

일차배양 뇌세포를 이용한 글루타메이트성 신경에 작용하는 천연물의 검색방법

박미정 · 김소라 · 문애리* · 김승희** · 김영중[†]

서울대학교 약학대학, *덕성여자대학교 약학대학, **국립보건안전연구원

(Received July 26, 1995)

Primary Cultured Brain Cells as Screening Methods for Natural Products Acting on Glutamatergic Neurons

Mi Jung Park, So Ra Kim, Aree Moon*, Seung Hee Kim**
and Young Joong Kim[†]

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea*

*** National Institute of Safety Research, Seoul 122-020, Korea*

Abstract—Primary cultures of rat cortical and chicken embryonic brain cells were employed to establish a reliable screening method for natural products blocking or enhancing glutamate-induced neurotoxicity. Exposure of primary cultured rat cortical cells or chicken embryonic brain cells to high dose of glutamate resulted in the fragmentation of neurites and consequent neuronal death. The level of cytoplasmic lactate dehydrogenase(LDH), indicator for cell survival in cultures, was significantly reduced at exposure to glutamate. For the practical application of the methods, series of concentrations of plants extracts and positive control were applied prior to the glutamate insult on primary cultures of rat cortical and chicken embryonic brain cells. Relative LDH level in cells was measured for the estimation of the effect of the test materials on the glutamatergic neurons. The validity of the present screening method for natural products acting on glutamatergic neurons was examined with dextromethorphan, a known glutamatergic antagonist. The treatment of 100 μ M dextromethorphan prevented the reduction of LDH in rat cortical and chicken embryonic brain cells caused by glutamate insult keeping 60% and 90% of LDH level in normal control, respectively. Above results indicate that primary cultures of rat cortical and chicken embryonic brain cells could be proper systems for the screening of potential natural agents acting on glutamatergic neurons. Between the two types of cultures, primary culture of chicken embryonic brain cells seemed to be a better system for the primary screening, since it is technically easier and economical compared to that of rat cortical cells.

Keywords □ Glutamatergic neurons, primary cultured rat cortical cells, primary culture of chicken embryonic brain cells, glutamate, dextromethorphan

현대 의학의 눈부신 발달과 더불어 인간의 수명이 연장되고 이에 따른 노인 인구의 증가로 인구의 고령화 현상은 가속될 추세이다. 이와 같이 노인 인구가 증가함에 따라 노인성 질환을 앓고 있는 환자도 크게 늘었으며 특히 노인성 뇌신경계 질환을 앓고 있는 환자의 경우는 사회적인 문제로까지 크게 대두되고 있다. 최근

이러한 측면에서 관심이 고조되고 있는 치매는 예전에는 단순히 노화로 인한 노망으로 생각되었으나 일종의 질환이라는 것이 판명되었다. 치매의 원인은 아직까지 정확히 밝혀지지 않았으나 콜린성, 아드레날린성, GABA (γ -aminobutyric acid)성 및 글루타메이트성 신경 등 뇌신경세포의 구조적 퇴화에 따른 신경세포의 손실에 일차적으로 기인한다.¹⁻³ 특히, 노인성 치매 환자의 뇌에서 글루타메이트의 대사나 수용체에 이상이

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

생기고, 뇌의 기억력 및 학습력을 관장하는 부위에 글루타메이트를 신경전달물질로 이용하는 신경이 많이 분포되어 있다고 알려지고 있어 치매의 발병에 글루타메이트성 신경이 깊이 관여하는 것으로 많은 학자들은 추정하고 있다.^{4, 6)} 글루타메이트는 흥분성 신경전달물질로 뇌의 원활한 기능 유지에 꼭 필요하나 일단 뇌가 손상을 입으면 신경세포 밖의 글루타메이트의 농도가 급속히 증가되어 신경세포의 괴사를 초래하는 것으로 알려져 이를 차단시키는 약물을 찾으려는 노력이 경주되고 있다.^{7, 10)} 이에 본 연구에서는 신경세포의 괴사기전을 밝히는데 이용되고 있는 흰쥐의 일차배양 신경세포를 천연물로부터 글루타메이트성 신경에 작용하는 물질의 검색에 처음으로 도입하여 그 효용을 밝혔으며, 아울러 이 방법보다 배양기술이 쉽고 경제적으로도 저렴한 일차배양 계배의 뇌신경세포를 글루타메이트에 의한 신경독성을 회복시키거나 경감시킬 수 있는 물질의 검색계로 확립하고자 하였다.

