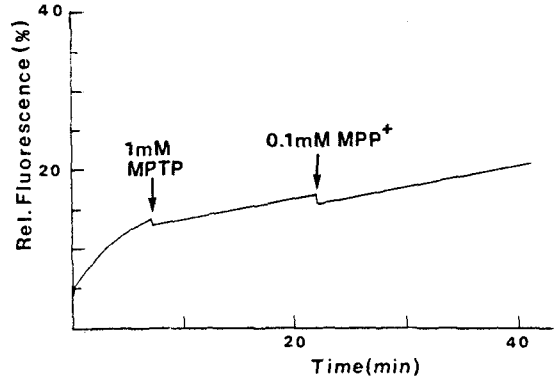


Fig. 7. Inhibitory effect of MPTP on the generation of intracellular oxidants from cultured neuronal cells. The condition is same as described in Fig. 6. and 1mM MPTP was added to the cells and monitored fluorospectrometrically. MPTP also inhibited the production of intracellular oxidant induced by MPP⁺.

유의하게 증가됨을 볼 수 있었으며 2시간 이상 지속적으로 형광이 증가됨을 보였다(Fig. 6).

한편 이러한 형광생성 반응이 산소대사물에 의해 나타날 수 있는 것인지를 알아보기 위해 10 mM H₂O₂를 첨가한 경우 0.1 mM MPP⁺에서 보인 결과와 같은 양상으로 급격하게 형광이 생성됨을 볼 수 있었다(Fig. 6).

그러나 MPP⁺처리에 의해 나타나는 형광 증가 효과는 catalase, Vit. E를 전처리한 경우 어느정도 유의한 억제효과를 볼 수 있었으나 완전히 억제되지 않았으며, 한편 1.0 mM MPTP를 같은 반응조건에서 처리한 결과 앞서의 MPP⁺와는 달리 형광생성 속도가 현저히 억제됨을 보였다. 이러한 MPTP에 의해 형광생성 억제효과는 MPP⁺에 의해 촉진되는 형광증가도 유의하게 억제하였다(Fig. 7).

이상의 결과는 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate로 세포를 처리한 경우 이 화합물이 세포내에 축적되고 그 후 MPP⁺에 의해 반응성 산화물의 생성이 촉진됨을 보인 결과로 해석되나, 사용된

Table 3. Effect of various scavengers, antioxidants and inhibitors on the cytotoxicity induced by MPTP in cultured neuronal cells*

Reaction condition	TH immunoreactivity (% of control)
control	100
1 mM MPTP only	57.0 ± 7.6
+ 20 µg/ml SOD	58.8 ± 5.3
+ 20 µg/ml Catalase	72.6 ± 10.8
+ 100 µg/ml Vit. E	42.4 ± 5.8
+ 100 µM Deprenyl	60.0 ± 12.0
+ 0.5 mM Glutathione	57.6 ± 5.0
+ 10 µM Diltiazem	49.8 ± 15.9
+ 0.1 mM Benztropine	11.8 ± 3.1

*Rat dopaminergic neurons were prepared and maintained. After one-week of growth the cultures were pretreated with various scavengers, antioxidants and inhibitors for 20 minutes. And then 1 mM MPTP was incubated for 24 hours. Cells were processed for TH immunoreactivity as described in Materials and Methods. The values are shown as Mean ± S.E.M. of 4-7 triplicated experiments.

산소대사를 제거제에 의해 완전히 억제되지 못함으로 미루어 MPP⁺에 의해 생성되는 반응성 산화물은 산소대사를 뿐만아니라 다른 종류의 산화물 생성이 촉진된 결과로 믿어지며, 한편 MPTP는 반응성 산화물 생성을 억제함을 알 수 있었다.

5) MPTP 및 MPP⁺의 독성효과에 대한 보호효과 검토

MPP⁺에 의해 생성된 반응성 산화물이 세포독성을 나타내는 데 결정적인 역할을 한다면 산소제거제가 세포손상에 대한 보호효과를 보일 수 있리라 믿어지므로 이들의 보호효과 여부를 알아보고자 superoxide dismutase, catalase의 반응성 산소대사를 제거제와 Vit. E, glutathion 등의 항산화제 그리고 MAO 억제제인 deprenyl, 갈슘 길항제인 diltiazem, dopamine uptake 억제효과를 나타낸다고 알려진 benzotropine을 전처치한 후 0.1 mM MPP⁺를 처리한 후 TH 면역 반응정도의 변

Table 4. Effect of various scavengers, antioxidants and inhibitors on the cytotoxicity induced by MPP⁺ in cultured neuronal cells.*

Reaction condition	TH immunoreactivity (% of control)
control	100
1 mM MPTP only	64.5 ± 5.7
+ 20 µg/ml SOD	63.1 ± 14.5
+ 20 µg/ml Catalase	69.1 ± 7.2
+ 100 µg/ml Vit. E	31.6 ± 6.3
+ 100 µM Deprenyl	54.8 ± 6.8
+ 0.5 mM Glutathione	41.6 ± 10.3
+ 10 µM Diltiazem	40.8 ± 6.5
+ 0.1 mM Benztropine	10.5 ± 2.0

*The experimental condition is same as Table 3, but 0.1 mM MPP⁺ was added to the cultures for 24 h. The values are shown as Mean ± S.E.M. of 4~8 triplicate experiments.