실험방법

흰쥐의 대뇌피질세포의 분리 및 배양¹¹⁾ - 흰쥐 태자의 대뇌를 적출하여 해부현미경을 이용하여 피질 부분만을 분리한 후 0.25% trypsin으로 30분간 처리하여 조직을 연화시킨 다음 개개의 세포 상태로 분리하였다. 분리한 신경세포 1 × 10⁶ cells/ml씩을 collagen으로 도포한 배양 용기(Corning, 15 × 24 mm)에 이식하였다. 배양액은 Dulbeco's modified eagle medium(DMEM) 90%, 소 태아 혈청 10%, penicillin 100 IU/ml과 streptomycin 100 µg/ml으로 구성된 것을 사용하였다. 세포의 배양은 일정한 습도를 유지하는 37°C 배양기에서 공기(95%)와 CO₂(5%)의 혼합기체를 계속 공급시키면서 수행하였다.

계배의 뇌신경 세포의 배양¹²⁾ - 일령이 10일된 계배에서 뇌를 적출하여 Hank's balanced salt solution으로 세척한 후, 결합조직을 제거하고 0.15% trypsin으로 15분간 처리하여 조직을 연화시켜 세포 상태로 분리하였다. 분리한 세포를 collagen으로 도포한 배양용기(Corning, 15 × 24 mm)에 1 × 10⁶ cells/ml씩 이식하여 배양하였다. 배양액은 DMEM 85%, 말 혈청 10%, 계배 추출물 5%, penicillin 100 IU/ml과 streptomycin 100 µg/ml로 구성된 것을 사용하였다. 세포는 흰쥐의 대뇌피질세포와 동일한 조건 하에서 배

양하였다.

글루타메이트에 의한 세포독성 유발 - 분리한 뇌세포를 12일 동안 배양한 후 글루타메이트를 작용시켜 신경독성을 유발시켰다.

생약의 총 메탄올 추출물의 투여 - 생약의 총 메탄올 추출물을 증류수에 1 mg/ml의 농도로 용해시킨 다음 한외여과막(0.22 µm, Millex-GV, U.S.A.)을 통과시켜 무균상태로 만든 후 농도를 달리하여 배양 중인 신경세포에 투여하였다.

Lactate dehydrogenase의 정량¹³⁾ - 일차배양한 뇌신경세포에 5% Triton X-100을 가하여 세포 내에 남아있는 LDH를 유리시킨 후 LDH 정량 kit을 이용하여 정량하였다.

통계처리 - 통계적 유의성 검토는 대조치로부터의 변동을 "one way ANOVA" test로 하였으며 p값이 5% 미만일 때는 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

신경계에 작용하는 새로운 약물을 개발할 수 있는 적

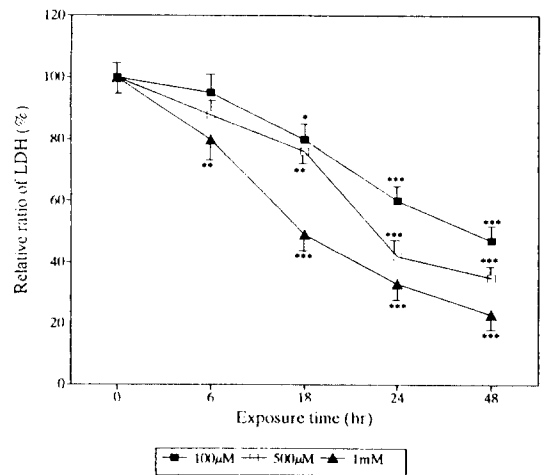


Fig. 1 - Time-course and dose-response curves of glutamate-induced neurotoxicity in primary cultured rat cortical cells. After 12 days incubation, cortical cells were exposed to glutamate at the concentration ranging from 100 µM to 1 mM. LDH value was determined in cortical cells periodically. Differs significantly from the control: p < 0.05*, p < 0.01**, p < 0.001***

절한 실험 방법을 찾으려는 노력이 부단히 경주되고 있다. 이는 기존의 실험동물을 사용하는 연구법에는 한계가 있으며, *in vitro*에서 생화학적 변화를 간단히 측정하는 방법에 의존하기에는 신경계 질환의 발병기전이 복합적이어서 적절한 연구 수단이 될 수 없기 때문이다. 이에 본 연구에서는 신경세포의 연구에 이용되고 있는 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포를 이용하여 천연물에서부터 글루타메이트성 신경에 작용하는 물질을 검색하고 그 작용 기전을 연구할 수 있는 방법을 확립하고 더 나아가서 전문적인 배양기술이 필요없고 경제적인 면에서 보다 저렴한 방법을 개발하고자 하였다. 흰쥐의 태자로부터 대뇌피질세포를 분리하여 12일간 배양하여 글루타메이트성 신경의 수용체가 충분히 발현되도록 한 후¹⁴⁾ 글루타메이트 100 μ M, 500 μ M 및 1 mM을 각각 농도별로 투여하여 보았다. 글루타메이트를 배양한 대뇌피질세포에 작용시키면 이미 보고된 바와 같이^{11, 14)} 신경축색돌기의 굵기가 가늘어지며 분절되고 신경세포 자체도 팽윤되고 결국에는 터져 사멸되는 것을 현미경으로 관찰할 수 있었다. 이에 배양한 세포를 수집하여 세포 내의 LDH 값을 측정함으로써 글루타메이트로 인한 신경세포의 괴사 정도를 알아보았다(Fig. 1). LDH는 세포 내에 존재하는 효소로서 세포막이 파괴되어 사멸될 때 세포 밖으로 유리된다. 글루타메이트에 의해 배양세포 내의 LDH 값이 감소되면 글루타메이트가 수용체에 결합하여 글루타메이트성 신경세포의 괴사를 초래한 것으로 추정할 수 있겠다. 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포에 100 μ M의 글루타메이트를 작용시켰을

때는 24시간 정도 후에 세포 내에 존재하는 LDH 값이 감소되었으나 500 μ M로 농도를 증가시키면 30분 이내에 신경축색돌기가 분절되고 세포가 팽윤되어 괴사되는 것을 현미경으로 관찰할 수 있었다. 그러나 배양세포 내의 LDH 값은 글루타메이트를 작용시킨 후 6시간 이후에나 유의성 있는 감소를 인지할 수 있었다. 이는 글루타메이트에 의한 독성은 즉각적으로 발현되나 대조군과 비교하여 유의성 있는 LDH의 감소를 인지하기에 필요한 시간으로 생각된다. 이상의 결과로 글루타메이트로

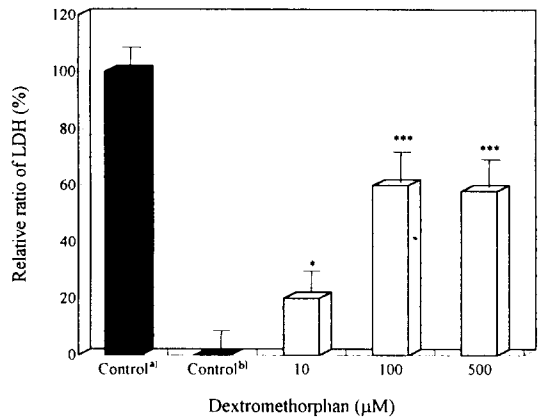


Fig. 2 — The effect of dextromethorphan on glutamate-induced neurotoxicity in primary cultured rat cortical cells.
 Control^a: normal rat cortical cells
 Control^b: rat cortical cells exposed to glutamate
 Differs significantly from the control: p < 0.05*, p < 0.001***.

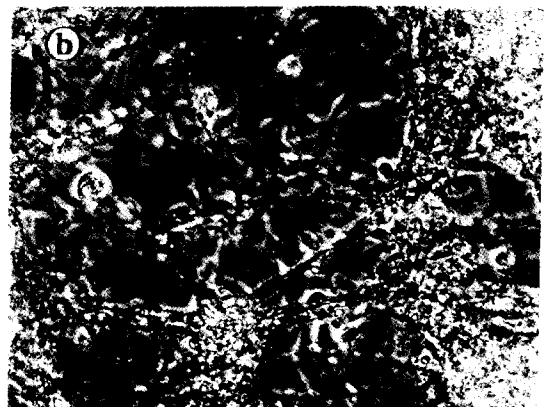
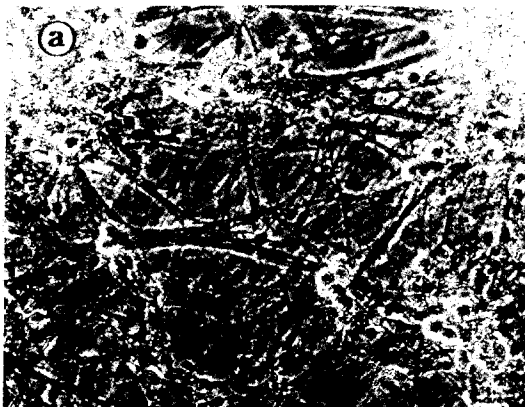


Fig. 3 — Primary cultures of chicken embryonic brain cells.