화를 검토하였다.

1.0 mM MPTP를 24시간 처리한 경우 TH 면역반응이 대조군에 비해 57.0 ± 7.6%로, 0.1 mM MPP⁺ 처리시 64.5 ± 5.5%로 감소되었으며, 이러한 TH면역반응감소는 SOD, catalase, Vit. E, deprenyl, glutathion 그리고 diltiazem, benzotropine에 의해 역전되지 못하였으며, dopamine uptake 억제효과를 나타낸다고 보고된 benztropine은 MPTP의 독성효과를 더욱 증가시킨 결과를 보였다(Table 3, 4).

이상의 결과는 MPTP 그리고 MPP⁺에 의한 dopamine 신경세포에 대한 독성효과는 사용된 산소대사를 제거제, 항산화제(Vit. E, glutathione), MAO 억제제, 그리고 Ca⁺⁺길항제의 하나인 diltiazem등에 의해 감소되지 못함으로 보아 반응성 산소대사물이 세포독성에 결정적인 역할을 못함을 보였다.

고찰 및 결론

지금까지 알려진 MPTP의 중요한 독성기전으로

는 MPTP의 대사물인 MPP⁺가 직접 mitochondria의 전자전달계를 억제하여 ATP 생성을 급속히 감소시킨다는 것과 또 하나는 산소대사물의 생성을 증가시켜 세포독성을 나타낸다는 것이다 (Castagnoli 등, 1985; Lewin, 1984; Vyas 등, 1986). 그러나 이상의 두 기전은 MPP⁺가 mitochondria의 전자전달계내 complex I을 억제함으로써 ATP 생성을 감소시킬 뿐만아니라 정상적인 전자전달을 차단함으로써 mitochondria로부터 산소대사물의 생성도 증가시킬 수 있는바 이들 두 가설에 대한 상호작용을 검토하여 궁극적으로 dopamine 신경세포의 치사에 산소대사물이 관여할 수 있는지를 알아보고자 하였다. 고농도의 MPTP 그리고 0.1 mM MPP⁺에 의해 배양신경세포에서 세포손상효과는 6시간 이후부터 관찰될 수 있었으며 dopamine 신경세포의 marker인 tyrosine hydroxylase에 대한 면역반응이 비특이적인 손상보다 현저함을 보여 dopamine 신경세포가 보다 선택적으로 손상을 받음을 알 수 있었다.

MPTP 또는 MPP⁺ 처치 6시간 내 즉 현저한 세포독성이 나타나지 않는 초기조건에서 1 mM MPTP는 대조군에 비해 세포내 ATP와 lactate 함량에 변화를 초래하지 못하나 0.1 mM MPP⁺를 처치한 경우 반응 2시간에서부터 세포내 lactate 함량이 증가됨으로 보아 이 MPP⁺는 세포내로 흡수되어 mitochondria의 전자전달계에 영향을 미쳐 anaerobic glycolysis가 촉진되고, 에너지 대사가 장애를 받은 결과로 해석될 수 있다(Mytilineus와 Fricedman, 1988; Vyas 등, 1986). 또한 동일 반응시간내에서 지질과산화 반응 정도는 MPTP 그리고 MPP⁺에 의해 직접적으로 영향을 받지 못함으로 보아 MPP⁺의 세포독작용은 일차적으로 에너지대사에 영향을 미쳐 세포내 ATP농도가 감소됨으로 그 결과 세포손상을 나타내게 되는 것으로 믿어지며, 지질과산화반응은 세포손상에 중요한 역할을 하지 못함을 알 수 있었다.