A. 12-day-cultured chicken embryonic brain cells

B. The effect of 24 hr-treatment of 500 μ M glutamate on 12-day-cultured chicken embryonic brain cells.

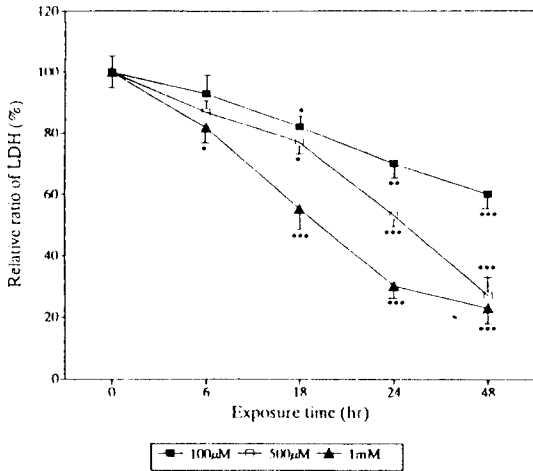


Fig. 4 — Time-course and dose-responses curve of glutamate-induced neurotoxicity in primary cultured chicken embryonic brain cells. The experimental protocol was same as in Fig. 2. Differs significantly from the control: $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$.

신경세포의 괴사를 유발시키면서 이를 차단하는 물질을 찾거나 그 작용기전을 연구하기에는 글루타메이트 100 μM을 신경세포에 24시간 작용시켜 서서히 독성을 유발시키는 방법이 500 μM 이상의 농도에서 급성독성을 유발시키는 방법보다 적절하다고 판단된다. 이 실험 모델의 글루타메이트에 의한 신경독성을 차단시키거나 약화시킬 수 있는 물질을 찾는 방법으로서의 타당성 여부는 글루타메이트 수용체의 길항제가 신경독성을 차단시키는 것을 입증함으로써 검토하였다. 배양한 흰쥐의 대뇌피질세포에 글루타메이트 수용체의 길항제로 알려진 dextromethorphan¹⁵⁾ 100 μM을 글루타메이트를 작용시키기 2시간 전에 투여하였을 경우 신경세포의 괴사는 60%까지 차단되었다(Fig. 2). Dextromethorphan은 Ca²⁺ channel 차단제로 글루타메이트 수용체인 N-methyl-D-aspartate, quisqualate, kainate 및 metabotropic 수용체들이 직접적이던, 간접적이던 간에 이온 channel들과 연결되어 있음을 감안할 때¹⁶⁾ 이러한 결과는 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포에 과량의 글루타메이트를 작용시켜 인위적으로 신경독성을 유발시키고 이를 약화시키거나 차단시키는 물질을 찾으려는 본 실험 모델이 글루타메이트성 신경에 작용하는 물질을 찾을 수 있는 타당한 방법임을 입증한다고 하겠다.

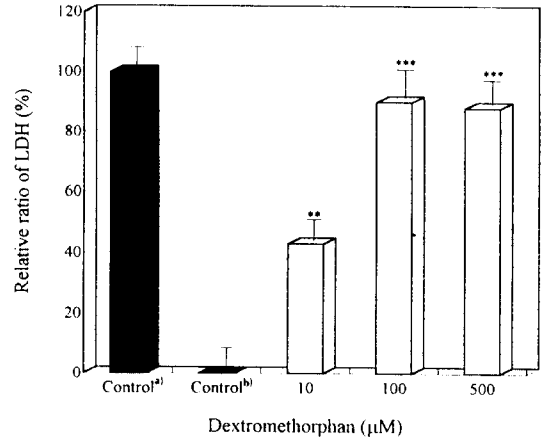


Fig. 5 — The effect of dextromethorphan on glutamate-induced neurotoxicity in primary cultured chicken embryonic brain cells. Control^(a): normal chicken embryonic brain cells. Control^(b): chicken embryonic brain cells exposed to glutamate. Differs significantly from the control: $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$.