그리고 세포내 반응성 산화물의 생성촉진 효과를 검토한 결과에서 보듯 0.1 mM MPP⁺에 의해 2',7'-dichlorofluorescin diacetate 처리된 세포에서

형광이 증가된 현상은 MPP⁺ 자체에 의해 반응 초기에서부터 반응성 산화물의 생성이 증가됨을 시사하는 것이나, 이렇게 생성된 반응성 산화물이 지질과산화 반응을 촉진시키지 못하였고, 한편 MPP⁺에 의해 반응산화물의 증가는 사용된 산소 대사물 제거제(superoxide dismutase, catalase) 및 monoamine oxidase B 억제제인 deprenyl, 그리고 항산화제(Vitamine E, glutathione)도 유의하게 억제되지 못함으로 미루어 보아 산소대사물이 아닌 반응성 산화물의 생성을 예측할 수 있는 결과이다. 이러한 2',7'-dichlorofluorescin diacetate를 사용하여 세포내 반응성 산화물을 측정하는 것은 Bass 등(1983)의 보고에서 보듯 반응성 산소 대사물 이외에도 세포내에서 일어나는 peroxidative reaction을 통해서도 일어날 수 있는 현상이며, 한편 MPP⁺ 투여 후 즉시 형광이 증가되고 이렇게 생성된 형광이 장시간 안정하게 존재하고 기존의 산소대사물 제거제나 항산화제로 완전히 억제되지 못하나 반대로 prostaglandin synthetase 억제제인 indomethacin을 30분 전 처치한 경우 현저하게 억제됨을 보이는 결과는(data not shown)이 화합물이 세포내 반응성 산화물에 의해 형광이 나타나는 것 이외에도 세포막에 결합되어 존재하다가 MPP⁺ 투여에 의해 세포막에서부터 반응성 산화물의 형성을 촉진함으로 반응액내로 형광물질을 유리시켜 나타난 결과로도 해석될 수 있으므로 정말로 MPP⁺가 세포내로 들어가서 세포내 산화물질의 생성을 촉진시킬 수 있는지에 대한 자세한 검토가 필요하다.

산소 대사물 제거제 및 항산화제에 의해 MPP⁺에 의한 세포독성이 억제될 수 있다면 MPP⁺에 의해 생성된 반응성 산화물이 세포독성을 나타내는 데 관여할 수 있음을 간접적으로 증명할 수 있는 현상이므로 이들 물질의 세포보호 효과를 알아보고자 세포보호 효과가 알려진 여러 종류의 물질을 사용하여 30분간 전 처치한 후 0.1 mM MPP⁺를 24시간 처리한 경우에서도 항산화제가 dopamine 세포손상을 보호하지 못하였고, 또한 Ca⁺⁺ 길항제로 알려진 diltiazem, monoamine oxidase

B 억제제인 deprenyl, 그리고 dopamine uptake 억제작용을 갖는다는 benzotropine 전 처치에 의해서도 MPP⁺의 독성이 억제되지 못하였다. 이러한 결과는 MPP⁺에 의한 dopamine 신경세포의 손상은 MPP⁺ 처치로 초기에 세포내 반응성 산화물이 생성될 수 있더라도 이때 생성되는 반응성 산화물이 세포독성에 중요한 역할을 한다기보다는 MPP⁺가 직접 mitochondria에 작용하여 에너지 대사를 억제함으로 나타난 결과로 믿어진다. 그러나 세포내로 MPP⁺의 유입을 차단함으로 MPP⁺의 세포독성을 감소시킬 수 있으리라 생각되어진 benzotropine 전처치에서 MPP⁺ 독성 효과가 더욱 증가되어 나타난 결과는 benzotropine이 dopamine uptake 억제제로선 선택적이지 못한 결과로 해석될 수 있으며, 한편 benzotropine이 선택적인 항 muscarinic 효과를 갖음으로 보아 이들 수용체와의 관계도 다시 검토되어야 할 것이다.

한편 MPTP는 1 mM의 고농도에서 dopamine 신경세포에 대한 유의한 독성을 보였으나 이러한 세포독성은 MPTP 처리시 초기 과정에서 세포내 ATP와 lactate 함량의 변화 그리고 지질과산화 반응에 영향을 미치지 않고 나타난 현상이며 세포내 반응성 산화물생성에 있어서도 강력한 억제효과를 보이는 기존에 알려진 바와 같이 MPTP가 MPP⁺로 대사됨으로 인해 초기에는 생화학적 변화를 나타내지 못하였고, MPTP처리 24시간에서 현저한 세포독성을 초래한 것으로 생각될 수 있었다. 그러나 deprenyl 전처치로 MPTP의 독성효과가 억제되지 못함으로 미루어보아 MPTP가 MPP⁺로 대사되어 독작용을 나타내는 것 이외에도 MPTP 자체가 직접 다른 기전을 통해서도 세포손상을 일으킬 수 있을 가능성을 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 보면, 고농도의 MPTP와 MPP⁺는 dopamine 신경세포가 함유된 랫트 중뇌 배양세포에 대해 각각 세포독성을 나타내어 TH 면역반응 정도를 현저하게 억제하나, MPP⁺의 경우 mitochondria의 전자전달계를 억제함으로 에너지 대사에 영향을 미치는 것이 세포독성기전과 관련이 있으며 MPP⁺에 의해 초기에 나타나는 세포

내 반응성 산화물의 증가는 세포독성을 나타내기에 충분하지 못하거나, 중요한 역할을 하지 못하리라 믿어졌다.