그러나 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포를 이용하는 이 실험 모델은 고도의 전문기술을 요하며 경제적인 면에서도 검색법으로는 고가인 점이 단점이라고 할 수 있다. 이에 흰쥐 대신 계배를 이용하는 방법을 강구하여 보았다. 계배의 뇌신경세포를 글루타메이트 수용체가 충분히 발현되도록 12일 동안 배양한 후에 글루타메이트를 100 μM, 500 μM 및 1 mM 각각 농도별로 작용시켜 보았다(Figs. 3 and 4). 일차배양한 계배의 뇌신경세포에 글루타메이트를 작용시켰을 경우에도 글루타메이트에 의하여 독성이 유발되었다. 그러나 100 μM의 농도에서 흰쥐의 대뇌피질세포에서와 동일한 정도의 독성을 유발시키려면 작용시간을 24시간에서 42시간으로 연장시켜야 되었다. 일차배양한 신경세포에 인위적으로 괴사를 유도시키기에 42시간은 비교적 긴 시간이므로¹⁷⁾ 검색조건으로 적합하지 않은 것으로 생각된다. 따라서 글루타메이트의 농도를 500 μM로 증가시키면 24시간만 작용시켜도 신경세포를 현저하게 괴사시키므로 계배의 뇌신경세포에 글루타메이트에 의한 독성을 유발시키기 위한 조건으로는 500 μM의 글루타메이트를 24시간 작용시키는 것이 더 적합하다고 생각된다. 계배의 뇌신경세포를 이용하는 이 실험 모델의 타당성을 검토하기 위하여 역시 dextromethorphan을 선택하여 글루타메이트를 투여하기 2시간 전에 미리 작

Table I— Effects of methanol extracts of several crude drugs on glutamate-induced neurotoxicity in cultured chicken embryonic brain cells.

| Samples | Concentration (μg/ml) | Relative ratio of LDH(%) |
|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Control ^f | | 100.0 |
| Control ^g | | 0.0 |
| Polygalae Radix | 10 | 12.7* |
| | 50 | 0.8 |
| | 100 | -12.4 |
| Anemarrhenae Rhizoma | 10 | 34.5** |
| | 50 | 26.7** |
| | 100 | 7.4 |
| Pinelliae Tuber | 10 | 48.0*** |
| | 50 | 29.0** |
| | 100 | 3.3 |
| Acori graminei Rhizoma | 10 | 34.5*** |
| | 50 | 30.7** |
| | 100 | 18.2** |
| Corydalis Tuber | 10 | 11.4* |
| | 50 | 2.5 |
| | 100 | -27.4 |
| Magnoliae Cortex | 10 | 2.6 |
| | 50 | 3.8 |
| | 100 | 3.5 |
| Evodiae Fructus | 10 | 12.7* |
| | 50 | 20.1** |
| | 100 | 18.8** |
| Schizandrae Fructus | 10 | 27.9** |
| | 50 | 40.3*** |
| | 100 | 37.2*** |

Control^f is the value for primary cultured chicken embryonic brain cells. LDH value: 1976.8 ± 10.6 Unit/ml.

Control^g is the value for primary cultured chicken embryonic brain cells exposed to glutamate. LDH value: 1109.3 ± 31.8 Unit/ml.

Differs significantly from the control: p < 0.05*, P < 0.01**, P < 0.001***.

용시켜 글루타메이트에 의한 신경세포의 피사를 차단시키는 가를 알아보았다. 배양한 계배의 뇌신경세포에 미리 100 μM의 dextromethorphan을 작용시키면 흰쥐의 대뇌피질세포에서와 마찬가지로 글루타메이트로 인한 신경세포의 피사를 차단시켜 정상상태 때의 LDH 값의 90% 수준까지 유지시켰다(Fig. 5). 계배의 뇌신경세포에 존재하는 글루타메이트성 수용체는 흰쥐의 대뇌피질세포에서보다 Ca²⁺ channel에 직접 작용하는 수용체의 수가 많은 것으로 일단은 생각되나 이를 뒷받침하는 연구가 뒤따라야 할 것이다. 또한 본 연구결과로 배양기술이 훨씬 간편하고 저렴한 비용이 드는 계배의 뇌신경세포를 흰쥐의 대뇌피질세포를 대체하여 글루타

메이트에 의한 신경독성을 차단시키는 물질을 찾는 실험모델로 정착시킬 수 있겠다.