그리고 MPTP의 경우에는 세포내 ATP와 lactate 함량 그리고 세포내 반응성 산화물 생성에 대해 MPP⁺와는 다른 양상을 보이니, 세포독성을 나타낼 수 있음으로 보아 MPP⁺와는 다른 기전을 통해서도 dopamine 신경세포에 대해 독성 효과를 보일 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

- Bannon MJ, Goedert M and Williams B: *The possible relation of glutathione, melanin and 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) to Parkinson's disease. Biochem Pharmacol* 33: 2697-2698, 1984
- Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC and Thomas M: *Flow cytometric studies of oxydative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. J Immunol* 130: 1910-1918, 1983
- Castagnoli JN, Chiba K and Trevor AJ V: *Potential bioactivation pathways for the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). Life Sci* 36: 225-230, 1985
- Chiuch C, Markey SP, Burns RS, et al: *Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetra-hydropyridine in the rat. Eur J Pharmacol* 100: 189-194, 1984
- Corongiu FP, Dessi MA, Bannis S, et al: *MPTP fails to induce lipid peroxidation in vivo Biochem pharmacol* 36: 2251-2253, 1987
- Corsini GU, Pintus S, Bocchetta A, et al: *A reactive metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is formed in rat brain in vitro by B monoamine oxidase. J Pharmacol Exp Ther* 238: 648-652
- Demopoulous HB, Flamin ES, Pietronigro DD, et al: *The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. Act Physiol Scand(Suppl)*

- 492: 91-119, 1980
- Heikkilä RE, Hess A and Duvoisin RC: *Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: relationship between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity.* *Life Sci* 36: 231-236, 1985
- Jarvis MF and Wagner GC: *Neurochemical and functional consequences following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and methamphetamine.* *Life Sci* 36: 249-254, 1985
- Johannessen JN, Adams JD, Schuller HM, et al: *1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) induces oxidative stress in the rodent.* *Life Sci* 38: 743-749, 1986
- Kalaria RN, Mitchell MJ and Harik SI: *MPTP neurotoxicity: correlation with blood-brain barrier monoamine oxidase activity.* *Proc Natl Acad Sci* 84: 3521-3525, 1987
- Langston JW, Irwin I and Langston EB: *Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates.* *Science*: 1480-1482, 1984
- Lewin R: *Brain enzyme is the target of drug toxin.* *Science* 225: 1460-1462, 1984
- Mitchel PP, Dandapami BK, Sanchez-Ramos J, et al: *Toxic effects of potential environmental neurotoxins related to 1-methyl-4-phenylpyridinium on cultured rat dopaminergic neurons.* *J Pharmacol Exp Ther* 248: 842-850, 1988
- Monte DD, Sandy MS, Ekstrom GE, et al: *Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) cytotoxicity.* *Biochem Biophys Res Commun*. 137: 303-309, 1986
- Mytilineou CC and Cohen G: *MPTP destroys DA neurons in explants of rat embryo mesencephalon.* *Science* 225: 529-531, 1984
- Mytilineou CC, Cohen G and Heikkilä RE: *MPP⁺ is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons in culture.* *Neurosci Lett* 57: 19-24, 1985
- Mytilineou CC and Friedman L: *Studies on the metabolism and toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in cultures of embryonic rat mesencephalon.* *J Neurochem* 51: 750-755, 1988
- Nicklas WJ, Vyas I and Heikkilä RE: *Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenylpyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.* *Life Sci* 36: 2503-2508, 1985
- Ramsay RR, Salach JI, Dadgar J, et al: *Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic parkinsonism.* *Biochem Biophys Res Commun* 135: 269-331, 1986
- Salz JC, Kessler JA, Bennett MV, et al: *Superoxide dismutase protects cultured neurons against death by starvation.* *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3056-3059, 1987
- Sanchez-Ramos JR, Barrett JN, Goldstein M, et al: *MPP⁺ but not MPTP is toxic to dopamine neurons in cultures of dissociated rat mesencephalic neurons.* *Neurosci Lett* 72: 215-220, 1986
- Smith MT, Ekstrom G, Sandy MS, et al: *Studies on the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine cytotoxicity in isolated hepatocytes.* *Life Sci* 40: 741-748, 1987
- Snyder SH and D'Amato RJ: *MPTP: A neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease.* *Neurology* 36: 250-258, 1986
- Trush MA, Mimnaugh EG and Gram TE: *Activation of pharmacological agents to radical intermediates: Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity.* *Biochem Pharmacol* 31: 3335-3346, 1982
- Vyas I, Keikkilä RE and Nicklas WJ: *Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.* *J Neurochem* 46: 1501-1507, 1986