이에 이 실험모델을 이용하여 글루타메이트에 의한 신경세포의 피사를 차단시키는 활성을 갖는 물질을 찾기 위하여 수종의 생약을 대상으로 그 활성을 검색하여 보았다(Table I). 검색 대상 생약 중에서 지모, 반하, 오미자, 창포 등의 메탄올 추출물은 글루타메이트에 의한 신경세포의 피사를 유의성 있게 차단시키는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 일차배양한 계배의 뇌신경세포를 이용한 본 실험모델을 이용하여 천연물로부터 글루타메이트성 신경에 효능 작용이나 길항작용을 하는 물질을 찾을 수 있을 것으로 기대된다.

결론

1. 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포와 계배의 뇌신경세포에 100 μM과 500 μM의 글루타메이트를 각각 24시간 동안 작용시키면 신경독성이 유발되어 신경세포가 사멸되었다.

2. 이러한 신경세포의 독성은 Ca²⁺ channel 차단제인 dextromethorphan을 글루타메이트를 작용시키기 전에 미리 작용시키면 유의성 있게 차단되었다.

3. 천연물에서부터 글루타메이트성 신경에 작용하는 물질을 검색하고 그 작용 기전을 연구할 수 있는 방법으로는 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포보다는 배양기술이 용이하고 경제적인 일차배양한 계배의 뇌신경세포를 이용하는 것이 더 적합하다고 생각된다.

감사의 말씀

본 연구에 소요된 경비는 교육부 지원 한국학술진흥재단의 94년도 자유공모과제 (과제번호: 01 F 0119) 학술연구조성비로 충당된 것으로 이 연구비 지원에 감사드립니다.

문헌

1. Webster, R. A. and Jordan, C. C.: *Neurotransmitters, Drugs and Disease*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, p428 (1989).
2. Rossor, M. N., Iversen, L. L., Reynolds, G. P., Mountjoy, C. Q. and Roth, M.: *Neurochemical*

- characteristics of early and late onset types of Alzheimer's disease. *Clin. Res.* **288**, 961 (1984).
3. Lal, H., Kumar, B. and Froster, M. J.: Enhancement of learning and memory in mice by a benzodiazepine antagonist. *FASEB J.* **2**, 270 (1988).
 4. Cowburn, R., Hardy, J., Roberts, P. and Briggs, R.: Regional distribution of pre- and post-synaptic glutamatergic function in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **452**, 403 (1988).
 5. Chalmers, D. T., Dewar, D., Graham, D. I., Brooks, D. N. and McCulloch, J.: Differential alterations of cortical glutamatergic binding sites in senile dementia of the Alzheimer type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 1352 (1990).
 6. Izquierdo, I.: Role of NMDA receptors in memory. *TiPS.* **12**, 128 (1991).
 7. Frandsen, A., Drejer, J. and Schousboe, A.: Direct evidence that cytotoxicity in cultured neurons is mediated via N-methyl-D-aspartate (NMDA) as well as non-NMDA receptors. *J. Neurochem.* **53**, 297 (1989).
 8. Garthwaite, G. and Garthwaite, J.: *In vitro* neurotoxicity of excitatory acid analogues during cerebellar development. *J. Neurosci.* **17**, 755 (1986).
 9. Hajós, F., Garthwaite, G. and Garthwaite, J.: Reversible and irreversible neuronal damage caused by excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neurosci.* **18**, 417 (1986).
 10. Kauppsen, R. A., McMahon, H. T. and Nicholls, D. G.: Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca^{2+} concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: Possible relevance to hypoglycemia and anoxia. *Neurosci.* **27**, 175 (1988).
 11. Choi, D. W.: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.* **58**, 293 (1985).
 12. Kim, Y. C. and Kim, E. K.: Studies on the effect of ginseng extract on chicken embryonic nerve and muscle cells. *Yakhak Hoeji* **24**, 143 (1980).
 13. Choi, D. W. and Koh, J. Y.: Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Methods* **20**, 83 (1987).
 14. Choi, D. W.: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **623** (1988).
 15. Choi, D. W.: Dextrorphan and dextromethorphan attenuate glutamate neurotoxicity. *Brain Res.* **403**, 333 (1987).
 16. Monaghan, D. T., Bridges, R. J. and Cotman, C. W.: The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**, 365 (1989).
 17. Meldrum, B. and Garthwaite, J.: Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *TiPS.* **11**, 379 (1990).